



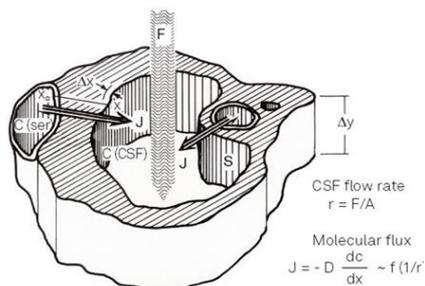
# *«Методы выявления антинейрональных антител: достоинства и ограничения»*

*Лапин Сергей Владимирович, к.м.н.*

**Лаборатория диагностики аутоиммунных заболеваний  
Научно-методический центр Минздрава России  
по Молекулярной медицине  
ПСПбГМУ им.акад.И.П.Павлова**

*[www.autoimmun.ru](http://www.autoimmun.ru)*

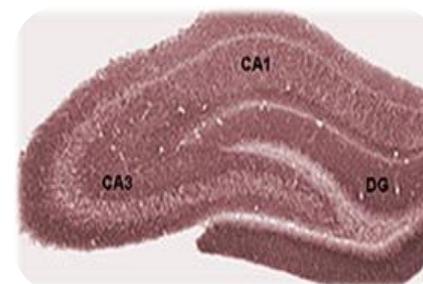
# Основные компоненты лабораторного обследования в неврологической диагностике



Индекс проницаемости гемато-энцефалического барьера



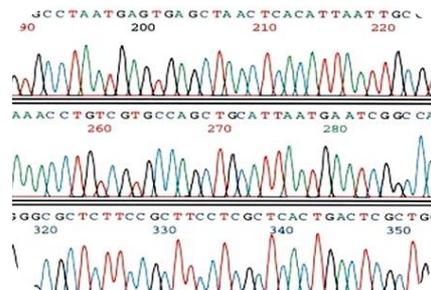
ОКП и интратекальный синтез



Антинейрональные антитела в сыворотке



Оценка интратекального синтеза антител к вирусам и бактериям



Генетические исследования



АФС и другие прокоагуляционные состояния



# Основные разделы неврологического направления *www.autoimmun.ru*

1. Ликвородиагностика и биомаркеры заболеваний ЦНС в ликворе;
2. Серодиагностика аутоиммунных и воспалительных заболеваний;
3. Генодиагностика экстрапирамидных нарушений и атаксии;
4. Генодиагностика болезней моторных нейронов и миопатий;
5. Диагностика полирадикулопатий и полиневритов ;
6. Диагностика ишемических заболеваний нервной системы;
7. Отставание развития у детей и эпилепсии детского возраста;
8. Фармакогенетика назначения трициклических антидепрессантов и ингибиторов обратного захвата серотонина;

# Определение аутоиммунитета (в модификации Y. Shoenfeld, 2008)

- Хроническое воспаление (системное или тканевое) неизвестной этиологии
- Связь заболевания с генами системы HLA
- Сочетание с другими аутоиммунными заболеваниями
- Терапия иммуносупрессивными препаратами
- Аутореактивные лимфоциты и **аутоантитела** в сыворотке крови и биологических жидкостях

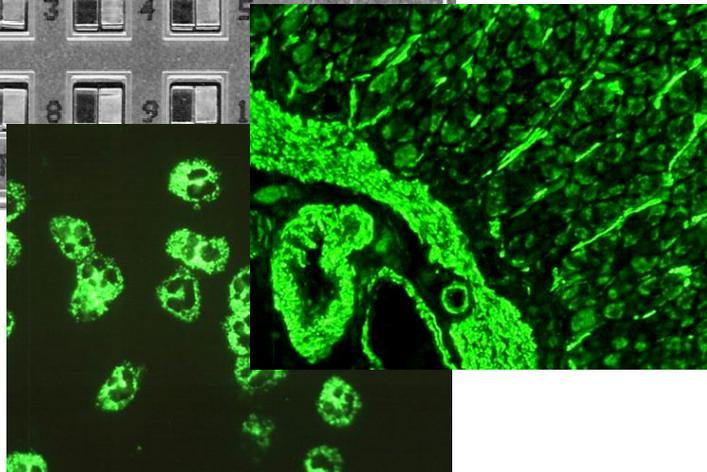
# Аутоантитела как диагностические маркеры

- 👍 Появляются до развернутой клинической картины;
  - 👍 Могут использоваться для ранней диагностики;
  - 👍 Связаны с патогенезом АИЗ;
  - 👍 Выявляют подтипы заболевания с уникальной симптоматикой;
  - 👍 Выявляют риск развития определенных осложнений и исходов заболевания
  - 👍 Определяют ответ на лечение
  - 👍 Важность определения спектра аутоантител
- 👎 Разные классы иммуноглобулинов и разные мишени;
  - 👎 Множество белковых мишеней в пределах одного семейства аутоантител;
  - 👎 Разные эпитопы связывания;
  - 👎 Выявляются у «здоровых» и при других АИЗ;
  - 👎 Тесты первого поколения низкоспецифичны, однако не всегда описаны антитела;
  - 👎 Отсутствие стандартизации и гармонизации тестирования;

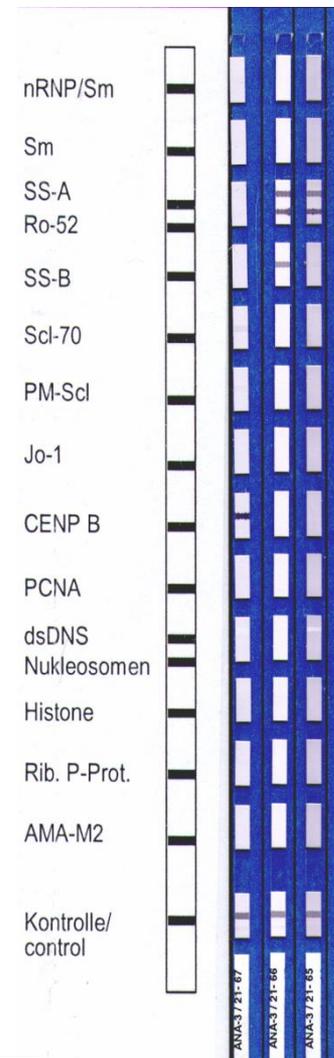
# Методические возможности выявления аутоантител



**ИРИФ**



**ИФА**



**БЛОТ**

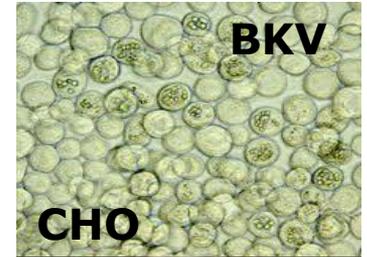
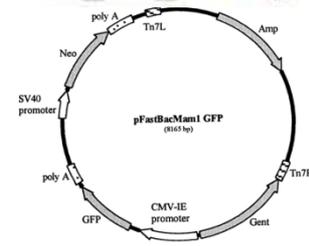
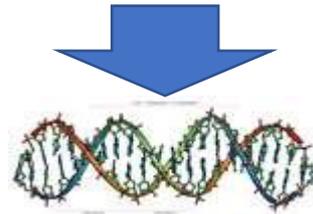
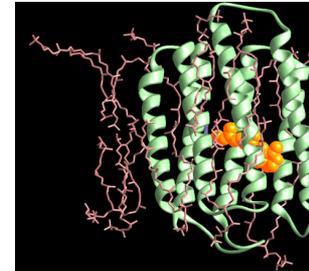
Определение серологического спектра  
(*autoantibody profiling*) в диагностике АИЗ

<b>Задача обследования</b>	<b>Используемый метод</b>
Скрининг аутоантител при ранней диагностике	нРИФ
Дифференциальная диагностика	Иммуноблот
Мониторинг эффективности терапии	ИФА, иммунохимия

Для эффективного назначения диагностических тестов необходимы клинически-оправданные алгоритмы и показания к обследованию

# Преимущества тестов «второго поколения»

- **Тесты «первого поколения»** - очистка аутоантигенов из тканей и клеток организма/ клеточных культур
- Частые проблемы – примеси, низкая концентрация, денатурация, неспецифические эпитопы
- Синтез иммунореактивных антигенов для тестирования, их модификация для улучшения реакций
- **Тесты «второго поколения»:** антитела к цитруллиновому пептиду (АЦЦП), дезаминированные пептиды глиадина, антитела к дсДНК-НсХ, антитела к рекомбинантной транскламиназе 2 человека
- Новый подход - выявление аутоантител на **генетически-модифицированных организмах**



# Паранеопластические неврологические синдромы

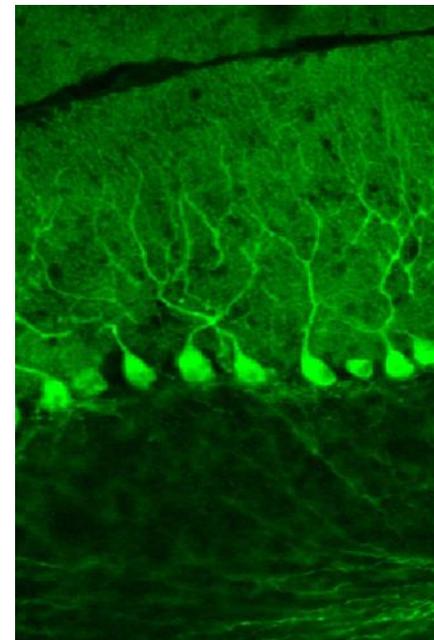
- 1888 год Герман Оппенгейм – **периферическая нейропатия** и рак легких;
- 1890 год профессор М. Ауче – связь между **периферической нейропатией** и раком;
- 1901 год Карл Вейгерт – миастения и тимома;
- 1949 год Гитчард и Вигно впервые использовали термин «**паранеопластический**» не обнаружив метастазов при полинейропатии на фоне рака матки;
- 1950 год Л. Томас и Ф.Бурнет – концепция иммунного ответа при раке (противоопухолевые антитела);
- 1956 год Эдварт Ламберт – миастенический синдром Ламберта-Итона и мелкоклеточный рак легких;



**Герман  
Оппенгейм  
(1858-1919)**

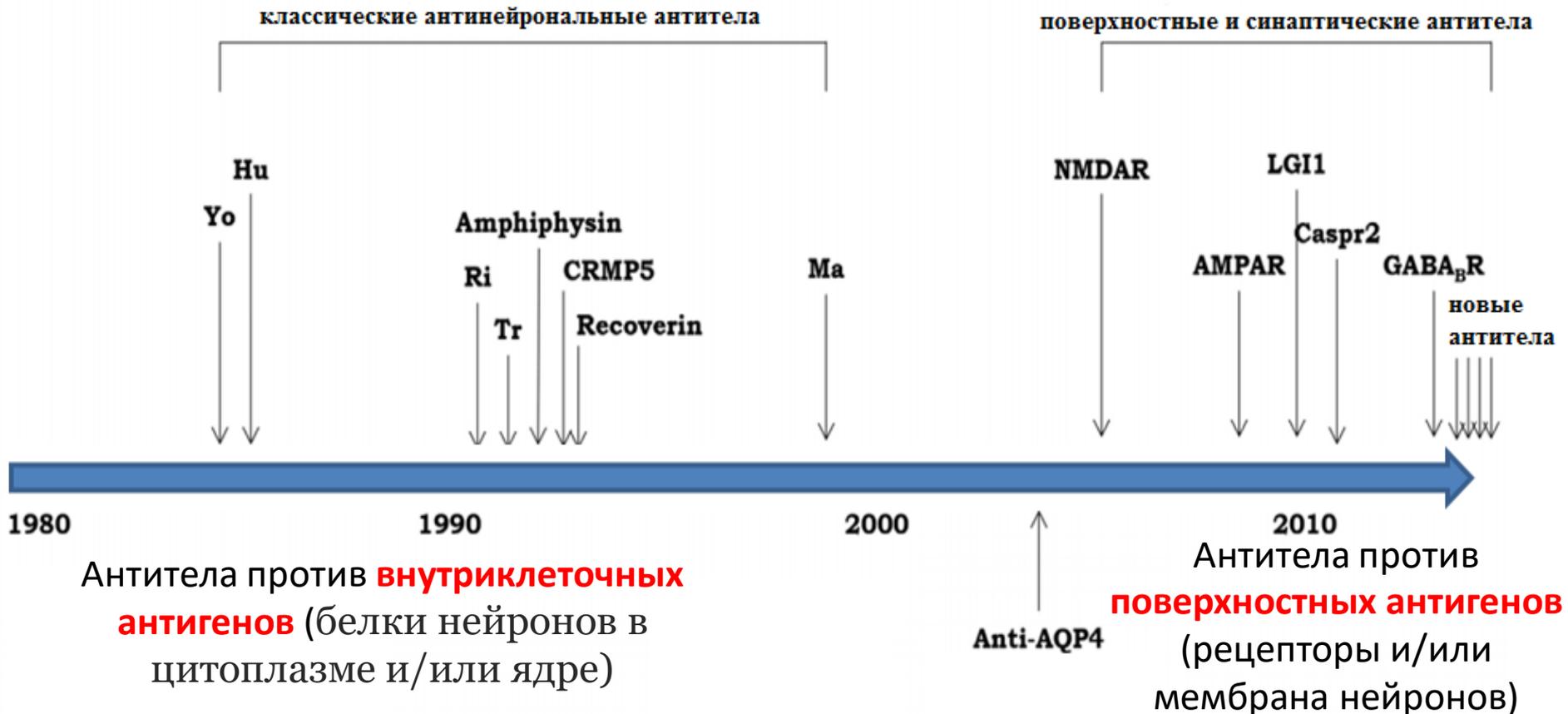
# Описание семейства антинейрональных антител

- 1965 год Вилкинсон и Зеромски - идентифицировали антитела, связывающиеся с цитоплазмой и ядрами нейронов у пациентов с раком и сенсорной нейропатией (ANNA-1 впоследствии анти-Hu) ;
- 1976 год Дж.Л. Троттер - антитела к мозжечковым клеткам Пуркинье (PCA-1) у пациента с болезнью Ходжкина и мозжечковой атаксией;
- 1983 год Гринли и Брашер - **анти-Yo (PCA1)** у пациенток с дегенерацией мозжечка на фоне рака яичников;
- 1986 год Гринли и Липтон - **анти-Hu (ANNA-1)** у пациентов с сенсорной нейропатией и дегенерацией мозжечка;
- 2003 год Джозеп Далмау – **NMDA-энцефалит** и тератома яичников;
- 2004 год – Вингерчук и Леннон – **антитела к AQP4**
- на сегодняшний день описаны около 30 видов антинейрональных антител (20 тестов у Mayo Clinic);



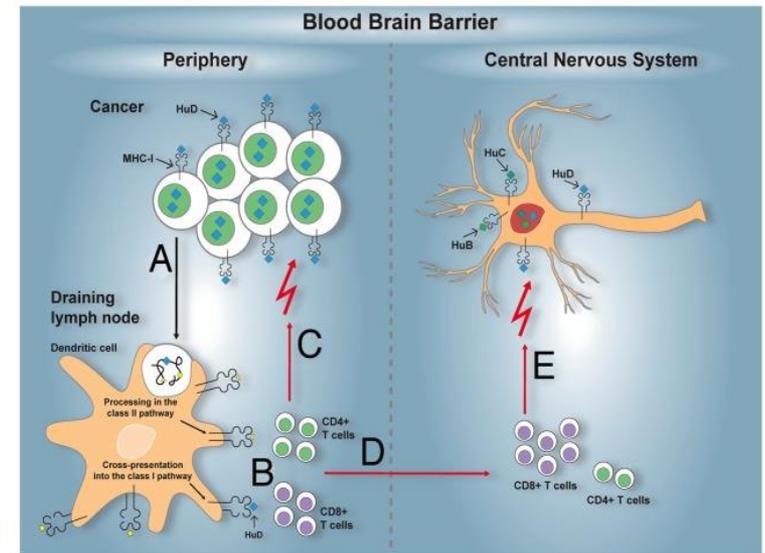
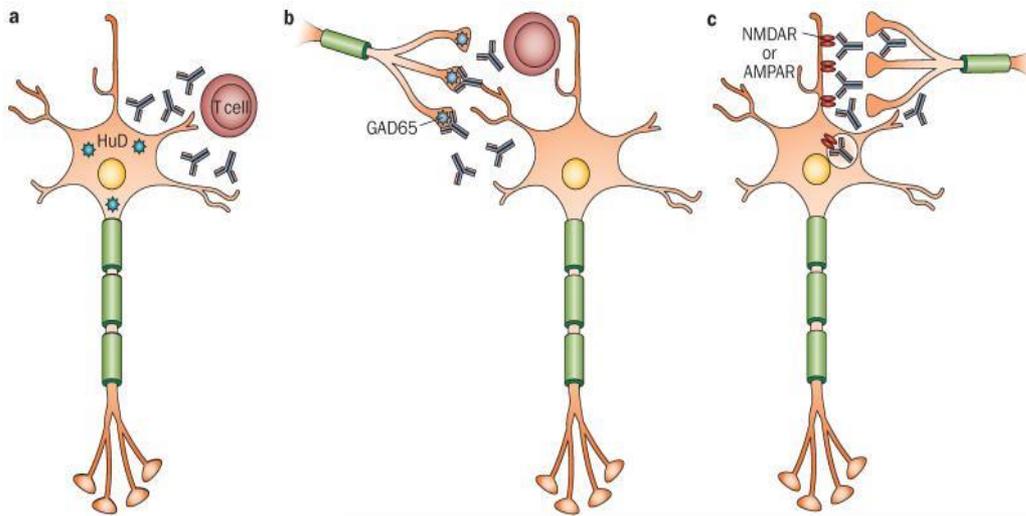
# Семейство: антинейрональные антитела

**Антинейрональные антитела** – органоспецифические аутоантитела, в крови и спинномозговой жидкости пациентов **с неврологическими нарушениями**, развившимися **на фоне онкологического заболевания**.



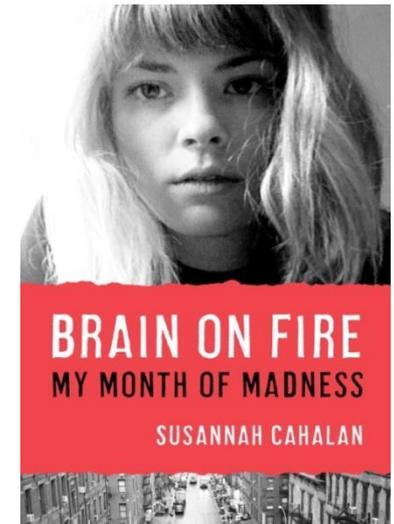
# Патогенез

- Иммунный ответ против **онконейрональных антигенов** опухоли;
- Перекрестная реакция **T- и B-клеток против антигенов опухоли и ЦНС;**
- Цитотоксические **T-лимфоциты** воздействуют на **внутриклеточные антигены**, приводя к появлению антинейрональных антител (Hu, Ri, Yo, GAD и т.д.);
- Онко-специфические **B-клетки** реагируют **против мембранных антигенов** (рецепторов нейронов), формируя антисинаптические антитела (NMDA, AchR, LGI1, CASPR и т.д.);



# Клинические проявления ПНПС

- **энцефаломиелит** (головная боль, угнетение сознания, нарушение чувствительности, когнитивные расстройства);
- **подострая сенсорная нейропатия** (парестезия в дистальных отделах конечностей) и **миелит** (парезы);
- **опсоклонус-миоклонус синдром** (тремор, хаотичные движения глаз, нарушения сна, эмоциональная нестабильность);
- **стволовой энцефалит** (нарушение сознания, атаксия, асимметричный нижний парапарез, гиперрефлексия);
- **лимбический энцефалит** (возбуждение, бессонница, спутанность сознания, снижение памяти и внимания, обонятельные галлюцинации и судороги);
- **мозжечковая дегенерация** (глазодвигательные нарушения, атаксия);
- **анти-NMDA энцефалит** (нарушения сознания, дискинезии, деменция);
- **Миастения или миастенический синдром** (характерная клиническая симптоматика);

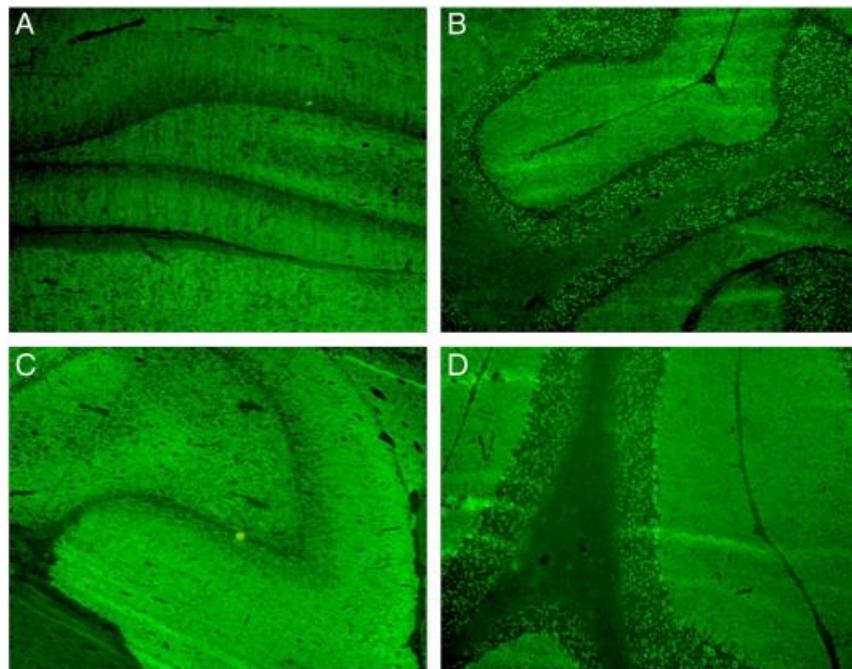


# Антитела против внутриклеточных белков и связанные с ними клинические синдромы

Антитела	Синдром ЦНС	Связь с неоплазией
Yo	Подострая дегенерация мозжечка	Тератома яичников, карцинома матки, молочных желез, фаллопиевых труб
Hu	Энцефаломилит, подострая дегенерация мозжечка, сенсорная нейропатия, вегетативная недостаточность	Мелкоклеточный рак легких
Ri	Опсоклонус, энцефаломиелит, мозжечковая атаксия	Мелкоклеточный рак легких, карцинома молочной железы
Амфи-физин	Синдром ригидного человека Лимбический энцефалит	Карцинома молочной железы, мелкоклеточный рак легких
GAD-65	Синдром ригидного человека Лимбический энцефалит Мозжечковая атаксия и миелит	Различная ассоциация с опухолями (молочная железа, легкие, тимома и др.)
Ma1/2	Лимбический энцефалит, поражение ствола, мозжечковый синдром	Мелкоклеточный рак легких и семиномы
Sox 1	Мозжечковый синдром	Мелкоклеточный рак легких
Tr	Подострая мозжечковая дегенерация	Болезнь Ходжкина

# Семейство антитела к поверхностным нейрональным антигенам

- Антитела направлены на антигены нейропиля- богатой синапсами лимбической зоны гиппокампа
- Антитела к антигенам вольтаж-зависимого калиевого комплекса (VGKC) – основные маркеры LGI-1, CASPR2, VGCC
- Ряд минорных антигенов: AMPAR, GABABR и GlyR
- Антигены отмечаются при **ЛЕМС** (мышечная слабость с атаксией и полинейропатией), **лимбическом энцефалите** (потеря памяти, судороги, психоз, делирий), **синдроме Морвана** (инсомния, психоз, нейромиотония) и ряде других состояний



Антитела	Синдром ЦНС	Связь с неоплазией
DPPX	Энцефалопатия, миелопатия, нарушение моторики кишечника	Лимфома
CASPR2	Лимбический энцефалит, синдром Морвана	Тимома
GABAaR	Энцефалит, эпилепсия	Тимома, болезнь Ходжкина, мн. миелома
GABAbR	Эпилепсия, лимбический энцефалит, опсоклонус-миоклонус	Мелкоклеточный рак легких
AMPA	Лимбический энцефалит	Мелкоклеточный рак легких, карцинома молочной железы, тимома
IGLON5	Деменция, расстройства сна, нарушение дыхания	Тимома
NMDA	Лимбический энцефалит, психоз, эпилепсия, двигательные расстройства, кататония	Тератома яичек и яичников
mGluR1	Мозжечковая атаксия	болезнь Ходжкина
mGluR5	Лимбический энцефалит, синдром Офелии	болезнь Ходжкина
VGCC	Мозжечковая атаксия (синдром Ламберта-Итона)	Мелкоклеточный рак легких

# Европейская Федерация неврологических сообществ (EFNS) Рекомендации по диагностике и лечению ПНС, 2011 г.

1. Неврологическое исследование для исключения иного генеза неврологического синдрома (КТ/МРТ головного мозга, исследование ЦСЖ, ЭЭГ, ЭНМГ и др.)

ЦСЖ: признаки воспаления (умеренный лимфоцитарный плеоцитоз, увеличения концентрации белка, высокий уровень IgG и олигоклональный синтез)

## **2. Скрининг на АТ (оценка риска)**

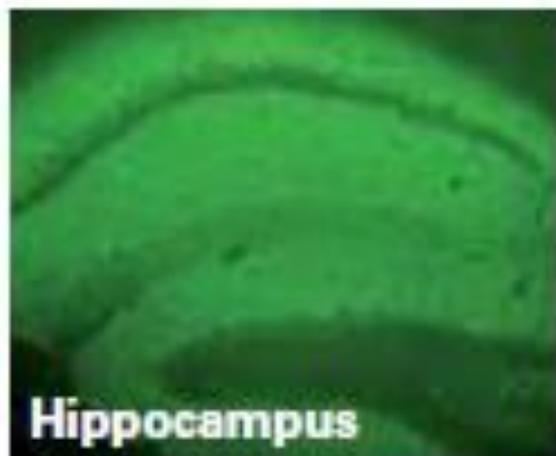
3. Поиск основной опухоли с учетом характера неврологических нарушений и результатов скрининга на АТ (КТ/МРТ соответствующей анатомической области, УЗИ и т.д.)

# Классификация антинейрональных антител в зависимости от риска развития неоплазии

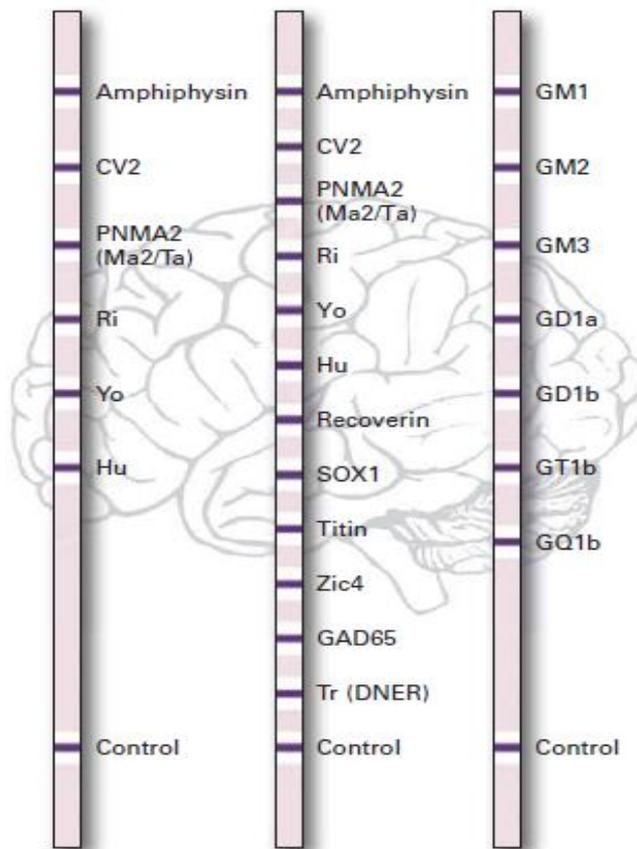
Высокий риск (>70%)	
<b>Hu</b>	<b>Ri</b>
<b>CV2/CRMP5</b>	<b>Yo</b>
SOX1	<b>Ma2/Ta</b>
PCA2 (MAP18)	<b>Tr</b>
<b>Амфифизин</b>	KLHL 11
Средний риск (30-70%)	
<b>AMPA R (&gt;50%)</b>	P/Q VGCC (50-90%)
<b>GABA<sub>B</sub>R (&gt;50%)</b>	<b>CASPR2 (50%)</b>
mGluR5 (50%)	<b>NMDAR (38%)</b>
Низкий риск (<30%)	
mGluR1 (30%)	<b>LG1 (&lt;10%)</b>
GABA <sub>A</sub> R (<30%)	DPPX (<10%)
<b>GAD65 (&lt;15%)</b>	GlyR (<10%)

# Методы выявления антинейрональных антител

ИРИФ

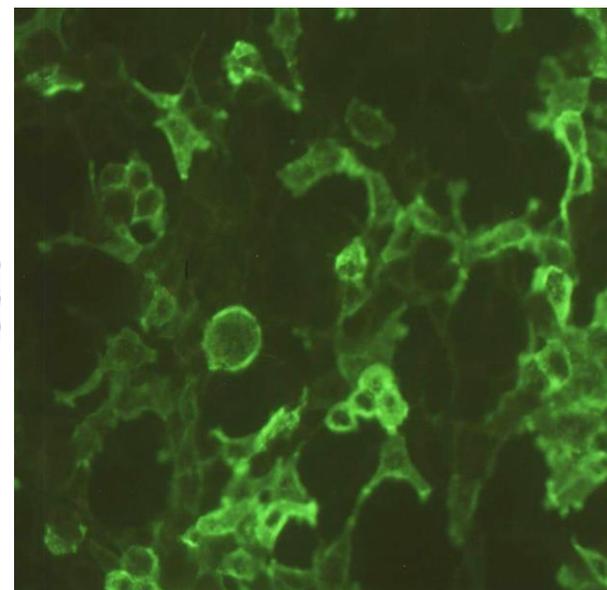


иммуноблот



EUROLINE

трансфицированные  
линии клеток



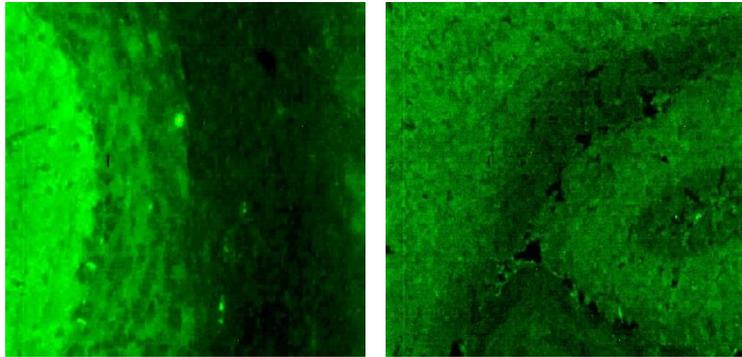
EUROIMMUN



# Диагностический подход (сыворотка и ликвор!)

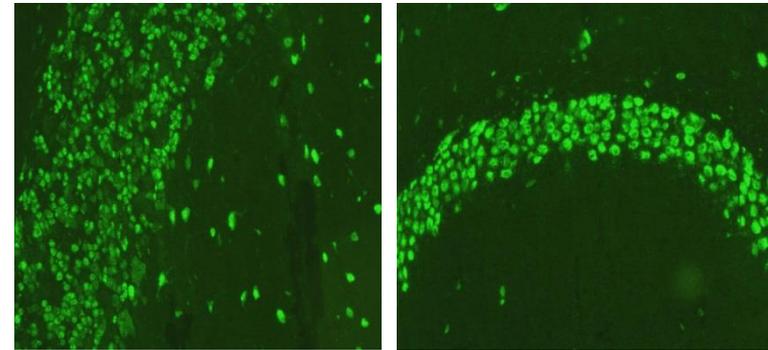
ИРИФ (мозжечок, гиппокамп, печень)

Выявлено свечение  
молекулярного слоя мозжечка и  
гиппокампа



Специфического  
свечения не выявлено  
↓  
Антинейрональные  
антитела не выявлены

Выявлено свечение  
зернистого слоя мозжечка  
и гиппокампа



**Исследование на трансфицированных  
линиях клеток**

(LG1/CASPR2/NMDA/GABARB1/B2  
/AMPA1/AMPA2)

**Иммуноблот на антинейрональные антитела**

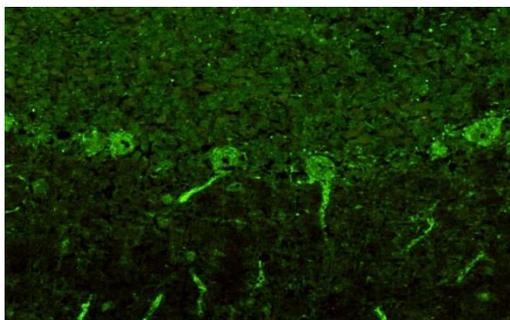
(Анти-Yo-1, Hu, Ri, PNMA2(Ma2/Ta), CV2,  
Амфифизин) и ИФА (GAD)

**Наличие АТ и отрицательный онкопоиск требуют повторного скрининга  
каждые 6 месяцев в течение 4 лет**

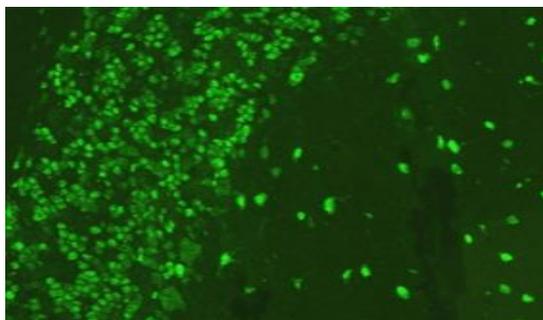
# Выявление антинейрональных антител на тканевом комплексе мозжечок-гиппокамп (метод ИРИФ)



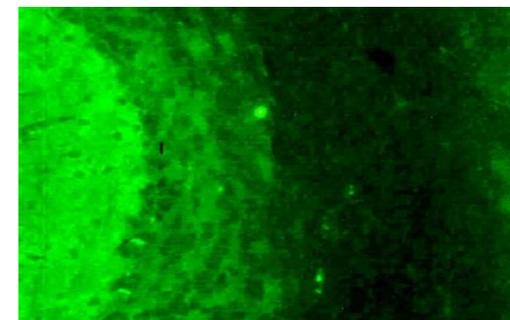
Свечение клеток  
Пуркинье (Yo)



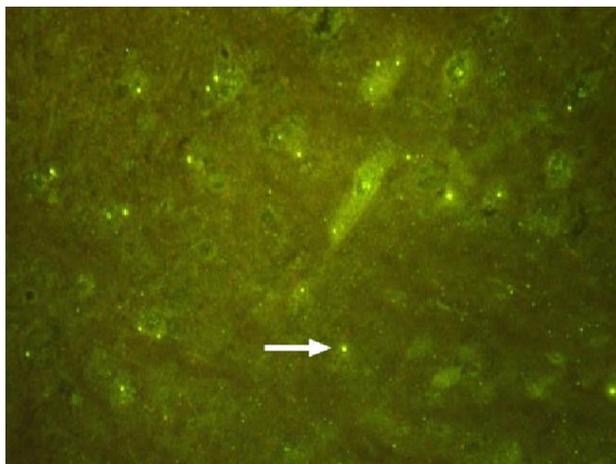
Ядерный нейрональный  
(Hu, Ri)



Рецепторный  
(NMDA, LG1, CASPR2)



Ядрышковый нейрональный  
(Ma1, Ma2/Ta)



Цитоплазматический нейрональный  
(GAD65, амфифизин)

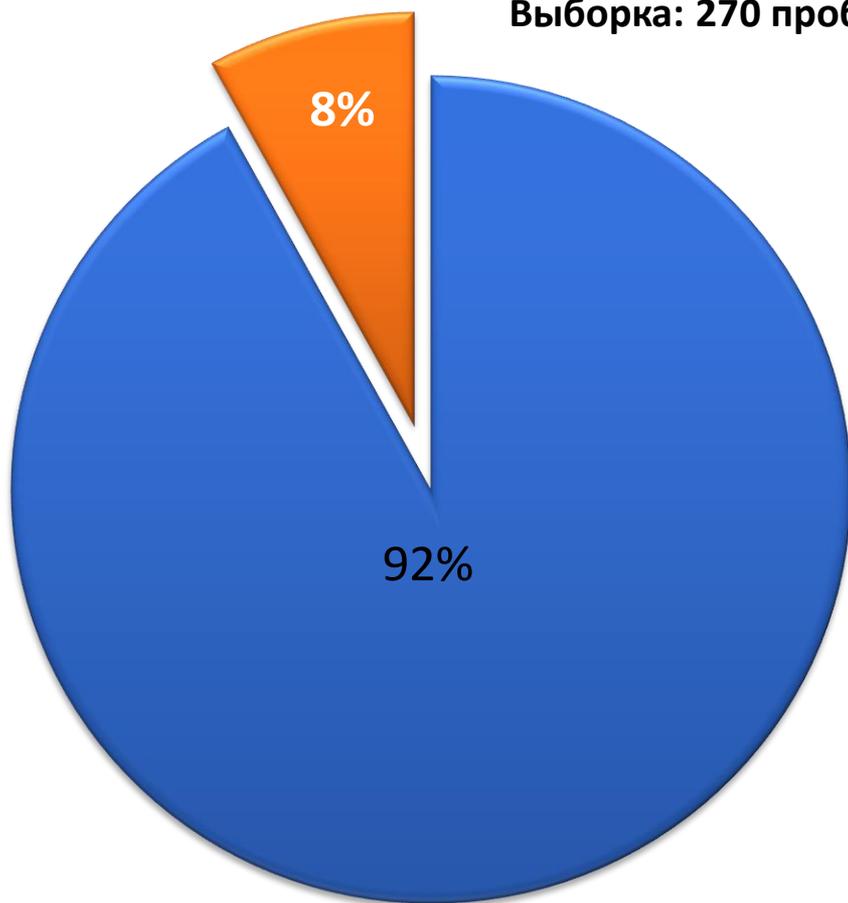


Атипичное свечение  
нейронов

# Встречаемость антинейрональных антител в сыворотке (нРИФ-скрининг)

2021

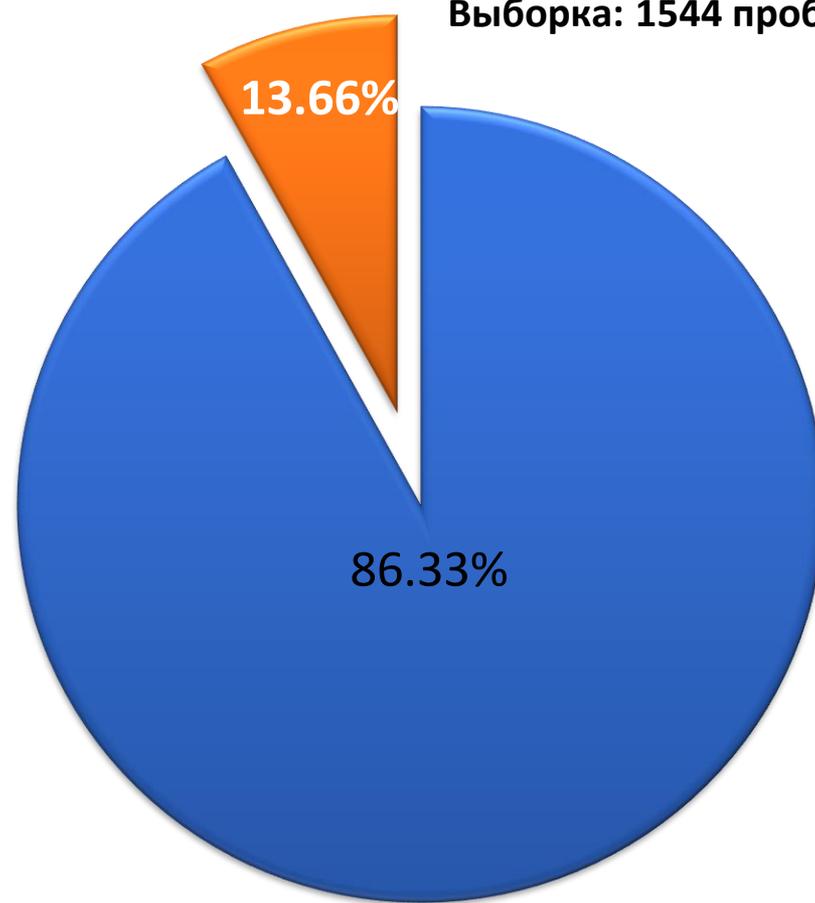
Выборка: 270 проб



■ отрицательный ■ положительный

2022

Выборка: 1544 пробы



■ отрицательный ■ положительный

# Оптиконеуромиелит как аутоиммунное заболевание



- **Подострое воспалительное заболевание ЦНС**, сопровождающееся тканевым воспалением, появлением аутоантител (AQP4, MOG), контролируемое иммуносупрессивной терапией (солюмедрол, анти-CD20, IVIG, анти-C5, анти-IL6R, плазмафорез)
- Поражает лиц в возрасте 30-50 лет, ♀/♂ - 9/1, популяционная частота 0,3-4,4 /100 000, наиболее часто отмечается у азиатов и негров, геоэпидемиология «обратна» РС;
- **Наследственность (до 3%)**, HLA-DRB1\*0301, но часто другие АИЗ, есть популяционная связь с миастенией, СКВ, АФС и синдромом Шегрена;
- **Онкологическое заболевание** выявляется у 8-15% пациентов с рецидивирующим течением ОНМ, описаны 61 случай ПН-ЗНОМ, с преобладанием рака груди, легкого, яичников (*Shahmohammadi et al. 2021*), экспрессия AQP4 в опухоли отмечалась в большинстве случаев (*Yinghui et al. 2022*);
- **Разнообразная неврологическая симптоматика** (неврит зрительного нерва часто билатеральный, поперечный миелит, поражение ствола мозга, ОДЭМ, и т.д.), часто развиваться рецидивирующее течение (в отсутствии терапии);

# Заболевания спектра нейрооптикомиелита

## Симптомы:

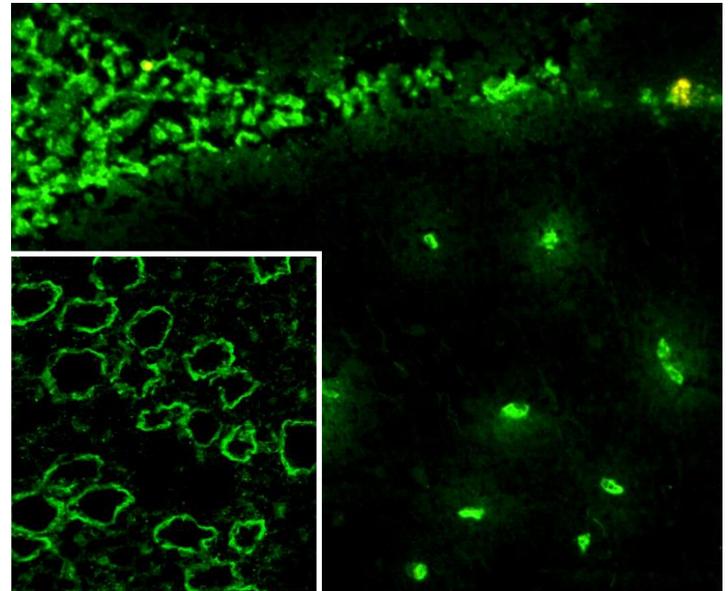
- Слепота или снижение остроты зрения (часто цветового), чаще двухстороннее;
- Слабость или парезы, пароксизмальные спазмы мышц;
- Онемение или утрата чувствительности;
- Тошнота, рвота, икота;
- Нарушения тазовых органов;
- Нарушения сна;
- Редкие: нарколепсия, анорексия, миопатия, энцефалопатия и когнитивный дефицит, гидроцефалия;
- Рецидивирующее течение;

## Неврологические синдромы:

- **Оптический неврит;**
- **Острый миелит** (поперечный продольно распространенный);
- **Синдром постремной зоны;**
- Острый ствольной синдром;
- Нарколепсия (диэнцефальный синдром);
- Церебральный синдром;
- +
- **Наличие антител к AQP4** (возможны серонегативные формы);
- Подострое течение;
- Исключить другие заболевания;
- Типичные МРТ признаки;
- Типичная иммунологическая картина ЦСЖ;

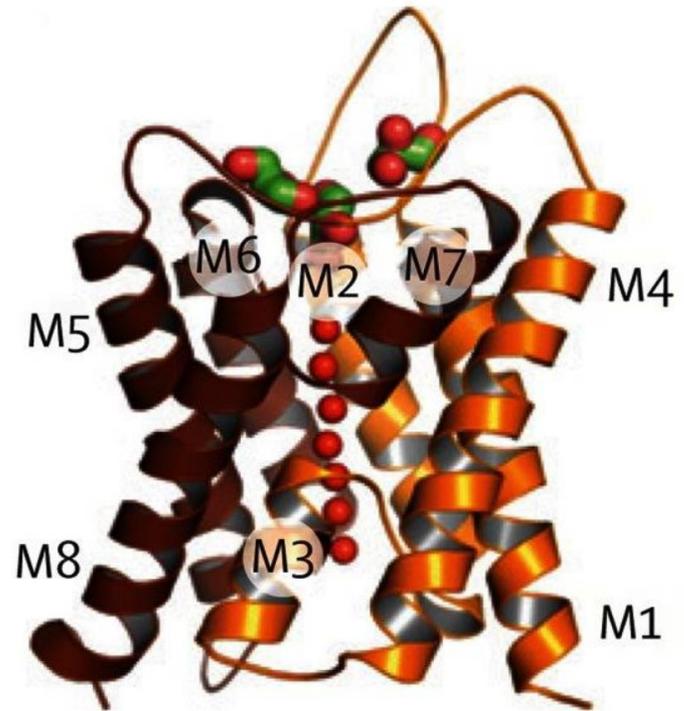
# Антитела к аквапорину 4 (AQP4)

- Впервые описаны **Vanda Lennon** и **Dean M. Wingerchuk** из клиники Мауо на серии 102 пациентов с ОНМ и 12 с оптикоспинальным-РС;
- Использовалась нРИФ на комплексных субстратах мышинных тканей (мозжечок и почка);
- Характерная реакция мягкой мозговой оболочки, сосудов и пространств Вирхова с клинической чувствительностью 78% и специфичностью 91%;



# Аквапорин 4 роль и функции

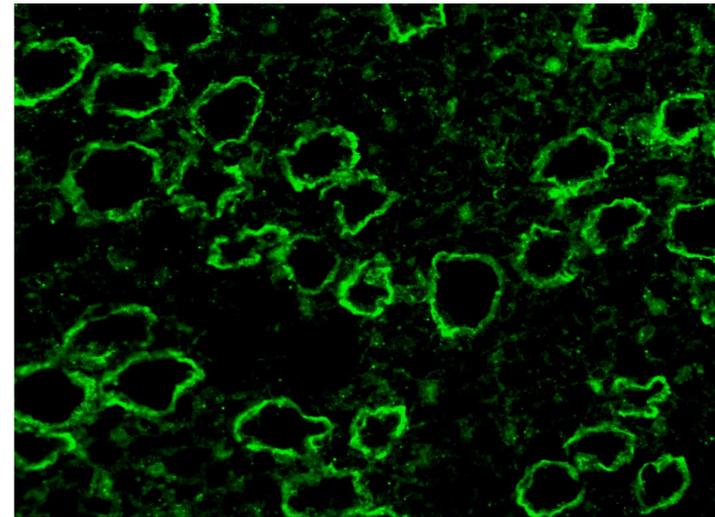
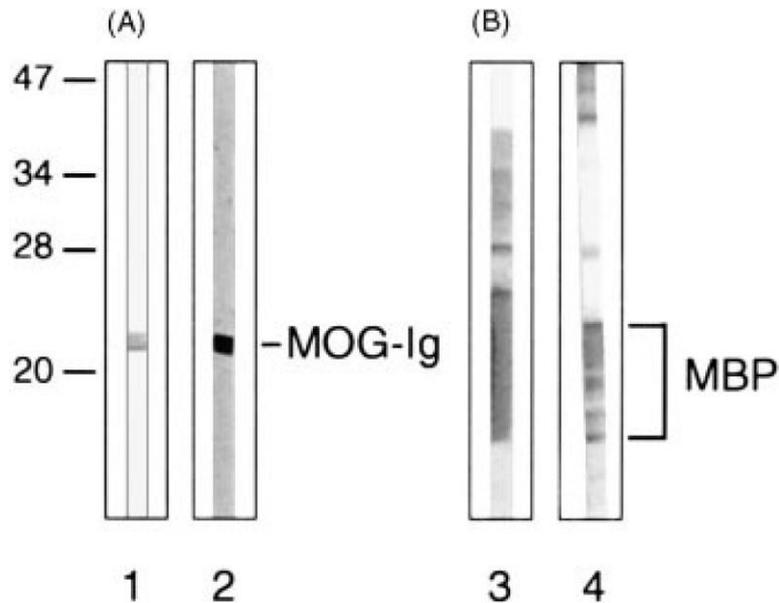
- Аквапорин принадлежит к широкому семейству (AQP0-AQP12) трансмембранных водных каналов (6 TMS) ;
- AQP4 экспрессируется в астроцитах, вокруг мелких сосудов мозга, а также в оболочках мозга;
- Также присутствует в собирательных канальцах почек, слизистой желудка, мышцах и ряде других тканей;
- Две сплайсо-формы M1-AQP1 (323AK) и M23-AQP (301AK), при этом M23 образует ортогональные полимеры, которые встречаются только в астроцитах;



# Факты про антитела к AQP4

- Возможно асимптоматическое носительство антител обычно до клинического дебюта заболевания ( *Collongues N et al. 2010*);
- Усредненная чувствительность по многоцентровым исследованиям составляет 76,7%, частота ложно-положительных результатов при РС при использовании клеточной экспрессии аутоантигена составляет 0,1% ( *Waters PJ et al. 2012*);
- Титры антител могут увеличиваться со временем - сероконверсия ( *Jarius S. et al. 2008*), медленно снижаются при успешной иммуносупрессивной терапии - серореверсия;
- В отличие от других антител поверхностным антигенам нейронов (eg. Anti-NMDA) антитела к AQP4 чаще и в более высоких титрах выявляются в сыворотке, а не в ЦСЖ;

# Методы выявления антител к AQP4 и MOG: тесты «первого» поколения

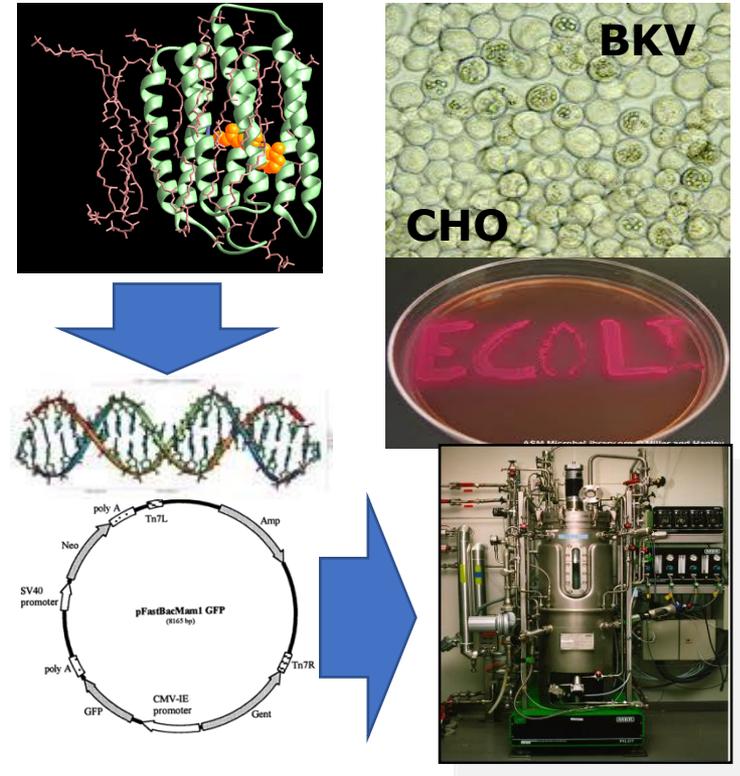


Вестерн-блот и ИФА для выявления анти-MOG: рекомбинатный фрагмент 102 АК, очищенного из бактерии продуцента (*Reindl et al., 1999;*)

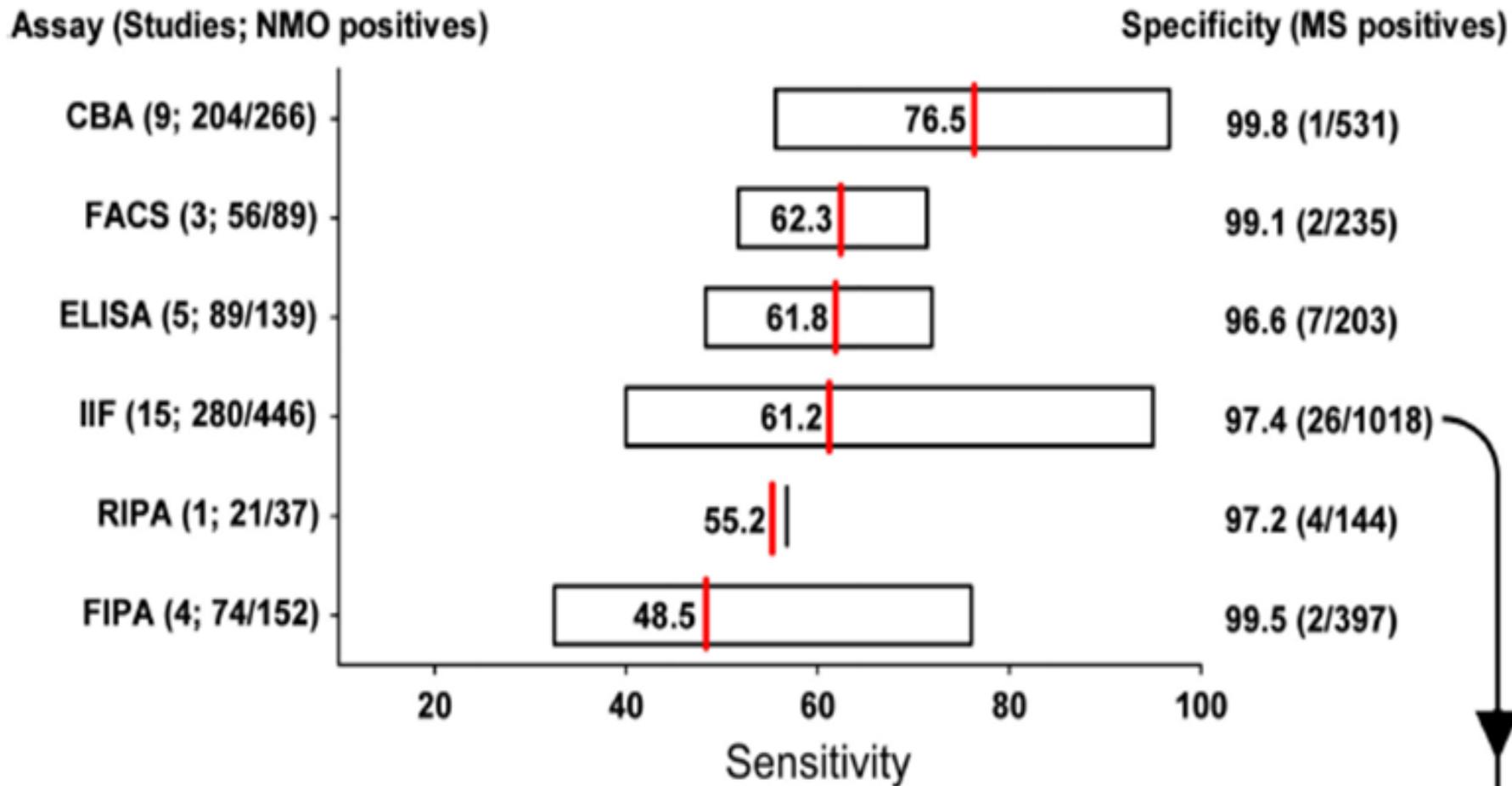
Непрямая иммунофлуоресценция для определения антител к AQP4: собирательные трубочки мозгового вещества почки мыши богатые аквапорином-4 окрашенные сывороткой пациента (*V. Lennon et al., 2004;*)

# Тесты «второго поколения» с улучшенными характеристиками

- **Тесты «первого поколения»** - очистка аутоантигенов из тканей и клеток организма/ бактериальных клеточных культур
- Частые проблемы – примеси, низкая концентрация, денатурация, неспецифические эпитопы
- Синтез иммунореактивных антигенов для тестирования, их модификация для улучшения реакций
- **Тесты «второго поколения»:** антитела к цитруллиновому пептиду (АЦЦП), дезаминированные пептиды глиадина, антитела к дсДНК-НсХ, антитела к рекомбинантной транскламиназе 2 человека
- Новый подход - выявление аутоантител на **генетически-модифицированных организмах (т.н. Cell based assay)**



# Методы определения антител к аквапорину-4



# Принцип тестирования на гено-модифицированных клеточных линиях (cell based assays) – «клеточная презентация антигена»

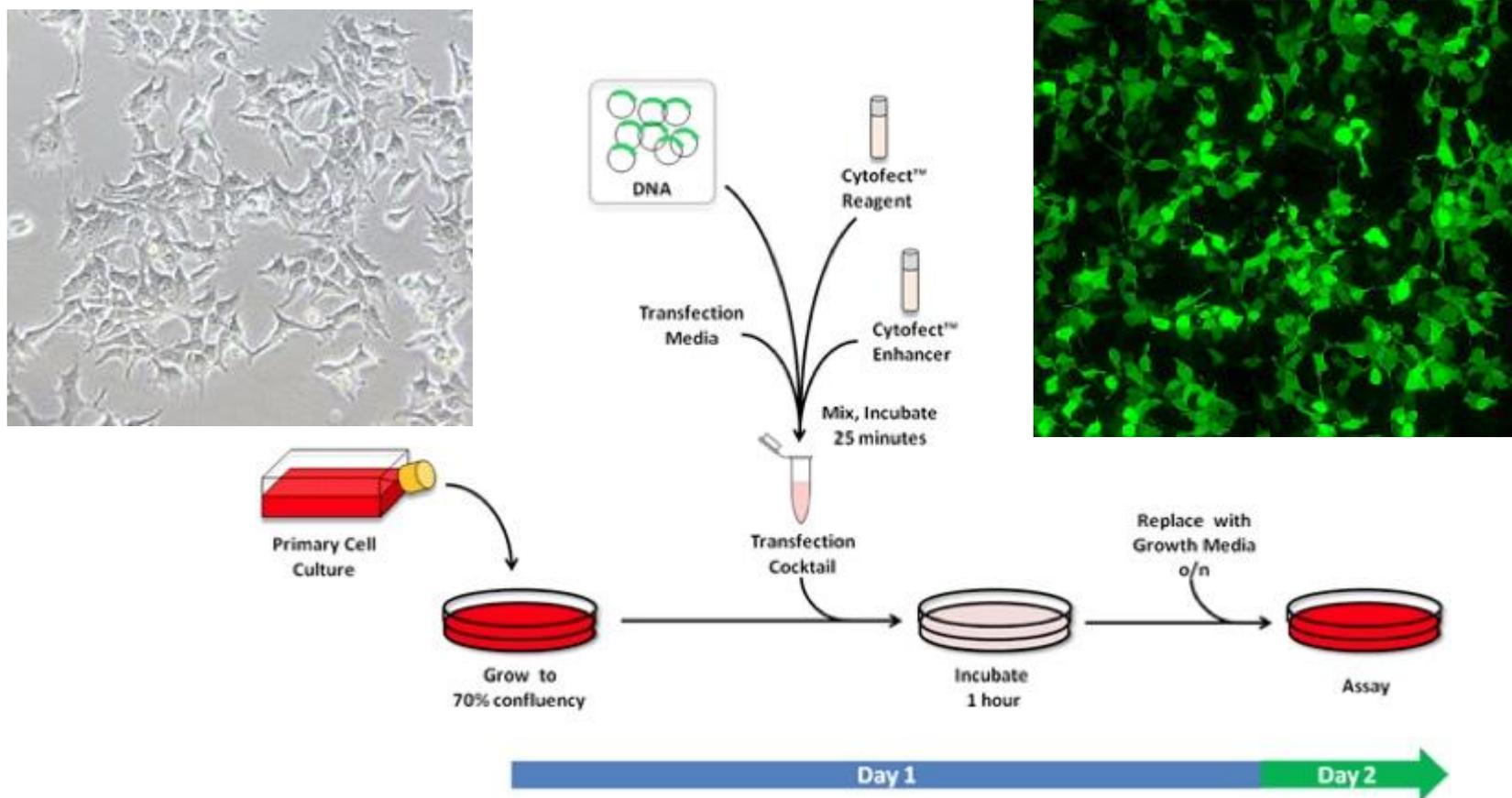
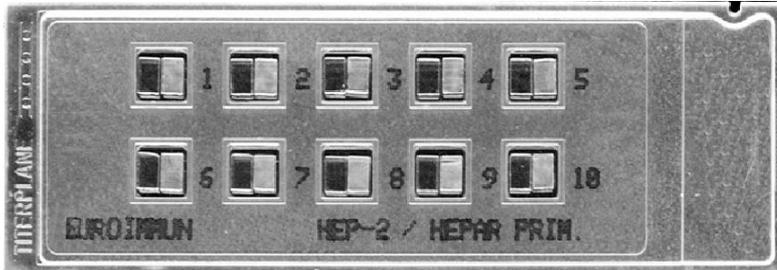


Схема эксперимента с трансфекцией клеток HEK239 целевым геном

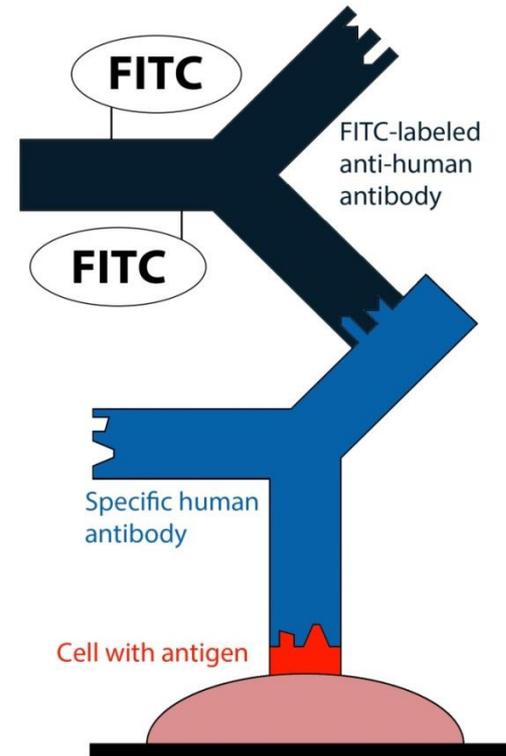
# Принцип реакции непрямой иммунофлуоресценции (нРИФ) для выявления аутоантител



Клетки, фиксированные в лунках на предметном стекле



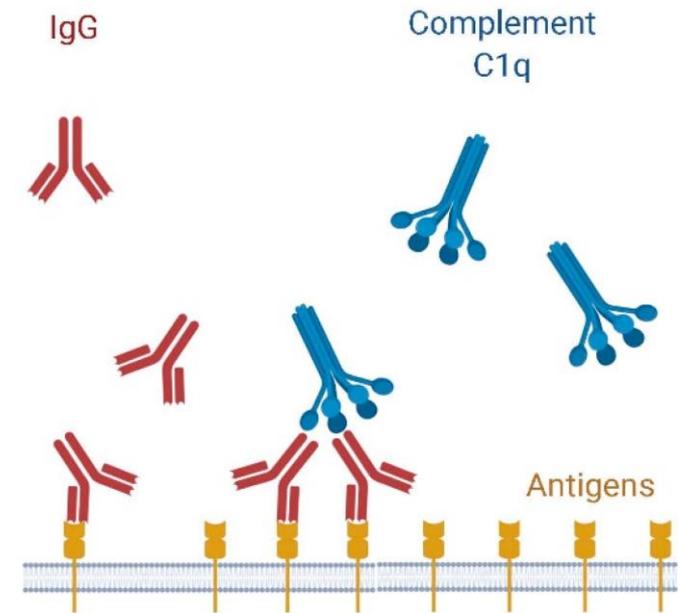
Методы детекции: проточная цитометрия или флуоресцентная микроскопия



1. Реакция аутоантител из крови пациента с антигеном
2. Отмывка нереагирующих антител
3. Визуализация: FITC-меченные античеловеческие антитела

# Антитела к AQP4

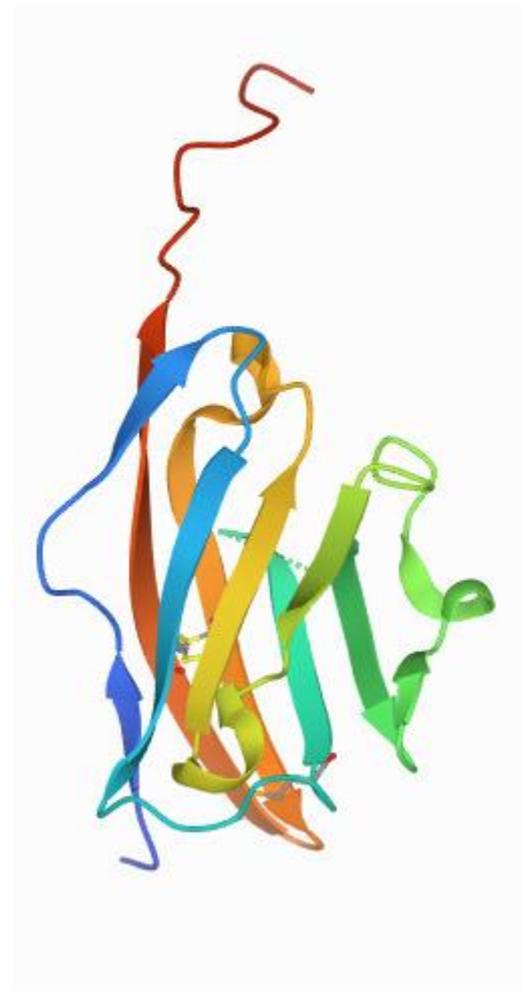
- Антитела к аквапорину синтезируются интратекально, представлены IgG1, активирующим комплемент;
- Системный синтез антител к AQP4 появляется за годы до развития заболевания;
- Титры антител коррелируют с активностью заболевания;
- Слабо сформированный ГЭБ в зрительном нерве и спинном мозге является местом клеточной инфильтрации (e.g. постремная зона);
- Астроциты лишены мембранных регуляторов активности комплемента (CD46, CD55, CD59);



M. Papadopoulos, and A S Verkman  
Lancet Neurol. 2012 Jun; 11(6): 535–544.

# MOG как мишень иммунной реакции

- Миелиновый олигодендроцитарный гликопротеин является интегральным белком мембраны олигодендроцитов;
- MOG экспрессируется только в ЦНС;
- Антитела к MOG описаны при РС (Reindl et al., 1999;), комплемент-фиксирующие антитела при ОНМ описаны Mader et al., 2011;
- Анти-MOG отмечаются 10-20% пациентов с ОНМ, часто отрицательных по анти-AQP4;
- Анти-MOG чаще у молодых мужчин, вовлечение конуса спинного мозга, чаще двусторонний неврит зрительного нерва, монофазное течение заболевания;
- Уровни антител коррелируют с клинической активностью заболевания, отмечаются у AQP4 отрицательных случаях ОНМ;



A. K. Mangalam et al.  
Brain 1999

# Клиническая чувствительность выявления анти-MOG аутоантител

**Table 1**

Sensitivity of MOG Ab in demyelinating disease. Data from (Peschl et al., 2017).

	Average sensitivity (%)	95% confidence interval (CI)
Multiple sclerosis (MS)	5.1	4.2–6.1
Acute disseminated encephalomyelitis (ADEM)	36.4	31.4–41.7
AQP4 negative ON/TM/NMOSD	26.9	23.9–30.1
AQP4 positive NMOSD	2 <sup>a</sup>	1.2–3.4
Healthy controls	1.5	

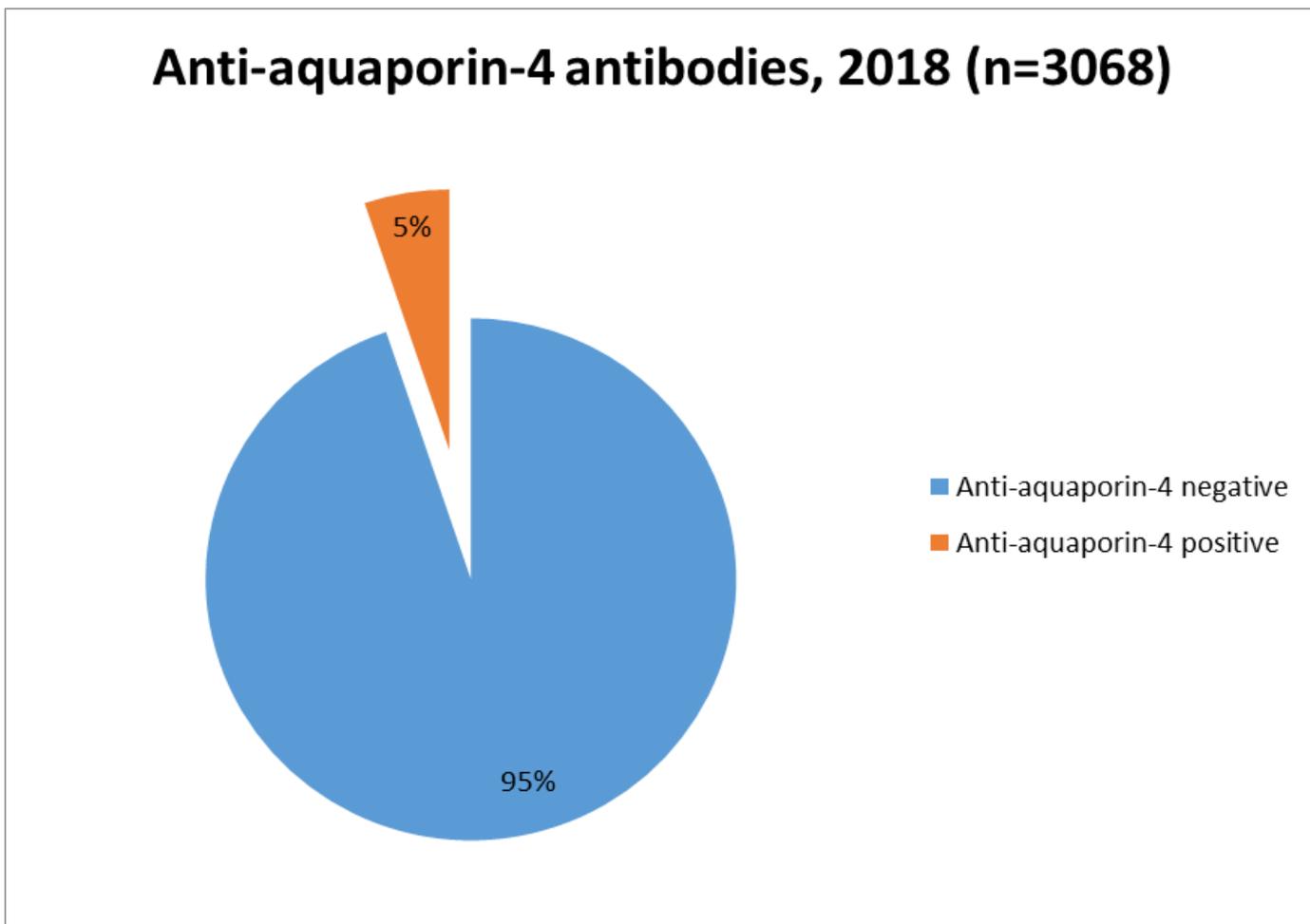
<sup>a</sup> Not significantly different from healthy controls.

# Сравнение анти-MOG+ и анти-AQP4+ ОНМ

Характеристика	Анти-MOG+	Анти-AQP4+
Возраст	5-30	30-50
Дети	Обычно <12 лет	Редко
Пол (Ж:М)	2:1	9:1
Другие АИЗ	+	>50%
Течение	Монофазное	Рецидивирующее
Двустороний ОН	+++	+
Ликвор	ОБ повышен у 30%, IgG index- N, цитоз- N	ОБ повышен у 100%, ↑Qalb, «+++» цитоз
Олигоклональный IgG	Не выявляется	Не выявляется
Реконвалесценция	Чаще полная	Неполная
МРТ	Часто признаки ОДЭМ	Классический ОНМ

«MOG энцефаломиелит»

## Выявление антител к аквапорину-4 (собственные данные)



Собственные данные за 2020-2021 год:  
результаты парного тестирования ОСВ и AQP4+

Тип ОСВ	Число ОСВ	анти AQP+
1 (норма)	327	22
2	345	2
3	21	0
4	2	0
5	3	0

# Другие лабораторные тесты для дифференциальной диагностики миелитов

- Основной белок миелина в ЦСЖ (ОДЭМ);
- Индекс интратекальной продукции антител HSV1/2;
- Антитела к боррелиям IgG/IgM;
- Серология сифилиса, туберкулеза;
- Ангиотензин-превращающий фермент (саркоидоз);
- Типирование HLA-B51 (болезнь Бехчета);
- Уровни витаминов и гормонов: B12, фолат, ТТГ;
- Аутоантитела при аутоиммунных заболеваниях: АНФ на HEp2 (SS-A), анти-ТПО, анти-AxP, анти-кардиолипин;
- Другие антинейрональные антитела: NMDA/anti-GFAP, CRMP5/амфифизин, DPPX, анти-Hu, GAD65, Yo-1, SOX...

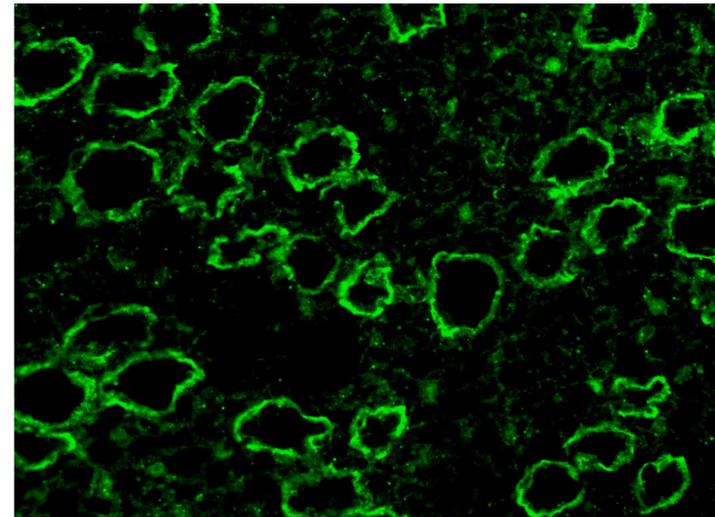
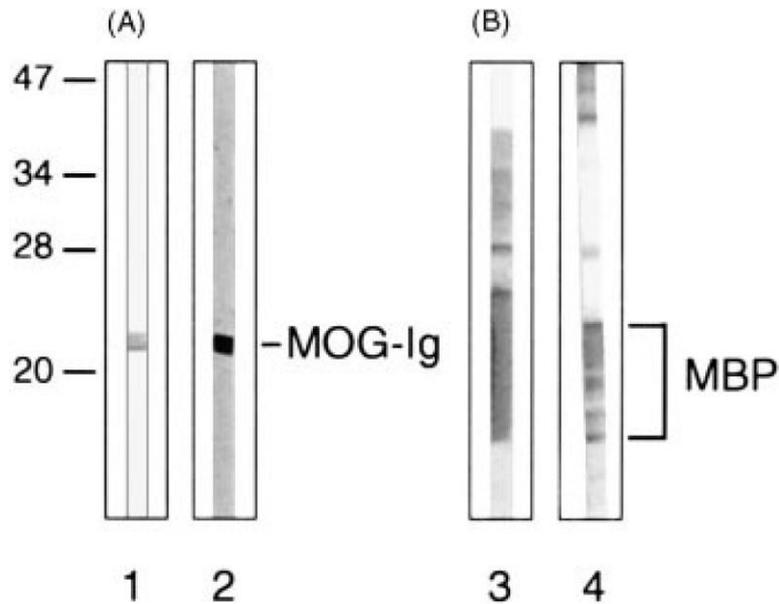
# Презентация 2

Лапин Сергей Владимирович

# Методы определения антител

- Исторически первым методом было исследование нРИФ на мозговом веществе почки грызунов, позитивная реакция собирательных трубочек (чувствительность 50-60%), а также вестерн-блот экстрактов головного мозга;
- Детекция антител с помощью ИФА с помощью рекомбинантного антигена обладала чувствительностью 63-64%, высока частота ложно положительных реакций (0,5-1,3%) (Waters P et al. 2014);
- Angela Vincent первой предложила трансфецировать клетки для поиска антител (Vincent A et al., Lancet Neurol.2011), а Dalmau J. в 2008 году описал антитела к NMDA глутаматному рецептору;
- Чувствительность клеточных тестов (клеточная презентация антигена) достигает 96,7% (факт 75-80%), при этом обладает почти 100% специфичностью;
- Существуют варианты работы с живыми клетками, использование проточной цитометрии и конфокального микроскопа;

# Методы выявления антител к AQP4 и MOG: тесты «первого» поколения

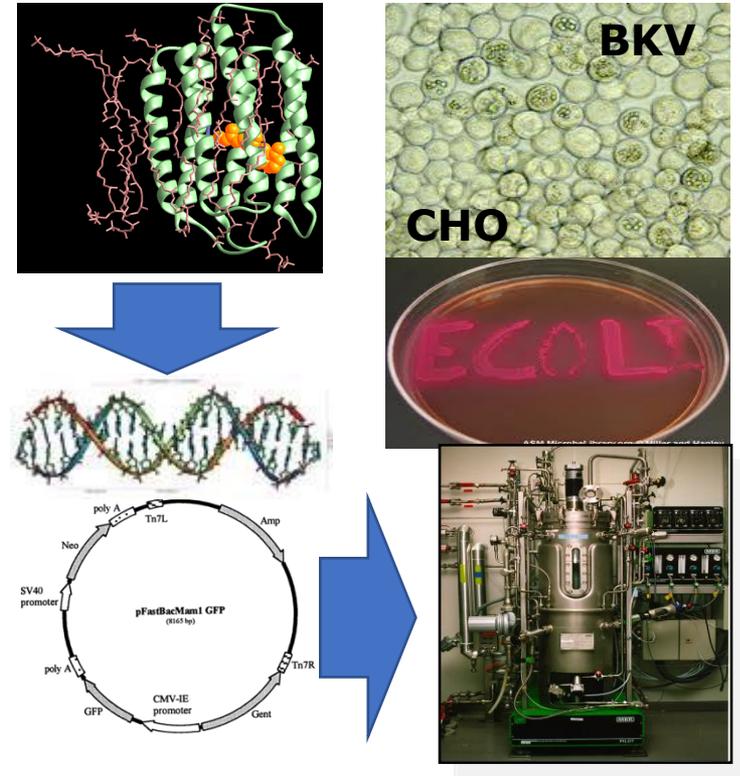


Вестерн-блот и ИФА для выявления анти-MOG: рекомбинатный фрагмент 102 АК, очищенного из бактерии продуцента (*Reindl et al., 1999;*)

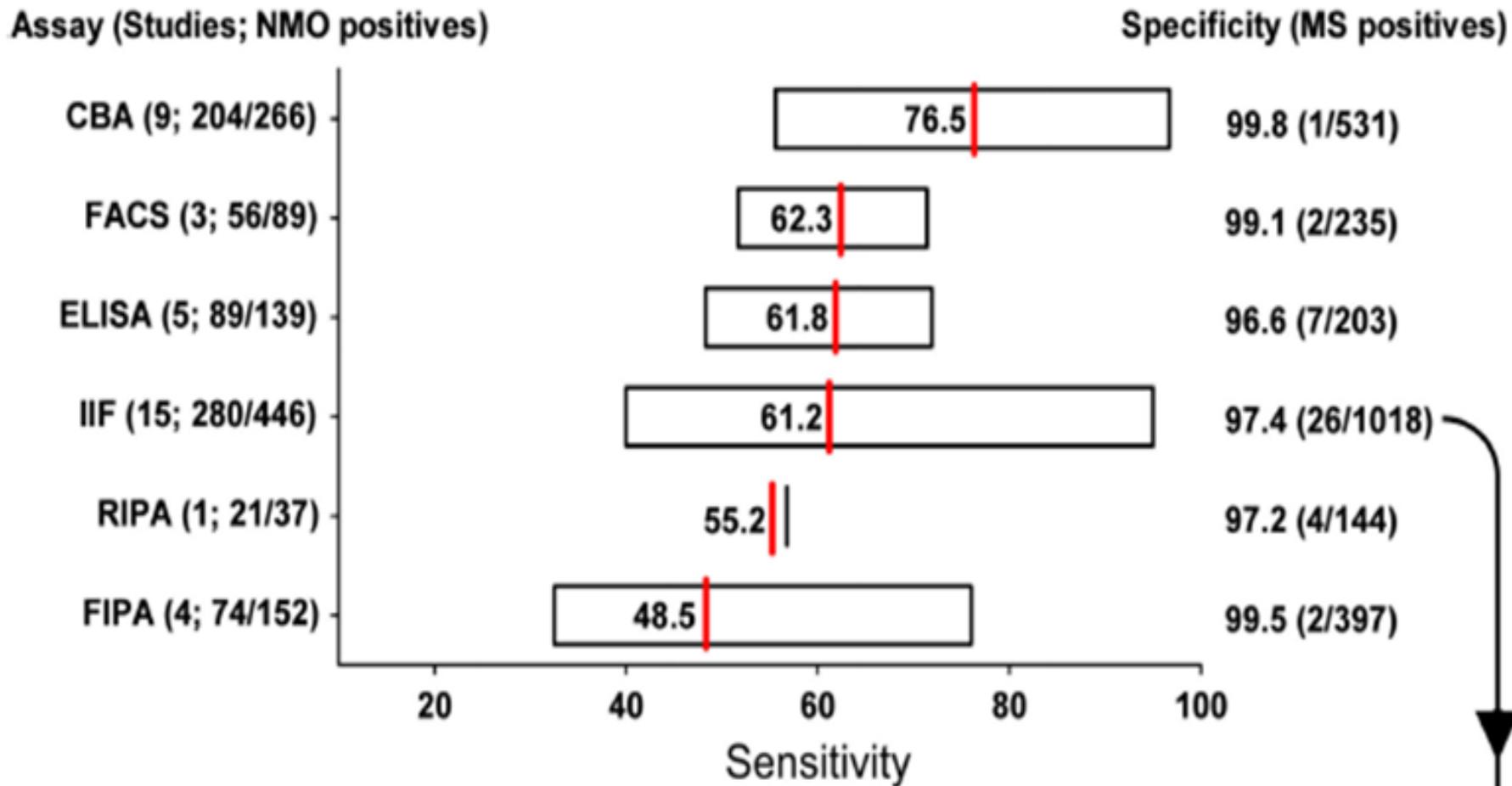
Непрямая иммунофлуоресценция для определения антител к AQP4: собирательные трубочки мозгового вещества почки мыши богатые аквапорином-4 окрашенные сывороткой пациента (*V. Lennon et al., 2004;*)

# Тесты «второго поколения» с улучшенными характеристиками

- **Тесты «первого поколения»** - очистка аутоантигенов из тканей и клеток организма/ бактериальных клеточных культур
- Частые проблемы – примеси, низкая концентрация, денатурация, неспецифические эпитопы
- Синтез иммунореактивных антигенов для тестирования, их модификация для улучшения реакций
- **Тесты «второго поколения»:** антитела к цитруллиновому пептиду (АЦЦП), дезаминированные пептиды глиадина, антитела к дсДНК-НсХ, антитела к рекомбинантной транскламиназе 2 человека
- Новый подход - выявление аутоантител на **генетически-модифицированных организмах (т.н. Cell based assay)**



# Методы определения антител к аквапорину-4



# Принцип тестирования на гено-модифицированных клеточных линиях (cell based assays) – «клеточная презентация антигена»

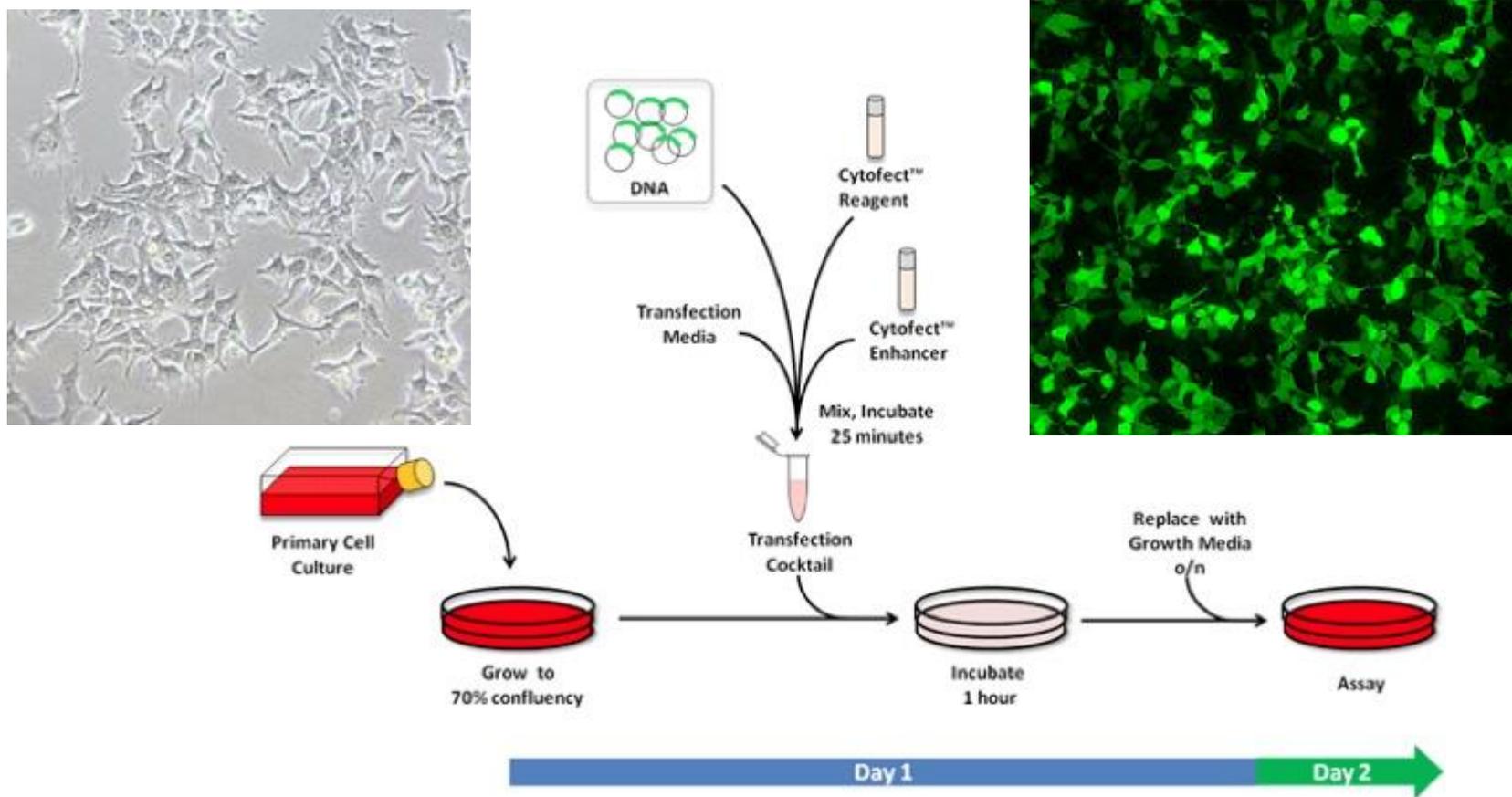
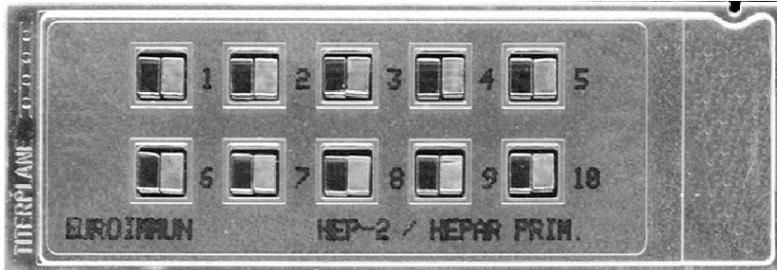


Схема эксперимента с трансфекцией клеток HEK239 целевым геном

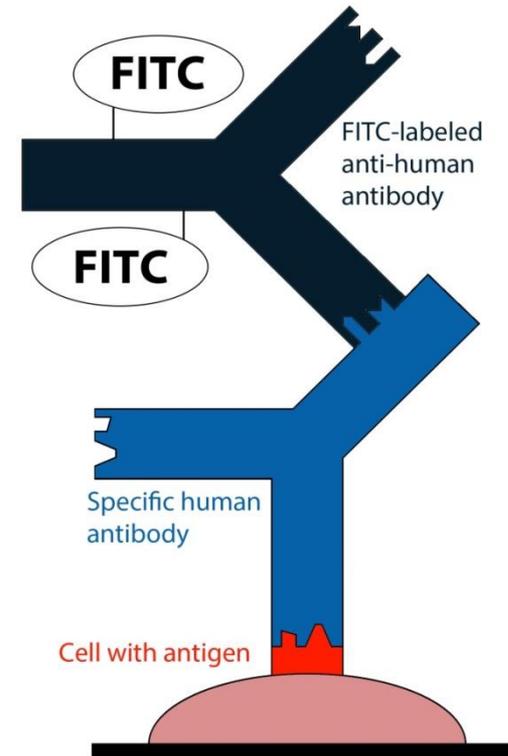
# Принцип реакции непрямой иммунофлуоресценции (нРИФ) для выявления аутоантител



Клетки, фиксированные в лунках на предметном стекле



Методы детекции: проточная цитометрия или флуоресцентная микроскопия



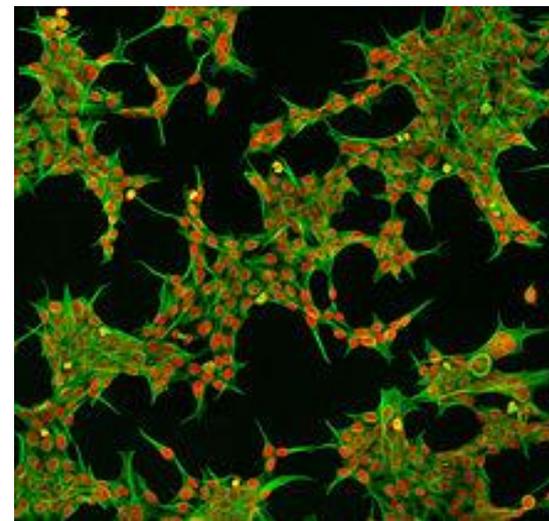
1. Реакция аутоантител из крови пациента с антигеном
2. Отмывка нереагирующих антител
3. Визуализация: FITC-меченные античеловеческие антитела

# Характеристики метода выявления антител к AQP4

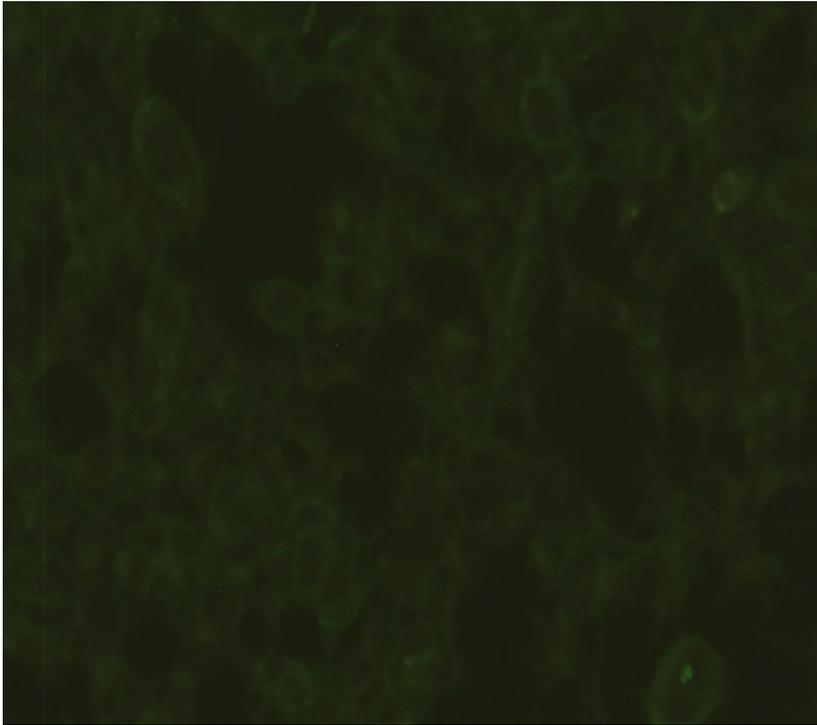
- Клеточный субстрат: адгезионная клеточная линия HEK80 (аналог HEK292);
- Трансфект: плазида M23 AQP4;
- Тип трансфекции: нестабильная трансфекция 20-30% клеток;
- Клеточная фиксация: фиксатор мембранных белков на основе глутаральдегида;
- Контроль специфичности связывания антител: поле с нетрансфицированными клетками (другие аутоантитела: АНФ, АМА, антифосфолипидные антитела и т.д.)
- Биоматериал: сыворотка крови, цереброспинальная жидкость
- Норма: антитела не обнаружен в титре 10;
- Титрование при положительной реакции: 1/10 - 1/80 - 1/320;

# Клеточная линия HEK293

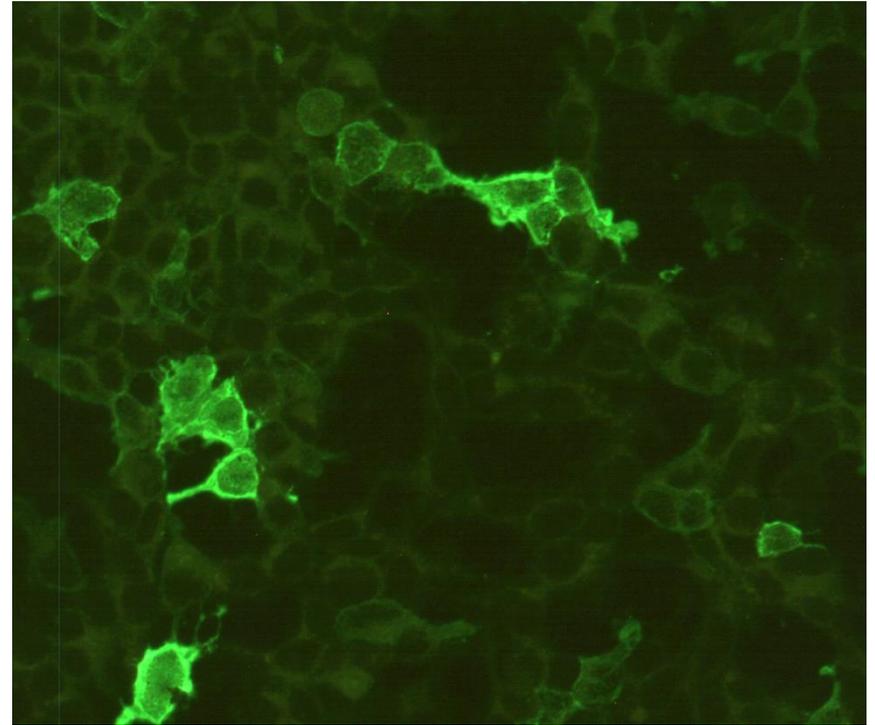
- Стандартный субстрат многих генетических экспериментов;
- Источник клеток – почки эмбриона женского пола, выделена 1973 году, трансформирована геномом аденовируса (Ad5), полиплоидна (64 хромосомы);
- Способна производить много белка особенно с плазмидными векторами, содержащими CMV промотер;
- Имеет эпителиоидную морфологию, может расти как адгезионная;
- Существует много вариантов этой линии, которые позволяют модифицировать синтез белка;



# Метод выявления антител к AQP4 на культурах гено-модифицированных HEK80 клеток (Euroimmun AG)



**Антител не обнаружено**

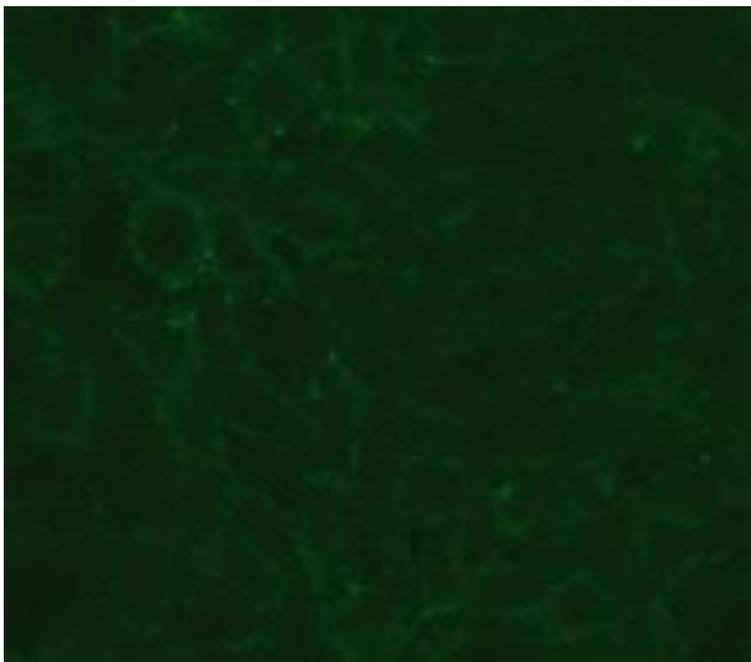


**Антитела к AQP-4  
обнаружены, титр 160**

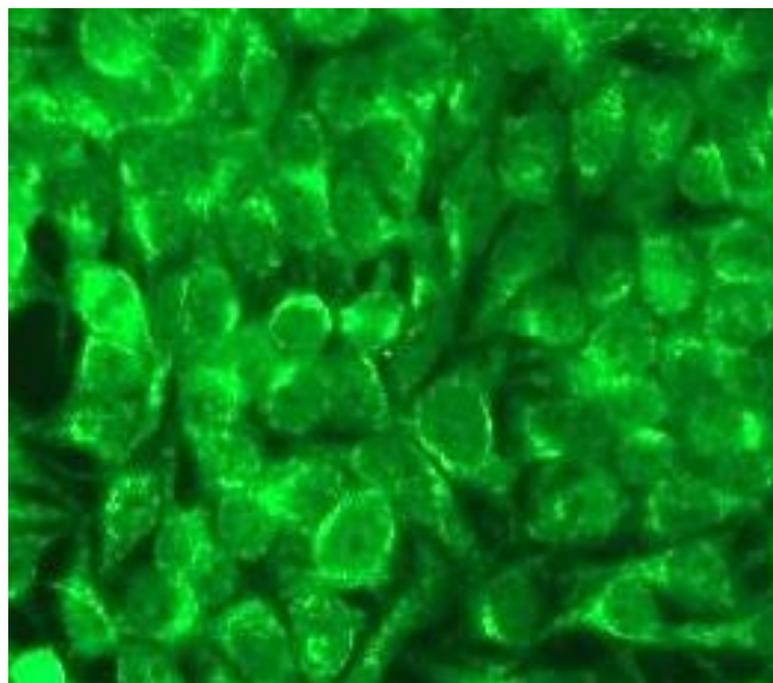
Параллельное тестирование на 2-х субстратах: адгезирующие клетки HEK293 и адгезирующие клетки, трансфицированные плазмидой с геном M23 AQP4

## Пример 1

Специфичность выявления антиклеточных антител к комплексу Гольджи на трансфицированных клеточных линиях



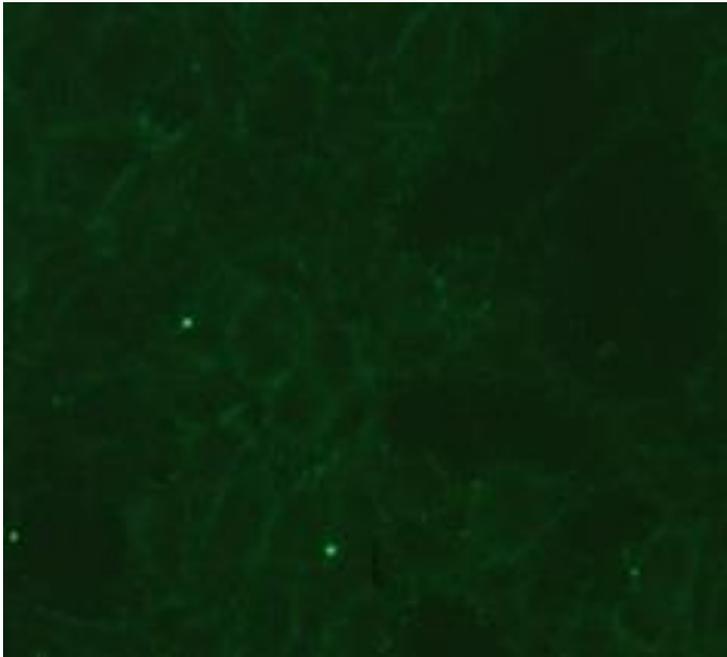
Клетки HEK80-AQP4 инкубированы с сывороткой крови, содержащей антитела к комплексу Гольджи (АС-22), титр АНФ- 1/2560, x20



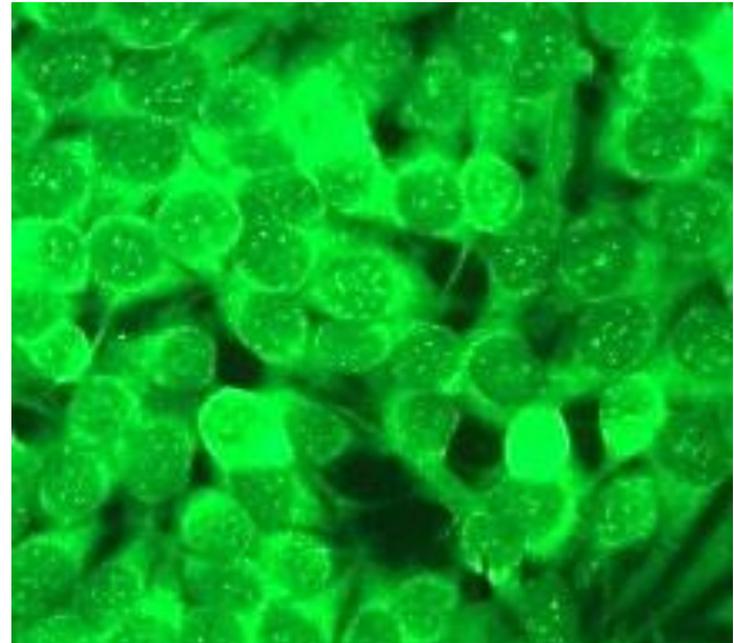
Клетки HEK80-NMDA инкубированы с сывороткой крови, содержащей антитела к комплексу Гольджи (АС-22), титр АНФ- 1/2560, x20

## Пример 2

Специфичность выявления антиклеточных антител к центромерам на трансфецированных клеточных линиях



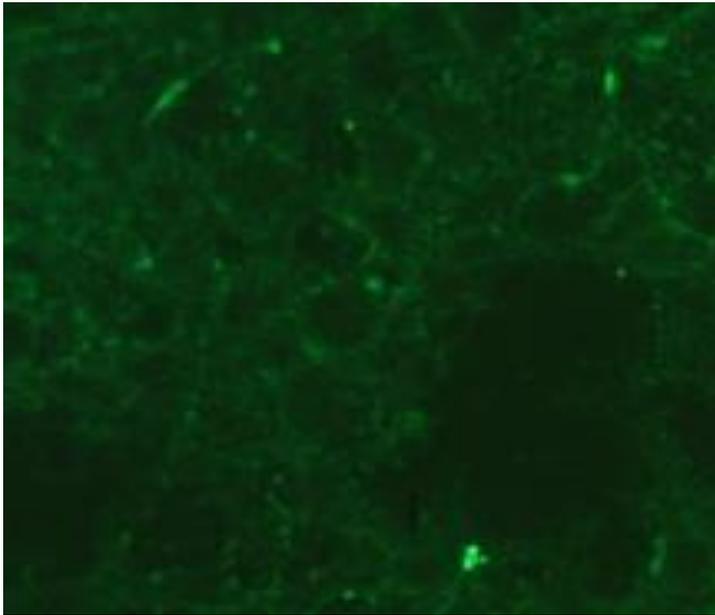
Клетки HEK80-AQP4 инкубированы с сывороткой крови, содержащей антитела к центромерам (АС-3), титр АНФ- 1/640, x20



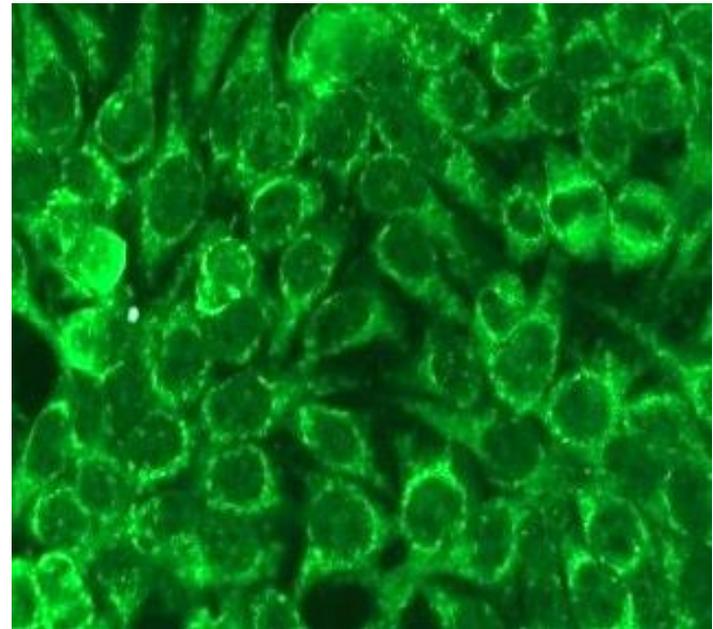
Клетки HEK80-NMDA инкубированы с сывороткой крови, содержащей антитела к центромерам (АС-3), титр АНФ- 1/640, x20

## Пример 3

### Специфичность выявления антиклеточных антител к митохондриям на трансфицированных клеточных линиях



Клетки HEK80-AQP4 инкубированы с сывороткой крови, содержащей антитела к митохондриям (АС-21), титр АНФ- 1/10120, x20



Клетки HEK80-NMDA инкубированы с сывороткой крови, содержащей антитела к митохондриям (АС-21), титр АНФ- 1/10120, x20

# Объяснение:

- Аквапорин-4 является трансмембранным водным каналом, который экспрессируется на клеточной мембране в виде агрегатов;
- Аквапорин-4 экспрессируется в клетках почки в норме, поэтому его процессинг в клеточную мембрану происходит нормально;
- Фиксация клеток HEK80-AQP глутаральдегидным фиксатором позволяет сохранить клеточную мембрану и избежать проникновения антител в цитоплазму клетки;
- NMDA рецептор является гетеротетрамером , содержащим разные субъединицы, мембранная экспрессия невозможна, поэтому белок накапливается в эндоплазматическом ретикулуме;
- Фиксация клеток HEK80-NMDA парафальмадегидом приводит изменению проницаемости клеточной мембраны и позволяет антителам реагировать с соответствующим антигеном;





Первый Санкт-Петербургский  
государственный медицинский университет  
имени академика И.П.Павлова

# Лаборатория диагностики аутоиммунных заболеваний ПСПбГМУ им.акад.И.П.Павлова

- Доступный спектр из **400 специализированных тестов**: аутоантитела, биомаркеры, электрофорез, генетика человека, витальные биопсии;
- Технические комментарии для каждого теста в зависимости от результатов обследования;
- Экспертная лаборатория в области аутоиммунной серологии : 14 программ аутоиммунной серологии, 6 программ МГИ ВОК, 359 участников в 2022

E-mail: [autoimmun@mail.ru](mailto:autoimmun@mail.ru)

**WWW.AUTOIMMUN.RU**