

Способ определения циркулирующих иммунных комплексов

Шойбонов Б.Б.^{1,2,3}, Баронец В.Ю.^{2,3}, Панченко Л.Ф.^{1,2}, Кубатиев А.А.¹

¹ — Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

² — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный научный центр наркологии»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119002, г. Москва, М. Могильцевский пер., 3

³ — Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина»

Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

Разработан простой способ определения циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), основанный на их преципитации из сыворотки крови человека в специальном буфере, содержащем 10% полиэтиленгликоль с мол. массой 3350 (ПЭГ-3350). К сыворотке крови человека добавляют равный объем буфера, содержащего 10% ПЭГ-3350, инкубируют в течение 10 мин при комнатной температуре. Агрегированные ЦИК отделяют центрифугированием, растворяют в буфере без ПЭГ-3350 и определяют содержание общего уровня ЦИК либо спектрофотометрически при длинах волн 280 нм и 260 нм, либо определение белка в преципитате проводят по методу Лоури. Способ позволяет повысить точность количественного определения как общих (ЦИК_{общ}), так и комплемент-связывающих (ЦИК-1) и несвязывающих (ЦИК-2) циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови человека. Патогенность ЦИК рассчитывают как отношение ЦИК-1 к ЦИК-2.

Ключевые слова: циркулирующие иммунные комплексы, полиэтиленгликоль 3350, система комплемента, патогенность ЦИК

Введение

Проблема определения уровня ЦИК в сыворотке крови человека остается в настоящее время актуальной в связи с тем, что в лабораторной диагностике отсутствуют доступные, точные тест-системы для рутинных исследований, которые необходимы как для диагностики аутоиммунных, онкологических заболеваний, так и для контроля эффективности терапии.

Тесты определения ЦИК, используемые в клинической практике, основаны на:

1) преципитации ЦИК полиэтиленгликолем 6000 (ПЭГ-6000) [2];

2) взаимодействии ЦИК с комплементом (C1q-тест) [9];

3) определении ЦИК, связанных с C3b (Raji-клеточный тест, конглоитиновая проба) [20];

4) связывании ЦИК с аутоантителами, такими, как моноклональный ревматоидный фактор (mRF-тест) [21].

В сравнительных исследованиях ВОЗ [14] было показано, что не все тесты обладают достаточной чувствительностью и воспроизводимостью. Поэтому для более точного определения ЦИК ВОЗ рекомендует использовать не менее двух тестов, основанных на различных иммунологических свойствах иммунных комплексов. Комбинированное применение C1q- и mRF-тестов позволяет определять как комплемент фиксирующие, так и не связывающие комплемент иммунные комплексы различных размеров [21].

Коммерческие иммуноферментные тесты используют факторы комплемента или моноклональные антитела к ним (C1q, mC1q, C3d, mC3d), что делает их малодоступными для рутинных исследований.

Наиболее распространенным способом определения ЦИК является метод преципитации раствором ПЭГ-6000, который является одним из веществ, используемых для избирательной преципитации гликопротеинов из водных растворов [1]. Он также был использован для преципитации антител и искусственных антиген-антител комплексов из сыворотки [7]. Эти работы позволили использовать ПЭГ-6000 в тестах для определения ЦИК в сыворотках больных, страдающих различными заболеваниями [8]. Наличие ЦИК в ПЭГ-преципитатах было показано определением общего белка, радиальной иммунодиффузией IgG [5], IgM, IgA, C1q [22], C1 [15], C3 [13] или C4 [8], C1q с использованием радиоиммунного анализа [10, 16], а также измерением антикомплемента активности [6, 11].

Эти различные тесты отличаются экспериментальными условиями: сыворотка использовалась в области от 2% [15] до 83% [5, 13]; концентрация ПЭГ — от 2,5% [10] до 10% [7]. Большинство авторов предварительно инкубировали преципитационную пробу до центрифугирования от 1 часа [13] до 18 ч [7]. Также различались условия центрифугирования, а именно: 20 мин при 1000g и 4°C [7]; 10 мин при 1750g и 4°C [11]; 20 мин при 20000g и 4°C [13]; 15 мин при 15000g при 21°C [17].

Недостатками данных методов являются как противоречивость результатов, получаемых, в частности, при аутоиммунных заболеваниях [12], так и потребность в дорогостоящем оборудовании.

Целью настоящей работы является разработка простого, доступного способа количественного определения уровня ЦИК (общих, связывающих и не связывающих комплемент ЦИК) в сыворотке крови человека для рутинных исследований [3].

Материалы и методы

В работе исследовали сыворотки крови 15 здоровых доноров и 15 больных ишемической болезнью сердца. Забор крови осуществляли из локтевой вены после 14-часового голодания. Содержание общего холестерина (ОХС), триацилглицеридов (ТАГ) и общего белка в ПЭГ-преципитате сыворотки крови определяли с помощью наборов ЗАО «ЭКОлаб» (г.Электрогорск, МО, Россия).

В работе использовали веронал и мединал — фирмы «Seriva» (Германия), Трис — «Merck» (Германия), полиэтиленгликоль 3350 (ПЭГ-3350) «Sigma» (США), комплект морской свинки, консервированные эритроциты барана — ЗАО «ЭКОлаб», (г.Электрогорск, МО, Россия), остальные реактивы квалификации не ниже ч.д.а. — отечественного производства.

Приготовление нативных эритроцитов барана, эритроцитов барана, сенсibiliзировавшихся антителами кролика (ЕА), изотонического вероналового буфера, рН 7,4 (VBS), буфера, содержащего ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} (VBS²⁺) описано в работе [19].

Буфер-1 для преципитации циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) содержал: 10% полиэтиленгликоль с молекулярной массой 3350 (ПЭГ-3350) в 0,01М Трис-НСl-буфере, рН 7,4, содержащем 0,15 М NaCl. Буфер-2 для растворения преципитата ЦИК: 0,01М Трис-НСl-буфер, рН 7,4, содержащий 0,15 М NaCl.

Приготовление преципитата сыворотки крови при возрастающих концентрациях ПЭГ-3350. К 50 мкл пулированной сыворотки крови здоровых доноров добавляли от 25 до 200 мкл буфера-1, тщательно перемешивали и инкубировали 10 мин при комнатной температуре (50 мкл буфера-1 соответствуют 5% ПЭГ-3350). Образовавшиеся агрегаты ЦИК осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 3100g. Супернатант декантировали и осадок (ПЭГ-преципитат) растворяли в объеме буфера-2, равном исходному объему буфера-1 (в случае 5% ПЭГ-3350 объем равен 50 мкл).

Приготовление преципитата из сыворотки крови при условиях 5% ПЭГ-3350. К 50 мкл сыворотки крови больных ИБС или здоровых доноров добавляли 50 мкл буфера-1, тщательно перемешивали и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Образовавшийся преципитат осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 3100g. Супернатант тщательно декантировали и осадок (ПЭГ-преципитат) растворяли в 50 мкл буфера-2.

Приготовление эритроцитов барана, сенсibiliзировавшихся гетерофильными антителами человека (ЕАч). Предварительно определяли титр гетерофильных антител в сыворотках крови человека. Использовали инактивированную прогреванием при 56°C в течение 20 мин сыворотку крови человека с титром гетерофильных антител 1:512 для получения иммунного комплекса (эритроциты барана-антитела человека (ЕА_ч) в субагглютинирующей дозе). После 30 мин инкубации сформированный комплекс ЕА_ч отделяли центрифугированием, осадок 3 раза промывали 0,15 М раствором NaCl при центрифугировании и готовили 1% взвесь ЕА_ч.

Определение гемагглютинирующего титра антител барана к гетерофильным антителам в составе иммунного комплекса (ЕА_ч). Предварительно проводили титрование препарата антител барана к IgG человека в 96-луночных круглодонных иммунологических планках, затем добав-

ляли равный объем 1% суспензии ЕА_ч, тщательно перемешивали и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После инкубации определяли конечное разведение антител барана, при котором наблюдается полная гемагглютинация. Данное разведение антисыворотки принимали за 1 гемагглютинирующую единицу (ГАЕ). В нашем случае 1 гемагглютинирующей единицей было разведение 1:32400. Для реакции торможения гемагглютинации (РТГА) использовали препарат антител барана против IgG человека в разведении 1:8100 (4 ГАЕ).

Определение преципитации гетерофильных антител (ГА) из сыворотки крови человека при возрастающих концентрациях ПЭГ-3350. Реакцию гемагглютинации (РГА) ставили в стандартных пластиковых 96-луночных микропланках с круглодонными лунками. Во все лунки вносили по 40 мкл 0,15М раствора NaCl и готовили серии двукратных разведений ПЭГ-преципитатов. Затем вносили по 40 мкл стандартизированной суспензии эритроцитов барана ($1,5 \times 10^8$ кл/мл) и перемешивали содержимое лунок путем осторожного встряхивания панели в горизонтальной плоскости. Панель, прикрытую сверху стеклянной пластинкой, выдерживали 60 мин при 37°C. Результаты реакции учитывали визуально, определяли последнее разведение ПЭГ-преципитата, в котором еще произошла гемагглютинация. Контроль эритроцитов не содержал ПЭГ-преципитата.

Результаты и обсуждение

Определение холестерина, триглицеридов и общих белков в ПЭГ-преципитатах, приготовленных при разных концентрациях ПЭГ-3350. В ПЭГ-преципитатах, приготовленных как описано в материалах и методах, после растворения в 50 мкл буфера-2 определяли содержание холестерина, триглицеридов, общего белка с использованием наборов реагентов фирмы ЗАО «ЭКОлаб» (г. Электрогорск, МО, Россия), а также содержание белка определяли спектрофотометрически при длинах волн 280 нм и 260 нм и рассчитывали по формуле:

$$\text{Концентрация белка (мг/мл)} = 1,55A_{280} - 0,76A_{260}.$$

Общий белок в ПЭГ-преципитате представлял собой общий пул циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК_{общ}), включающий как комплемент связывающие (ЦИК-1), так и не связывающие (ЦИК-2) иммунные комплексы. Полученные результаты представлены в табл. 1.

Определение содержания комплемент связывающих циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК-1) в ПЭГ-преципитатах. К 10 мкл растворов ПЭГ-преципитатов, разбавленных в соотношении 1:99 буфером VBS²⁺, добавляли 20 мкл раствора разбавленного комплемента морской свинки. Общий объем доводили до 0,3 мл буфером VBS²⁺ и инкубировали 20 мин при 37°C. После инкубации добавляли 200 мкл ЕА и повторно инкубировали 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 2,5 мл холодного раствора 0,15 М NaCl, центрифугировали и определяли величину лизиса эритроцитов по выходу гемоглобина в супернатант. Контрольная проба не содержала ПЭГ-преципитата. Пониженный гемолиз в опытных пробах по сравнению с контролем свидетельствовал о наличии связывания комплемента. Степень лизиса эритроцитов (У) определяли по формуле:

$$Y (\%) = [(X-R)/(H-R) \times 100],$$

где H, R и X — величины оптической плотности A_{412} в гемолитических системах контрольной пробы, в контроле спонтанного лизиса EA и в опытной пробе соответственно. Степень связывания комплемента (ССК) определяли по формуле:

$$ССК (\%) = 100 - Y.$$

Содержание ЦИК-1 в ПЭГ-преципитатах определяли по калибровочному графику, как описано в работе [4] и представлены в табл. 1.

Определение ЦИК, не связывающих комплемент (ЦИК-2). ЦИК-2 рассчитывали как разность содержанием белка в ПЭГ-преципитате (ЦИК_{общ}) и ЦИК-1. Полученные результаты представлены в табл. 1.

Из данных, представленных в табл. 1, видно, что при концентрации ПЭГ-3350 до 5,0% в системе не наблюдается агрегация и преципитация липопротеинов низкой (ЛПНП) и очень низкой плотности (ЛПОНП). Показателями преципитации ЛПНП и ЛПОНП в пробах являются наличие холестерина и триглицеридов в ПЭГ-преципитатах, полученных при концентрациях ПЭГ-3350 свыше 5% в пробе.

Таким образом, при концентрации 5% ПЭГ-3350 из пулированной сыворотки здоровых доноров наблюдается избирательная преципитация циркулирующих иммунных комплексов.

Определение содержания IgG в ПЭГ-преципитате, приготовленном в 5% ПЭГ-3350. Приготовление эритроцитов барана, сенсibilизированных гетерофильными антителами человека (EA_ч) и определение титра антител барана к IgG человека с использованием, приготовленного иммунного комплекса (EA_ч) подробно описано в материалах и методах. Для реакции торможения гемагглютинации (РТГА) использовали разведение 1:8100 (4 ГАЕ) препарата антител барана против IgG человека.

Проведение РТГА. Предварительно титровали преципитаты иммунных комплексов, разведенных 1:99, на 12 лунок в 96-луночных круглодонных иммунологических планках. В качестве стандарта использовали препарат IgG с исходной концентрацией 1 мг/мл. После титрования преципитатов и стандартного препарата IgG добавляли равный объем разбавленного раствора антител против IgG человека, содержащего 4 ГАЕ. Тщательно перемешивали и добавляли равный объем 1% суспензии иммунных комплексов (EA_ч), повторно перемешивали и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После инкубации определяли для каждой пробы лунку, где наблюдается торможение гемагглюти-

нации. Расчеты проводили с использованием данных по торможению гемагглютинации стандартным раствором IgG человека. Полученные данные представлены в табл. 1.

Из данных, представленных в табл. 1, следует, что РТГА выявляет IgG во всех пробах ПЭГ-преципитатов, причем наблюдается осаждение IgG в зависимости от концентрации ПЭГ-3350 в системе. Отсутствие роста комплемент связывающей активности ПЭГ-преципитатов при концентрации 6,7% ПЭГ-3350 в пробе свидетельствует об осаждении нативных (свободных, не связанных с антигеном) молекул IgG, которые не связывают комплемент морской свинки. Возрастание комплемент связывающей активности ПЭГ-преципитата, приготовленного в условиях от 5% до 6,7% ПЭГ-3350 в системе, возможно, связано с преципитацией иммунных комплексов, содержащих множественно модифицированные липопротеины низкой плотности, о чем свидетельствуют холестерин и триглицериды в ПЭГ-преципитатах.

Для исключения преципитации нативных IgG в ПЭГ-преципитате, приготовленном в 5% ПЭГ-3350, проводили тест на гетерофильные антитела (ГА) по гемагглютинации эритроцитов барана. Данные по выявлению ГА в ПЭГ-преципитатах представлены в табл. 1.

Как видно из этих данных, нативные IgG (гетерофильные антитела) начинают преципитировать при концентрации ПЭГ-3350 от 6% и выше в пробе.

Определение ЦИК в 5% ПЭГ-преципитатах, приготовленных из сыворотки больных ИБС и здоровых доноров. В ПЭГ-преципитатах, приготовленных, как описано в материалах и методах, после растворения в 50 мкл буфера-2 определяли содержание общего белка с использованием набора «Общий белок» фирмы ЗАО «ЭКОлаб» (г.Электроргорск, МО, Россия), а также белок определяли в ПЭГ-преципитате спектрофотометрически при длинах волн 280 нм и 260 нм и рассчитывали по формуле, описанной выше. Общий белок в ПЭГ-преципитате представлял пул циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК_{общ}), включающие как комплемент-связывающие (ЦИК-1), так и не связывающие (ЦИК-2) иммунные комплексы. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Определение комплемент-связывающих циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК-1) в ПЭГ-преципитатах. Комплемент-связывающие циркулирующие иммунные комплексы определяли в тесте связывания комплемента, как описано выше. Данные содержания ЦИК-1 представлены в табл. 2.

Таблица 1

Содержание, холестерина, ТАГ, ЦИК_{общ}, ЦИК-1 и ЦИК-2, IgG и гетерофильных антител (ГА) в ПЭГ-преципитатах, приготовленных из пулированной сыворотки крови здоровых доноров в зависимости от концентрации ПЭГ-3350

Концентрация ПЭГ-3350, %	3,3	5,0	6,0	6,7	7,1	7,5	8,0
Холестерин, мг/дл	0	0	3	6	21	42	60
ТАГ, мг/дл	0	0	6	15	31	52	76
ЦИК, мг/мл	0,3	0,5	2,0	4,0	5,0	6,0	8,0
ЦИК-1, мг/мл	0,13	0,36	1,23	3,52	3,86	3,86	3,89
ЦИК-2, мг/мл	0,17	0,14	0,77	0,48	1,14	2,14	4,11
IgG мг/мл	0,06	0,12	0,24	0,48	0,96	1,92	3,84
Титр ГА (1:....)	0	0	4	8	16	32	64

Определение ЦИК не связывающих комплемент (ЦИК-2). ЦИК-2 рассчитывали как разность между ЦИК_{общ} и ЦИК-1. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, в группе здоровых доноров средний уровень ЦИК_{общ} составил $0,80 \pm 0,12$ мг белка в мл (Биуретовый метод) и $0,72 \pm 0,13$ мг/мл (спектрофотометрическое определение $A_{280/260}$), колебания составили от 0,53 до 1,04 мг/мл. Разница между двумя методами составила 10%. Средний уровень ЦИК_{общ} у больных ИБС составил $2,13 \pm 0,68$ мг/мл и $2,14 \pm 0,76$ мг/мл, соответственно, при колебаниях от 1,4 до 3,54 мг/мл. Разница между средними уровнями ЦИК_{общ} у больных ИБС и здоровых доноров в зависимости от метода определения белка в ПЭГ-преципитате составила 2,7 раза. Более существенные сдвиги наблюдаются, если сравнивать отношение ЦИК-1 к ЦИК-2 у больных ИБС и здоровых доноров, которые составили 3,84 и 0,39 соответственно (разница в 9,8 раза). Увеличение доли ЦИК-1 в общем пуле ЦИК_{общ} у больных ИБС свидетельствует о высокой патогенности иммунных комплексов. Для выявления природы патогенности иммунных комплексов у больных ИБС был проведен их анализ.

Определение холестерина, триглицеридов, ЦИК_{общ}, ЦИК-1, ЦИК-2 в ПЭГ-преципитатах, приготовленных из

пулированной сыворотки больных ИБС при возрастающих концентрациях ПЭГ-3350. Эксперименты проводили аналогично с контрольной группой, как описано выше. Результаты анализа представлены в табл. 3.

Из пулированной сыворотки больных ИБС при концентрации 5% ПЭГ-3350 начинают преципитировать модифицированные липопротеины низкой плотности, обладающие комплемент-связывающими свойствами. Увеличение концентрации ПЭГ-3350 выше 5% приводит к преципитации преимущественно нативных липопротеинов низкой плотности. Об этом свидетельствует постоянный уровень ЦИК-1 с 6% и выше ПЭГ-3350 при возрастании уровня холестерина и триглицеридов в преципитате. При концентрации 5% ПЭГ-3350 в системе из сыворотки больных ИБС преципитируют циркулирующие иммунные комплексы, содержащие множественно модифицированные липопротеины, которые связывают систему комплемента морской свинки.

В представленной работе с целью преципитации ЦИК использован нами впервые ПЭГ-3350 и показано, что полная агрегация ЦИК наблюдается в условиях 5% ПЭГ в преципитационной пробе в течение 10 мин и 23°C. Дальнейшая инкубация преципитационной пробы в течение 18 ч при 23°C практически не влияет на уровень определения ЦИК. Полученные данные о влиянии хранения сыво-

Таблица 2

Содержания циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови доноров и больных ИБС

Доноры	ЦИК _{общ} (Биуретовый метод), мг/мл	ЦИК _{общ} $A_{280/260}$, мг/мл	ЦИК-1, мг/мл	ЦИК-2, мг/мл	Больные ИБС	ЦИК (Биуретовый метод), мг/мл	ЦИК $A_{280/260}$, мг/мл	ЦИК-1, мг/мл	ЦИК-2, мг/мл
1	0,66	0,704	0,2	0,504	1	2,28	2,12	1,5	0,62
2	0,83	0,704	0,21	0,493	2	1,58	2,01	1,24	0,77
3	0,83	0,825	0,13	0,695	3	1,58	2	1,62	0,38
4	1,04	0,887	0,19	0,697	4	1,4	1,12	0,99	0,13
5	0,91	823	0,12	0,603	5	1,87	1,85	1,62	0,23
6	0,75	0,704	0,22	0,484	6	3,54	2,38	1,58	0,8
7	0,75	0,529	0,14	0,389	7	1,83	1,95	1,65	0,3
8	0,91	0,882	0,46	0,422	8	2,52	2,77	1,8	0,97
9	0,79	0,707	0,1	0,607	9	1,91	1,65	1,44	0,21
10	0,87	0,88	0,54	0,34	10	2,96	3,37	2,53	0,74
11	0,87	0,709	0,17	0,539	11	1,83	1,59	1,57	0,02
12	0,72	0,7	0,24	0,46	12	1,83	2,01	1,62	0,39
13	0,53	0,42	0,12	0,3	13	1,5	1,24	1,04	0,2
14	0,72	0,65	0,1	0,55	14	3,45	4,03	3,8	0,23
15	0,8	0,68	0,11	0,57	15	1,91	1,96	1,42	0,54
M±m	$0,8 \pm 0,12$	$0,72 \pm 0,13$	$0,2 \pm 0,13$	$0,51 \pm 0,12$	M±m	$2,13 \pm 0,68$	$2,14 \pm 0,76$	$1,69 \pm 0,68$	$0,44 \pm 0,29$

Таблица 3

Содержание холестерина, ТАГ, ЦИК_{общ}, ЦИК-1 и ЦИК-2 в ПЭГ-преципитатах пулированной сыворотки крови больных ИБС в зависимости от концентрации ПЭГ-3350

Концентрация ПЭГ-3350, %	3,3	5,0	6,0	6,7	7,1	7,5	8,0
Холестерин, мг/дл	0	13,7	30,7	49,9	73,0	98,8	133,9
ТАГ, мг/дл	0	31,2	46,1	52,8	67,0	76,6	87,0
ЦИК _{общ} , мг/мл	2,5	3,2	10,6	12,2	12,6	12,9	12,9
ЦИК-1, мг/мл	0,13	2,15	3,69	3,73	3,82	2,92	3,0
ЦИК-2, мг/мл	1,37	1,05	6,91	8,47	8,78	9,98	9,9

ротки при 4°C в течение 7 суток свидетельствуют о незначительном возрастании ЦИК за счет иммунных комплексов, содержащих множественно модифицированные ЛПНП (данные не приведены).

С целью повышения чувствительности теста нами использована концентрация сыворотки, равная 50% в преципитационной пробе и для теста определения ЦИК использовали всего 50 мкл сыворотки крови человека. Для осаждения агрегированных ЦИК проводили центрифугирование в условиях 3100g и 23°C, т.е. при небольших оборотах. На данном этапе обязательным условием является поддержание постоянной температуры при центрифугировании.

С целью анализа ПЭГ-преципитата были определены:

- 1) наличие IgG в ТТГА;
- 2) отсутствие ЛПОНП и ЛПНП в ПЭГ-преципитатах, приготовленных из пулированной сыворотки крови здоровых доноров;
- 3) отсутствие свободных гетерофильных антител в тесте гемагглютинации с эритроцитами барана;
- 4) уровень ЦИК_{общ} определяли двумя независимыми тестами (Биуретовая реакция и спектрофотометрия A_{280/260});
- 5) определение уровня ЦИК-1 в тесте связывания комплемента морской свинки;
- 6) расчет ЦИК-2, как разность между ЦИК_{общ} и ЦИК-1;
- 7) патогенность ЦИК рассчитывали как отношение ЦИК-1 к ЦИК-2.

Таким образом, способ позволяет повысить точность количественного определения ЦИК в сыворотке крови. Доступность реагентов и простота теста определения патогенных ЦИК в лабораторной практике позволяет проводить углубленное исследование патогенеза хронических заболеваний, сопровождающихся повышенным уровнем ЦИК в крови. С другой стороны, определение уровней ЦИК-1 и ЦИК-2 позволит контролировать эффективность проводимой терапии при аутоиммунных и опухолевых заболеваниях.

Список литературы

1. Меньшиков В.В., Делеторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова. — М.: Медицина, 1987. — 368 с.
2. Фримель Г. Иммунологические методы. — М.: Медицина, 1987. — С. 120-128.
3. Шойбонов Б.Б., Борголов В.М., Баронец В.Ю. и др. Тест-система определения циркулирующих иммунных комплексов // Описание изобретения к патенту №2452962 от 10.06.2012 г. Бюл. №16.
4. Шойбонов Б.Б., Борголов В.М., Сониев В.М. и др. Модифицированный метод определения ЦИК в тесте связывания комплемента ПЭГ-преципитатом // Клиническая лабораторная диагностика. — 2007. — №5. — С. 29-35.

5. Barnett E.V., Chia D. Quantification of immunoglobulin G in serum and immune complexes isolated in polyethylene glycol // *Ann. Rheum. Dis.* — 1977. — Vol. 365. — P. 26.

6. Brandslund I., Siersted H.C., Jensenius J.C., Svenag S.-E. Detections and quantitation of immune complexes with a rapid polyethylene glycol precipitation complement consumption method (PEG-CC) // *Methods in Enzymology.* — 1981. — Vol. 74, Pt C. — P. 551-571.

7. Creighton W.D., Lambert P.H., Meischer P.A. Detection of antibodies and soluble antigen-antibody complexes by precipitation with polyethylene glycol // *J. Immunol.* — 1973. — Vol. 111. — P. 1219-1227.

8. Digeon M., Laver M., Riza J., Bach J.F. Detection of circulating immune complexes in human sera by simplified assays with polyethylene glycol // *J. Immunol. Meth.* — 1977. — Vol. 16. — P. 165-183.

9. Glikmann G., Svehag S.E. Detection and quantitation of circulating immune complexes by the C1q-protein A binding assay (C1q-PA-BA) // *Methods Enzymol.* — 1981. — Vol. 74. — P. 571-587.

10. Hach C.E., Erenberg-Belmer A.J.M., Hannema A.J. et al. Polyethylene glycol enhances the binding of C1q to circulating immune complexes // *J. Immunol. Meth.* — 1981. — Vol. 44. — P. 211-221.

11. Harkiss G.D., Brown D.L. Detection of immune complexes by a new assay, the polyethylene glycol precipitation-complement consumption test (PEG-CC) // *Clin. Exp. Immunol.* — 1979. — Vol. 36. — P. 117-129.

12. Klein M., Simonovitch K. The significance and limitation of current methods for detecting immune complexes // *J. Rheumatol.* — 1981. — Vol. 8. — P. 188-192.

13. Krapf F., Renger D., Schedel et al. A PEG-precipitation laser nephelometer technique for detection and characterization of circulating immune complexes in human sera // *J. Immunol. Meth.* — 1980. — Vol. 54. — P. 107-117.

14. Lambert P.H., Dixon F.J., Zubler R.H. et al. A WHO collaborative study for the evaluation of eighteen methods for detecting immune complexes in serum // *J. Clin. Lab. Immunol.* — 1978. — P. 1-15.

15. Mod A., Fust G., Hollan S. Characterization of circulating immune complexes by nephelometry in acute leukaemia // *Clin. Lab. Haematol.* — 1982. — Vol. 16, №4(2). — P. 139-147.

16. Mooney N.A., Hay F.C., Poulton T.A. A comparative study of complement components in polyethylene glycol precipitated immune complexes from patients with ovarian cancer and patients with rheumatoid arthritis // *Clin. Exp. Immunol.* — 1983. — Vol. 52. — P. 561-568.

17. Polson A., Potgieter G.H., Largier J.F. et al. The fractionation of protein mixtures by linear polymers of high molecular weight // *Biophys. Acta.* — 1964. — Vol. 82. — P. 463-472.

18. Report of IUIS/WHO working group. Use and abuse of laboratory tests in clinical immunology: critical considerations of eight widely used diagnostic procedures // *Clin. Exp. Immunol.* — 1981. — Vol. 46. — P. 662-674.

19. Shoibonov B.B., Osipov A.V., Kryukova E.V. et al. Oxiagin from the *Naja oxia* cobra venom is the first reprolysin inhibiting the classical pathway of complement // *Mol. Immunol.* — 2005. — Vol. 42. — P. 1141-1153.

20. Theofilopoulos A.N., Aduado M.T. Assays for the detection of complement-fixing immune complexes: Raji cells, conglutinin, and anti-C3 assays // Rose N.R., Friedman H., Fahey J.L., Eds. *Manual of clinical laboratory immunology.* — Washington D.C.: ASM, 1992. — P. 104-109.

21. Vanham G., Bloemmen F.J., Ceuppens J.L., Stevens E.A.M. Influence of complex size and antigen-antibody ratio on immune complex detection with monoclonal rheumatoid factor and C1q // *J. Clin. Lab. Immunol.* — 1984. — Vol. 15. — P. 63-68.

22. UCLA Conference Circulating immune complexes: their immunochemistry, detection and importance // *Ann. Int. Med.* — 1979. — Vol. 91. — P. 430-440.

Method for determining circulating immune complexes

Shoibonov B.B.^{1,2,3}, Baronets V.Yu.^{1,2}, Panchenko L.F.^{1,2}, Kubatiev A.A.¹

¹ – Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMS, Russia, 125315, Moscow, Baltiiskaya str., 8

² – National Research Center for Addictions Russian Ministry of Public Health, Moscow, Russia

³ – Anokhin Institute of Normal Physiology, RAMS, Moscow, Russia

There has been developed a simple method for determining circulating immune complexes (CIC), based on their precipitation from human serum in a special buffer containing 10% polyethylene glycol mol. weight 3350 (PEG-3350). We add human serum to an equal volume of buffer containing 10% PEG-3350, incubated for 10 min at room temperature. CIC aggregated by centrifugation, are dissolved in buffer without PEG-3350, and we determine the total level of the CIC or by spectrophotometry at 280 nm and 260 nm, or the determination of protein in the precipitate is performed according to the method of Lowry. The method improves the accuracy of the quantitative determination of both general (CICtot) and complement-binding (CIC-1) and non-binding (CIC-2) circulating immune complexes in human serum. Pathogenicity of the CIC is calculated as the ratio of the CIC-1 to CIC-2.

Key words: *circulating immune complexes, polyethylene glycol 3350, complement system, pathogenicity of the CIC*