

Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP)

Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) является основным структурным белком астроцитов (астроглии) центральной нервной системы (головного и спинного мозга), также он присутствует в немиелинизирующих клетках Шванна периферической нервной системы. Он поддерживает форму клетки и участвует в регуляции процессов, связанных с пролиферацией клеток, синаптической пластичностью, а также функциями гематоэнцефалического барьера.

Биохимия GFAP

GFAP принадлежит к группе белков промежуточных филаментов III типа. На сегодняшний день описано десять изоформ GFAP. Однако клиническое значение имеет только преобладающая изоформа (изоформа 1 или GFAP- α) (1).

GFAP представляет собой фибриллярный белок с массой около 50 кДа. Формирование филаментов включает 2 этапа: латеральную димеризацию GFAP и полимеризацию образующихся димеров по принципу “голова к хвосту”. Белок является высококонсервативным у разных живых организмов и очень похож на некоторые другие белки, которые также участвуют в образовании таких промежуточных филаментов, как, например, виментин, десмин, периферин и альфа-интернексин.

GFAP как маркер в диагностике

GFAP является маркером повреждения глиальных клеток. В условиях, когда глиальные клетки повреждены, GFAP высвобождается из клеток и затем появляется в крови. GFAP может быть обнаружен в образцах крови вскоре после повреждения (2,3).

Как показали недавние исследования, GFAP может использоваться в качестве биомаркера черепно-мозговой травмы (ЧМТ). В частности, было установлено, что уровень GFAP заметно возрастает через восемь часов даже после легкой или умеренной ЧМТ (3). Кроме того, есть предположение,

что по уровню концентрации GFAP можно прогнозировать последствия травмы для организма пациента (4). Более того, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США одобрило тест, измеряющий уровень GFAP и UCH-L1 (убиквитин карбокси-концевой гидролазы L1), для оценки состояния пациента после легкой ЧМТ (5).

Разграничение между геморрагическим и ишемическим инсультом.

Все большее число исследований свидетельствуют, что GFAP может быть полезным биомаркером для уточнения диагноза между геморрагическим и ишемическим инсультом. Обе патологии могут иметь серьезные последствия для пациента, но поскольку их физиология различается, то назначаются взаимоисключающие стратегии лечения. Поэтому крайне важно наличие инструмента, позволяющего установить верный диагноз в кратчайшие сроки. Согласно исследованиям, в случае геморрагического инсульта уровень GFAP увеличивается в течение двух часов после начала инсульта, достигая пика между 6 и 12 часами. В случае же ишемического инсульта концентрация GFAP в крови повышается позднее (2,6).

Компания Хайтест предлагает несколько моноклональных антител (МоАт), специфичных к GFAP. Также мы предлагаем рекомбинантный антиген GFAP, который можно использовать в качестве стандарта или калибратора в иммуноанализах.

КЛИНИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ Черепно-мозговая травма (ЧМТ)

Моноклональные антитела, специфичные к GFAP

Хайтест предлагает несколько хорошо охарактеризованных моноклональных антител (МоАт). Эти МоАт специфичны к GFAP и могут быть использованы для количественного определения GFAP в сыворотке, плазме или спинномозговой жидкости.

Сэндвич-иммуноанализы для детекции GFAP

Для определения GFAP в образцах плазмы (с цитратом или гепарином) или сыворотки крови методом сэндвич-иммуноанализа мы рекомендуем четыре различные пары моноклональных антител (см. Таблицу 1). Данные пары антител не показали перекрестной реактивности с виментином, десмином и периферином. Калибровочные кривые, полученные с помощью прототипов

Таблица 1.

Рекомендуемые пары (захват-детекция) для определения GFAP.

Данные основаны на результатах, полученных с использованием сэндвич-хемилюминесцентного иммуноанализа (CLIA). Аббревиатура LoD в таблице означает предел детекции

Захватывающее антитело	Детекторное антитело	LoD (пг/мл)
GFAP83cc	GFAP81cc	4.8
GFAP94cc	GFAP98cc	15.3
GFAP15cc	GFAP81cc	13.3
GFAP83cc	GFAP98cc	6.0

тест-систем GFAP83cc-GFAP81cc (А) и GFAP83cc-GFAP98cc (В), представлены на Рисунке 1.

Сравнение с методом Simoa® GFAP (Quanterix)

Концентрация GFAP в образцах сыворотки человека была измерена с помощью присутствующего на рынке набора Simoa® GFAP (Quanterix), а также с помощью нашей прототипной тест-системы с парой антител GFAP83cc-GFAP98cc. Уровень GFAP был измерен в 34 образцах сыворотки с концентрациями в диапазоне от 46 до 33 074 пг/мл (как показано на Рис. 2А). Также была построена корреляционная кривая для более низкого диапазона концентраций (от 46 до 1000 пг/мл) в 18 образцах сыворотки (Рис. 2В). Как видно из Рисунка 2, мы наблюдаем сильную корреляцию между нашей прототипной тест-системой и референсным методом.

Определение GFAP в клинических образцах

На Рисунке 3 показано определение GFAP в образцах плазмы, полученных от пациентов с геморрагическим (N=5) или ишемическим (N=5) инсультом, с помощью прототипа тест-системы GFAP83cc-GFAP81cc. Все образцы были взяты в течение первых 12 часов после начала инсульта. Прототип тест-системы обнаруживал GFAP только в образцах плазмы пациентов, перенесших геморрагический инсульт.

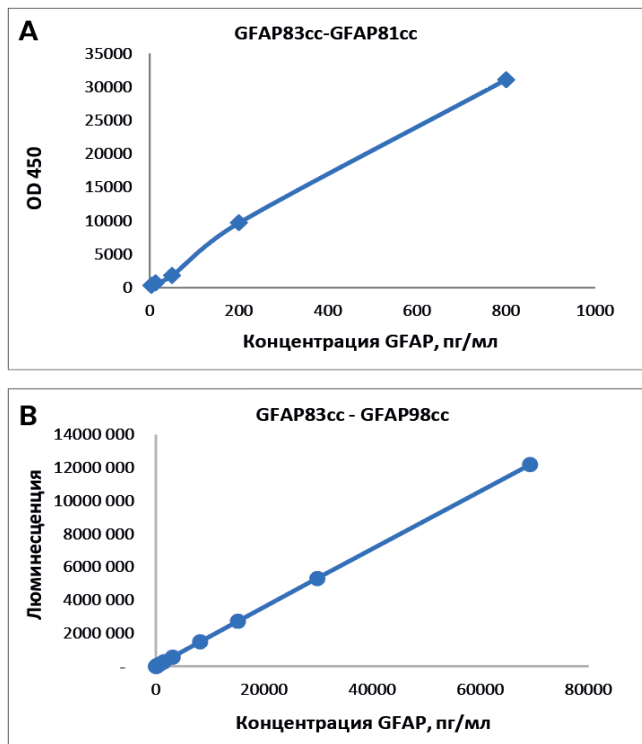


Рисунок 1.

Калибровочная кривая для А) пары GFAP83cc-GFAP81cc (захват-детекция) с использованием нативного GFAP в качестве антигена В) пары GFAP83cc-GFAP98cc (захват-детекция) с использованием рекомбинантного GFAP в качестве антигена.

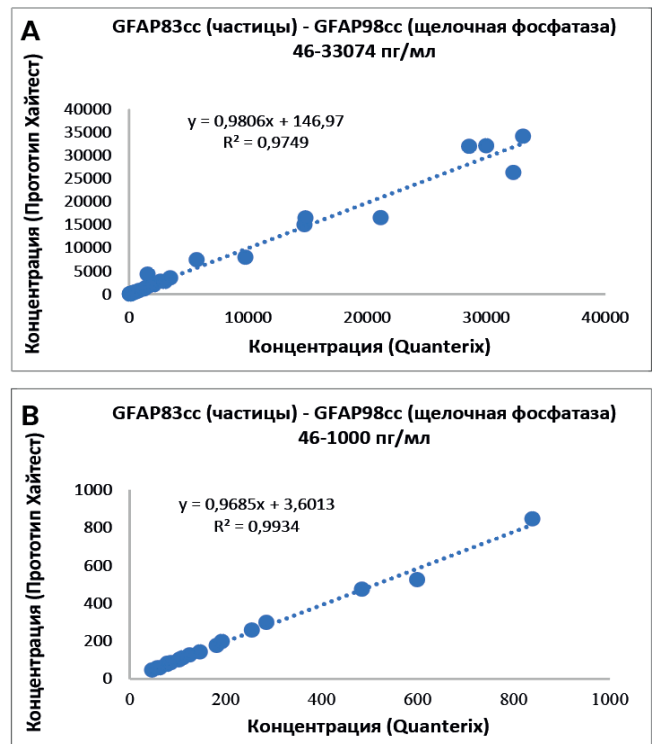


Рисунок 2.

Корреляция между результатами измерения А) GFAP в 34 образцах сыворотки крови (концентрации в диапазоне от 46 до 33074 пг/мл) В) GFAP в 18 образцах сыворотки крови (концентрации в диапазоне от 46 до 1000 пг/мл) с использованием прототипа анализа GFAP83cc-GFAP98cc с использованием Simoa® GFAP (Quanterix)

Это согласуется с результатами других исследований и позволяет предположить, что GFAP можно использовать для дифференциации этих двух типов инсульта. При ишемическом инсульте уровень GFAP повышается только через 24 часа.

Моноклональные антитела, пригодные для иммуоцитохимии

Моноклональные антитела GFAP15сс, GFAP81сс и GFAP83сс могут применяться в иммуоцитохимии. Пример окрашивания GFAP в глиальных клетках с использованием антитела GFAP81сс представлен на Рисунке 4.

Рекомбинантный белок GFAP

Рекомбинантный GFAP нашей компании подходит для использования в качестве стандарта или калибратора в иммуноанализах. Белок представляет собой фрагмент аминокислотной последовательности (30-383 а.к.о.) GFAP человека и экспрессируется в *E. coli*. Чистота белка превышает 90%. При электрофорезе в ДСН-ПААГ рекомбинантный GFAP мигрирует в

виде единственной полосы с видимой молекулярной массой около 34 кДа (см. Рисунок 5).

Важно отметить, что GFAP является фибриллярным белком и склонен к полимеризации. Поэтому рекомбинантный GFAP имеет тенденцию к образованию димеров, и препарат очищенного белка, вероятно, всегда содержит некоторое количество димерной формы. Длительная инкубация при положительных температурах увеличивает долю димерной формы и в конечном итоге может привести к дальнейшей агрегации.

Рекомбинантный GFAP устойчив к циклам замораживания-оттаивания

Мы проверили иммунохимическую стабильность рекомбинантного GFAP после повторяющихся циклов замораживания-оттаивания. Иммунореактивность белка, измеренная с помощью прототипа тест-системы GFAP83сс–GFAP81сс, не претерпела значительных изменений после десяти таких циклов (см. Рисунок 6).

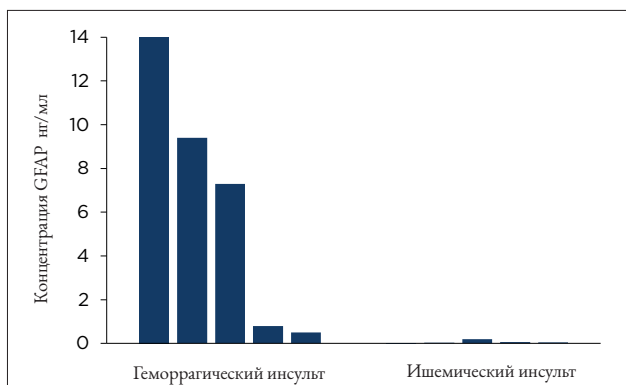


Рисунок 3. Измерение уровня GFAP в образцах плазмы пациентов с геморрагическим и ишемическим инсультом с использованием прототипа тест-системы GFAP83сс–GFAP81сс.

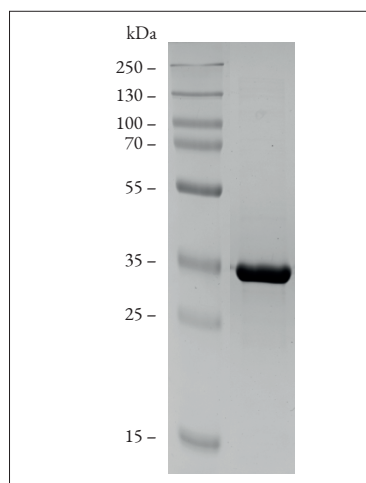


Рисунок 5. Электрофорез в ДСН-ПААГ рекомбинантного фрагмента GFAP в восстанавливающих условиях в градиентном геле (10-20%). Нагель нанесли 2 мкг очищенного белка.

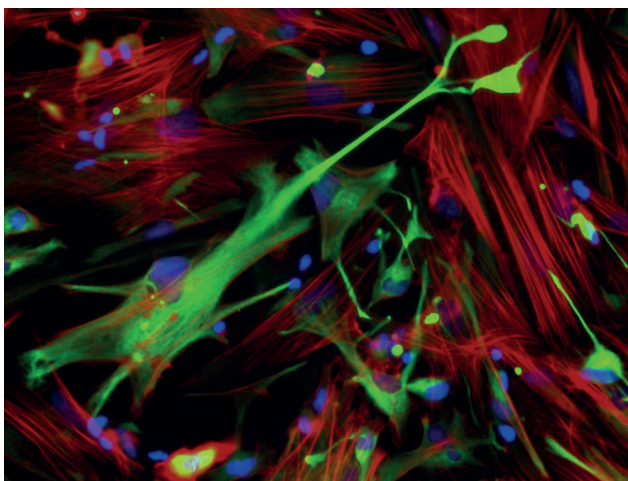


Рисунок 4. Окрашивание GFAP в культивируемых глиальных клетках. Захватывающее антитело: GFAP81сс. Детекторное антитело: поликлональные антитела, специфичные к иммуноглобулинам G мыши, конъюгированные с Alexa-488 (зеленый).

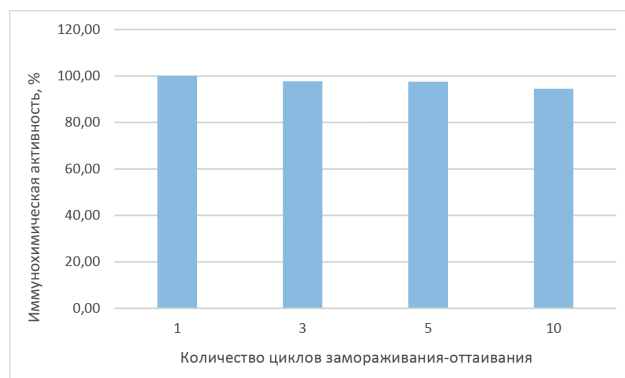


Рисунок 6. Стабильность рекомбинантного GFAP при замораживании-оттаивании. Рекомбинантный GFAP подвергли десяти циклам замораживания-оттаивания. Иммунохимическую активность после первого, третьего, пятого и десятого циклов измеряли с помощью сэндвич-иммуноанализа (GFAP83сс–GFAP81сс).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Middeldorp, J. & Hol, E. M.** GFAP in health and disease. *Progress in Neurobiology* 93, 421–443 (2011).
2. **Foerch, C. et al.** Diagnostic accuracy of plasma glial fibrillary acidic protein for differentiating intracerebral hemorrhage and cerebral ischemia in patients with symptoms of acute stroke. *Clinical Chemistry* 58, 237–245 (2012).
3. **Papa, L. et al.** Time course and diagnostic accuracy of glial and neuronal blood biomarkers GFAP and UCH-L1 in a large cohort of trauma patients with and without mild traumatic brain injury. *JAMA Neurology* 73, 551 (2016).
4. **Vos, P. E. et al.** GFAP and S100B are biomarkers of traumatic brain injury: An observational cohort study. *Neurology* 75, 1786–1793 (2010).
5. **U.S. Food & Drug Administration.** FDA authorizes marketing of first blood test to aid in the evaluation of concussion in adults. FDA (2018). At <<http://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-authorizes-marketing-first-blood-test-aid-evaluation-concussion-adults>>
6. **Herrmann, M. et al.** Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke: A comparative analysis of serum concentrations of protein S-100B and glial fibrillary acidic protein. *Stroke* 31, 2670–2677 (2000).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Название продукта	Кат. №	Клон	Подкласс	Примечания
Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP)	4G25	GFAP15cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, ИГХ
		GFAP81cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, ИГХ
		GFAP83cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, ИГХ
		GFAP94cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ
		GFAP98cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ

АНТИГЕНЫ

Название продукта	Кат. №	Чистота	Источник
Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), человека	8G47	>90%	Рекомбинантный