**Резюме**

 Цель исследования. Характеристика антител к эритропоэтину в сыворотках крови пациентов, проходящих терапию препаратами эритропоэтина.

Материалы и методы. Проанализированы 106 сывороток крови пациентов, получавших препараты эритропоэтина. Для сравнительного анализа были исследованы 134 сыворотки пациентов, не получавших препараты ЭПО. Исследование проводили методом твердофазного ИФА при пассивной иммобилизации рчЭПО и иммунохимической через стептавидин-биотиновое взаимодействие. Выявление антител к эритропоэтину проводили с использованием мышиных моноклональных антител к IgG, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека, конъюгированных с пероксидазой хрена, а при количественном определении - конъюгата протеина-А с пероксидазой. В качестве калибровочного стандарта применяли поликлональные антитела кролика к ЭПО человека с известной концентрацией. Для построения калибровочного графика были выбраны шесть калибровочных образцов в диапазоне концентрацией 16-1000 нг/мл. Предел обнаружения составил 12 нг/мл, а предел количественного обнаружения 31 нг/мл.

Результаты. При иммунохимической иммобилизации частота выявления суммарных антител увеличилась на 25,5%, IgG1 – на 2,8%, IgG2 – на 1%, IgG3 – на 9,4%, IgG4 - на 11,4%. У большинства пациентов были обнаружены антитела со смешанным изотипом, в 3-х образцах были детектированы только IgG1 или IgG4 антитела к ЭПО. В выборке из 106 образцов IgМ антитела не определялись, суммарные IgG антитела были выявлены в 36,8 % случаев, в 34% образцов их наличие было подтверждено выявлением антител хотя бы одного из подклассов. IgG1 антитела были выявлены в 94,4%, IgG4 - в 80,6% образцов, в которых присутствовали суммарные IgG антитела. Во всех случаях антитела IgG2 и/или IgG3 подклассов были обнаружены в присутствии IgG1 или IgG4 антител. Концентрация антител составила 3,2 -35,5 мкг/мл у 28 пациентов, у 8 пациентов уровень антител был более 50 мкг/мл, у 3-х находился ниже предела количественного обнаружения. Только в 6 образцах были выявлены антитела с индексом авидности более 50%.

Заключение. Иммунохимическая иммобилизации антигена привела к повышению чувствительности при определения специфических антител всех подклассов. IgG антитела были выявлены более чем в трети сывороток крови пациентов, получавших препараты ЭПО, преимущественно определялись низкоавидные антитела IgG1 и IgG4 подклассов.

Abstract

Aim: Characteristic of anti-EPO antibodies in serum samples of patients treated with erythropoietin.

Materials and methods. 106 serum samples of patients treated with erythropoietin were analyzed. 134 serum samples of patients who did not receive EPO were studied for comparative analysis. Result obtained for anti-EPO antibody detection in ELISA employing rhEPO capturing on the ELISA plates by passive and via steptavidin-biotin immunochemical ways. Mouse monoclonal antibodies to human IgG, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 conjugated with horseradish peroxidase were used to anti-EPO antibodies detection, protein-A peroxidase conjugate was used for quantitative assay. Rabbit anti-human EPO polyclonal antibodies with known concentration were used as a calibration standard. Six calibration samples in the concentration range of 16-1000 ng/ml were used to plot the calibration curve. The detection limit was 12 ng/ml and the quantitative detection limit was 31 ng/ml.

Results. Immunochemical capturing led to increasing of total IgG antibody detection by 25.5%, IgG1 – by 2.8%, IgG2 – by 1%, IgG3 – by 9.4%, IgG4 - by 11.4%. Antibodies with mixed isotype were found in most patients, only IgG1 or IgG4 antibodies to EPO were detected in 3 samples. Among of 106 sera samples specific IgM was not determined, total IgG was detected in 36.8 % of cases, in 34% of samples their presence were confirmed by detection of at least one of the subclasses. IgG1 antibody was detected in 94.4%, IgG4 - in 80.6% of samples in which total IgG antibody present. In all cases, IgG2 and/or IgG3 were detected in the presence of IgG1 or IgG4 antibodies. In 28 patients sera samples the of antibody concentration was 3.2 -35.5 µg/ml, in 8 patients the level of antibodies was more than 50 µg/ml, in 3 patients it was below the limit of quantitative detection. Only 6 samples showed antibodies with avidity index of more than 50%.

Conclusions. Immunochemical capturing of the antigen led to increased sensitivity for all subclasses specific antibodies detection. IgG antibodies were found in more than a third of serum samples of patients treated with erythropoietin. Mainly low-avidity antibodies of IgG1 and IgG4 subclasses were determined.