

SIGNIFICANCE OF MOLECULAR BIOMARKERS IN THE DIAGNOSIS OF NEUROMYELITIS OPTICA SPECTRUM DISORDER

ZNAČAJ MOLEKULARNIH BIOMARKERA U DIJAGNOSTICI NEUROMIJELITIS OPTIKA SPEKTRA BOLESTI

Marko Andabaka^{1,2}, Jelena Drulović^{1,3}, Ivana Novaković^{1,4}

¹ Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija

² Univerzitetski klinički centar Srbije, Klinika za neurologiju i psihijatriju za decu i omladinu, Beograd, Srbija

³ Univerzitetski klinički centar Srbije, Klinika za neurologiju, Beograd, Srbija

⁴ Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za humanu genetiku, Beograd, Srbija

Correspondence: marko_med@yahoo.com

Abstract

Discovery of antibodies to aquaporin-4 channels as a laboratory or molecular biomarker for neuromyelitis optica spectrum disorder contributed to a better understanding of the etiopathogenesis, with a clear separation of the clinical, neuroradiological and laboratory characteristics of this disease. This resulted in the definition of criteria for establishing the diagnosis of neuromyelitis optica spectrum disorder and a clear distinction in relation to multiple sclerosis. Clinical presentation of the inflammatory diseases of the central nervous system may be highly variable, with numerous, often overlapping symptoms and signs. Therefore, in the differential diagnostic, in addition to the clinical presentation, it is necessary to consider paraclinical characteristics, such as laboratory findings of the blood and cerebrospinal fluid and the neuroradiological examination findings. Since aquaporin-4 is a clearly defined, crucial diagnostic biomarker in the neuromyelitis optica spectrum disorder, different methodological approaches were developed to evaluate antibodies to aquaporin-4, taking into account the specificity and sensitivity of the tests themselves. One of the first tests that was routinely applied in clinical practice for the detection of antibodies to aquaporin-4, were tests in the form of an immunoenzymatic assay that showed great variability in the degree of specificity and sensitivity. The second group of tests for the detection of antibodies to aquaporin-4 applied the technique of indirect immunofluorescence on a substrate of animal origin, which achieved a higher degree of sensitivity and specificity, with certain disadvantages, such as the impossibility of precise quantification as well as difficulties in the interpretation of the results. Special methodological principles of immunoprecipitation such as fluorescent and radioimmunoprecipitation did not achieve a satisfactory level of sensitivity in the detection of antibodies to aquaporin-4. The highest level of sensitivity with absolute specificity has been achieved via developing a cell assay methodology, based on the application of human aquaporin-4 transfected cells fixed on a biochip, with a negative control when antibodies to aquaporin-4 from serum are detected by indirect immunofluorescence methodology or special cellular assays, and when these antibodies are quantified by flow cytometry method. Using this cell assay methodology is extremely important in order to establish the correct diagnosis of seropositive neuromyelitis optica spectrum disorder.

Keywords:

Neuromyelitis optica spectrum disorder, antibodies to aquaporin 4, laboratory analyses, ELISA, indirect immunofluorescence, cell assays, myelin oligodendrocyte glycoprotein, molecular biomarkers

Sažetak

Otkriće antitela prema akvaporin 4 kanalima kao laboratorijskog, odnosno molekularnog biomarkera za neuromijelitis optika spektar bolesti doprinelo je boljem razumevanju etiopatogeneze uz jasno izdvajanje kliničkih, neuroradioloških i laboratorijskih karakteristika ove bolesti, što je rezultiralo definisanjem kriterijuma za postavljanje dijagnoze neuromijelitis optika spektra bolesti i jasnom distinkcijom u odnosu na multiplu sklerozu. Imunski posredovane bolesti centralnog nervnog sistema u okviru kliničke manifestacije mogu imati simptome i znake koji se često preklapaju, te je u procesu diferencijalno dijagnostičke eksploracije, pored kliničke slike, neophodno razmotriti parakliničke karakteristike kao što su parametri neuroradiološkog ispitivanja i rezultati laboratorijskih nalaza krvi i, vrlo često, cerebrospinalne tečnosti. Kako je u neuromijelitis optika spektru bolesti jasno definisan dijagnostički biomarker, tako su se razvijali različiti metodološki pristupi testiranju antitela na akvaporin 4 u okviru dijagnostičke i diferencijalno dijagnostičke eksploracije, uzimajući u obzir specifičnost i senzitivnost samih testova. Neki od prvih testova koji su se rutinski primenjivali u kliničkoj praksi za detekciju antitela na akvaporin 4 bili su testovi u vidu imunoenzimskog esejaja koji su pokazali veliku varijabilnost u stepenu specifičnosti i senzitivnosti. Druga grupa testova za detekciju antitela na akvaporin 4 primenjivala je tehniku indirektno imunofluorescencije na supstratu animalnog porekla, čime je postignut viši stepen senzitivnosti i specifičnosti, uz određene nedostatke kao što su nemogućnost precizne kvantifikacije i poteškoće u samoj interpretaciji rezultata. Posebni metodološki principi imunoprecipitacije, kao što su fluorescentna i radioimunoprecipitacija, nisu postigli zadovoljavajući stepen senzitivnosti u detekciji antitela na akvaporin 4. Razvojem metodologije ćelijskog esejaja koja se bazira na primeni humanih akvaporin 4 transfektovanih ćelija, bilo fiksiranih na biočipu sa negativnom kontrolom, kada se antitela na akvaporin 4 iz seruma detektuju metodologijom indirektno imunofluorescencije, bilo posebnim ćelijskim esejajima, kada se ova antitela kvantifikuju metodom protočne citometrije, postignut je najviši stepen senzitivnosti uz apsolutnu specifičnost, što je od izuzetne važnosti u postavljanju dijagnoze seropozitivnog neuromijelitis optika spektra bolesti.

Ključne reči:

neuromijelitis optika
spektar bolesti, antitela
na akvaporin 4,
laboratorijske analize,
ELISA,
indirektna imunofluorescencija, ćelijski esejaji,
mijelin oligodendrocitni glikoprotein,
molekularni biomarkeri

Uvod

Neuromijelitis optika spektar bolesti (NMOSB) predstavlja heterogeni klinički entitet u čijoj osnovi se nalazi imunski posredovano oštećenje centralnog nervnog sistema (CNS) (1). Konceptualno posmatrano, različiti nazivi bolesti u prethodnom periodu pratili su, u stvari, dinamiku razumevanja kako etiopatogeneze, tako i njenog kliničkog ispoljavanja tokom evolucije medicinske nauke i kliničke prakse uopšte (2,3). Sada istorijski naziv neuromijelitis optika (NMO), ustanovljen je u drugoj polovini XIX veka, kada je francuski neurolog Ežen Devik (*Eugène Devic*, 1858 - 1930) izdvojio i prikazao seriju slučajeva pacijenata sa razvojem akutnog mijelitisa (AM) i optičkog neuritisa (ON), 1894. godine u Lionu (Francuska), sugerišući postojanje posebnog kliničkog entiteta koji je u njegovu čast ubrzo i dobio eponim Devikova bolest (4). Međutim, u narednom periodu, gotovo tokom čitavog XX veka, vladalo je uverenje da NMO predstavlja formu multiple skleroze (MS), koja se predominantno razlikuje u težini ispoljavanja simptoma i znakova, tj. stepenu neurološkog deficita, ali da se suštinski radi o jednoj bolesti (2,5). Ipak, treba istaći da je kraj XX veka bio obeležen i istraživanjima koja su sve više isticala činjenicu da NMO ispoljava određene kliničke, neuroradiološke, laboratorijske i druge karakteristike koje su bitno različite u odnosu na „tipičnu MS“ (2,6). Tako su, na samom pragu XXI veka,

V. A. Lenon (*Lennon*) i saradnici sa Mejo (*Mayo*) klinike u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), 2004. godine objavili revolucionarno otkriće autoantitela – imunoglobulina klase G (IgG) u serumu obolelih od NMO, koja su specifično usmerena ka akvaporin 4 (engl. *Aquaporin-4* - AQP4) vodenim kanalima u CNS, predstavljajući prvi jasni molekularni biomarker ove bolesti, sa konkretnom distinkcijom u odnosu na obolele od MS (7). Otkriće antitela prema AQP4 (AQP4 At) kao molekularnog biomarkera za NMO doprinelo je boljem razumevanju etiopatogeneze ove bolesti, uz izdvajanje kliničkih, neuroradioloških i laboratorijskih karakteristika, što je omogućilo definisanje prvih dijagnostičkih kriterijuma 2006. godine, čime NMO postaje poseban klinički entitet (8). Nova era u razumevanju NMO obeležena je daljom ekspanzijom istraživanja i formiranjem Internacionalnog panela za dijagnozu NMO, koji je, na osnovu saznanja dobijenih ukupnim sagledavanjem i analizom podataka studija koje su se bavile etiopatogenetskim, kliničkim, neuroradiološkim i laboratorijskim karakteristikama, uspostavio savremene, aktuelno važeće dijagnostičke kriterijume 2015. godine, u okviru kojih je posebno istaknuto da, pored ON i longitudinalnog ekstenzivnog transvezalnog mijelitisa (LETM), u okviru ove bolesti mogu postojati i simptomi i znaci zahvaćenosti diencefalona, moždanog stabla i aree postreme, što je nozološki obuhvaćeno jedinstvenim entitetom pod nazivom neuromijelitis optika spektar bolesti (9).

S druge strane, imunski posredovane bolesti CNS kao što su MS, NMOSB, bolest udružena sa antitelima prema mijelin oligodendrocitnom glikoproteinu (engl. *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Associated Disease* - MOGAD), u okviru svoje kliničke manifestacije mogu imati simptome i znake koji se često preklapaju, te je u procesu diferencijalno dijagnostičke eksploracije, pored kliničke slike, neophodno razmotriti i parakliničke karakteristike, kao što su parametri neuroradiološkog ispitivanja i rezultati laboratorijskih nalaza (10,11). Laboratorijske analize uključuju brojna ispitivanja krvi i vrlo često likvora, tj. cerebrospinalne tečnosti (CST) pacijenata kod kojih postoji sumnja na imunski posredovano oboljenje CNS-a i sastavni su deo dijagnostičkog procesa (10).

Citobiohemijski pregled likvora

Citobiohemijski pregled likvora, kao rutinska laboratorijska analiza kojom se određuje broj i tip celularnih elemenata, uz koncentraciju proteina i glukoze u jedinici zapremine likvora, zadržala je određeni značaj u procesu diferencijalno dijagnostičke eksploracije kod mnogih neuroloških bolesti, uključujući inflamatorne, odnosno imunski posredovane bolesti CNS-a (12-14). Kada je u pitanju NMOSB, analiza likvora suštinski nije neophodna za postavljanje dijagnoze, posebno u slučajevima jasne kliničke i neuroradiološke manifestacije uz pozitivna AQP4 At u serumu, mada poslednje preporuke sugerišu sprovođenje lumbalne punkcije i analizu likvora kod svih suspektnih NMOSB slučajeva za potrebe diferencijalno dijagnostičkog ispitivanja (14).

Izoelektrično fokusiranje likvora i seruma

Kao što je poznato, unutar CNS-a prisutan je mali broj klonova B-limfocita, pre svega u moždanim ovojnicama, a mnogo manje u samom moždanom parenhimu. Imunska aktivacija klonova ovih ćelija dovodi do produkcije proteina, odnosno IgG koji se oslobađaju u CST – likvor, tipa oligoklonskog inflamatornog odgovora (15, 16).

Izoelektrično fokusiranje (IEF) likvora i seruma predstavlja laboratorijsku metodu kojom se pomenuti intratekalni inflamatorni odgovor kvalitativno detektuje paralelnom analizom likvora i seruma na agaroznom gelu, sa imunoblotom za IgG frakciju imunoglobulina (17, 18). Metoda IEF likvora i seruma ustanovljena je sedamdesetih godina prošlog veka i, uz određene modifikacije, zadržala je do danas svoje značajno mesto u neurološkoj kliničkoj praksi (10, 18-20). Interpretacija mogućih nalaza IEF likvora i seruma prikazana je u tabeli 1.

Sa diferencijalno dijagnostičkog aspekta, važno je napomenuti da se pozitivne oligoklonske IgG trake u likvoru, kao odraz intratekalne imunske aktivacije klonova B-ćelija, sa posledničnom produkcijom i oslobađanjem IgG, sreću kod brojnih imunski posredovanih neuroloških bolesti i infektivnih oboljenja koja zahvataju CNS, u prvom redu: MS, NMOSB, encefalitisa različite etiologije, kao i sistemskih bolesti i stanja sa afekcijom CNS-a kao što su

neurolupus, neurosarkoidoza, neuroborelioza, neurolues, Behčetova bolest (*Morbus Behcet*), neurovaskulitisi, neoplastični, paraneoplastični sindromi i druge bolesti (17).

Međutim, primena metode IEF likvora i seruma ima vrlo važan dijagnostički značaj kada je u pitanju MS, gde se prisustvo IgG oligoklonskih traka u likvoru smatra dokazom temporalne diseminacije ove bolesti, što je prepoznato i u aktuelno važećim dijagnostičkim kriterijumima za postavljanje dijagnoze MS (22). Prisustvo dve ili više oligoklonskih traka u likvoru, uz normalan nalaz u paralelno analiziranom serumu pacijenata, smatra se pozitivnim oligoklonskim intratekalnim odgovorom u MS, primenom metodologije IEF likvora i seruma kao zlatnog standarda (23). Naime, u zavisnosti od različitih studija, pozitivan oligoklonski odgovor sreće se kod većine pacijenata sa MS, tj. u preko 90% obolelih (24-26). Nedavno je pokazano da dijagnostička senzitivnost oligoklonskih traka u likvoru kod obolelih od MS čini prosečno 85%, a da dijagnostička specifičnost ove metode u proseku iznosi 92% (27).

Tabela 1. Interpretacija nalaza izoelektričnog fokusiranja likvora i seruma

TIP Odgovora	Interpretacija nalaza
1	Odsustvo oligoklonskih traka u likvoru i serumu. Normalan nalaz
2	Pozitivne oligoklonske trake u likvoru, odsutne u serumu. Nalaz ukazuje na intratekalni imunski odgovor.
3	Pozitivne oligoklonske trake u likvoru i pozitivne oligoklonske trake u serumu u manjem broju u odnosu na likvor. Nalaz sugeriše intratekalni i sistemski imunski odgovor.
4	Pozitivne oligoklonske trake u likvoru i u serumu istog broja i intenziteta. Nalaz ukazuje na sistemsku imunsku aktivaciju.
5	Tri do pet IgG traka u likvoru i serumu čiji crtež odgovara monoklonskim IgG trakama. Nalaz ukazuje na monoklonsku IgG gamapatiju.

Prema Freedman et al. (21)

S druge strane, pozitivan intratekalni oligoklonski odgovor kod obolelih od NMOSB ne smatra se tipičnim i sugeriše da je potrebno pažljivo diferencijalno dijagnostički razmotriti sve druge mogućnosti (9). Pokazano je, međutim, da se pozitivne oligoklonske trake u likvoru mogu naći i kod manjeg broja pacijenata sa NMOSB, tj. između 15% i 35 %, u zavisnosti od studije, koje su uglavnom obuhvatale pacijente kavkaskog porekla i za koje je pokazano da se oligoklonski intratekalni odgovor obično javlja tokom ataka NMOSB, a da se nakon toga gubi kod velikog broja obolelih, što se razlikuje u odnosu na perzistentan nalaz oligoklonskih traka u likvoru koji se sreće kod prirodnog toka MS (6, 28-30). U Japanu, odnosno u azijskoj populaciji obolelih od neuromijelitis optika (NMO), pokazano je da se pozitivne oligoklonske trake u likvoru sreću kod oko 10% obolelih (31). Takođe, među japanskom populacijom

pacijenata obolelih od NMO nije sa sigurnošću pokazan obrazac nestajanja intratekalnog oligoklonskog odgovora ispitivanog metodom IEF likvora i seruma tokom vremena, mada treba uzeti u obzir da je studija obuhvatila mali broj ispitanika, kao i da je istaknuto da kod obolelih postoji istorija drugih hroničnih autoimunskih bolesti čiji značaj nije razjašnjen u kontekstu oligoklonskog intratekalnog odgovora (32).

Antitela na akvaporin 4

Svakako najvažniji laboratorijski, odnosno molekularni biomarker NMOSB jesu autoantitela prema akvaporin 4 kanalima (7). Akvaporini predstavljaju familiju transmembranskih proteina sa dominantnom ulogom u regulaciji transporta molekula vode kroz ćelijsku membranu, po čemu su i dobili ime (33-36). Generalno posmatrano, strukturno-funkcionalna organizacija akvaporina ogleda se u formiranju homotetramernih proteinskih kompleksa, od kojih svaki monomer sadrži jednu vodenu transmembransku poru (37,38). Međutim, AQP4 vodeni kanali pokazuju nešto kompleksniju strukturnu i funkcionalnu organizaciju koja se, pre svega, ogleda u postojanju više izoformi ovih proteina od kojih su najvažnije M1 i M23 izoforma, koje formiraju heterotetramerne komplekse na ćelijskoj membrani (37,39-41). Upravo se tetrameri AQP4 dalje organizuju u posebne strukture u vidu ortogonalnih nizova intramembranskih čestica (engl. *Orthogonal Arrays of Intramembranous Particles* - OAPs) koji su različito raspoređeni u zavisnosti od tipa ćelija, odnosno tkiva sa najvišim stepenom ekspresije na membrani stopalastih produžetaka astrocita kada je u pitanju CNS (37,42-44).

S druge strane, AQP4 antitela (At) predstavljaju IgG antitela koja su prisutna u serumu obolelih od NMOSB i za koje je pokazano da imaju afinitet vezivanja upravo za epitope AQP4 koji se nalaze u okviru OAPs, kada pokreću kompleksan imunski odgovor pa tako čine glavni etiopatogenetski supstrat ove bolesti (7,45-47). Zbog svega navedenog, detekcija AQP4 At u serumu omogućava brzo i efikasno postavljanje definitivne dijagnoze seropozitivnog NMOSB prema aktuelno važećim dijagnostičkim kriterijumima (9). Važno je istaći da su od momenta otkrivanja AQP4 At i njihovog definisanja kao dijagnostičkog biomarkera u NMOSB pa do danas upotrebljavane različite metodologije testiranja u procesu dijagnostičke i diferencijalno dijagnostičke eksploracije, uzimajući u obzir specifičnost i senzitivnost samih testova (47-49). Generalno, postoji šest različitih metodoloških pristupa odnosno esaja u detekciji AQP4 At: enzimski esej - ELISA test (engl. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), tehnika indirektno imunofluorescencije (IIF), radioimunoprecipitacioni esej (engl. *Radioimmunoprecipitation Assay* - RIPA), fluorescentna imunoprecipitacija (engl. *Fluorescence Immunoprecipitation Assay* - FIPA), kao i posebne metode ćelijskog esaja (engl. *Cell Based Assay* - CBA; *Flow Cytometry Activated Cells Sorting* - FACS) (48).

Jedan od prvih testova za detekciju AQP4 At u serumu i CST u rutinskoj kliničkoj praksi bio je ELISA test,

koji se zasniva na detekciji i kvantifikaciji biomolekula od interesa pomoću specifičnih antitela i enzima vezanih za njih, a čija reakcija, odnosno kataliza dodatog supstrata dovodi do reakcije koja se može objektivizovati i izmeriti (48,50). Do danas je razvijeno nekoliko metodoloških modifikacija ELISA testa kao što su: direktni ELISA test, indirektni ELISA test, „sendvič“ ELISA, kao i komparativna ELISA, koje imaju određene prednosti i nedostatke, kao i različitu primenu kada su u pitanju bazična istraživanja, ali i upotreba u rutinskoj kliničkoj praksi (51). Primena različite metodologije ELISA testa, kao i upotreba različitih komercijalnih ELISA testova u detekciji AQP4 At u serumu pacijenata kod kojih postoji sumnja na NMOSB, takođe se razlikovala u stepenu senzitivnosti i specifičnosti. U zavisnosti od literature, senzitivnost ELISA testa je bila od 48,3 % do 75,8%, prosečno 64% kada su u pitanju pojedini komercijalni kitovi, dok se senzitivnost pojedinih metodoloških pristupa ELISA testa kretala od 66% do 83,3% (48,52-56). Postignuti stepen specifičnosti ELISA testa takođe se razlikuje u odnosu na metodološke pristupe pa se tako, u zavisnosti od literature, kreće od 96,6% do 100% (48,54). Upravo zbog visoke varijabilnosti kada su u pitanju senzitivnost i specifičnost u odnosu na različite klase imunoenzimskih esaja, s jedne strane, kao i razvoja novih metodoloških pristupa, s druge strane, primena ELISA testova se više ne preporučuje za detekciju serumskih AQP4 At u procesu dijagnostičke i diferencijalno dijagnostičke eksploracije osoba kod kojih postoji sumnja na NMOSB ili drugo imunski posredovano oboljenje CNS-a (9,48). Zbog svojih prednosti kao što su niska cena testiranja, mogućnost kvantitativnog merenja (titar antitela), dostupnost i rasprostranjenost metode, ELISA test je ipak zadržao određeni stepen primene, pa do danas nije u potpunosti napušten u kliničkoj praksi (57).

Posebnu grupu testova za detekciju AQP4 At predstavljaju testovi koji koriste IIF tehniku i koji u osnovi sadrže tkivo kao supstrat za vezivanje ispitivanih antitela iz seruma, nakon čega se dodaju posebna fluorescentno obeležena antitela, koja se vezuju za humana serumska AQP4 At, čime postaju vidljiva upotrebom fluorescentnog mikroskopa (48,58,59). Dakle, sama metodologija IIF zasniva se na postojanju dva tipa antitela: prva su AQP4 At koja se nalaze u serumu pacijenata i koja se, kada se dodaju na supstrat (preparat tkiva mozga miša, pacova, primata), vezuju za AQP4 proteine, a potom se dodaju fluorescentno obeležena antihumana antitela koja se vezuju za AQP4 At (prethodno vezana za supstrat testa), nakon čega se posmatra posebnim fluorescentnim mikroskopom (48,58-61). Prednost ove metode ogleda se u tome što su u samom supstratu, odnosno tkivu normalno prisutne obe izoforme AQP4 proteina, što povećava prijemčivost za AQP4 At, dok je, s druge strane, nedostatak što tkivo sadrži brojne druge protein, odnosno antigene za koje se mogu vezati i druga antitela iz ispitivanog seruma, što povećava mogućnost pojave lažno pozitivnih rezultata, te je neophodno koristiti veliko razblaženje seruma što, sa svoje strane, može rezultirati pojavom lažno negativnog rezultata, posebno kod niskog titra AQP4 At u serumu (48). Stoga su senzitivnost i

specifičnost ove metode, u zavisnosti od različitih studija, procenjene na 40 - 78,0%, odnosno 97,1 - 100% (48, 59, 62).

Metode kao što su RIPA i FIPA generalno su pokazale nižu senzitivnost (RIPA 56,8%; FIPA 48,7%) u odnosu na druge eseje za detekciju AQP4 At, te se ređe koriste u kliničkoj praksi, čemu doprinosi i činjenica da se za neke od njih (RIPA) koriste radioaktivni obeleživači (48, 59).

Izuzetno važnu grupu testova u detekciji serumskih AQP4 At čine metode CBA, koje koriste posebno obrađene ćelije sa eksprimiranim AQP4 (9, 48, 58, 63, 64). Dakle, najčešće su u pitanju humane embrionalne ćelije bubrega (engl. *Human Embryonic Kidney* - HEK) kod kojih je izvršena transfekcija AQP4 proteina, zbog čega oni postaju eksprimirani na površini ovih ćelija (47, 48, 58, 60).

Ćelijski esej CBA može koristiti principe IIF kada se AQP4 transfektovane ćelije nalaze fiksirane na biočipu, a detekcija AQP4 At se vrši pomoću fluorescentnog mikroskopa (58, 59, 61, 65). Ovo je subjektivna metoda jer podrazumeva klasičnu primenu IIF i analizu rezultata pomoću fluorescentnog mikroskopa, samo što supstrat testa čine humane AQP4 transfektovane ćelije, kao i netransfektovane ćelije kao kontrolno polje (65).

Ćelijski esej FACS predstavlja potpuno automatizovanu i vrlo preciznu metodu CBA, koja se takođe zasniva na primeni AQP4 transfektovanih ćelija i fluorescencije merene protočnom citometrijom, što omogućava i kvantifikaciju AQP4 At (titar u serumu), što nije karakteristika CBA metode sa IIF, odnosno sa fluorescentnom mikroskopijom (63, 64, 65). Međutim, protokoli za sprovođenje FACS su kompleksni, zahtevaju dosta vremena, kao i dobro opremljenu laboratoriju (63, 66).

Pokazano je, u zavisnosti od literature, da se senzitivnost CBA za detekciju AQP4 At kod NMOSB kreće do 96,7%, dok je specifičnost praktično iznosila 100% (48, 62, 64). Zbog toga što CBA ima najveću senzitivnost i specifičnost u odnosu na druge metode, u kliničkoj praksi se preporučuje upravo primena ovog eseja kada je u pitanju proces dijagnostičke eksploracije u NSMOB (9, 14, 48, 62, 64).

Antitela na mijelin oligodendrocitni glikoprotein

Kod određenog broja pacijenata sa kliničkom i radiološkom manifestacijom koja odgovara imunski posredovanim inflamatornim demijelinizacionim bolestima CNS-a, kao i kod seronegativnih pacijenata sa NMOSB, mogu se detektovati autoantitela klase IgG na mijelin oligodendrocitni glikoprotein (MOG At) (67, 68). Ovaj glikoprotein predstavlja transmembranski protein sastavljen od 218 aminokiselina ukupne molekulske mase 26 - 28 kilodaltona (kD), koji je eksprimiran na oligodendrocitima unutar CNS-a (68-70). Njegove biološke funkcije nisu do kraja razjašnjene, ali se smatra da, između ostalog, ima ulogu adhezivnog molekula ali i celularnog receptora (68-70). Intenzivna istraživanja bila su usmerena i na značaj primene metodološki različitih testova za detekciju MOG At u serumu, kada je pokazano da je, u odnosu na

sve standardne laboratorijske metode za detekciju autoantitela, senzitivnost i specifičnost CBA metode bila najveća, iznosivši 74,6 - 89,1%, odnosno 93,3 - 100%, kao i da je postignut najveći stepen interlaboratorijske podudarnosti rezultata CBA metodologije od 90% do 96% (71-73). Uzimajući u obzir sve kliničke i parakliničke karakteristike, Internacionalni MOGAD panel je definisao i predložio dijagnostičke kriterijume za bolest udruženu sa MOG At (MOGAD), navodeći da je prisustvo MOG At u serumu ovih pacijenata ključno, tj. neophodno za postavljanje dijagnoze MOGAD, kao i da je jedina visokospecifična i senzitivna laboratorijska metoda izbora u detekciji serumskih MOG At, upravo CBA (67).

Značaj ostalih laboratorijskih testova u neuromijelitis optika spektru bolesti

Brojne druge laboratorijske analize, koje u prvom redu uključuju rutinske biohemijske analize krvi i urina, potom imunološke analize, mikrobiološke i druge analize, svakako imaju svoje mesto u procesu diferencijalno dijagnostičkog ispitivanja u svakodnevnoj kliničkoj praksi kod svih pacijenata kod kojih postoji sumnja na NMOSB (14).

Zaključak

Laboratorijska ispitivanja krvi i cerebrospinalne tečnosti su nezaobilazan korak u procesu diferencijalno dijagnostičke eksploracije pacijenata kod kojih postoji sumnja na imunski posredovanu bolest CNS-a. Primena specifičnih tehnika i metoda laboratorijskih analiza omogućava postavljanje definitivne i pouzdane dijagnoze bolesti kao što je NMOSB, posebno imajući u vidu da su kod većine obolelih u serumu detektibilna AQP4 At, koja predstavljaju jasno ustanovljen i pouzdan molekularni biomarker ove bolesti.

Literatura

1. Wingerchuk DM, Weinshenker BG. Neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Handb Clin Neurol*. 2014; 122:581-99.
2. Jarius S, Wildemann B. The history of neuromyelitis optica. *J Neuroinflammation*. 2013; 10:8.
3. Jarius S, Wildemann B. The history of neuromyelitis optica. Part 2: 'Spinal amaurosis', or how it all began. *J Neuroinflammation*. 2019; 16(1):280.
4. Devic E. Myélite aiguë dorso-lombaire avec névrite optique: Autopsie. Paris: Asselin et Houzeau, Louis Savy; 1895. p.434-9.
5. Brain WR. Critical review: disseminated sclerosis. *QJM*. 1930; 23(91):343-91.
6. Wingerchuk DM, Hogancamp WF, O'Brien PC, Weinshenker BG. The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Neurology*. 1999; 53(5):1107-14.
7. Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Fujihara K, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet*. 2004; 364(9451):2106-12.
8. Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Weinshenker BG. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis

- optica. *Neurology*. 2006; 66(10):1485-9.
9. Wingerchuk DM, Banwell B, Bennett JL, Cabre P, Carroll W, Chitnis T, et al. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology*. 2015; 85(2):177-89.
10. Solomon AJ, Arrambide G, Brownlee WJ, Flanagan EP, Amato MP, Amezcu L, et al. Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: an updated consensus approach. *Lancet Neurol*. 2023; 22(8):750-68.
11. Banwell B, Bennett JL, Marignier R, Kim HJ, Brilot F, Flanagan EP, et al. Diagnosis of myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disease: International MOGAD Panel proposed criteria. *Lancet Neurol*. 2023; 22(3):268-82.
12. Rahimi J, Woehrer A. Overview of cerebrospinal fluid cytology. *Handb Clin Neurol*. 2017; 145:563-71.
13. Hepnar D, Adam P, Žáková H, Krušina M, Kalvach P, Kasík J, et al. Recommendations for cerebrospinal fluid analysis. *Folia Microbiol (Praha)*. 2019; 64(3):443-52.
14. Jarius S, Aktas O, Ayzenberg I, Bellmann-Strobl J, Berthele A, Giglhuber K, et al. Update on the diagnosis and treatment of neuromyelitis optica spectrum disorders (NMOSD) - revised recommendations of the Neuromyelitis Optica Study Group (NEMOS). Part I: Diagnosis and differential diagnosis. *J Neurol*. 2023; 270(7):3341-68.
15. Lovato L, Willis SN, Rodig SJ, Caron T, Almendinger SE, Howell OW, et al. Related B cell clones populate the meninges and parenchyma of patients with multiple sclerosis. *Brain*. 2011; 134(Pt 2):534-41.
16. Racke MK. The role of B cells in multiple sclerosis: rationale for B-cell-targeted therapies. *Curr Opin Neurol*. 2008; 21 Suppl 1:S9-18.
17. Petzold A. Intrathecal oligoclonal IgG synthesis in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2013; 262(1-2):1-10.
18. Deisenhammer F, Zetterberg H, Fitzner B, Zettl UK. The Cerebrospinal Fluid in Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2019; 10:726.
19. Deisenhammer F, Sellebjerg F, Teunissen CE, Tumani H, editors. *Cerebrospinal Fluid in Clinical Neurology*. 1st ed. Heidelberg; New York; Dordrecht; London: Springer; 2015.
20. Carta S, Ferraro D, Ferrari S, Briani C, Mariotto S. Oligoclonal bands: clinical utility and interpretation cues. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2022; 59(6):391-404.
21. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol*. 2005; 62(6):865-70.
22. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. 2018; 17(2):162-73.
23. Link H, Huang YM. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol*. 2006; 180(1-2):17-28.
24. Olsson T. Multiple sclerosis: cerebrospinal fluid. *Ann Neurol*. 1994; 36 Suppl:S100-2.
25. Dobson R, Ramagopalan S, Davis A, Giovannoni G. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013; 84(8):909-14.
26. Reiber H, Teut M, Pohl D, Rostasy KM, Hanefeld F. Paediatric and adult multiple sclerosis: age-related differences and time course of the neuroimmunological response in cerebrospinal fluid. *Mult Scler*. 2009; 15:1466-80.
27. Hegen H, Walde J, Berek K, Arrambide G, Gnanapavan S, Kaplan B, et al. Cerebrospinal fluid kappa free light chains for the diagnosis of multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Mult Scler*. 2023; 29(2):169-81.
28. O'Riordan JI, Gallagher HL, Thompson AJ, Howard RS, Kingsley DP, Thompson EJ, et al. Clinical, CSF, and MRI findings in Devic's neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1996; 60(4):382-7.
29. Jarius S, Paul F, Franciotta D, Ruprecht K, Ringelstein M, Bergamaschi R, et al. Cerebrospinal fluid findings in aquaporin-4 antibody positive neuromyelitis optica: results from 211 lumbar punctures. *J Neurol Sci*. 2011; 306(1-2):82-90.
30. Bergamaschi R, Tonietti S, Franciotta D, Candeloro E, Tavazzi E, Piccolo G, et al. Oligoclonal bands in Devic's neuromyelitis optica and multiple sclerosis: differences in repeated cerebrospinal fluid examinations. *Mult Scler*. 2004; 10(1):2-4.
31. Nakashima I, Fujihara K, Sato S, Itoyama Y. Oligoclonal IgG bands in Japanese patients with multiple sclerosis. A comparative study between isoelectric focusing with IgG immunofixation and high-resolution agarose gel electrophoresis. *J Neuroimmunol*. 2005; 159(1-2):133-6.
32. Nakamura M, Nakashima I, Sato S, Miyazawa I, Fujihara K, Itoyama Y. Clinical and laboratory features of neuromyelitis optica with oligoclonal IgG bands. *Mult Scler*. 2007; 13(3):332-5.
33. Foo JN, Liu JJ, Tan EK. Whole-genome and whole-exome sequencing in neurological diseases. *Nat Rev Neurol*. 2012; 8(9):508-17.
34. Verma M, Kulshrestha S, Puri A. Genome Sequencing. *Methods Mol Biol*. 2017; 1525:3-33.
35. Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Hum Immunol*. 2021; 82(11):801-11.
36. Xue Y, Ankala A, Wilcox WR, Hegde MR. Solving the molecular diagnostic testing conundrum for Mendelian disorders in the era of next-generation sequencing: single-gene, gene panel, or exome/genome sequencing. *Genet Med*. 2015; 17(6):444-51.
37. Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P, Noell S, Mack AF. Structure and functions of aquaporin-4-based orthogonal arrays of particles. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2011; 287:1-41.
38. Li S, Li C, Wang W. Molecular aspects of aquaporins. *Vitam Horm*. 2020; 113:129-81.
39. Lu M, Lee MD, Smith BL, Jung JS, Agre P, Verdijk MA, et al. The human AQP4 gene: definition of the locus encoding two water channel polypeptides in brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93(20):10908-12.
40. Yang B, Ma T, Verkman AS. cDNA cloning, gene organization, and chromosomal localization of a human mercurial insensitive water channel. Evidence for distinct transcriptional units. *J Biol Chem*. 1995; 270(39):22907-13.
41. Neely JD, Christensen BM, Nielsen S, Agre P. Heterotetrameric composition of aquaporin-4 water channels. *Biochemistry*. 1999; 38(34):11156-63.
42. Rash JE, Yasumura T, Hudson CS, Agre P, Nielsen S. Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95(20):11981-6.
43. Venero JL, Vizuete ML, Machado A, Cano J. Aquaporins in the central nervous system. *Prog Neurobiol*. 2001; 63(3):321-36.
44. Hasegawa H, Ma T, Skach W, Matthay MA, Verkman AS. Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues. *J Biol Chem*. 1994; 269(8):5497-500.
45. Nicchia GP, Mastroianni M, Rossi A, Pisani F, Tortorella C, Ruggieri M, et al. Aquaporin-4 orthogonal arrays of particles are the target for neuromyelitis optica autoantibodies. *Glia*. 2009; 57(13):1363-73.
46. Pisani F, Mastroianni M, Rossi A, Nicchia GP, Tortorella C, Ruggieri M, et al. Identification of two major conformational aquaporin-4 epitopes for neuromyelitis optica autoantibody binding. *J Biol Chem*. 2011; 286(11):9216-24.
47. Pisani F, Sparaneo A, Tortorella C, Ruggieri M, Trojano M, Mola MG, et al. Aquaporin-4 autoantibodies in Neuromyelitis Optica: AQP4 isoform-dependent sensitivity and specificity. *PLoS One*. 2013; 8(11):e79185.
48. Waters PJ, Pittock SJ, Bennett JL, Jarius S, Weinshenker BG, Wingerchuk DM. Evaluation of aquaporin-4 antibody assays. *Clin Exp Neuroimmunol*. 2014; 5(3):290-303.
49. Redenbaugh V, Montalvo M, Sechi E, Bucic M, Fryer JP, McKeon A, et al. Diagnostic value of aquaporin-4-IgG live cell based assay in neuromyelitis optica spectrum disorders. *Mult Scler J Exp Transl Clin*. 2021; 7(4):20552173211052656.
50. Tabatabaei MS, Ahmed M. Enzyme-Linked Immunosorbent

- Assay (ELISA). *Methods Mol Biol.* 2022; 2508:115-34.
51. Hayrapetyan H, Tran T, Tellez-Corrales E, Madiraju C. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Types and Applications. *Methods Mol Biol.* 2023; 2612:1-17.
 52. Hayakawa S, Mori M, Okuta A, Kamegawa A, Fujiyoshi Y, Yoshiyama Y, et al. Neuromyelitis optica and anti-aquaporin-4 antibodies measured by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Neuroimmunol.* 2008; 196(1-2):181-7.
 53. Kim W, Lee JE, Li XF, Kim SH, Han BG, Lee BI, et al. Quantitative measurement of anti-aquaporin-4 antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay using purified recombinant human aquaporin-4. *Mult Scler.* 2012; 18(5):578-86.
 54. Tampoia M, Abbracciavento L, Barberio G, Fabris M, Bizzaro N. Study Group on Autoimmune Diseases of the Italian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine, Italy. A new M23-based ELISA assay for anti-aquaporin 4 autoantibodies: diagnostic accuracy and clinical correlation. *Auto Immun Highlights.* 2019; 10(1):5.
 55. Isobe N, Yonekawa T, Matsushita T, Kawano Y, Masaki K, Yoshimura S, et al. Quantitative assays for anti-aquaporin-4 antibody with subclass analysis in neuromyelitis optica. *Mult Scler.* 2012; 18(11):1541-51.
 56. Jarius S, Franciotta D, Paul F, Bergamaschi R, Rommer PS, Ruprecht K, et al. Testing for antibodies to human aquaporin-4 by ELISA: sensitivity, specificity, and direct comparison with immunohistochemistry. *J Neurol Sci.* 2012; 320(1-2):32-7.
 57. Williams JP, Abbatemarco JR, Galli JJ, Rodenbeck SJ, Peterson LK, Haven TR, et al. Aquaporin-4 Autoantibody Detection by ELISA: A Retrospective Characterization of a Commonly Used Assay. *Mult Scler Int.* 2021; 2021:8692328.
 58. Kim YJ, Jung SW, Kim Y, Park YJ, Han K, Oh EJ. Detection of anti-aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica: comparison of tissue-based and cell-based indirect immunofluorescence assays and ELISA. *J Clin Lab Anal.* 2012; 26(3):184-9.
 59. Fazio R, Malosio ML, Lampasona V, De Feo D, Privitera D, Marnetto F, et al. Anti-aquaporin 4 antibodies detection by different techniques in neuromyelitis optica patients. *Mult Scler.* 2009; 15(10):1153-63.
 60. Jarius S, Probst C, Borowski K, Franciotta D, Wildemann B, Stoecker W, et al. Standardized method for the detection of antibodies to aquaporin-4 based on a highly sensitive immunofluorescence assay employing recombinant target antigen. *J Neurol Sci.* 2010; 291(1-2):52-6.
 61. Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol.* 2019; 1897:299-311.
 62. Prain K, Woodhall M, Vincent A, Ramanathan S, Barnett MH, Bundell CS, et al. AQP4 Antibody Assay Sensitivity Comparison in the Era of the 2015 Diagnostic Criteria for NMOSD. *Front Neurol.* 2019; 10:1028.
 63. Fryer J, Lennon V, Pittock S, Jenkins SM, Fallier-Becker P, Clardy SL, et al. AQP4 Autoantibody assay performance in clinical laboratory service. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2014; 1(1):e11.
 64. Redenbaugh V, Montalvo M, Sechi E, Buciu M, Fryer JP, McKeon A, et al. Diagnostic value of aquaporin-4-IgG live cell based assay in neuromyelitis optica spectrum disorders. *Mult Scler J Exp Transl Clin.* 2021; 7(4):20552173211052656.
 65. Liu C, Zhu M, Wang Y. Human Serum Anti-aquaporin-4 Immunoglobulin G Detection by Cell-based Assay. *J Vis Exp.* 2019; (146).
 66. Selliah N, Eck S, Green C, Oldaker T, Stewart J, Vitaliti A, et al. Flow Cytometry Method Validation Protocols. *Curr Protoc Cytom.* 2019; 87(1):e53.
 67. Banwell B, Bennett JL, Marignier R, Kim HJ, Brilot F, Flanagan EP, et al. Diagnosis of myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disease: International MOGAD Panel proposed criteria. *Lancet Neurol.* 2023; 22(3):268-82.
 68. Tea F, Lopez JA, Ramanathan S, Merheb V, Lee FXZ, Zou A, et al. Australasian and New Zealand MOG Study Group. Characterization of the human myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody response in demyelination. *Acta Neuropathol Commun.* 2019; 7(1):145.
 69. Reindl M, Waters P. Myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies in neurological disease. *Nat Rev Neurol.* 2019; 15(2):89-102.
 70. Johns TG, Bernard CC. The structure and function of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Neurochem.* 1999; 72(1):1-9.
 71. Gastaldi M, Scaranzin S, Jarius S, Wildemann B, Zardini E, Mallucci G, et al. Cell-based assays for the detection of MOG antibodies: a comparative study. *J Neurol.* 2020; 267(12):3555-64.
 72. Reindl M, Schanda K, Woodhall M, Tea F, Ramanathan S, Sagen J, et al. International multicenter examination of MOG antibody assays. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2020; 7(2):e674.
 73. Lopez JA, Houston SD, Tea F, Merheb V, Lee FXZ, Smith S, et al. Validation of a Flow Cytometry Live Cell-Based Assay to Detect Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Antibodies for Clinical Diagnostics. *J Appl Lab Med.* 2022; 7(1):12-25.