

ИММУНОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ СВОБОДНЫХ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА

Самойлович М.П.^{1,3}, Грязева И.В.¹, Мазинг А.В.², Лапин С.В.²,
Климович В.Б.¹

¹ ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий», Санкт-Петербург, Россия

² ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский государственный университет, Россия

Резюме. Выявление свободных легких цепей (СЛЦ) иммуноглобулинов (Ig) и их соотношения (каппа/лямбда коэффициент) используют при диагностике и мониторинге миеломной болезни и других гаммапатий, первичного амилоидоза и рассеянного склероза. Разработанный ранее метод детекции СЛЦ, основанный на применении моноклональных антител (МКАТ) против криптоических и постоянно экспонируемых эпитопов СЛЦ, не обеспечивал выявления редких вариантов белков Бенс-Джонса лямбда-типа и значительной части свободных лямбда-цепей, экскретируемых с мочой. Для усовершенствования метода использовано новое МКАТ (1С8) изотипа IgG2b, которое связывает СЛЦ лямбда-типа, но не взаимодействует с целостными молекулами IgG, IgA и IgM. МКАТ распознает эпитоп лямбда цепей, который присутствует на антигене в циркулирующей крови здоровых доноров и пациентов с миеломной болезнью, не разрушается и не маскируется в процессе почечной фильтрации. Цель исследования состояла в определении основных характеристик новой системы и в оценке ее диагностических возможностей при выявлении моноклональных гаммапатий. В качестве калибраторов использованы смеси белков Бенс-Джонса каппа- или лямбда-типа, выделенных из мочи пациентов с миеломной болезнью. Предложенный метод позволяет выявлять в сыворотке и в моче СЛЦ каппа- и лямбда-типа в интервале концентраций от 1 до 100 нг/мл, что на три порядка превышает возможности метода Freelite, основанного на использовании поликлональных антител. Предложенный метод позволяет выявлять сопоставимые концентрации СЛЦ и вычислять коэффициент каппа/лямбда. Метод обеспечивает выявление в сыворотке и моче СЛЦ в присутствии 10-тысячекратного избытка целостных молекул IgG. Калибровочные графики для определения концентраций СЛЦ обоих типов имеют в логарифмической системе координат вид линейных зависимостей с одинаковым углом наклона. Порог детекции СЛЦ каппа- и лямбда-типа равен 5 и 3 нг/мл соответственно. В сыворотках крови здоровых доноров средние величины концентраций (M±SD) свободных каппа-цепей составили 6,7±2,1, в моче – 4,2±3,8 мкг/мл. Соответствующие значения для лямбда-цепей составили 4,7±1,96 и 1,6±1,0 мкг/мл. Величины коэффициентов каппа/лямбда в сыворотке крови и моче сопоставимы с данными, приводимыми в литературе. В сыворотках и моче пациентов с множественной миеломой выявлены моноклональные СЛЦ того же типа, что и парапротеин, обнаруженный в сыво-

Адрес для переписки:

Климович Владимир Борисович
ФГБУ «Российский научный центр радиологии
и хирургических технологий»
197136, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Гатчинская, 9, кв. 18.
Тел.: 8 (921) 954-44-87.
E-mail: vklimovich@gmail.com

Address for correspondence:

Klimovich Vladimir B.
Russian Research Center for Radiology and Surgical
Technologies, St. Petersburg, Russian Federation
197136, Russian Federation, St. Petersburg,
Gatchinskaya str. 9, apt 18.
Phone: 7 (921) 954-44-87.
E-mail: vklimovich@gmail.com

Образец цитирования:

М.П. Самойлович, И.В. Грязева, А.В. Мазинг, С.В. Лапин,
В.Б. Климович «Иммунометрический метод определения
концентраций свободных легких цепей иммуноглобулинов
человека» // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 4.
С. 385-394. doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-385-394

© Самойлович М.П. и соавт., 2016

For citation:

M.P. Samoylovich, I.V. Griazeva, A.V. Mazing, S.V. Lapin,
V.B. Klimovich "Immunometric assay to determine free light chain
concentrations of human immunoglobulins", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2016, Vol. 18, no. 4,
pp. 385-394. doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-385-394

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-4-385-394>

ротке крови с помощью электрофореза с последующей иммунофиксацией. Значения коэффициентов каппа/лямбда при этом соответствовали типу выявленной гаммапатии.

Ключевые слова: свободные легкие цепи, Ig, белки Бенс-Джонса, гаммапатии, иммуноферментный анализ, моноклональные антитела, сыворотка крови, моча

IMMUNOMETRIC ASSAY TO DETERMINE FREE LIGHT CHAIN CONCENTRATIONS OF HUMAN IMMUNOGLOBULINS

Samoylovich M.P.^{a,c}, Griazeva I.V.^a, Mazing A.V.^b, Lapin S.V.^b, Klimovich V.B.^a

^a Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg, Russian Federation

^b First I.P. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^c St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Detection of total free light chains (FLC) of immunoglobulins and their ratio (kappa/lambda quotient) are used in diagnostics and monitoring of multiple myeloma and other gammopathies, primary amyloidosis and multiple sclerosis. Previously described immunoassays with monoclonal antibodies (Mabs) against cryptic and constantly exposed epitopes of FLC failed to recognize rare variants of lambda Bence-Jones proteins and a significant proportion of lambda chains excreted with urine. Aiming to improve this approach, a novel murine Mab (IgG2b coded as 1C8) was employed, which specifically binds free lambda chains but doesn't interact with native IgA, IgG, and IgM. The novel Mab recognized an epitope exposed at free lambda chains in peripheral blood of healthy donors and patients with multiple myeloma. It is not destroyed or masked upon renal filtration.

The aim of this study was to determine basic features of improved assay system, and to estimate its potential in diagnostics of monoclonal gammopathies. The mixtures of three Bence-Jones proteins of either kappa- or lambda- types purified from the urine of multiple myeloma patients were used as calibrator samples.

Improved immunometric assay is able to detect free kappa and lambda chains in serum and urine at a scale of 1 to 100 ng/ml, thus being three orders more sensitive than, e.g., detection levels of Freelite method based on polyclonal antibodies.

A novel assay allows to detect free kappa and lambda chains at comparable levels in serum or urine, and to deduce kappa/lambda ratio. The proposed assay is able to detect FLC in 10,000-fold excess of whole IgG molecules. The calibrating plots for both antigens are linear on log-log scales, with very similar slopes. Detection thresholds for kappa or lambda chains proved to be 5 and 3 ng/ml, respectively. Mean concentrations of free kappa chains in sera of healthy donors were 6.7 ± 2.1 , in urine, 4.2 ± 3.8 mcg/ml. Mean concentrations of free lambda chains were 4.7 ± 1.96 , and 1.6 ± 1.0 mcg/ml, respectively. This method, if applied to serum and urine samples from multiple myeloma patients, revealed free light chains were similar to the paraproteins detected by means of electrophoresis/immunofixation. The values of kappa/lambda ratios corresponded to the types of gammopathies revealed.

Keywords: immunoglobulin, free light chains, Bence-Jones proteins, gammopathies, immunoenzyme assay, monoclonal antibodies, serum, urine

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (соглашение №16-15-00118).

Введение

Выявление в биологических жидкостях моно- или олигоклональных свободных легких цепей (СЛЦ) иммуноглобулинов (Ig) и их соотношения (каппа/лямбда коэффициент) используют при диагностике и мониторинге миеломной болезни и других гаммапатий [19, 13], первичного амило-

идоза [27] и рассеянного склероза [17, 25]. В последние годы рассматривается вопрос о целесообразности выявления поликлональных СЛЦ при воспалительных и аутоиммунных заболеваниях [8].

Молекулы СЛЦ несут антигенные детерминанты (эпитопы) двух категорий. Первые, экспонируемые постоянно, распознаются специфическими антителами независимо от того, входят ли легкие цепи в состав Ig или существуют в виде отдельных молекул. Эпитопы второго типа называют криптоическими, т.к. в полных молекулах

Ig они маскируются прилегающими участками тяжелых цепей [15, 21]. Наличие на антигене двух топографически удаленных эпитопов является предпосылкой создания иммунометрического метода детекции [14], который по уровню специфичности и чувствительности превосходит другие методы иммуноанализа. Применительно к детекции СЛЦ иммунометрический анализ [7] предполагает сочетанное использование двух антител, одно из которых, направленное к криптической детерминанте, адсорбировано на твердой фазе и служит для извлечения СЛЦ из пробы. Второе антитело, распознающее постоянно экспонируемый эпитоп, используют в виде меченого реагента для выявления образованного на твердой фазе иммунного комплекса. Преимущество иммунометрического метода состоит в высокой специфичности за счет одновременного распознавания двух эпитопов одной молекулы. Метод позволяет выявлять низкие концентрации СЛЦ вне зависимости от присутствия в пробе целостных молекул Ig.

На протяжении последних двух десятилетий было предпринято несколько попыток создания иммунометрических систем на основе моноклональных антител (МКАТ) против постоянно экспонируемых и криптических эпитопов СЛЦ [5, 20, 22]. Эффективность предложенных систем не достигала желаемого уровня. В частности, метод, предложенный американскими авторами [12], оказался чрезмерно трудоемким. Разработанная ранее система на основе МКАТ, созданных в лаборатории гибридной технологии [1], выявляла в сыворотках пациентов с миеломной болезнью не все встречающиеся варианты лямбда-цепей. Кроме того, концентрация лямбда-цепей, определяемая в моче, была на 2 порядка ниже уровня каппа-цепей, что исключало корректное определение коэффициента каппа/лямбда. Из этого следовало, что в первых опытах по созданию гибридом не удалось найти МКАТ к криптическому эпитопу лямбда-цепей, который присутствовал бы на подавляющем большинстве молекул этого типа и сохранялся бы на них в процессе почечной фильтрации. С подобной проблемой сталкивались и авторы аналогичных разработок [22].

В ходе попыток усовершенствовать предложенную ранее систему было получено новое МКАТ против криптического эпитопа лямбда-цепей, которое не связывало молекулы целостных Ig. На его основе был разработан метод детекции СЛЦ лямбда-типа, который, в сочетании с ранее предложенной методикой выявления СЛЦ каппа-типа, составил единую аналитическую систему определения концентраций СЛЦ в биологических жидкостях человека.

Цель настоящей работы состояла в определении основных параметров усовершенствованной системы и в оценке возможностей ее применения при оценке уровня СЛЦ у здоровых лиц и при диагностике моноклональных гаммапатий.

Материалы и методы

Образцы биологических жидкостей

В работе использованы образцы сывороток крови 30 здоровых доноров в возрасте от 25 до 73 лет. От 23 доноров были получены образцы утренней мочи. Были исследованы также 34 парных образца сыворотки крови и мочи пациентов с миеломной болезнью, у которых присутствие моноклональных Ig в крови и моче было установлено с помощью методов электрофореза и иммунофиксации с использованием реагентов и оборудования фирмы Helena Bioscience (Великобритания). До исследования все образцы хранили при -70°C .

При установлении специфичности полученных МКАТ были использованы образцы парапротеинов и белков Бенс-Джонса (ББД) от пациентов с миеломной болезнью из собранной в лаборатории коллекции. Изотипы парапротеинов и характеристики ББД были определены с помощью полученных в лаборатории МКАТ против тяжелых и легких цепей Ig человека [3].

Из мочи больных множественной миеломой ББД выделяли концентрированием с помощью ультрафильтрации с последующим осаждением сульфатом аммония при 75%-ном насыщении и ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-Сефацелом. Поликлональный IgG выделяли из глобулиновой фракции донорской плазмы также с помощью ионообменной хроматографии. Для освобождения от возможных примесей СЛЦ препарат дополнительно подвергли очистке на колонке с протеин G-сефарозой (GE Healthcare, США). Поликлональные легкие цепи получали фрагментированием очищенного IgG человека путем восстановления дисульфидных связей 2-меркаптоэтанолом, последующего алкилирования иодацетамидом и разделения легких и тяжелых цепей с помощью гель-хроматографии на Сефадексе G-75.

Поликлональные IgG, IgA и IgM получали из пула донорских сывороток с помощью аффинной хроматографии, используя протеин A-сефарозу (GE Healthcare, США) и иммуносорбенты на основе МКАТ против IgA, IgM [2] и четырех подклассов IgG [4]. При оценке специфичности выявления СЛЦ использовали коммерческие препараты IgG человека для внутривенного введения Пентаглобин (Октафарм, Германия) и Иммуновенин (Микроген, Россия).

Получение МКАТ против постоянно экспонируемых эпитопов каппа- (4G7) и лямбда-цепей (2G9), а также против криптоического эпитопа каппа-цепей (4C11) было описано ранее [1]. В качестве антигенов при иммунизации мышей, при отборе гибридом, продуцирующих МКАТ, а также при изучении специфичности МКАТ использовали ББД каппа- и лямбда-типа. В качестве отрицательных контролей применяли поликлональный IgG человека и препараты аффинно очищенных поликлональных IgA, IgM и IgG.

При создании новых штаммов гибридом-продуцентов МКАТ против криптоического эпитопа лямбда-цепей были использованы описанные ранее [1] методы. Отличие нового цикла получения МКАТ состояло в том, что иммуногеном служила смесь шести образцов ББД лямбда-типа, которые не взаимодействовали с полученным ранее МКАТ (3D12) против криптоического эпитопа лямбда-цепей. Перед введением животным смесь белков денатурировали нагреванием при 56 °С в 2М ацетатном буфере, рН = 4,9 [6]. При скрининге гибридом использовали нативные ББД лямбда-типа, которые не входили в состав иммунизирующей смеси. Второе отличие нового цикла создания гибридом состояло в том, что партнером при гибридизации с лимфоцитами служила клеточная линия мышинной плазмацитомы SP-2/0.

Тестирование надосадочных жидкостей из культур с гибридными клетками для выявления антител к лямбда-цепям проводили трижды, начиная с 10-го дня после слияния. При этом использовали два метода твердофазного иммуноферментного анализа. Первый из них заключался в иммобилизации на твердой фазе ББД или интактных Ig. Связанные с антигеном антитела выявляли с помощью меченных пероксидазой кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши. Во втором методе немеченые кроличьи антитела против Ig мыши адсорбировали на твердой фазе и использовали для захвата антител из культуральной среды, а для выявления связавшихся антител использовали меченные пероксидазой ББД лямбда-типа, IgG или IgA.

Культуры гибридных клеток искомой специфичности клонировали трижды методом лимитирующих разведений на фидерном слое из перитонеальных макрофагов. Затем гибридомы выращивали в массовых культурах и вводили внутрибрюшинно мышам, получившим за 7 дней до прививки инъекцию 0,5 мл пристана. Асцитические жидкости получали через 10-20 дней после инъекции клеток. Выделение МКАТ из асцитической жидкости осуществляли путем осаждения сульфатом аммония при 40%-ном насыщении с последующей аффинной хроматографией на протеин-G-сефарозе (GE Healthcare, США).

При разработке иммунометрических систем определения концентраций СЛЦ в лунки 96-луночных полистироловых планшетов (NUNC Maxisorp, Дания) вносили по 100 мкл растворов МКАТ (10 мкг/мл) против криптоических эпитопов свободных каппа- или лямбда-цепей (4C11 и 1C8 соответственно) в 0,1 М бикарбонатном буфере (рН = 9,5) и инкубировали при 4 °С в течение 18 часов. Затем промывали 3 раза фосфатно-солевым раствором (рН = 7,4), содержащим 0,1% Твин-20 (ФСР-Т). Вносили по 100 мкл образцов сыворотки, мочи или стандартных калибрующих растворов. Образцы сыворотки разводили ФСР-Т в соотношениях 1:50, 1:100 и 1:300, а образцы мочи – 1:10, 1:30 и 1:90. В качестве калибраторов использовали смеси из трех ББД лямбда- или каппа-типа, взятых в равных количествах. Для построения калибровочных графиков, определения чувствительности метода и подбора оптимальных концентраций калибрующих проб готовили стандартные разведения, содержащие от 1000 до 0,1 нг/мл ББД каппа- или лямбда-типа. Пробы инкубировали 1,5 часа при 37 °С, промывали 3 раза ФСР-Т и вносили растворы конъюгированных с пероксидазой МКАТ против постоянно экспонированных эпитопов каппа- или лямбда-цепей (4G7 или 2G9 соответственно) [1]. Инкубировали при 37 °С в течение 1 часа, промывали и вносили раствор тетраметилбензидина (Хема, Россия). Реакцию останавливали через 10 мин добавлением 50 мкл 1N H₂SO₄. Результаты регистрировали на планшетном фотометре при длине волны 450 нм.

Для определения метрологических характеристик системы каждую серию экспериментов выполняли в трех-десяти независимых повторях. При статистической обработке данных использовали стандартные возможности программного обеспечения "Microsoft Office". Вычисляли средние величины и стандартные отклонения. Уровень статистической значимости принимали равным менее 0,05.

Результаты

Эксперимент по гибридизации позволил получить 80 культур гибридных клеток, продуцирующих МКАТ против лямбда-цепей. Для дальнейшей работы был отобран штамм с кодовым обозначением 1C8. Синтезируемые этим штаммом МКАТ (изотип IgG2b) связывали все испытанные препараты ББД лямбда-типа и не проявляли перекрестной реактивности с целостными молекулами IgG, IgA и IgM (табл. 1). Поскольку новое МКАТ сохраняло высокую антиген-связывающую активность при иммобилизации на твер-

ТАБЛИЦА 1. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МКАТ ПРОТИВ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ С МИЕЛОМНЫМИ ПАРАПРОТЕИНАМИ, БЕЛКАМИ БЕНС-ДЖОНСА И ПОЛИКЛОНАЛЬНЫМИ ИММУНОГЛОБУЛИНАМИ

Миеломные белки и белки Бенс-Джонса*	Количество образцов, взаимодействующих с			
	МКАТ против каппа-цепи		МКАТ против лямбда-цепи	
	4G7**	4C11**	2G9**	1C8
IgG _κ (n = 15)	15	0	0	0
IgG _λ (n = 10)	0	0	10	0
IgM _κ (n = 2)	2	0	0	0
IgM _λ (n = 2)	0	0	2	0
IgA1 _κ (n = 8)	8	0	0	0
IgA1 _λ (n = 4)	0	0	4	0
IgA2 _κ (n = 1)	1	0	0	0
IgA2 _λ (n = 2)	0	0	2	0
IgD _κ (n = 1)	1	0	0	0
ББД _κ (n = 12)	12	12	0	0
ББД _λ (n = 11)		0	11	11
Поликлональные				
Легкие цепи (κ+λ)	+	+	+	+
IgG	+	–	+	–
IgA	+	–	+	–
IgM	+	–	+	–

Примечание. * – в скобках указано число испытанных образцов; ** – по данным публикации [1].

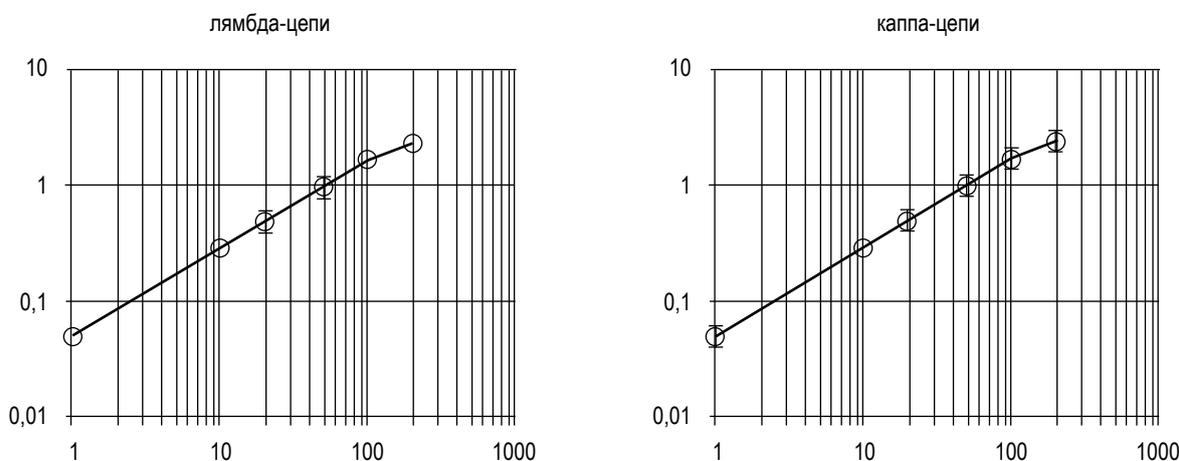


Рисунок 1. Калибровочные графики для определения концентраций СЛЦ каппа- (А) или лямбда-типа (Б)

Примечание. По оси абсцисс – концентрации антигенов (нг/мл), по оси ординат – оптическая плотность (условные единицы). На графиках указаны средние значения и стандартные отклонения.

дой фазе, оно было использовано для разработки иммунометрической системы определения концентраций СЛЦ лямбда-типа.

Определение диапазона линейных значений оптической плотности показало, что такой интервал для СЛЦ каппа- и лямбда-типа находится в пределах от 1 до 100 нг/мл (рис.2). Отклонения от линейного характера зависимости наблюдали при увеличении концентраций СЛЦ до 200 нг/мл.

Приведенные калибровочные графики были использованы для определения концентраций СЛЦ в сыворотке крови и в моче здоровых доноров и пациентов с миеломной болезнью (табл. 2). Выявленные у доноров концентрации свободных каппа- и лямбда-цепей находились в пределах одного числового диапазона, что позволило вычислять коэффициенты каппа/лямбда, которые оказались близки к ожидаемым величинам. При

ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИИ СВОБОДНЫХ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ КАППА- И ЛЯМБДА-ТИПОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И В МОЧЕ ДОНОРОВ И ПАЦИЕНТОВ С МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

Исследуемый материал	Количество образцов	каппа-цепи (мкг/мл)	лямбда-цепи (мкг/мл)	Соотношение каппа/лямбда
Здоровые доноры				
Сыворотка крови	30	6,7±2,1 (3,4-11,35)	4,7±2,0 (1,65-8,65)	1,56±0,5 (0,87-2,8)
Моча	23	4,2±3,8 (0,11-13,7)	1,6±1,0 (0,08-3,69)	2,2±1,7 (0,64-6,5)
Множественная миелома с моноклональным Ig-каппа				
Сыворотка крови	16	124,2 (3,7-365)	3,5 (0,5-8,2)	39 (2,7-256)
Моча	16	414 (0,38-1182)	3,39 (0,15-7,2)	423 (2,5-1212)
Множественная миелома с моноклональным Ig-лямбда				
Сыворотка крови	18	8,7 (1,7-17)	79 (10,5-300)	0,17 (0,0016-1,6)
Моча	18	5,4 (0,06-17)	217,3 (0,006-560)	0,5 (0,01-8,7)

Примечание. Указаны средние значения с доверительными интервалами, в скобках – минимальные и максимальные значения концентраций.

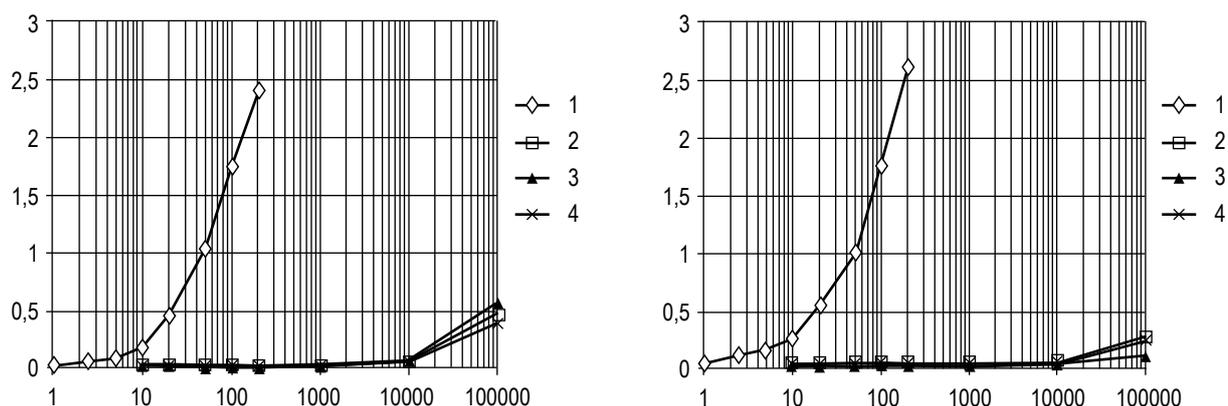


Рисунок 2. Выявление СЛЦ каппа- (А) или лямбда- (Б) типа в препаратах ББД (1), аффинно очищенного IgG человека (2) и в препаратах IgG для внутривенного введения: Пентаглобине (3) и Иммуновенине (4)

Примечание. По оси абсцисс – концентрация препаратов (нг/мл), по оси ординат – оптическая плотность (условные единицы).

исследовании образцов сыворотки и мочи пациентов с миеломной болезнью было установлено, что выявленные типы моноклональных СЛЦ соответствовали типам обнаруженных парапротеинов, а их концентрации в сыворотке и в моче варьировали в широких пределах. Соответственно были изменены и коэффициенты каппа/лямбда: при наличии моноклонального Ig лямбда-типа их значения были меньше единицы, при наличии Ig каппа-типа увеличивались в десятки и сотни раз.

Подтверждение специфичности разработанного метода было получено путем сравнения зависимостей величин оптической плот-

ности от концентраций выявляемых антигенов. Если исследуемые пробы содержали ББД каппа- или лямбда-типа, величина сигнала начинала расти при концентрациях от 1 до 10 нг/мл. Если пробы содержали IgG, аффинно очищенный на протеин G-сефарозе, или препараты IgG для внутривенного введения (Пентаглобин или Иммуновенин), рост сигнала регистрировался при концентрациях, в 10 000 раз превышающих указанный интервал величин (рис. 2).

Определенные в ходе экспериментов метрологические характеристики метода приведены в таблице 3.

ТАБЛИЦА 3. ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИММУНОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ СЛЦ В СЫВОРОТКЕ И МОЧЕ

Показатели	При определении концентраций	
	каппа-цепей	лямбда-цепей
Порог детекции (нг/мл)	5	3
Коэффициенты вариации при выявлении СЛЦ в сыворотке (%)	6,8	7,8
Коэффициенты вариации при выявлении СЛЦ в моче	10,8	7,7
Диапазон линейности (нг/мл)	1-100	1-100
Тест на открытие в сыворотке (%)	110	100
Тест на открытие в моче (%)	105	105

Обсуждение

Криптические эпитопы СЛЦ известны уже более 35 лет [20], но до сих пор остаются недостаточно изученными. Не определено их число, взаимное расположение на молекулах каппа- и лямбда-цепей, их способность реагировать со специфическими антителами. МКАТ, распознающие криптические эпитопы СЛЦ, описаны в ряде публикаций [12, 15, 20, 22], но детально также не изучены. Новое МКАТ (1С8), полученное в ходе настоящей работы, распознает эпитоп лямбда-цепей, который присутствует на антигене в циркулирующей крови здоровых доноров и пациентов с миеломной болезнью, не разрушается и не маскируется в процессе почечной фильтрации. Как уже было сказано, попытки разработать иммунометрический метод детекции СЛЦ на основе МКАТ долгое время не давали желаемых результатов.

Для определения концентрации СЛЦ в клинических лабораториях в настоящее время чаще всего используют коммерчески доступные наборы реагентов FREELITE™ Каппа kit и FREELITE™ Lambda kit (The Binding Site Ltd., Великобритания). Анализ основан на нефелометрическом или турбидиметрическом выявлении агглютинации латексных частиц, сенсibilизированных аффинно очищенными поликлональными антителами против каппа- или лямбда-цепей [9, 18, 19]. Для его выполнения требуются дорогостоящие реагенты и аналитическое оборудование. Порог детекции СЛЦ в методе FREELITE составляет 1-3 мкг/мл. Рекомендуемое производителем начальное разведение образца составляет 1:10, что не позволяет выявлять СЛЦ в ряде проб, например, в спинномозговой жидкости, без предварительного концентрирования. Сомнения в корректности определения СЛЦ с помощью метода, основанного на поликлональных антителах, высказаны во многих публикациях [11, 29, 30], а также в дискуссии на страницах авторитетного научного журнала [19]. Сомнения касаются вариабельности результатов при использовании

отдельных серий реагентов, риска искажения данных при высоких концентрациях антигена в пробе и сохранения линейности в пределах динамического диапазона.

Описанный в настоящей работе метод определения уровней СЛЦ обладает высокой чувствительностью, т.к. позволяет выявлять в сыворотке и в моче нанограммовые концентрации СЛЦ, что на три порядка превышает возможности метода Freelite.

Одним из факторов, осложняющих сравнение результатов измерения уровней СЛЦ в сыворотке крови и других биологических жидкостях у здоровых лиц и при различных заболеваниях, является отсутствие международно признанных референс-образцов, которые могли бы служить для сопоставления данных, полученных в разных лабораториях.

В качестве калибраторов в настоящей работе, так же как в ряде других, использованы смеси из нескольких ББД. В других исследованиях используют поликлональные СЛЦ, полученные в результате фрагментирования интактных Ig и последующего выделения каппа- и лямбда-цепей. Предложено также использовать пул СЛЦ, выделенных из мочи здоровых волонтеров [23]. Однако использование поликлональных СЛЦ также не может обеспечить точность определения концентрации СЛЦ при гаммапатиях, так как каждый ББД уникален по структуре и способности взаимодействовать с антителами.

Применение МКАТ для выявления СЛЦ может обеспечивать высокий уровень воспроизводимости, однако реагенты с необходимой совокупностью свойств до сих пор не были разработаны. Так, в системе, описанной в 2008 году [12], калибровочные графики для определения концентраций каппа- и лямбда- цепей принципиально различны: первый имеет форму кривой насыщения, второй – сигмоидную.

Описанный в настоящей работе метод обладает высокой специфичностью, т.к. позволяет выявлять СЛЦ в присутствии 10 000-кратного избыт-

ТАБЛИЦА 4. СОДЕРЖАНИЕ СЛЦ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И В МОЧЕ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ (по данным литературы и настоящего исследования)

Метод определения	Концентрация СЛЦ				Публикации
	в сыворотке крови		в моче		
	каппа-типа	лямбда-типа	каппа-типа	лямбда-типа	
ИФА	10 (1,6-15,2) ^a	3 (0,4-4,2) ^a	–	–	[24]
ИФА	16,6±6,1 ^a	33,8±14,8 ^a	2,96±1,84 ^a	1,07±0,69 ^a	[5]
Нефелометрия	8,4±2,66 ^a	14,5±4,4 ^a	5,5±4,95 ^a	3,17±3,3 ^a	[8]
Нефелометрия	6,3-9,1 ^c	12,4-15,1 ^c	–	–	[18]
ИФА	25,7±10,5 ^a	4,34±2,0 ^a	1,25±1,76 ^b	0,51±0,69 ^b	[22]
ИФА	7,9±2,8 ^a	58,5±26,0 ^a	–	–	[12]
ИФА	6,7±2,1 ^a	4,7±1,96 ^a	4,2±3,8 ^a	1,6±1,0 ^a	наст. работа

Примечание. ^a – мкг/мл, ^b – мг/г креатинина, ^c – 95% доверительный интервал, «–» – отсутствие данных.

ка молекул целостных Ig. Порог детекции СЛЦ каппа-типа – 5 нг/мл, лямбда-цепей – 3 нг/мл. Следовательно, начальные разведения образцов сыворотки и мочи могут составлять 1/100 и 1/30 соответственно. Существенное достоинство разработанного метода состоит в том, что калибровочные графики для определения концентраций каппа- и лямбда-цепей имеют форму линейных зависимостей с одинаковым наклоном и охватывают практически совпадающие динамические диапазоны (от 1 до 100 нг/мл).

В сыворотке и моче здоровых доноров с помощью описанного метода выявляются сопоставимые концентрации СЛЦ каппа- и лямбда-типов (табл. 3), что позволяет определять соотношение каппа/лямбда и оценивать отклонения от нормальных значений у пациентов с гаммапатиями. Рекомендации международной рабочей группы предлагают рассматривать коэффициент каппа/лямбда как один из основных критериев при установлении диагноза миеломной болезни и начала терапии [28].

Полученные в настоящей работе значения концентраций СЛЦ и их соотношения у здоровых лиц носят ориентировочный характер. Они демонстрируют возможность получения с помощью описанной системы результатов, которые согласуются с данными ряда публикаций

(табл. 4). В то же время очевидно, что необходимы испытания метода с привлечением более обширных групп здоровых доноров и пациентов.

Опыт применения описанного метода при обследовании пациентов с неврологическими нарушениями показал, что он позволяет выявлять СЛЦ в сыворотке крови и в спинномозговой жидкости без предварительного концентрирования образцов и с высокой степенью достоверности идентифицировать индивидов, у которых повышен риск развития рассеянного склероза в течение последующих двух лет [25].

Как следует из данных, приведенных на рисунке 2, при исследовании препаратов IgG для внутривенного введения при концентрациях IgG, превышающих 10 мкг/мл, наблюдается рост оптической плотности, который может быть связан с присутствием примесей СЛЦ, образующихся в процессе изготовления или хранения препаратов. Поскольку известно, что СЛЦ способны взаимодействовать с мембранами тучных клеток [16] и индуцировать проявления гиперчувствительности [26], наличие их в препаратах лечебного назначения представляется нежелательным. В связи с этим логично предположить, что описанный метод может оказаться полезным при контроле качества препаратов IgG для внутривенного введения.

Список литературы / References

1. Грязева И.В., Климович В.Б., Пашкова С.Ф. Моноклональные антитела к легким цепям иммуноглобулинов человека и их применение в иммуноанализе // Иммунология, 1994. № 3. С. 31-37. [Gryazeva I.V., Klimovich V.B., Pashkova S.F. Application of monoclonal antibodies to light chains of human immunoglobulins in immunoassays. *Immunologiya = Immunologia*, 1994, no. 3, pp. 31-37. (In Russ.)]
2. Климович В.Б., Самойлович М.П., Крутецкая И.Ю., Грязева И.В., Шмидт Е.Н., Котова Т.С. Получение и иммунохимическая характеристика моноклональных антител против IgM человека // Биотехнология, 1997. № 4. С. 40-46. [Klimovich V.B., Samoylovich M.P., Krutetskaya I.Yu., Gryazeva I.V., Schmidt E.N., Kotova T.S. Development and characterization of monoclonal antibodies against human IgM. *Biotekhnologiya = Biotechnology*, 1997, no. 4, pp. 40-46. (In Russ.)]
3. Климович В.Б. Самойлович М.П., Грязева И.В., Крутецкая И.Ю. Моноклональные антитела против иммуноглобулинов в диагностике заболеваний человека // Медицинский Академический Журнал. 2008.

T. 8, № 3. С. 84-95. [Klimovich V.B., Samoilovich M.P., Griazeva I.V., Krutetskaya I.Yu. Monoclonal antibodies against immunoglobulins in diagnostics of human diseases. *Meditinskii akademicheskii zhurnal = Medical Academic Journal*, 2008, Vol. 8, no. 3, pp. 84-95. (In Russ.)]

4. Самойлович М.П., Крутецкая И.Ю., Климович В.Б., Шмидт Е.Н., Пашкова С.Ф., Котова Т.С. Моноклональные антитела против подклассов IgG человека. Получение и определение специфичности // Иммунология, 1998. № 3. С. 27-30. [Samoylovich M.P., Krutetskaya I.Yu., Klimovich V.B., Schmidt E.N., Pashkova S.F., Kotova T.S. Monoclonal antibodies to human IgG subclasses. Development and specificity determination. *Immunologiya = Immunology*, 1998, no. 3, pp. 27-30. (In Russ.)]

5. Abe M., Goto T., Kosaka M., Wolfenbarger D., Weiss D.T., Solomon A. Differences in kappa to lambda (kappa:lambda) ratios of serum and urinary free light chains. *Clin. Exp. Immunol.*, 1998, Vol. 111, no. 2, pp. 457-462.

6. Abe M., Goto T., Wolfenbarger D., Weiss D.T., Solomon A. Novel immunization protocol and ELISA screening methods used to obtain and characterize monoclonal antibodies specific for human light chain variable-region subgroups. *Hybridoma*, 1993, Vol. 12, no. 4, pp. 475-483.

7. Boscatto L.M., Egan G.M., Stuart M.C. Specificity of two-site immunoassays. *J. Immunol. Methods*, 1989, Vol. 117, no. 2, pp. 221-229.

8. Bradwell A.R., Carr-Smith H.D., Mead G.P., Tang L.X., Showell P.J., Drayson M.T., Drew R. Highly sensitive automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin. Chem.*, 2001, Vol. 47, pp. 673-680.

9. Brebner J.A., Stockley R.A. Polyclonal free light chains: a biomarker of inflammatory disease or treatment target? *F1000 Med. Rep.*, 2013, Vol. 5, 4.

10. Bridoux F., Leung N., Hutchison C.A., Touchard G., Sethi S., Ferman J.P., Picken M.M., Herrera G.A., Kastiris E., Merlini G., Roussel M., Fervenza F.C., Dispenzieri A., Kyle R.A., Nasr S.H. International Kidney and Monoclonal Gammopathy Research Group. Diagnosis of monoclonal gammopathy of renal significance. *Kidney Int.*, 2015, Vol. 87, no. 4, pp. 698-711.

11. Daval S., Tridon A., Mazon N., Ristori J.M., Evrard B. Risk of antigen excess in serum free light chain measurements [letter]. *Clin. Chem.*, 2007, Vol. 53, no. 11, pp. 1985-1986.

12. Davern S., Tang L.X., Williams T.K., Macy S.D., Wall J.S., Weiss D.T., Solomon A. Immunodiagnostic capabilities of anti-free immunoglobulin light chain monoclonal antibodies. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2008, Vol. 130, no. 5, pp. 702-711.

13. Dimopoulos M., Kyle R., Ferman J.P., Rajkumar S.V., San Miguel J., Chanan-Khan A., Ludwig H., Joshua D., Mehta J., Gertz M., Avet-Loiseau H., Beksaç M., Anderson K.C., Moreau P., Singhal S., Goldschmidt H., Boccadoro M., Kumar S., Giral S., Munshi N.C., Jagannath S. International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. Consensus recommendations for standard investigative workup: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. *Blood*, 2011, Vol. 117, no. 18, pp. 4701-4705.

14. Hales C.N., Woodhead J.S. Labelled antibodies and their use in the immunometric assay. *Meth. Enzymol.*, 1980, Vol. 70A, pp. 334-355.

15. Hutchison C.A., Basnayake K., Cockwell P. Serum free light chain assessment in monoclonal gammopathy and kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.*, 2009, Vol. 5, no. 11, pp. 621-618.

16. Hutchinson A.T., Jones D.R., Raison R.L. The ability to interact with cell membranes suggests possible biological roles for free light chain. *Immunol. Lett.*, 2012, Vol. 142, no. 1-2, pp. 75-77.

17. Kaplan B., Aizenbud B.M., Golderman S., Yaskariyev R., Sela B.A. Free light chain monomers in the diagnosis of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.*, 2010, Vol. 229, no. 1-2, pp. 263-271.

18. Katzmann J.A., Clark R.J., Abraham R.S., Bryant S., Lymp J.F., Bradwell A.R., Kyle R.A. Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clin. Chem.*, 2002, Vol. 48, no. 9, pp. 1437-1444.

19. Legg A., Hobbs J.A.R., Mead G.P., Bradwell A.R. Monoclonal vs Polyclonal Free Light Chain Assays. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2009, Vol. 131, no. 6, pp. 897-903.

20. Ling N.R., Lowe J., Hardie D., Evans S., Jefferis R. Detection of free kappa chains in human serum and urine using pairs of monoclonal antibodies reacting with C kappa epitopes not available on whole immunoglobulins. *Clin. Exp. Immunol.*, 1983, Vol. 52, no. 1, pp. 234-240.

21. Nakano T., Matsui M., Inoue I., Awata T., Katayama S., Murakoshi T. Free immunoglobulin light chain: its biology and implications in diseases. *Clin. Chim. Acta*, 2011, Vol. 412, no. 11-12, pp. 843-849.

22. Nakano T., Nagata A. ELISAs for free human immunoglobulin light chains in serum: improvement of assay specificity by using two specific antibodies in a sandwich detection method. *J. Immunol. Methods*, 2004, Vol. 293, no. 1-2, pp. 183-189.

23. Nakano T., Miyazaki S., Shinoda Y., Inoue I., Katayama S., Komoda T., Nagata A. Proposed reference material for human free immunoglobulin light chain measurement. *J. Immunoassay Immunochem.*, 2006, Vol. 27, no. 2, pp. 129-137.

24. Nelson M., Brown R.D., Gibson J., Joshua D.E. Measurement of free kappa and lambda chains in serum and the significance of their ratio in patients with multiple myeloma. *Br. J. Haematol.*, 1992, Vol. 81, no. 2, pp. 223-230.

25. Makshakov G., Nazarov V., Kochetova O., Surkova E., Lapin S., Evdoshenko E. Diagnostic and Prognostic Value of the Cerebrospinal Fluid Concentration of Immunoglobulin Free Light Chains in Clinically Isolated Syndrome with Conversion to Multiple Sclerosis. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 11, e0143375.

26. Powe D.G., Groot-Kormelink T., Sisson M., Blokhuis B.J., Kramer M.F., Jones N.S., Redegeld F.A. Evidence for the involvement of free light chain immunoglobulins in allergic and nonallergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 125, no. 1, pp. 139-145.
27. Pratt G. The evolving use of serum free light chain assays in haematology. *Br. J. Haematol.*, 2008, Vol. 141, no. 4, pp. 413-422.
28. Rajkumar S.V., Dimopoulos M.A., Palumbo A., Blade J., Merlini G., Mateos M.V., Kumar S., Hillengass J., Kastritis E., Richardson P., Landgren O., Paiva B., Dispenzieri A., Weiss B., LeLeu X., Zweegman S., Lonial S., Rosinol L., Zamagni E., Jagannath S., Sezer O., Kristinsson S.Y., Caers J., Usmani S.Z., Lahuerta J.J., Johnsen H.E., Beksac M., Cavo M., Goldschmidt H., Terpos E., Kyle R.A., Anderson K.C., Durie B.G., Miguel J.F. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.*, 2014, Vol. 15, no. 12, pp. 538-548.
29. Tate J.R., Gill D., Cobcroft R., Hickman P.E. Practical considerations for the measurement of free light chains in serum. *Clin. Chem.*, 2003, Vol. 49, no. 8, pp. 1957-1958.
30. Tate J.R., Mollee M., Dimeski G., Carter A.C., Gill D. Analytical performance of serum free light-chain assay during monitoring of patients with monoclonal light-chain diseases. *Clin. Chim. Acta*, 2007, Vol. 376, no. 1-2, pp. 30-36.

Авторы:

Самойлович М.П. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории гибридомной технологии ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий»; Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербурге, Россия

Грязева И.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории гибридомной технологии ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий», Санкт-Петербург, Россия

Мазинг А.В. — к.м.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория диагностики аутоиммунных заболеваний ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербурге, Россия

Лапин С.В. — к.м.н., заведующий лабораторией диагностики аутоиммунных заболеваний ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

Климович В.Б. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией гибридомной технологии ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Samoylovich M.P., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Hybridoma Technology Laboratory, Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg, Russian Federation

Griazeva I.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Hybridoma Technology Laboratory, Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg, Russian Federation

Mazing A.V., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Diagnostics of Autoimmune Diseases, First I.P. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Lapin S.V., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Diagnostics of Autoimmune Diseases, First I.P. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Klimovich V.B., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Hybridoma Technology Laboratory, Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 23.05.2016
Принята к печати 14.06.2016

Received 23.05.2016
Accepted 14.06.2016