

# Регистрация изотипического состава иммунных комплексов как новая диагностическая процедура

Ланда С.Б.<sup>1</sup>, Иванов А.В.<sup>2</sup>, Комличенко Е.В.<sup>2</sup>, Филатов М.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> — Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт» Гатчина, Россия; e-mail: fil\_53@mail.ru

<sup>2</sup> — Клиника Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия

*В работе предложен новый подход анализа циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), образующихся в гетерогенных биологических жидкостях. Метод основан на анализе вклада иммунных комплексов в светорассеяние, регистрируемое с помощью спектрометра динамического светорассеяния с гетеродинамической схемой измерения [4]. Предлагаемый подход способен регистрировать иммунные комплексы, образующиеся при добавлении антигена в концентрат, превышающей 50 пг в мл. Увеличение размера иммунных комплексов за счет их дальнейшей агрегации с помощью антител, специфичных для различных иммуноглобулинов человека позволяет определять изотипический состав и гетерогенность комплексов.*

**Ключевые слова:** динамическое светорассеяние, распределение частиц по размерам, циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК), изотипы иммуноглобулинов

## Введение

Многочисленные аллергические, аутоиммунные и инфекционные заболевания, сопровождаются появлением циркулирующих в плазме крови иммунных комплексов (ЦИК). Данные об их концентрации могут служить основой для прогноза развития патологии [1]. ЦИК, или комплексы антиген-антитело — макромолекулярные структуры, образующиеся в результате специфического взаимодействия антигенов с бивалентными и мультивалентными антителами. При их эквивалентных соотношениях или при умеренном избытке антигена формируются крупные молекулярные образования, состоящие из множества частиц антигена и молекул антител. Образование и удаление ЦИК представляет собой естественную часть иммунного ответа, обеспечивающее защитные потребности организма. В то же время, образование ЦИК может приводить к развитию патологических анафилактических реакций [1]. Выявление ЦИК, и идентификация антигенов в их составе — является актуальной проблемой, решение которой в дальнейшем будет способствовать развитию диагностических подходов и выработке стратегий лечения инфекций, аллергических и аутоиммунных заболеваний.

Существует значительное разнообразие методов регистрации иммунных комплексов, возникающих в плазме крови и других биологических жидкостях. Недостатком данных методов является значительная сложность в исполнении и большое количество преаналитических этапов, большое разнообразие и высокая стоимость расходных материалов, надежность анализа. Поэтому ВОЗ рекомендует использовать не менее двух тестов, которые основаны на различных иммунологических свойствах ЦИК [2]. К сожалению, все эти методы предполагают разделение макромолекулярных систем на компоненты. Необходимы поиски альтернативных путей исследования биологических агрегатов, позволяющих изучать структурно-функциональные особенности организации нативных комплексов.

Нам представляется, что наиболее перспективным методом для решения таких задач является метод динамического светорассеяния (ДСР), [3] позволяющий без внесения внешних возмущающих воздействий получать информацию о распределении частиц по размерам в поли-

дисперсных растворах, каковыми и являются биологические жидкости [4]. Уникальность метода ДСР заключается в том, что он может регистрировать образование макромолекулярных комплексов в сложных биологических системах, не прибегая к фракционированию или каким либо другим процедурам, нарушающим нативные условия, в которых происходит образование комплексов и, таким образом, получать более достоверную информацию. Радикальное увеличение светорассеяния с увеличением линейных размеров макромолекулярных образований в сочетании с возможностью оценивать их реальные размеры, позволяет регистрировать и идентифицировать образование комплексов различными компонентами биологических жидкостей, даже когда возникающее их количество очень невелико. Ранее нами было показано, что обычно размер иммунных комплексов колеблется в среднем от 100 до 300 нм [6]. Более крупные комплексы размером до 1000 нм можно получить, используя специальные подходы. Более подробно на этом вопросе мы остановимся ниже.

В данной работе мы попытаемся продемонстрировать возможности ДСР для идентификации иммунных комплексов в плазме периферической крови.

## Материалы и методы

### Применяемые антигены

В качестве антигенов в данном исследовании мы применяли как стандартные аллергены производства ФГУП НПО «Микроген», Россия с исходной концентрацией 10000 PNU, чистые химические соединения (Например циклоцитрулин) в конечной концентрации 1 мкг/мл.

### Подготовка образцов крови для анализа методом ДСР

Для исследования использовали плазму крови, полученную в течение предшествующих суток путем стандартного взятия венозной крови у доноров. Забор крови проводили строго натощак. Получение плазмы крови осуществляли общепринятым методом [5]. В качестве антикоагулянта использовался гепарин в конечной концентрации 50 ед. на мл.

Плазма получалась путем удаления форменных элементов крови центрифугированием при 1500G в течение 15 мин. Супернатант отбирали и для осаждения тромбоцитов и продуктов распада клеточных элементов 1 мл центрифугировали 30 мин при 12000g. Затем образец разбавляли в 3 раза стандартным изотоничным фосфатным буфером (рН 7,2) с ионной силой, соответствующей ионной силе физиологического раствора (150 мМ NaCl), содержащим 10мМ ЭДТА. Непосредственно перед проведе-

нием измерений образцы фильтровали сначала через 0.22  $\mu$ M PVDF фильтр (Ref. № Millex-GV SLGV013SL) для префильтрации, а затем через 0.10  $\mu$ M Omnipore JV фильтр (Ref. № Millipore JWVP 01300).

Отфильтрованный образец делили на аликвоты объемом 0.18 мл по количеству исследуемых антигенов + 1 аликвота (без добавления антигена) в качестве контроля. К исследуемым аликвотам добавляли по 200 PNU мл антигена, тщательно перемешивали, и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре.

Измерения проводили на лазерном корреляционном спектрометре — «ПЛСС» производства «ООО ИНТОКС МЕД» (Регистрационное удостоверение на медицинское изделие МЗ РФ № РЗН 2014/1650 от 09 июня 2014 г.). Измерения и расчет размеров частиц в образцах биологических жидкостей проводили согласно методикам и программным продуктам, описанным ранее [7]. Результат измерений представляется в виде гистограммы распределения частиц по размерам (PSD), в которой ось абсцисс — шкала размеров в нанометрах, а по оси ординат отложен вклад в общее рассеяние образца частиц данного размера в процентах. При этом суммарное рассеяние всех частиц образца принимается за 100%. Для каждого образца измерения проводили не менее 3 раз, и данные, полученные в результате регуляризации, усредняли. Это позволило получить среднее и дисперсию размера и вклада в рассеяние для каждой фракции частиц, имеющих в измеряемом образце. О положительной реакции на антиген свидетельствовало отсутствие в исходной плазме частиц с Rh крупнее 100 нм, и появление таких частиц после воздействия антигена.

### Результаты и обсуждение

Как показали наши предыдущие исследования, гидродинамический радиус ИК лежит в диапазоне 100–250 нм [6]. Частицы такого размера легко могут быть зарегистрированы в плазме крови методом ДСР. Концентрационная чувствительность метода составляла порядка 50 пикограмм антигена/мл. Такого типа частицы могут быть удалены фильтрованием через фильтр с размером пор 100 нм, например 0.10  $\mu$ M Omnipore JV.

Если к фильтрованной плазме, в которой содержатся связывающие какой-либо антиген антитела, добавить небольшое количество данного антигена, то *de novo* произойдет образование ЦИК, содержащих данный антиген, и специфичные к нему иммуноглобулины. При этом, если молекулярный вес этого агента и его количество невысоки, то вносимый им самим вклад в динамическое рассеяние образцов плазмы крови будет пренебрежимо мал по сравнению с вкладом остальных частиц плазмы и никак не скажется на полученной гистограмме. Наиболее убедительно данное утверждение может быть проиллюстрировано на примере аллергической реакции организма на природные аллергены: пищевые, растительные, бытовые и т.д. Подобные реакции на уровне организма вызывают ряд широко известных симптомов, при наличии которых пациенту ставится диагноз аллергии на тот или иной антиген. Чаще всего для этого используется кожный скарификационный тест и определение титра свободно циркулирующего иммуноглобулина Е в плазме крови. С помощью динамического светорассеяния мы определили содержание ЦИК в плазме ряда пациентов с ярко выраженной аллергической реакцией на различные аллергены. Наиболее яркий пример описан ниже.

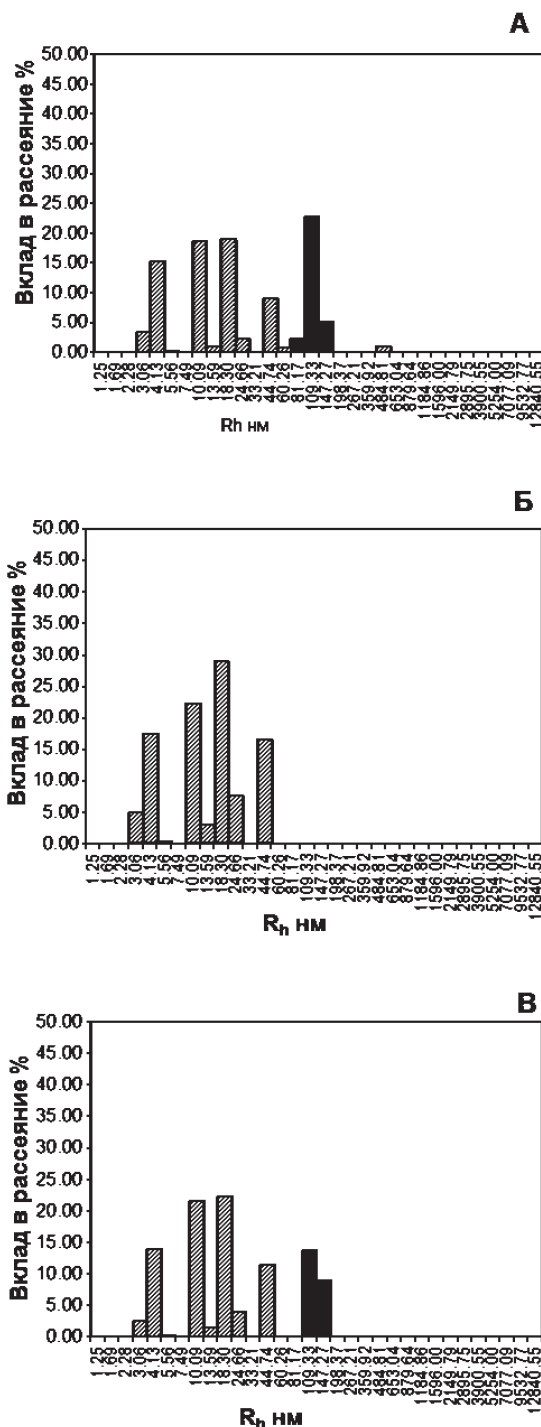


Рис. 1. Гистограммы распределения частиц по размерам исходной плазмы (А), плазмы, фильтрованной через фильтр 0.10  $\mu$ M Omnipore JV с диаметром пор 100 нм, (Б) и фильтрованной плазмы после добавления стандартного аллергена домашней пыли. По оси X — гидродинамический радиус частиц в нм, по оси Y — вклад в рассеяние в %.

Пациент Б. 52 года. Диагноз: аллергический риноконъюнктивит средней тяжести. Симптомы: отек слизистой носа, кашель, зуд. Скарификационный тест со стандартным аллергеном домашней пыли — положительный. Общий IgE — 560 кЕ/л.

Перед исследованием плазму крови пациента разводили в 3 раза изотоническим фосфатным буфером pH 7,2 с добавлением натриевой соли ЭДТА (10 mM) и фильтровали через фильтр 0.10 μM Omnipore JV с диаметром пор 100 нм. Данная процедура позволяла убрать все частицы с R<sub>h</sub> более 50 нм, в том числе и крупные иммунные комплексы. Измерения проводили по стандартной процедуре. Как видно рис. 1, на котором приведены гистограммы распределения частиц по размерам (PSD) число таких частиц падает с 30 % в исходном образце плазмы (рис. 1 А) до нуля (рис. 1 Б). Добавление к 0.2 мл образца 200 единиц PNU стандартного аллергена домашней пыли вызывает образование крупных иммунных комплексов с R<sub>h</sub> более 100 нм, вклад в рассеяние которых составляет более 20%. (рис. 1 В). На данном основании может быть подтверждено наличие у пациента аллергии на домашнюю пыль.

Приведенный пример не является единственным. В табл. 1 приведены данные исследований образования ЦИК у 25 чел., 15 из которых страдают тем или иным видом аллергии, а 10 обозначены нами как здоровые. Это не значит, что данные пациенты не страдают теми или иными заболеваниями, а означает только то, что у них в анамнезе отсутствует диагноз аллергии. Мы исследовали процесс образования ЦИК в плазме крови данных пациентов (строки таблицы) на 4 пищевых, 2 растительных и 5 бытовых аллергенов (столбцы таблицы). В ячейках таблицы приведены величины вклада в рассеяние частиц с R<sub>h</sub> от 70 до 500 нм. Если данные в ячейке таблицы отсутствуют, значит исследование реакции на данный аллерген у данного пациента не проводилось.

Как видно из данных таблицы, у пациентов с выраженной аллергией наблюдается образование иммунных комплексов в ответ на действие одного или нескольких исследованных аллергенов. Выраженность реакции организма пациента на тот или иной аллерген может сильно варьировать. (По приведенным в таблице данным вклад ЦИК в рассеяние может колебаться от 0% до 25%). Эмпирически выраженную реакцию мы определяем, когда

Таблица 1

**Образование иммунных комплексов в плазме пациентов с различными аллергиями и без выраженных аллергических реакций в ответ на добавление некоторых широко распространенных аллергенов в концентрации 200 PNU/мл**

	ID	Пищевые				Растительные		Бытовые				
		Говядина	Свинина	Цельное яйцо	Микс цитрусовые	Микс пыльцы деревьев	Пыльца амброзии	Шерсть кошки	Шерсть собаки	Перо подушек	Домашняя пыль	ДСП
Аллергии	A-1	2,9	6,3	5,1	16,6		2,3	9,8		2,4	0,0	8,0
	A-2					10,2		4,3	2,3	4,4	3,9	5,0
	A-3							7,4	8,4			
	A-4								7,9			
	A-5										16,3	
	A-6					9,2		6,3			4,5	
	A-7						12,4					14,4
	A-8					25,0						
	A-9					11,9						
	A-10								8,3		7,1	
	A-11	0,0	0,0	0,0	0,0	7,8	5,5	1,3		0,0	1,4	1,1
	A-12						0,0	0,4		1,2	6,4	1,9
	A-13										7,7	
	A-14	0,0	0,0	8,1	0,0	11,8		1,7	3,0	8,0	2,8	1,4
	A-15	0		1,2	1,2	0	0	1,3	0	0,7	3,4	0
Здоровые	З-1	0,0	0,0	0,0	0,0							
	З-2							0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	З-3						0,0	0,0	0,0		0,0	
	З-4	0,0	0,0	0,0	0,0							
	З-5						0,0					
	З-6						0,0					
	З-7	0,0	0,0	0,0	0,0			0,0			0,0	0,0
	З-8						0,0					
	З-9						0,0	0,0	0,0		0,0	
	З-10							0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

вклад в рассеяние данных частиц превышает 5%. Отрицательная реакция на аллерген — полное отсутствие образования ЦИК при добавлении в плазму аллергена (вклад в рассеяние 0%). В случае, если вклад в рассеяние ЦИК составляет менее 5% (но не 0%) реакция считается слабой. Как видно из приведенных в таблице данных у всех пациентов с аллергическими расстройствами имеется как минимум один аллерген, вызывающий выраженную реакцию. В то же время у условно здоровых людей реакции образования иммунных комплексов на все исследованные аллергены никогда не наблюдается (даже слабой). Таким образом, мы показали, что метод динамического светорассеяния может быть использован для диагностики аллергий и скрининга наиболее значимых для данного пациента аллергенов.

В тех случаях, когда для конкретного заболевания известен маркерный антиген, как в случае ревматоидного артрита — циклоцитрулин он с успехом может быть использован в качестве инициатора образования ЦИК, специфичных для данной патологии. При этом информация об изотипическом составе данных ЦИК представляет зна-

чительный интерес для диагностики и контроля тяжести течения заболевания. Данное положение иллюстрируется следующим примером.

*Пациент К. 49 лет.* Диагноз — ревматоидный артрит. Целью исследования было зафиксировать изменения в изотипическом составе ИК на фоне проведения терапевтического лечения. В качестве стандартного антигена использовали раствор циклоцитрулина в конечной концентрации 1 мкг/мл. Образцы плазмы готовили как описано выше, с тем отличием, что кроме циклоцитрулина к образцам добавляли по 20 мкл моноклональных антител к человеческим иммуноглобулинам различных изотипов, как в чистом виде, так и в различных сочетаниях. В данном случае, в образцы фильтрованной плазмы с циклоцитрулином добавляли антитела к иммуноглобулинам IgG1, IgG3, IgG4, IgE и смеси антител к IgG1 и антител к IgG3, антител к IgG1 и антител к IgE, антител к IgG3 и антител к IgE.

На рис. 2 выборочно представлены только наиболее характерные варианты распределения частиц по размерам. Как видно из приведенных распределений в филь-

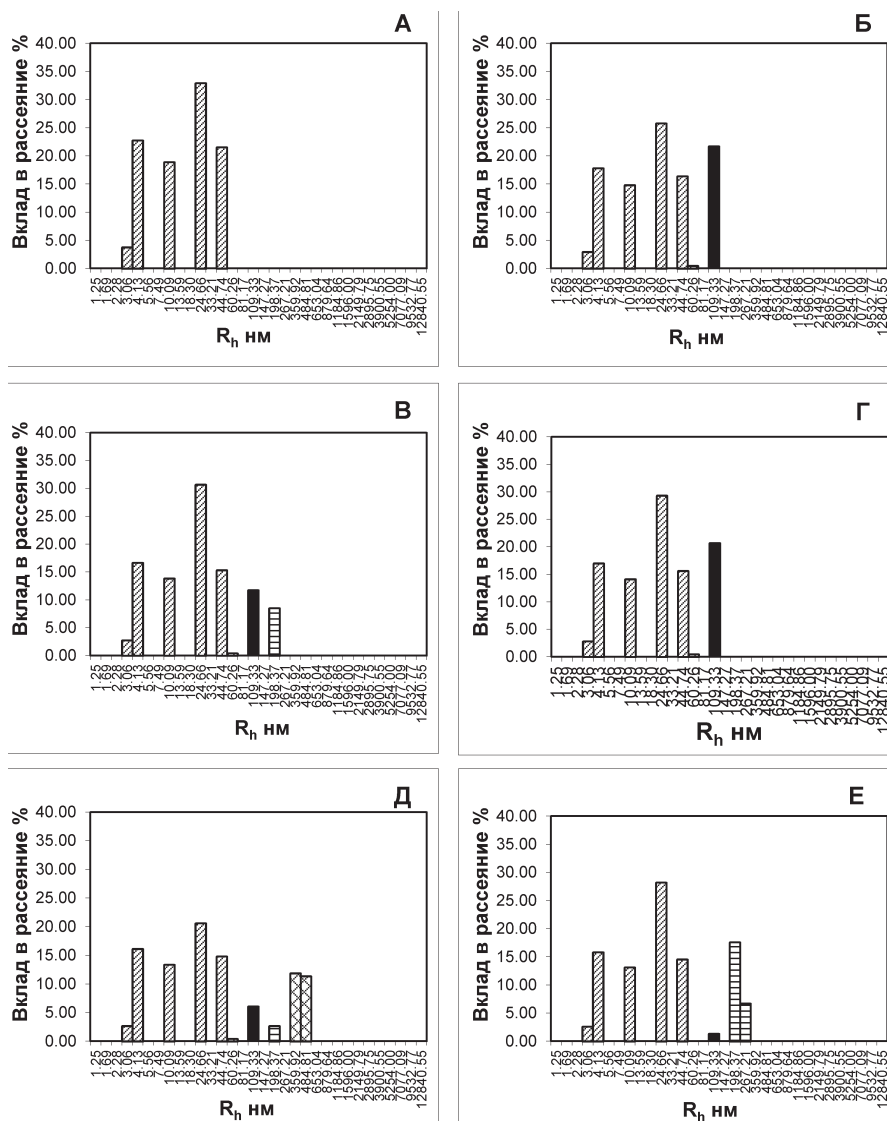


Рис. 2. Гистограммы распределения частиц по размерам фильтрованной плазмы (А), той же плазмы после добавления циклоцитрулина (Б), циклоцитрулина и антителами к IgG3 (В), циклоцитрулина и смеси антител к IgG1 и IgG3 (Г) и циклоцитрулина и смеси антител к IgG3 и IgE (Д). По оси X — гидродинамический радиус частиц в нм, по оси Y — вклад в рассеяние в %.



Изменение изотипического состава иммунных комплексов у пациента в процессе лечения

№	Образец	Вклад в рассеяние ИК, %				
		При поступлении	1 срок	2 срок	3 срок	4 срок
1	Исходная плазма	19,8	10,1	19,4	13,8	14,5
2	Фильтрованная плазма	0	0	0	0	0
3	Циклоцитрулин	9,4	5,8	13,0	11,4	7,8
4	Анти IgG1	0	0	0	4,5	7,6
5	Анти IgG2	—	—	—	—	—
6	Анти IgG3	9,3	5,6	12,2	8,6	4,2
7	Анти IgG4	0	0	0	0	0
8	Анти IgA	0	0	0	0	0
9	Анти IgE	0	0	3,4	3,6	2,8
10	Анти IgG1 + Анти IgG3	—	—	—	5,7 Мерааррр.	8,9 Мерааррр.
11	Анти IgG1 + Анти IgE	—	—	—	8,5 Аррр.	3,6 Мерааррр.
12	Анти IgG3 + Анти IgE	—	—	—	13,0 Аррр.	7,7 Аррр.

трованной плазме пациента отсутствуют частицы с  $R_h$  более 50 нм (рис. 2 А). После добавления к данной плазме циклоцитрулина происходит образование иммунных комплексов, о чем свидетельствует появление пика на гистограмме с  $R_h$  порядка 100 нм (рис. 2 Б — данный пик обозначен черным цветом). Если образовавшиеся иммунные комплексы содержат иммуноглобулины интересующего нас изотипа, (в данном конкретном случае IgG3 — рис. 2 В) на гистограмме появляется еще один пик с большим  $R_h$ , порядка 200 нм (горизонтальная штриховка пика). Вклад данных частиц в рассеяние позволяет примерно оценить долю иммуноглобулинов данного изотипа в общем пуле иммуноглобулинов. Однако эта оценка не может быть строго количественной в силу сильной нелинейности зависимости вклада в рассеяние частиц от их размера. В случае, если иммуноглобулины определенного изотипа (в данном конкретном случае IgG4) в иммунных комплексах отсутствуют нового пика на гистограмме не появляется (рис. 2 Г).

В случае использования смесей антител к различным иммуноглобулинам картина носит еще более сложный характер. Если иммунные комплексы гомогенны по своему составу, при добавлении смеси антител мы будем иметь картину, сходную с описанной выше (рис. 2 Е) Отличия от гистограммы на рис. 2 В заключаются в заметно большем вкладе в рассеяние крупных агрегатов, так как они образуются из иммунных комплексов, содержащих иммуноглобулины обоих изотипов. Если иммунные комплексы гетерогенны, и содержат иммуноглобулины обоих изотипов, происходит образование еще более крупных мега-агрегатов с  $R_h$  порядка 400 нм (рис. 2 Д) (крестообразная штриховка пика). В силу упомянутой выше нелинейности зависимости вклада в рассеяние от размера частиц, в данном случае мы можем только зафиксировать гетерогенность комплексов, но не можем ничего сказать о доле таких гетерогенных ИК в общем пуле. Пик с  $R_h$  порядка 100 нм в этом случае характеризует иммунные комплексы, не содержащие иммуноглобулины, антитела к которым добавлены в образец. После анализа данных по всем вариантам можно сделать заключение, что в данном конкретном случае, ЦИК, содержащие иммуноглобулины изотипов IgG3 и IgG1 образуют гетерогенные иммунные

комплексы, а иммунные комплексы, содержащие иммуноглобулин изотипа IgE — гомогенны. Содержание иммуноглобулинов остальных изотипов находится на уровне ошибки определения (вклад в рассеяние таких ЦИК менее 1%).

Мы проследили изменение изотипического состава иммунных комплексов у данного пациента в процессе лечения, которое проводилось в клинике СПбГУ. Изменение изотипического состава иммунных комплексов у данного пациента в процессе лечения представлено в табл. 2. Из данных таблицы видно, что изотипический состав ЦИК в процессе лечения претерпевает существенные изменения: если вначале (1 срок) картина не отличается от исходной и в плазме пациента содержатся иммунные комплексы образованные исключительно иммуноглобулинами типа IgG3, то начиная со 2 срока в составе иммунных комплексов появляются иммуноглобулины типа IgE. Начиная с 3 срока, в составе иммунных комплексов появляются иммуноглобулины типа IgG1, при этом он образует гетерогенные комплексы с иммуноглобулином IgG3. Комплексы, содержащие иммуноглобулин IgE остаются однородными. На последнем сроке иммуноглобулин IgG1 становится основным в составе иммунных комплексов.

Приведенные данные показывают, что метод динамического рассеяния с успехом может использоваться для обнаружения и исследования изотипического состава иммунных комплексов, образующихся в плазме крови под действием различных антигенов. На основании данного метода могут быть разработаны методы диагностики и контроля эффективности применяемых методов терапии различных аллергических расстройств и аутоиммунных заболеваний.

#### Список литературы

1. Ohyama K., Ueki Y., Kawakami A., Kishikawa N., Tamai M., Osaki M., Kamihira S., Nakashima K., Kuroda N. Immune complex analysis of serum and its application in screening for immune complex antigens in rheumatoid arthritis // J. Clin Chem. — 2011. — Vol. 57, № 6. — P. 905—599.
2. Lambert P.H., Dixon F.J., Zubler R.H., Agnello V., Cambiaso C., Casali P. et al. A WHO collaborative study for the evaluation of eighteen methods for detecting immune complexes in serum // J. Clin. Lab. Immunol. — 1978. — Vol. 1. — P. 1—15.

3. Cohen R.J., Benedek G.B. Immunoassay by light scattering spectroscopy // *Immunochemistry*. — 1975. — Vol. 12. — P. 349–351.

4. Lebedev A.D., Ivanova M.A., Lomakin A.V., Noskin V.A. Heterodyne quasi-elastic light-scattering instrument for biomedical diagnostic // *Appl. Opt.* — 1997. — Vol. 36. — P. 7518–7522.

5. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник / Под ред. В.В. Меньшикова. — М.: Медицина, 1987. — 368 с.

6. Кораблев П.В., Ланда С.Б., Семенова Е.В., Филатов М.В. Динамическое светорассеяние — простой и чувствительный метод, позволяющий определять появление иммунных комплексов в биологических жидкостях // *Биопрепараты*. — 2015. — Т. 54, № 2. — С. 53–58.

7. Ланда С.Б., Филатов М.В., Арутюнян А.В., Варфоломеева Е.В. Исследование образования мегамолекулярных комплексов в плазме крови методом лазерной корреляционной спектроскопии // *Клиническая лабораторная диагностика*. — 2008. — № 4. — С. 37–41.

Поступила 22.09.2015

### References

1. Ohyama K., Ueki Y., Kawakami A., Kishikawa N., Tamai M., Osaki M., Kamihira S., Nakashima K., Kuroda N. Immune comple-

xome analysis of serum and its application in screening for immune complex antigens in rheumatoid arthritis // *J. Clin. Chem.* — 2011. — Vol. 57, № 6. — P. 905–599.

2. Lambert P.H., Dixon F.J., Zubler R.H., Agnello V., Cambiaso C., Casali P. et al. A WHO collaborative study for the evaluation of eighteen methods for detecting immune complexes in serum // *J. Clin. Lab. Immunol.* — 1978. — Vol. 1. — P. 1–15.

3. Cohen R.J., Benedek G.B. Immunoassay by light scattering spectroscopy // *Immunochemistry*. — 1975. — Vol. 12. — P. 349–351.

4. Lebedev A.D., Ivanova M.A., Lomakin A.V., Noskin V.A. Heterodyne quasi-elastic light-scattering instrument for biomedical diagnostic // *Appl. Opt.* — 1997. — Vol. 36. — P. 7518–7522.

5. Laboratornie metody issledovaniya v klinike: spravochnik / V.V. Menshikov Ed. — M: Medicina. — 1987. — 368 p.

6. Korablev P.V., Landa S.B., Semenova E.V., Filatov M.V. Dynamic light scattering — a simple and sensitive method of determination immune complexes in biological liquids. // *Biopreparation (Biopharmaceuticals)*. — 2015. — Vol. 54, № 2. — P. 53–58.

7. Landa S.B., Filatov M.V., Arutiunian A.V., Varfolomeeva E.V. Study of plasma megamolecular complexation by laser correlation spectroscopy // *Klin Lab Diagn.* — 2008. — № 46. — P. 37–41.

Received 22.09.2015

## Registration of isotype composition of immune complexes as a new diagnostic procedure

Landa S.B.<sup>1</sup>, Ivanov A.V.<sup>2</sup>, Komlichenko E.V.<sup>2</sup>, Filatov M.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> — B.P. Konstantinov Peterburg Nuclear Physics Institute NRC «Kurchatov Institute» Gatchina, RF, e-mail: fil\_53@mail.ru

<sup>2</sup> — University Hospital of Sait-Petersburg State University Sait-Petersburg, RF

*In this paper we propose a new approach analysis of circulating immune complexes (CIC) formed in heterogeneous biological fluids. The method is based on an analysis of the contribution of immune complexes in light scattering that is logged by using dynamic light scattering spectrometer with heterodyne measurement scheme [4]. The proposed approach is capable of detecting immune complexes formed by the addition of the antigen in a concentration greater than 50 pg per ml. Increased immune complexes due to their size further aggregation using antibodies specific for the various human immunoglobulin isotype allows to determine the heterogeneity of the composition and complexes.*

**Key words:** *Dynamic light scattering, particle size distribution, circulating immune complexes, immunoglobulin isotypes*