

Imunoradiometrické stanovení koncentrace hormonu AFP

K. Stefanová, Gymnázium Boženy Němcové, Hradec Králové,
stefanova.klara97@gmail.com

A. Majchráková, Bilingválne gymnázium M. Hodžu, Sučany,
an.majchrakova@gmail.com

K. Čičová, Bilingválne gymnázium, Nové Mesto nad Váhom,
katarina.cicova98@gmail.com

H. Loskot, Masarykovo gymnázium, Příbor, hynek.loskot@gypri.cz

J. Dušek, Gymnázium J. S. Machara, Brandýs nad Labem – Stará
Boleslav, jindrich.dusek@gbl.cz

Abstrakt

Cílem tohoto projektu bylo stanovit koncentraci hormonu AFP v neznámém vzorku pomocí radioimunologické metody IRMA. Hladina koncentrace hormonu AFP v době těhotenství napomáhá k určení zdravého vývoje plodu a u ostatních jedinců může sloužit jako ukazatel rakovinného bujení v těle. Radioimunologické metody se v lékařství velmi často užívají k analýze látek obsažených v krvi, krevním séru nebo mozkomíšním moku.

1. Úvod

Radioimunologická analýza je důležitá součást moderní medicíny, která nám pomáhá určit látku a její přítomnost ve vzorku. Mezi výhody při využívání této metody patří například možnost zpracování velkého množství vzorků, protože je potřeba velmi malé množství látky na měření a jednoduchost praktické části měření. Hlavní nevýhodou je možnost nespecifické reakce, protože látka nemusí mít jedinou reakční protilátku.

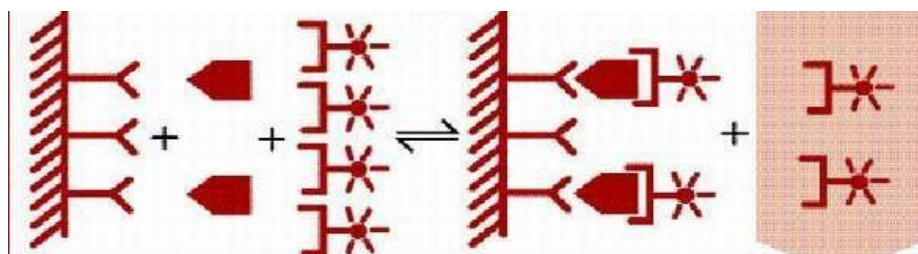
2. Radioimunologické metody

Podstatou těchto metod stanovení je imunochemický princip, který využívá specifickou vazbu mezi látkou (antigen) a protilátkou. Jelikož je tato vazba velice specifická a téměř nezaměnitelná můžeme pomocí těchto postupů přesně určit koncentraci daného antigenu i ve složitých maticích jako je například krev nebo mozkomíšní mok. Při indikaci těchto koncentrací využíváme radionuklid ^{125}I , jehož velkou výhodou je relativně dlouhý poločas rozpadu (60 dní). Vybavení

k provádění těchto metod je dodáváno komerčně v kitech, které obsahují standardizované vzorky, radionuklid a případně další potřebné chemikálie nebo laboratorní vybavení.

IRMA

IRMA je označení pro tzv. imunoradiometrické stanovení. Její velký rozvoj byl umožněn zavedením polystyrenových zkušev, které jsou potaženy protilátkou. S touto protilátkou následně reaguje antigen, jež je do zkumavky přidán. Poté je do zkumavky přimíchán ještě radioindikátor, který také vytvoří vazbu s antigenem. Tímto vzniká komplex, který je označován jako tzv. sendvič, složený z protilátky, antigenu a radioindikátoru (obr. 1). Tento komplex zůstává na stěněch zkumavky po vymytí a odsátí přebytečného radioindikátoru a následné změření aktivity reprezentuje množství těchto „sendvičových“ jednotek, jež následně slouží k určení koncentrace stanovované látky na základě kalibrační přímky.



Obrázek 1: Princip vzniku „sendvičové“ jednotky při metodě IRMA [2]

Alfafetoprotein (AFP)

Alfafetoprotein patří do skupiny glykoproteinů. Je produkován v těle ženy v době těhotenství žloutkovým váčkem a později játry plodu. Jeho největší koncentrace (okolo 3 g/l) se nachází ve fetální plazmě mezi 10. a 13. týdnem těhotenství, s blížícím se termínem porodu jeho koncentrace klesá. Jeho nízké hladiny v krevní plazmě mohou ukazovat trisomii 21 (Downův syndrom) nebo jiná onemocnění plodu jako např. toxémii a toxoplasmosu.

Mírné zvýšení hladiny AFP můžeme také pozorovat u pacientů trpících jaterní cirhózou nebo chronickou hepatitidou. Některá maligní onemocnění (leukemie, melanomy nebo nádory trávicího traktu) se také mohou projevat zvýšenými hladinami tohoto hormonu. [3]

3. Experimentální část

Veškerá příprava probíhala v laminárním boxu. Připravili jsme si osm zkumavek, jež byly pokryté protilátkou, které jsme umístili do stojánku v následujícím pořadí: 5 zkumavek s protilátkou na kalibraci (označeno 0-4), 2 zkumavky označené T a jednu zkumavku s protilátkou na neznámý vzorek (označeno N). Nejprve jsme si vytvořili roztok neznámého vzorku. Vzorek byl ve formě lyofilizátu, jeho rozpuštění bylo provedeno 0,5 ml destilované vody. Do každé ze zkumavek určených ke kalibraci a do zkumavky na neznámý vzorek jsme odpipetovali 50 μ l příslušného roztoku. Následně jsme do každé ze zkumavek napipetovali 200 μ l radioindikátoru, který obsahoval 125 I. Každá zkumavka byla promíchána na vibračním míchadle, a poté byly všechny

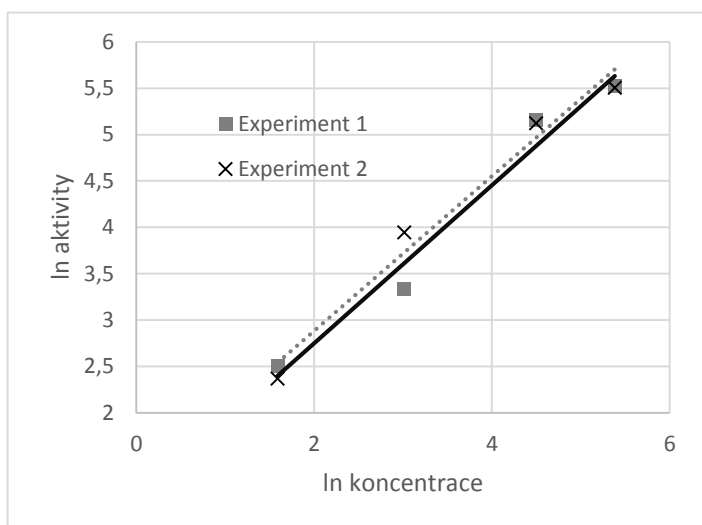
umístěny na třepačku po dobu 45 minut, aby došlo k jejich inkubaci. Po inkubaci jsme odsáli obsah zkumavek, ve zkumavkách s označením T indikátor ponechali. Do odsátých zkumavek jsme napipetovali 2 ml promývacího roztoku a ten poté opět pečlivě odsáli. Následně jsme změřili aktivitu všech zkumavek na scintilačním gama detektoru po dobu jedné minuty a získaná data dále zpracovali pomocí tabulkového programu. Stanovení byla prováděna dvakrát.

4. Výsledky a diskuze

Byly proměřeny obě sady vzorků, které dále jsou označovány jako experiment 1 a experiment 2. Každý vzorek byl proměřen celkem třikrát a při zpracování výsledku byla využita průměrná hodnota aktivity. Průměrné hodnoty aktivit jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Aktivity standardizovaných vzorků a vzorku s neznámou aktivitou

Koncentrace [IU/ml]	Aktivita experimentu č. 1 [imp/s]	Aktivita experimentu č. 2 [imp/s]
0	29,7	21,3
4,9	42	32
20,4	57,7	73
90,0	204	189,3
218,0	279,3	267,3
Neznámá	207,3	195,7



Obrázek 2: Závislost aktivity vzorku na koncentraci hormonu AFP

Hodnoty aktivit u standardizovaných vzorků byly vyneseny do grafu s tím, že vzorek s nulovou koncentrací byl uvažován jako pozadí a od naměřených hodnot byl odečten. Pro linearizaci kalibrační křivky byly hodnoty koncentrace vyneseny ve formě přirozeného logaritmu. Jednotlivé body byly proloženy kalibrační křivkou, jejíž rovnice nám umožnila určit koncentraci u neznámého vzorku. Výsledky vynesené do grafu spolu s kalibrační křivkou jsou uvedeny na obrázku 2.

Přímkou byly proloženy zlogaritmované hodnoty, což znamená, že dopočítávání výsledné koncentrace neznámého vzorku, musíme do rovnice dosadit zlogaritmovanou hodnotu aktivity za y a získanou hodnotu podle vztahu $c = e^x$ převedeme na koncentraci c . V tabulce 2 jsou uvedeny rovnice kalibračních křivek a koncentrace hormonu v neznámém vzorku, které jsme dopočítali pomocí rovnic kalibračních křivek.

Tabulka 2: Rovnice kalibračních křivek a koncentrace AFP v neznámém vzorku

	Experiment 1	Experiment 2
Rovnice kalibrační křivky	$y = 0,8512x + 1,0472$	$y = 0,8339x + 1,2156$
Koncentrace neznámého vzorku [UI/ml]	88,6	86,9

Při porovnání obou výsledků mezi sebou dojdeme k zjištění, že se stanovené koncentrace mírně liší. Tento jev je způsoben nepřesnostmi při manipulaci s látky, zejména poté při pipetování. Při porovnání průměru obou hodnot (87,75 UI/ml) a výsledku uvedené v návodu (63,6-107 UI/ml) zjišťujeme, že námi získaná hodnota je obsažena v intervalu možných hodnot, tudíž stanovení byla provedena správně. Rozdílné hodnoty u dílčích výsledků byly pravděpodobně způsobeny nepřesným pipetováním a nedostatečným výplachem zkumavek.

5. Závěr

Námi zjištěná koncentrace neznámého výsledku činila 87,75 UI/ml, což se shoduje s výsledkem uvedeným v návodu a z tohoto důvodu lze naše měření považovat za správné. Koncentrace neznámého vzorku je obsažena v návodu, protože neznámý vzorek slouží v laboratořích k ověření správnosti vytvořené kalibrační křivky.

Poděkování

Na závěr bychom chtěli poděkovat naší supervizorce Ing. Ekaterině Kuklevě za obětavou pomoc a cenné rady k našemu miniprojektu. Dále bychom chtěli poděkovat všem organizátorům TV@J v čele s Ing. Vojtěchem Svobodou, CSc. za vynaložené úsilí k přípravě TV@J a FJFI ČVUT za poskytnutí prostor a vybavení.

Reference

[1] Návod k úloze vypracovaný na FJFI

[2] Postgraduální medicína: Laboratorní metody v gynekologické endokrinologii, [cit. 21-06-2016] Dostupné z URL: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/laboratorni-metody-v-gynekologicke-endokrinologii-140508>

[3] Wikipedia- free encyklopedia: Alpha-fetoprotein [cit. 21-06-2016] Dostupné z URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Alpha-fetoprotein>