

P. Schneiderka, Ústav patologické fyziologie LFUP a OKB FN Olomouc

Radioimunoanalýza (RIA)

Úvod

V r. 1959 byla zveřejněna pionýrská práce S. A. Bersona a R. S. Yalowové (Quantitative aspects between insulin and insulin-binding antibody, *J. Clin. Invest.*, 1959) s využitím radioaktivně značeného analogu insulínu (izotop jodu ^{131}I). Pokračováním práce a publikací výsledků výzkumu (Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.*, 1960; 39:1157-75), byl položen základ kvantitativních analytických metod, založených na interakci antigen-protilátka, které se nazývají imunoanalytické metody = imunoanalýzy. V průběhu dalších let se pro značení v imunoanalýze začaly využívat také různé neizotopové značky, např. fluorescenční a chemiluminiscenční látky, cheláty lanthanidů, komplexy těžkých kovů, stabilní volné radikály, feritin, koenzymy a enzymy nebo jejich inhibitory. Přesto se RIA rychle rozšířila do všech oblastí laboratorní medicíny a stala se významným analyticko-diagnostickým nástrojem. Teprve v posledním desetiletí nasazení této metody klesá, neboť je postupně nahrazována neizotopovými imunoanalytickými a jinými metodami. Přesto si zachovává jisté uplatnění v analýze a ve výzkumu, zejména pro svou vysokou citlivost a nízkou finanční náročnost.

Klasifikace radioimunoanalýz a základní informace

Termínem RIA v užším smyslu se rozumí kompetitivní radioimunoanalýza v heterogenním uspořádání. Nekompetitivní modifikace na sendvičovém principu se nazývá imunoradiometrická analýza, **ImmunoRadioMetric Assay, IRMA**.

Kompetitivní heterogenní radioimunoanalýza může kompletně probíhat v kapalně fázi, jako je tomu u klasické RIA, nebo s použitím pevné fáze.

U klasické RIA v **kapalně fázi** "soutěží" antigen séra, který chceme stanovit, s antigenem značeným ^{125}I o vazbu na omezené množství vazebných míst specifických protilátek. Vznikají komplexy [antigen séra + protilátka] a [značený antigen + protilátka]. Po ukončené imunoreakci zůstávají v roztoku přítomny ještě nezreagované molekuly značeného antigenu. Je možno měřit jak komplex [značený antigen + protilátka] (obr. 1), tak zbyváající značený antigen. Druhou složku je ovšem nutno předem odstranit. To se provádí srážením např. polyethylenglykolem nebo koprecipitací pomocí druhé protilátky, nebo adsorpcí na vhodný sorbent, a následnou centrifugací. Vzhledem k tomu, že ^{125}I je gama-zářič, měříme radioaktivitu detektorem gama-záření. Jestliže se měří komplex [značený antigen + protilátka], což je častější případ, je mezi velikostí naměřeného signálu a koncentrací antigenu ve vzorku nepřímá závislost. Když se měří radioaktivita zbyváajícího značeného antigenu, je mezi velikostí signálu a koncentrací antigenu přímá závislost.

U RIA metod s **pevnou fází** je protilátka vázána na různé typy materiálů – imunosorbentů. Bývají to částice celulózy, polyakrylamidu, dextranu (Sephadexu), skleněné kuličky, nebo vnitřní stěny zkušev a mikrotitračních destiček z plastických hmot, nebo také feromagnetické částice. Imuno komplexy se potom nemusejí oddělovat srážením, ale pouhou centrifugací nebo s využitím magnetického pole. Způsoby měření a vyhodnocení jsou stejné jako je uvedeno výše.

Metody RIA se v klinických laboratořích nejčastěji využívají pro stanovení velkého spektra peptidových a steroidních hormonů, bílkovin o nízké koncentraci (citlivost metod cca 10 pmol/l) a léčiv.

Nekompetitivní imunoradiometrická analýza, IRMA, má odlišné uspořádání (obr. 2). Na pevnou fázi, např. na stěnu zkušev nebo mikrotitračních destiček, je navázána specifická protilátka proti stanovovanému antigenu. Přidáním vyšetřovaného vzorku s tímto antigenem vznikne primární komplex [vázaná protilátka + stanovovaný antigen]. Po vypláchnutí zbytku vzorku se přidá nadbytek značené protilátky proti stejnému antigenu. Ta se naváže na stávající komplex, a tím vznikne větší sekundární komplex [vázaná protilátka + stanovovaný antigen + značená protilátka]. Po odstranění zbyváající značené protilátky se měří radioaktivita

sekundárního komplexu. Čím více je stanovovaného antigenu ve vzorku, tím více se vytvoří sekundárního imunního komplexu, který se měří. Mezi velikostí naměřeného signálu a koncentrací stanovovaného antigenu ve vzorku je přímá úměra.

Pro tuto techniku se s výhodou používají monoklonální protilátky s vyšší specifitou. Předností IRMA je jednoduchost provedení, vysoká citlivost a možnost automatizace. Jak vyplývá z popsaného principu, metoda se používá pro stanovení větších a velkých molekul, které musí obsahovat alespoň 2 dostatečně stéricky vzdálené antigenní determinanty.

C-terminální telopeptid kolagenu I

Tento peptid, ve zkratce ICTP, je karboxyterminálním úsekem molekuly kolagenu typu I (čti: jedna). Je charakteristický množstvím pyridinolinových spojovacích úseků a uvolňuje se jako časný degradační produkt při odbourávání tohoto typu kolagenu. Na degradaci se pravděpodobně významně podílejí proteinázy mezibuněčné hmoty (matricové metaloproteinázy). Kolagen I je nejrozšířenějším kolagenem v našem organismu a jediným, který se vyskytuje v kosti. Spolu s kolageny III, IV a V je dále přítomen také v řídkých pojivových tkáních.

ICTP se z míst degradace kostí a pojiva uvolňuje do krve. Jeho zvýšené koncentrace v krvi (séru) se nacházejí při stavech spojených s vyšší osteolýzou, např. při mnohočetném myelomu a při osteolytických metastázách jiných nádorů, při déletrvajících imobilizaci a při revmatoidní artritidě.

Videosekvence „Radioimunoanalýza“

Příkladem radioimunoanalýzy je stanovení peptidu ICTP s použitím komerční soupravy činidel (UniQ, Orion Diagnostika, Finsko) a s měřením radioaktivity pomocí automatického gama-počítače Cobra (Canberra-Packard, USA). Toto stanovení obsahuje velký díl manuální laboratorní přípravy a teprve měřicí a výpočetní činnost je automatizována.

Gama-počítač Cobra je kompaktní stolní přístroj pro měření záření gama v diagnostických laboratorních testech *in vitro*. Je doplněn řídicím počítačem a tiskárnou. K práci jsou dále nezbytné pipety, míchačka, třepačka, termostat a vodní vývěva (nebo odstředivka).

Metoda je založena na principu **kompetitivní heterogenní radioimunoanalýzy** na pevné fázi. Radioindikátorem je ^{125}I , pevnou fází představuje vnitřní povrch polystyrenové zkumavky. Znamé množství značeného ICTP a stanovovaný ICTP ve vzorku soutěží o omezený počet vysoce afinitních vazebných míst protilátky proti ICTP. Po separaci volného antigenu se měří množství značeného ICTP zbývajících na stěně zkumavek. Velikost signálu je nepřímou úměrnou koncentraci stanovovaného ICTP ve vzorku.

Souprava pro stanovení ICTP se skládá z polystyrenových zkumavek, roztoku separátoru (polyethylenglykol), radioaktivní značky (traceru), roztoku protilátky a sady kalibračních roztoků o známých koncentracích 0; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 25; a 50 $\mu\text{g/l}$ ICTP.

Ve videoklipu je zachycena příprava kalibrační řady obsahující ve zkumavkách v dubletu 7 koncentrací kalibračních roztoků. K nim se postupně pipetuje nejdříve radioaktivní tracer (oranžová kapalina) a po něm protilátka (modrý roztok). Roztoky se promíchají a poté inkubují 2 hodiny ve vodní lázni nebo v termostatu při 37 °C (není zachyceno na videoklipu).

Po skončení této inkubace se přidává separační činidlo, které během následující půlhodinové inkubace na třepačce při pokojové teplotě vysráží zbývajících antigen. Obsah zkumavek se potom odsaje kapilárou pomocí vodní vývěvy. Zkumavky se přemístí do speciálních stojánek a v nich se uloží na pult gama-počítače.

Pokračuje automatické měření radioaktivity a po jeho skončení se na displeji řídicího počítače zobrazí hodnoty naměřené odezvy (CPM) kalibračních standardů. Na jejich základě lze sestavit graf kalibrační závislosti nebo jsou použity pro automatický výpočet koncentrací prostřednictvím softwaru přístroje.

Stejným postupem se zpracovávají a měří také vzorky biologického materiálu (séra) pacientů a kontrolní vzorky.

V závěru je pro srovnání uveden příklad stanovení růstového hormonu (GH) **nekompetitivní imunoradiometrickou metodou**. Komerční souprava obsahuje polystyrenové zkumavky s navázanou protilátkou proti GH, roztok stejné protilátky značené radioaktivním jódem 125, promývací roztok a kalibrační řadu GH.

Růstový hormon ve vzorku reaguje s protilátkou navázanou na stěně zkumavek a vytvoří tam primární komplex. Přidáním značené protilátky se vytvoří sekundární komplex. Po odstranění zbývající nezreagované značené protilátky promytím se radioaktivita tohoto komplexu měří gama počítačem stejně jako v předchozím příkladu stanovení ICTP metodou RIA.

Doporučená literatura

ČSN EN ISO 15189:2007 Zdravotnické laboratoře - Zvláštní požadavky na kvalitu a způsobilost.

Doležalová V. a kol.: Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii. Učební text IDVPZ Brno, 1996

Chromý V. a kol.: Bioanalytika. Učební text PŘF MU Brno, 2.vydání 2011

Sedlák J., Štolba P.: Enzymová imunoanalýza. Novinky v medicíně 29. Avicenum Praha, 1983

Štern P. a kol.: Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory studia, Karolinum Praha, 2. vydání 2011

Další zdroje:

Encyklopedie laboratorní medicíny. Dostupné na <http://www.sekk.cz>