

Антимюллеров гормон (АМГ)

Антимюллеров гормон (АМГ) представляет собой димерный гликопротеин семейства белков TGF- β и вырабатывается гранулозными клетками и клетками Сертоли у женщин и мужчин соответственно.

АМГ является гонадным гормоном, который регулирует частоту перехода первичного фолликула в фазу активного роста и чувствительность небольших антральных фолликулов к фолликулостимулирующему гормону (ФСГ) у женщин (1). АМГ секретируется гранулозными клетками мелких антральных и преантральных фолликулов и отражает размер пула этих фолликулов у женщин (2). Во время менструального цикла уровень АМГ в сыворотке меняется незначительно, соответственно его измерение возможно в любой день цикла (3).

У женщин секреция АМГ гранулозными клетками яичника начинается приблизительно через 36 недель после начала беременности, достигая максимума в возрасте приблизительно 25 лет. Затем он постепенно снижается до менопаузы, после чего он не детектируется в кровотоке. Уровень АМГ у мужчин высокий после рождения и остается таким же в препубертатном периоде, до тех пор, пока уровень АМГ не станет более низким и стабильным во взрослом возрасте (4).

АМГ как биомаркер в диагностике

В настоящее время АМГ считается одним из самых надежных биомаркеров для оценки овариального резерва яичников у женщин (5). Измерение АМГ может использоваться в исследованиях фертильности, чтобы помочь предсказать реакцию женщин на стимуляцию яичников, а также оценить время до наступления менопаузы, а также для диагностики и мониторинга женщин с синдромом поликистозных яичников (6).

Биохимия АМГ

У АМГ есть две формы, циркулирующие в крови. Первым является гомодимер ргоАМГ, который не связывается с рецепторами АМГ. Вторая – это расщепленная форма АМГ, способная к взаимодействию с рецептором АМГ 2 типа, известная как АМГ-N,C. Гомодимер ргоАМГ (140 кДа) может расщепляться протеазами с получением C-концевого димера 25 кДа (АМГ-C) и N-концевого димера 120 кДа (АМГ-N), которые остаются связанными в виде нековалентного комплекса (АМГ-N,C) (7) (см. Рис. 1 на стр. 2). Большинство современных иммунометрических систем для измерения концентрации АМГ позволяют обнаруживать обе формы АМГ в крови человека (8).

Реагенты для разработки иммуноанализов

Хайтест предоставляет несколько хорошо охарактеризованных мышиных моноклональных антител, которые специфичны к АМГ человека. Антитела были получены к рекомбинантному человеческому АМГ. Также, мы предоставляем рекомбинантный белок АМГ, который можно использовать в качестве калибратора или стандарта при разработке иммунометрических систем.

КЛИНИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Оценка овариального резерва яичников

Прогноз ответа на контролируруемую
стимуляцию яичников

Прогнозирование менопаузы

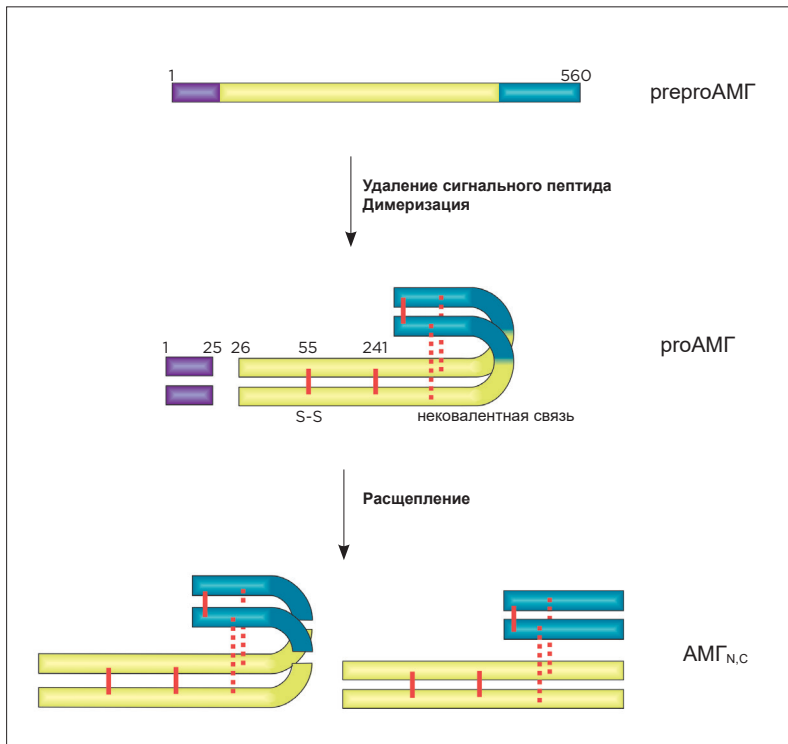


Рисунок 1.
Схематическое изображение формирования циркулирующих в крови человека форм АМГ
Адаптировано из (9).

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА, СПЕЦИФИЧНЫЕ К АМГ

Все наши моноклональные антитела к АМГ распознают N-концевую часть молекулы. Следовательно, в сэндвич-иммуноанализах будут обнаружены обе формы АМГ. Для разработки иммунометрических систем сэндвич-типа мы рекомендуем четыре различные комбинации антител, каждая из них обеспечивает высокую чувствительность (см. Таблицу 1). Калибровочные кривые для рекомбинантного АМГ с использованием двух прототипных систем сэндвич типа с хемилюминесцентной детекцией (CLIA) представлены на рис.2.

Таблица 1.

Рекомендуемые пары для сэндвич-иммунометрических систем.
Данные основаны на результатах, которые были получены в CLIA с использованием либо стрептавидина/HRP, либо щелочной фосфатазы для мечения.
LoD = предел обнаружения.

Capture MAb	Detection MAb	LoD (pg/ml)
AMH65cc	AMH47cc	5
AMH69cc	AMH41cc	2
AMH69cc	AMH46cc	3
AMH60cc	AMH69cc	5

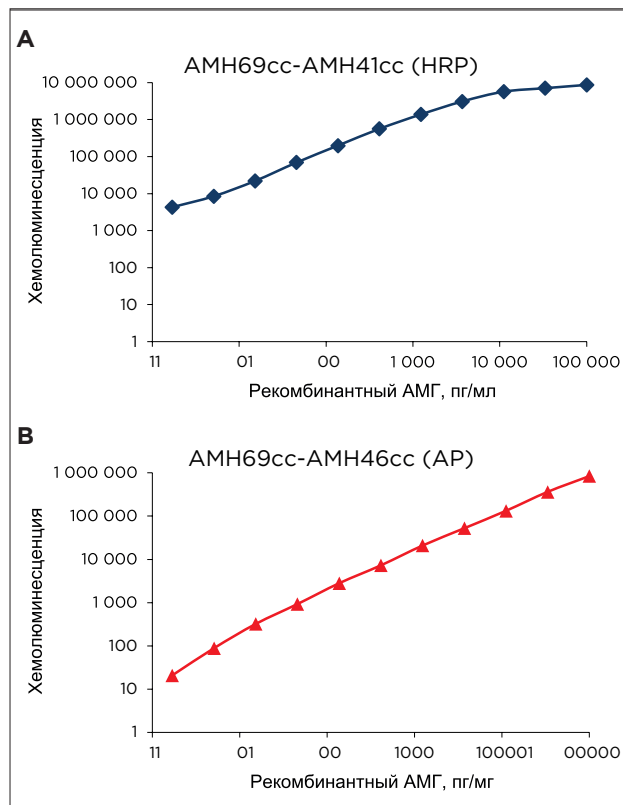


Рисунок 2.

Калибровочные кривые для рекомбинантного АМГ в сэндвич-CLIA с использованием пар антител (антитело подложки-детекторное антитело) AMH69cc-AMH41cc (А) и AMH69cc-AMH46cc (В).
В (А) использовалась метка стрептавидин/HRP. В (В) детектирующее антитело метили щелочной фосфатазой. Рекомбинантный антиген разбавляли фосфатно-солевым буфером, содержащим 0,1% Tween 20 и 75 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА)

Обнаружение АМГ в клинических образцах

Измерение нативного АМГ. Прототипы иммунометрических систем могут быть использованы для измерения концентрации нативного АМГ в образцах сыворотки. На рис.3, кривая разведения нативной сыворотки АМГ была получена в CLIA с использованием пары антител АМН69сс-АМН46сс. Чувствительность анализа составляла приблизительно 5 пг/мл. Концентрацию АМГ первоначально измеряли с использованием иммунометрической системы Beckman GEN II.

Прототипы иммунометрических систем Хайтест демонстрируют хорошую корреляцию с коммерческими наборами. Во-первых, АМГ измеряли в образцах сыворотки, полученных от 37 человек в возрасте от 2 до 46 лет (включая образцы обоих полов), с использованием пары АМН69сс - АМН46сс и набора Beckman GEN II. Набор Бекмана применяли в соответствии с инструкциями производителя. Для прототипа иммуноанализа Хайтест в качестве реакционного буфера использовали фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,1% Твин 20 и 75 мг/мл БСА. Рисунок 4 показывает, что обе системы показали хорошую корреляцию друг с другом ($R = 0,93$).

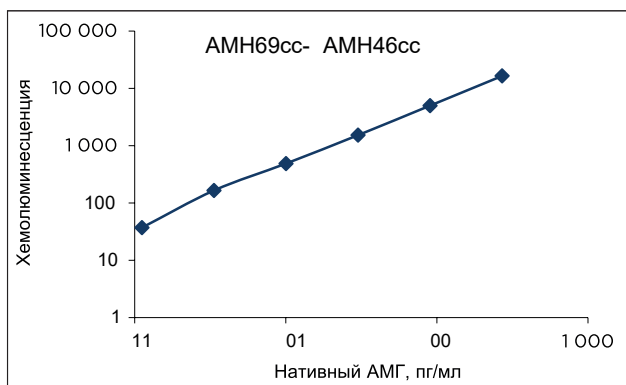


Рисунок 3.
Сэндвич CLIA нативного АМГ в сыворотке с щелочной фосфатазой с использованием пары антител АМН69сс-АМН46сс. Первоначально концентрацию нативного АМГ в сыворотке определяли с использованием иммунометрической системы Beckman GEN II. Серия разведений сыворотки была сделана в фосфатно-солевом буфере, содержащем 0,1% Твин 20, 75 мг/мл БСА.

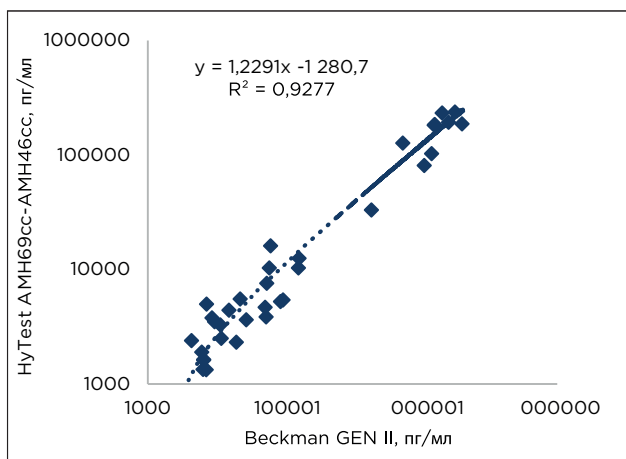


Рисунок 4.
Результаты измерения АМГ с использованием прототипа иммунометрической системы компании Хайтест (пара антител АМН69сс-АМН46сс) - хорошая корреляция с набором Beckman GEN II.

Другой сравнительный тест был выполнен между системами АМН69сс-АМН41сс и Roche Elecsys® АМН. Измерение АМГ в 40 индивидуальных сыворотках в диапазоне от 0 до 20 нг/мл показало хорошую корреляцию между этими системами (см. Рисунок 5).

РЕКОМБИНАНТНЫЙ АМГ ЧЕЛОВЕКА

Рекомбинантный антиген АМГ компании Хайтест можно использовать в качестве стандарта или калибратора в иммуноанализах. Белок экспрессируется в клеточной линии млекопитающих и не содержит аффинных меток.

Линейность при разбавлении рекомбинантного и нативного АМГ

Провели исследование линейности разведения, чтобы сравнить иммуореактивность рекомбинантного и нативного АМГ. Для этого рекомбинантный АМГ титровали вместе с образцом человеческой сыворотки. Калибровочные кривые обоих белков были параллельными, что указывает на то, что иммуореактивность рекомбинантного АМГ и нативного АМГ похожа (см. Рис. 6).

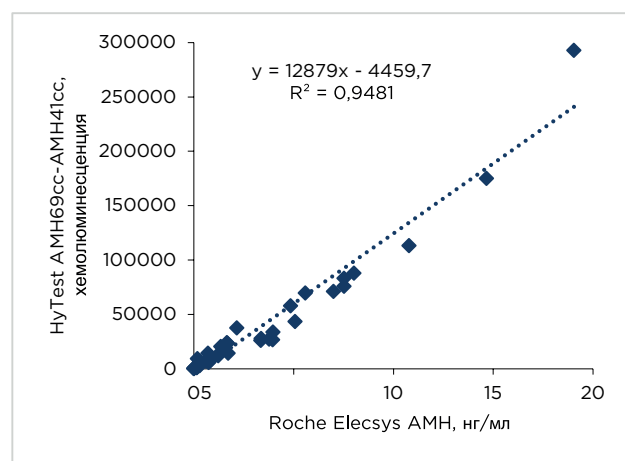


Рисунок 5.
Результаты измерения АМГ с помощью прототипа анализа компании Хайтест (пара АМН69сс-АМН41сс) показали хорошую корреляцию с набором Roche Elecsys АМН.

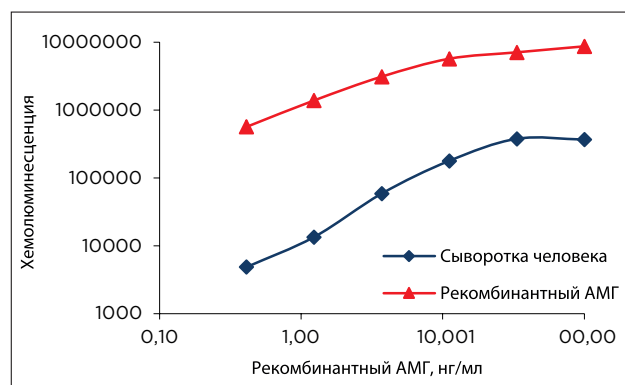


Рисунок 6.
Кривая разведения для пары моноклональных антител АМН69сс - АМН41сс. Сыворотку титровали вместе с рекомбинантным АМГ в фосфатно-солевом буфере, содержащем 0,1% Tween 20 и 75 мг/мл БСА.

Восстановление рекомбинантного АМГ в сыворотке
 Для изучения поведения рекомбинантного АМГ, добавленного в сыворотку человека, было проведено следующее исследование (см. Рисунок 7). Рекомбинантный АМГ добавлялся в сыворотку крови человека с известным уровнем иммунореактивности нативного АМГ. В идеальном случае сигнал в иммунометрической системе для смеси нативного и рекомбинантного АМГ будет равен сумме сигналов для рекомбинантного и нативного белков по отдельности. Для удобства интерпретации оценивается отношение вышеуказанных параметров, выраженное в процентах. Для рекомбинантного АМГ Хайтест было обнаружено хорошее соотношение (80-105%) в широком диапазоне протестированных концентраций рекомбинантного АМГ.

Варьирование иммунохимических свойств от лота к лоту

АМГ представляет собой гликозилированный гомодимер с несколькими участками протеолитического расщепления. Способность АМГ и его протеолитических фрагментов образовывать ковалентные и нековалентные связи модулирует его иммунохимические свойства. Рекомбинантный АМГ подвергается протеолизу, и очищенный продукт содержит фрагменты, которые видны на ДСН-электрофорезе (см. Рис.8). Образование фрагментов является результатом биологического процесса, который каждый раз может происходить по-разному, когда рекомбинантный АМГ экспрессируется в клеточной культуре. Обратите внимание, что это приводит к периодическому изменению иммунохимических свойств продукта.

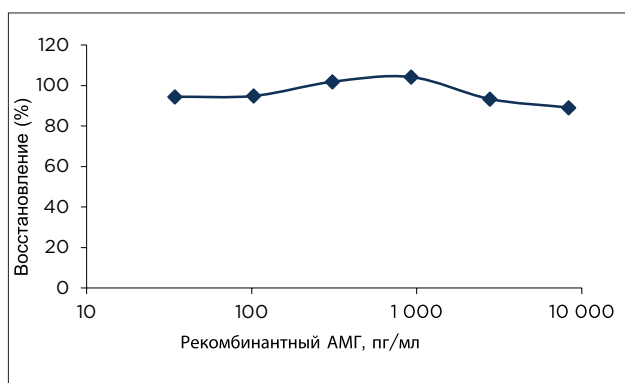


Рисунок 7.
 Восстановление рекомбинантного АМГ, добавленного в сыворотку человека, измеряют с использованием прототипа иммунометрической системы АМН69сс-АМН41сс в CLLA.

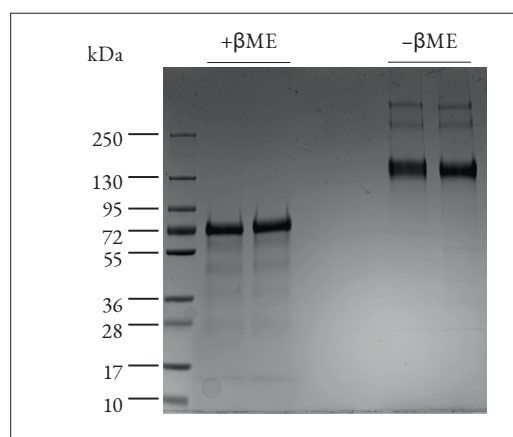


Рисунок 8.
 ДСН-электрофорез очищенного рекомбинантного АМГ (две партии) в восстанавливающих (+ бета-меркаптоэтанол, βME) и невосстанавливающих условиях (-βME).

На каждую полосу наносили по 6 мкг белка.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dewailly, D. et al. The physiology and clinical utility of anti-Müllerian hormone in women. *Human Reproduction Update* 20, 370–385 (2014).
2. Durlinger, A. L. L. et al. Anti-Müllerian Hormone Attenuates the Effects of FSH on Follicle Development in the Mouse Ovary. *Endocrinology* 142, 4891–4899 (2001).
3. Grinspon, R. P. et al. Early onset of primary hypogonadism revealed by serum anti-Müllerian hormone determination during infancy and childhood in trisomy 21: Early onset of hypogonadism in trisomy 21. *International Journal of Andrology* 34, e487–e498 (2011).
4. Kelsey, T. W. et al. A Validated Model of Serum Anti-Müllerian Hormone from Conception to Menopause. *PLoS ONE* 6, e22024 (2011).
5. McLennan, I. S. & Pankhurst, M. W. Anti-Müllerian hormone is a gonadal cytokine with two circulating forms and cryptic actions. *Journal of Endocrinology* 226, R45–R57 (2015).
6. Pankhurst, M. W. & McLennan, I. S. A specific immunoassay for proAMH, the uncleaved proprotein precursor of anti-Müllerian hormone. *Molecular and Cellular Endocrinology* 419, 165–171 (2016).
7. Pankhurst, M. W. et al. The Anti-Müllerian Hormone Precursor (proAMH) Is Not Converted to the Receptor-Competent Form (AMH-N,C) in the Circulating Blood of Mice. *Endocrinology* 157, 1622–1629 (2016).
8. Victoria, M. et al. Anti Müllerian Hormone: More than a biomarker of female reproductive function. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction* 48, 19–24 (2019).
9. Weenen, C. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Molecular Human Reproduction* 10, 77–83 (2004).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Название продукта	Кат. №	Клон	Подкласс	Примечания
Антимюллеров гормон человека (АМГ)	4AM5	АНМ41cc	IgG2a	In vitro, ИФА, ВБ
		АНМ46cc	IgG2a	In vitro, ИФА, ВБ
		АНМ47cc	IgG2a	In vitro, ИФА, ВБ
		АНМ60cc	IgG2b	In vitro, ИФА, ВБ
		АНМ65cc	IgG1	In vitro, ИФА, ВБ
		АНМ69cc	IgG2b	In vitro, ИФА, ВБ

АНТИГЕН

Название продукта	Кат. №	Чистота	Источник
Антимюллеров гормон человека (АМГ), рекомбинантный	8AM7	>90%	Рекомбинантный

Пожалуйста, обратите внимание, что часть данных, представленных в этом документе, была получена при работе с антителами, произведенными *in vivo*. Предполагается, что антитела, произведенные *in vitro*, будут демонстрировать аналогичные результаты.