

ЖУРНАЛ ДЛЯ ПРАКТИКУЮЩИХ ВРАЧЕЙ

ПРАКТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА



PRACTICAL MEDICINE

JOURNAL FOR PRACTICING DOCTORS

Неврология. Рассеянный склероз

Neurology. Multiple sclerosis

ISSN 2072-1757 (print) ISSN 2307-3217 (online)

WWW.MFVT.RU WWW.PMARCHIVE.RU



Специальный выпуск
Special issue № 1-1 (68) 2013

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ДЕМИЕЛИНИЗИРУЮЩИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И НЕЙРОИНФЕКЦИИ

УДК 616.15:616.832-004.2

Г.М. АХМЕДОВА, Л.А. АВЕРЬЯНОВА, Ф.А. ХАБИРОВ, Т.И. ХАЙБУЛЛИН, Е.В. ГРАНАТОВ, Н.Н. БАБИЧЕВА, З.Ф. РАХМАТУЛЛИНА

Казанская государственная медицинская академия

Республиканский клинико-диагностический центр по демиелинизирующим заболеваниям МЗ РТ, г. Казань

Изоэлектрофокусирование иммуноглобулинов ликвора и сыворотки крови в диагностике дизиммунных неврологических заболеваний

В обзоре представлены ключевые сведения о свойствах и синтезе иммуноглобулинов и их роли в иммунных реакциях, рассмотрены принципы гель-электрофореза с изоэлектрофокусированием и пять классических паттернов распределения иммуноглобулинов класса G в ликворе и сыворотке крови, отражающие различия в патогенезе аутоиммунных заболеваний. Также приведены рекомендации по клиническому исследованию ликвора, позволяющие повысить качество лабораторной диагностики дизиммунных неврологических заболеваний.

Ключевые слова: дизиммунные неврологические заболевания, иммуноглобулины, гель-электрофорез, изоэлектрофокусирование.

G.M. AKHMEDOVA, L.A. AVERIANOVA, F.A. KHABIROV, T.I. KHAYBULLIN, E.V. GRANATOV, N.N. BABICHEVA, E.F. RAHMATULLINA

Kazan State Medical Academy

Republican Research and Clinical Center of Demyelinating Diseases by the Ministry of Public Health of the Republic of Tatarstan, Kazan

Isoelectrofocusing of serum and cerebrospinal fluid immunoglobulins in the diagnosis of disimmune neurological diseases

The key information about properties and synthesis of immunoglobulins and their role in immune reactions have summarized in this review. Principles of gel electrophoresis and isoelectric focusing of five classical patterns of immunoglobulin G in the cerebrospinal fluid and serum are discussed. There are considered the recommendations for the clinical study of cerebrospinal fluid, which enhance quality of laboratory diagnosis of disimmune neurological diseases.

Key words: disimmune neurological diseases, immunoglobulins, gel electrophoresis, isoelectric focusing.

Введение

Дизиммунные заболевания (ДЗ) нервной системы представляют актуальную проблему современной неврологии вследствие неуклонного роста их распространенности и заболеваемости, зачастую тяжелым поражением нервной системы со склонностью к хроническому течению. В связи с этим возрастает роль ранней диагностики ДЗ, где помимо клинических данных значимое место занимают лабораторные методы выявления дизиммунного процесса. Ключевое звено в патогенезе многих аутоиммунных заболеваний составляют гуморальные воспалительные процессы с выработкой специфических иммуноглобулинов (Ig). С учетом этого разработано несколько ценных лабораторных методов выявления патогенетически значимых Ig, наиболее широкое применение из которых нашли гель-электрофорез с изоэлектрофокусированием (ИЭФ) и иммуноферментный анализ. В настоящей статье

будут рассмотрены основные аспекты гель-электрофореза с ИЭФ как мало распространенного и практически не внедренного в российское здравоохранение метода лабораторной диагностики воспалительных заболеваний нервной системы.

Понятие об иммуноглобулинах

Ig — группа гликопротеинов, участвующих в воспалительном процессе посредством связывания со специфическими антигенными мишенями и рецепторами иммунных клеток. Основная структурная единица Ig состоит из двух тяжелых цепей и двух легких, представленных каппа- или лямбда-типами. У млекопитающих, в зависимости от молекулярного строения, выделяют 5 классов Ig: A, D, M, G, E. Принадлежность Ig к определенному классу и подклассу находится в зависимости от строения их тяжелой цепи [1].

Ig представляет собой бифункциональную молекулу, одна область которой предназначена для связывания с антигеном



(V-область — отличается гипервариабельностью строения), другая осуществляет эффекторные функции (С-область — характеризуется постоянством строения): связывание с тканями организма, различными иммунными клетками, фагоцитарными клетками и первым компонентом комплемента (C1q) при активации этой системы сывороточных белков по классическому пути [2].

Синтез Ig осуществляется плазматическими клетками — активированными и трансформированными В-лимфоцитами (В-л). Для активации В-л одновременно необходимо взаимодействие их Ig-рецепторов с целевым антигеном и его презентация Т-лимфоцитам (Т-л), которые посредством секреции провоспалительных цитокинов (фактор некроза опухоли альфа, интерферон гамма, интерлейкин 2) дополнительно стимулируют В-л. Активация, селекция и пролиферация В-л происходит во вторичной лимфоидной ткани (лимфатических узлах) с герминативным центром. В структуре герминативного центра выделяют три зоны: темную, базальную светлую и апикальную светлую. В темной зоне происходит первичная пролиферация активированных В-л. В базальной светлой зоне В-л проходят процессы селекции, в апикальной светлой зоне происходит дальнейшая дифференцировка В-л в плазматические клетки или в клетки памяти [1].

Одной из главных особенностей Ig является их полиморфизм, обеспечивающий иммунные реакции при огромном разнообразии антигенов, обеспечиваемый вариабельностью генов, кодирующих различные компоненты белковых цепей. Легкие цепи Ig кодируются генными сегментами V и J (от англ. joining — соединительный сегмент). В кодировании тяжелых цепей, помимо сегментов V и J, участвуют сегменты D (от англ. diversity — разнообразие), привносящие дополнительное разнообразие. Рекомбинации ограниченного числа генных сегментов V, D и J обеспечивают бесконечное число вариабельных доменов разной специфичности, и их активность отчасти регулируется двумя генами (RAG-1 и RAG-2, от англ. recombination-activating genes). После антигенной стимуляции в генах легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов происходят точечные соматические мутации. Дополнительное создание разнообразия Ig обеспечивается псевдо-V-генами, вставками добавочных нуклеотидов, изменением позиции стыковки генных сегментов и рамок считывания сегментов D. Переключение изотипа Ig обусловлено рекомбинацией VDJ-генов с различными С-генами (от англ. constant — постоянный) и дифференциальным сплайсингом РНК [3].

Роль иммуноглобулинов в патогенезе дизиммунных заболеваний нервной системы

При заболеваниях нервной системы аутоиммунной этиологии в сыворотке крови или ликворе появляются Ig, направленные против специфических антигенных мишеней: компонентов клеточной мембраны, рецепторы и т.п. Особое значение в запуске и поддержании острого или хронического аутоиммунного поражения нервной системы отводится Ig классов М и G. В частности, первичная иммунизация вызывает преимущественное образование Ig М [4]. Повторное введение антигена стимулирует образование Ig G. Для многих аутоиммунных заболеваний нервной системы с применением ИФА установлены свои лабораторные маркеры — Ig с различной степенью специфичности, направленные на определенные антигенные мишени.

В результате продолжительного синтеза моноклональными или олигоклональными плазматическими клетками при хронических аутоиммунных процессах с доминированием гуморального звена воспаления, специфические Ig в сыворотке крови и/или ликворе накапливаются в особо большой концентрации, не наблюдаемой в норме. Таким образом, формируются моно- или олигоклональные фракции специфических Ig. Схожий процесс происходит и при миеломной болезни, когда однотипный клон дефектных плазматических клеток синтезируют неполноценный (например, только легкие цепи Ig, ди-

мерные легкие цепи [белок Бенс-Джонса]) или полноценный Ig различных классов, обладающий иммунными свойствами. Диагностика данного явления служит ценной информацией для объективизации хронического аутоиммунного или парапротеинемического процесса. С этой целью в настоящее время широко применяют гель-электрофорез с ИЭФ белков с последующим иммуноблотингом Ig [5].

Принцип гель-электрофореза с изоэлектрофокусированием и отличие от стандартного гель-электрофореза

При стандартном электрофорезе разделяемая смесь белковых молекул вносится в виде узкой зоны, как правило, со стороны катода (отрицательный заряд). Разделение происходит в процессе вынужденной электромиграции молекул образца в слое инертной матрицы (ацетилцеллюлоза, крахмал, агароза, полиакриламидный гель, сефадекс и т.п.), насыщенного буфером с определенным значением pH. Белки мигрируют с постоянной скоростью, поскольку в данном буферном растворе они несут постоянный суммарный поверхностный заряд, постепенно разделяясь и формируя отдельные фракции в соответствии с зарядом и размером молекул. Если поверхностный заряд белковых молекул отрицательный, то они мигрируют от катода, заряженного отрицательно, к положительному аноду. В то же время фракции в ходе электрофореза под действием тепловой диффузии макромолекул расширяются. При обычном электрофорезе стационарное молекул состояние в принципе недостижимо и процесс разделения необходимо прервать в какой-то момент, прежде чем произойдет элюция мигрирующих компонентов в анодную камеру [5].

При ИЭФ, наоборот, устанавливается стабильный градиент pH, уменьшающийся в направлении от катода к аноду, формирующийся за счет электрофоретического распределения амфолитов-носителей в подходящей антиконвекционной среде. Попадая в такую систему, белки начинают мигрировать в электрическом поле соответственно поверхностному заряду молекул. Если определенная молекула на данном участке градиента при данном значении pH заряжена положительно, то она будет мигрировать к катоду, т.е. в сторону увеличения pH. По мере такого продвижения положительный заряд этой молекулы будет уменьшаться, а отрицательный возрастать, например, за счет депонирования аминогрупп и карбоксильных групп. В итоге молекула достигает такой зоны, где ее электрический заряд окажется равным нулю, т.е. зоны с pH равной pI этой молекулы. Следовательно, в процессе ИЭФ скорость миграции белка постоянно уменьшается, поскольку его суммарный поверхностный заряд, соответствующий положению равновесия протонирования-депротонирования также уменьшается, стремясь к нулю. В конце концов миграция белковой молекулы полностью приостанавливается. Как только молекула случайно выйдет за пределы зоны pI, она тотчас приобретет отличный от нуля заряд и вынуждена будет вернуться к равновесному положению. Таким образом, электрическое поле прямо противодействует диффузии и, при соответствующих условиях белки или иные амфотерные макромолекулы достигают своего равновесного стационарного положения, вблизи которого они концентрируются в виде необычайно узких фракций [6].

Для последующей визуализации сфокусированных молекул Ig применяют метод иммуноблотинга. Образец обрабатывают раствором специфических антител (антисывороткой), затем инкубируют его в растворе, содержащем анти-Ig G, «сшитый» с пероксидазой. При последующей инкубации с перекисью водорода и 3,3'-диаминобензидином комплексы антиген-антитело-пероксидаза проявляются в виде окрашенных полос [7].

Паттерны распределения фракций иммуноглобулинов в сыворотке крови и ликворе

Гель-электрофорез с ИЭФ и иммуноблотингом — «золотой» стандарт качественного определения моно- и олигоклональных фракций Ig G в ликворе и сыворотке крови, особенно в

диагностике рассеянного склероза (РС). Другие методы электрофореза с этой целью в настоящее время не проводятся и представляют только исторический интерес, так как обладают меньшей специфичностью, а методологически более трудоемки и сложны [8].

В процессе гель-электрофореза с ИЭФ одновременно исследуют ликвор и разведенную в 400-500 раз сыворотку крови (для уравнивания концентрации Ig) одного больного. В процессе исследования белковые фракции распределяются в две параллельные друг другу полосы, что позволяет оценить паттерн распределения IgG в пространстве, в зависимости от их количества и заряда молекул. Оценка распределения фракций IgG проводится визуально, поэтому всегда существует вероятность влияния на интерпретацию результатов субъективного человеческого фактора (компьютерного программного анализа ИЭФ в рутинную практику до настоящего времени не внедрено). Принято выделять 5 классических паттернов распределения IgG, в большинстве случаев отражающих кардинальные различия в патогенезе заболеваний (рисунок и таблица) [8, 9].

Тип I — Отсутствие моно- и олигоклональных фракций IgG в ликворе и сыворотке крови (поликлональные Ig). Наблюдается в норме или на начальных стадиях РС при наличии очевидной неврологической симптоматики.

Тип II — Олигоклональные фракции IgG в ликворе, отсутствующие в сыворотке крови, что указывает на изолированный интратекальный синтез IgG. Олигоклональные IgG характеризуются наличием множества фракций Ig с неравномерным разбросанным распределением их в пространстве, с отсутствием тенденции к сохранению градиента концентрации. Наличие олигоклональных IgG в ликворе характерно для РС, подострого склерозирующего панэнцефалита Людо ван Богарта, нейросифилиса, реже для острого рассеянного энцефаломиелита (ОРЭМ). При РС паттерн распределения олигоклональных IgG достаточно стабильный, а количество фракций IgG с течением времени только возрастает (расширение спектра эпитопов), вне зависимости от лечения [10].

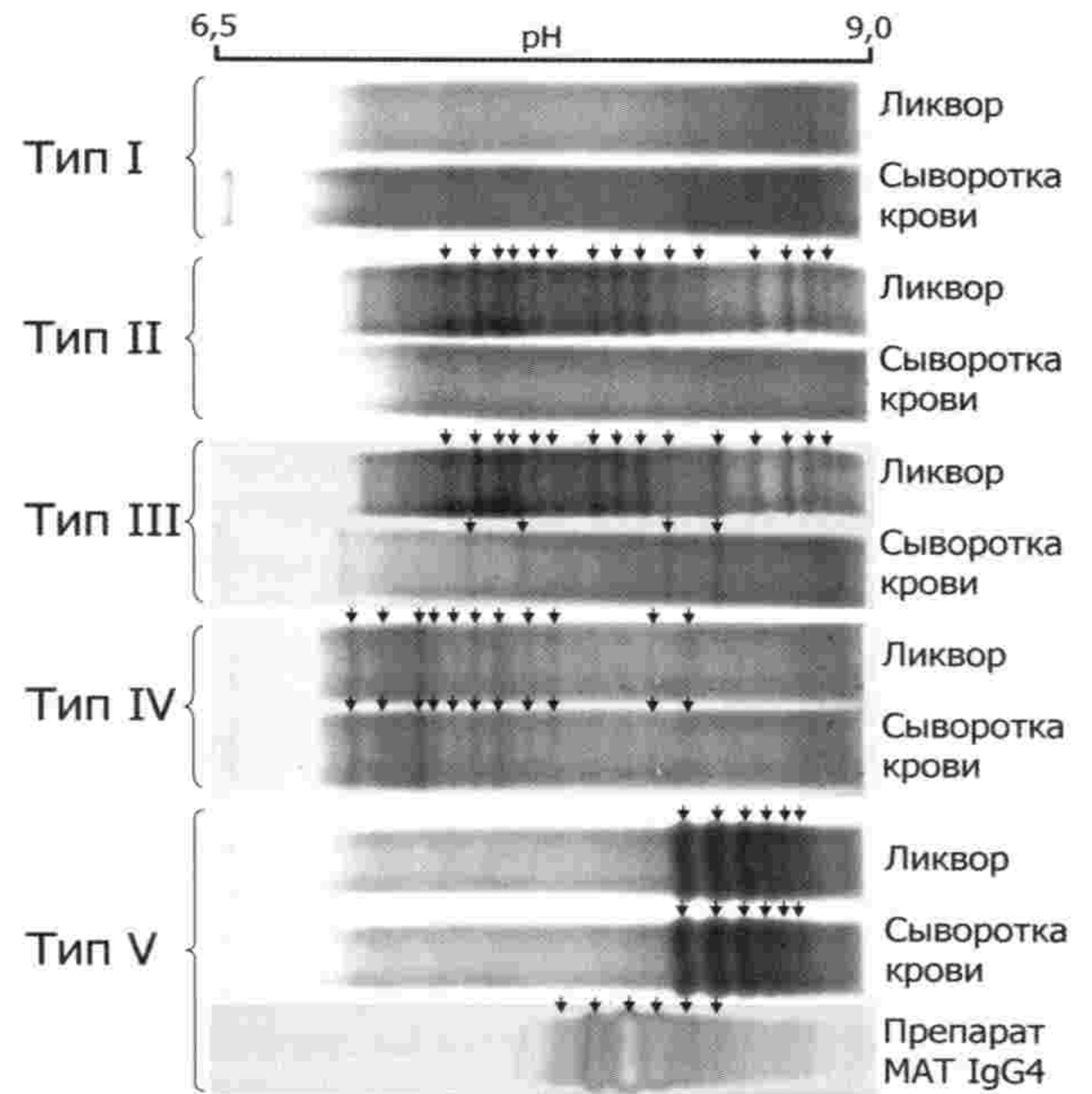
Тип III — Олигоклональные фракции IgG в ликворе, от-

части присутствующие в сыворотке крови. Также указывает на интратекальный синтез IgG. Часто выявляют при ОРЭМ, хронических нейроинфекциях, РС.

Тип IV — Идентичные олигоклональные фракции IgG в ликворе и в сыворотке крови, указывающие на хронический системный дизиммунный процесс с повышенной проницаемостью ГЭБ. Признак может быть ассоциирован с ОВДП, ОРЭМ, системной красной волчанкой, антифосфолипидным синдромом [11].

Рисунок.

Классические паттерны распределения IgG в процессе гель-электрофореза с изоэлектрофокусированием и иммуноблотингом.



Пояснения в тексте.

Примечание: MAT — моноклональные антитела

Таблица.

Паттерны распределения фракций IgG при различных дизиммунных заболеваниях нервной системы [10, 16]

Тип I	Начальная стадия РС (при очевидной неврологической клинической картине)
Тип II	РС Адренолейкодистрофия (редко) Нейроинфекции: — нейросифилис; — подострый склерозирующий панэнцефалит Людо ван Богарта; — прогрессирующий краснушный панэнцефалит. — трипаносомоз.
Тип III	РС Нейросифилис Системная красная волчанка Саркоидоз
Тип IV	ОРЭМ ОВДП Системная красная волчанка Системные инфекции — нейро-СПИД — нейроборрелиоз. Антифосфолипидный синдром
Тип V	Миеломная болезнь (множественная миелома) Лимфопролиферативные заболевания Паранеопластические заболевания Моноклональная гаммапатия неопределенного значения ХВДП, ассоциированная с М-протеином Вегетативная полиневропатия Заболевания спектра оптикомиелита

Тип V — Моноклональные фракции IgG в ликворе и сыворотке крови указывают на дис- или парапротеинемическую моноклональную гаммапатию. Моноклональные IgG характеризуются наличием множества фракций Ig с равномерным распределением в пространстве, с сохранением градиента концентрации при ИЭФ, что связано с особенностями синтеза парапротеина (посттрансляционные модификации, например, гликозилирование, несколько изменяющие изоэлектрическую точку фокусирования моноклональных Ig). Моноклональные IgG — специфичный признак миеломной болезни, моноклональной гаммапатии неопределенного значения, ассоциирован с некоторыми формами ХВДП и с заболеваниями спектра оптикомиелита [9, 10].

Общие рекомендации по исследованию ликвора

Для повышения диагностической ценности гель-электрофореза с ИЭФ, применяют только нативный неконцентрированный ликвор, который исследуется параллельно с сывороткой крови того же больного, что способствует оценить распределение Ig в двух изолированных гематоэнцефалическим барьером (ГЭБ) средах. Очевидным признаком изолированного интратекального синтеза IgG является визуальное выявление олигоклональных фракций IgG в ликворе при отсутствии их в сыворотке крови. Для объективизации исследования ИЭФ необходимо проводить с положительным и отрицательным контрольными биообразцами, что позволяет оценить состояние антисыворотки и качество ферментативного окрашивания. Все исследование признается недействительным, если положительный контроль практически не окрашивается или отрицательный контроль окрашивается чрезмерно, что не позволяет объективно визуализировать фракции Ig. Визуальную интерпретацию результатов исследования необходимо проводить опытному неврологу, его заключение должно быть строго формализованным, в соответствии с 5 классическими паттернами, отражающими качественные свойства синтеза Ig. Если очевидные клинические данные не соответствуют отрицательным лабораторным результатам, то целесообразно повторное исследование ликвора через 3-6 месяцев. Результаты исследования ликвора и ИЭФ на ранних стадиях заболевания (в частности РС) могут быть отрицательными, но с течением времени становятся положительными [8].

Помимо гель-электрофореза с ИЭФ, неврологу целесообразно осуществлять полноценное клиническое исследование ликвора, включающее цитологическое исследование с определением количества и морфологии клеточных элементов, определение концентрации белка (желательно альбумина), концентрации глюкозы. Подсчет клеточных элементов рекомендовано выполнять не позднее 2 часов после забора ликвора, в противном случае изменение фор-

мы клеток может вызвать затруднения в определении клеточного фенотипа. Большое количество эритроцитов ($5-7 \times 10^9/\text{л}$) может указывать на наличие путевой крови в ликворе вследствие травматичной поясничной пункции и затрудняет объективную интерпретацию других количественных характеристик ликвора. Примерно у 34% больных РС в ликворе определяется повышенное количество лейкоцитов ($>5 \times 10^9/\text{л}$). Очень высокое количество лейкоцитов ($>50 \times 10^9/\text{л}$) для РС не характерно и, скорее, свидетельствует об инфекционном процессе. Низкая концентрация глюкозы (по сравнению с сывороточной глюкозой, ликвор/сывороточное соотношение $<0,4$) и высокое содержание белка ($>1 \text{ г/л}$) характерно для инфекционного или паранеопластического процесса [13].

Для оценки проницаемости ГЭБ более предпочтителен подсчет индекса ликворного/сывороточного альбумина и индекса IgG. Индекс IgG рассчитывается по формуле: соотношение концентраций IgG ликвора/сыворотки крови, поделенное на соотношение концентраций альбумина ликвора/сыворотки крови. Концентрацию Ig и альбумина оценивают фотоэлектроколориметром по методу нефелометрии (от греч. *perhéle* — облако) — методу измерения интенсивности рассеянного в среде видимого или ультрафиолетового света, в зависимости от концентрации растворов. Референтные значения индекса ликворного IgG в норме — менее 0,85. Повышение индекса IgG отражает повышение проницаемости ГЭБ. В то же время повышенный индекс IgG не коррелирует с количеством олигоклональных IgG в ликворе. Выявление легких цепей в ликворе отчасти позволяет выявить интратекальный синтез Ig на ранних стадиях [14, 15].

Заключение

В настоящее время разработаны достаточно простые и надежные методы гель-электрофореза с ИЭФ, позволяющие внедрять их в рутинную практику, тем не менее из-за высокой стоимости оборудования и требуемых к нему реактивов в российском здравоохранении данное исследование применяется редко и осуществляется только в отдельных медицинских центрах, в том числе в Республиканском клинко-диагностическом центре по демиелинизирующим заболеваниям Министерства здравоохранения Республики Татарстан (РКДЦ ДЗ МЗ РТ, www.rkbvl.ru). В мировой практике гель-электрофорез с ИЭФ весьма популярен и признан ценным методом лабораторной диагностики РС — наиболее социально-экономически значимого демиелинизирующего заболевания. Ежегодно в России прослеживается рост распространенности РС и других форм демиелинизирующих заболеваний нервной системы, что позволяет рекомендовать более широкое внедрение гель-электрофореза с ИЭФ в отечественную неврологическую практику.

ЛИТЕРАТУРА

1. Paul W.E. Fundamental immunology // W.E. Paul. — Lippincott Williams & Wilkins, 2008. — 1603 p.
2. Minagar A. Inflammatory disorders of the nervous system: pathogenesis, immunology, and clinical management // A. Minagar, J.S. Alexander. — Humana Press, 2005. — 376 p.
3. Ройт А. Иммунология / пер. с англ. // А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл. — М.: Мир, 2000. — 592 с.
4. Sharief M.K. Immunoglobulin M in the cerebrospinal fluid: an indicator of recent immunological stimulation // M.K. Sharief, E.J. Thompson // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. — 1989. — Vol. 52. — P. 949-953.
5. Ригетти П. Изоэлектрическое фокусирование: теория, методы и применение / П. Ригетти. — М., 1986. — 398 с.
6. Остерман Л.А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами / Л.А. Остерман. — М., 1983. — 304 с.
7. Yua X. Intrathecally synthesized IgG in multiple sclerosis cerebrospinal fluid recognizes identical epitopes over time // X. Yua, M. Burgoona, M. Green [et al.] // J. Neuroimmunol. — 2011. — Vol. 240. — P. 129-136.
8. Freedman M.S. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis // M.S. Freedman, E.J. Thompson, G. Giovannoni [et al.] // Arch. Neurol. — 2005. — Vol. 62. — P. 865-870.

9. Pittock S.J. Aquaporin-4 autoantibodies in a paraneoplastic context // S.J. Pittock, V.A. Lennon // Archives of neurology. — 2008. — Vol. 65. — P. 629-632.

10. Confavreux C. Oligoclonal «fingerprint» of CSF IgG in multiple sclerosis patients is not modified following intrathecal administration of natural beta-interferon // C. Confavreux, C. Chapuis-Cellier, P. Araud [et al.] // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. — 1986. — Vol. 49. — P. 1308-1312.

11. Ijdo J.W. Anti-phospholipid antibodies in patients with multiple sclerosis and MS-like illnesses: MS or APS? // J.W. Ijdo, A.M. Conti-Kelly, P. Greco // Lupus. — 1999. — Vol. 8. — P. 109-115.

12. Bida J.P. Disease associations with monoclonal gammopathy of undetermined significance: a population-based study of 17,398 patients // J.P. Bida, R.A. Kyle, T.M. Themeau [et al.] // Mayo Clin. Proc. — 2009. — Vol. 84. — P. 685-693.

13. Deisenhammer F. Routine cerebrospinal fluid (CSF) analysis // F. Deisenhammer, A. Bartos, R. Egg [et al.] // European handbook of neurological management. — 2006. — Chapter 4. — P. 14-27.

14. Fortini A.S. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in the diagnosis of multiple sclerosis // A.S. Fortini, E.L. Sanders, B.G. Weinshenker [et al.] // Am. J. Clin. Pathol. — 2003. — Vol. 120. — P. 672-675.

15. Mares J. Correlation of the IgG index and oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis // J. Mares, R. Herzig, K. Urbanek [et al.] // Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. — 2008. — Vol. 152. — P. 247-249.