

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

STANOVENÍ KONCENTRACE FETUINU-A POMOCÍ NOVĚ VYVINUTÉ IMUNOTURBIDIMETRICKÉ METODY

DAVID STEJSKAL^a, MICHAL KARPÍŠEK^b,
LUDĚK ŠPRONGL^c, LENKA KOTKOVÁ-
VESELÁ^d, PETRA SEITLOVÁ^a, LENKA
KADALOVÁ^a a PAVLÍNA SOLICHOVÁ^a

^a Oddělení laboratorní medicíny Nemocnice Šternberk p.o., Jívavská 20, 785 16 Šternberk, ^b Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1–3, 612 00 Brno, ^c Centrální laboratoř Šumperská nemocnice a.s., Nerudova 41, 787 52 Šumperk, ^d Biovondor laboratorní medicína a.s., Evropská 873, 644 42 Modřice
david.stejskal@quick.cz, michal.karpisek@email.cz,
sprongl@nemspk.cz, vesela@biovondor.cz

Došlo 4.12.06, přepracováno 12.12.06, přijato 11.1.07.

Klíčová slova: fetuin-A, imunoturbidimetrie, metabolický syndrom, ateroskleróza, urolitiáza

Úvod

Fetuin-A (α 2-Heremans Schmid glykoprotein, AHSG) je protein, který je produkován játry. Skládá se ze dvou řetězců (A a B) a jeho homologa byla popsána u řady živočišných druhů. Gen pro tento protein je umístěn na chromosomu 3q27.

Fetuin-A má v organismu řadu funkcí; zcela zásadní je jeho schopnost vázat krystaly hydroxyapatitu a inhibovat receptor pro inzulin (inhibice autofosforylace a tyroxin kinasové aktivity inzulinového receptoru).

V řadě studií bylo prokázáno, že snížení koncentrace fetuinu-A (např. u osob s nefrotickým syndromem, renální insuficiencí, u pacientů se záněty, malnutricí, atp.) vede ke zvýšení rizika vzniku aterosgenních cévních lézí, kardiovaskulárních příhod a vyšší celkové i kardiovaskulární mortalitě.

Zvýšené hladiny fetuinu-A naopak nacházíme typicky u pacientů s metabolickým syndromem (jeho zvýšení vede k inhibici receptoru pro inzulin a související inzulinové rezistenci).

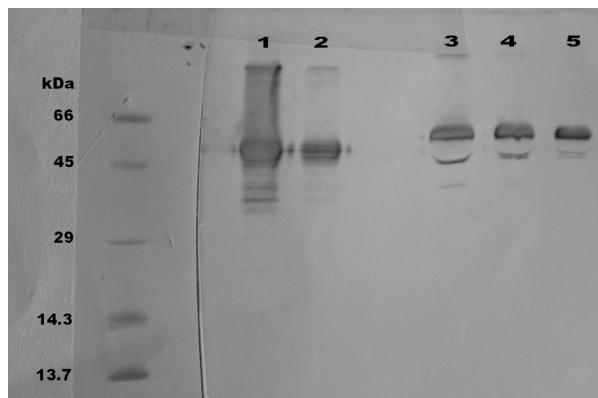
Fetuin-A také moduluje fagocytózu apoptotických buněk makrofágy (ovlivňuje průběh zánětu) a inhibuje na cytokinech závislou osteogenezu. Myši s deficitním genem pro AHSG mají poruchu růstu, zvýšenou kostní tvorbu

závislou na cytokinech, zvýšenou inzulinovou senzitivitu, menší množství tělesného tuku a zvýšené vylučování glukosy.

Experimentální část

Příprava protilátky, použitý kalibrátor

Koží protilátka proti lidskému fetuinu-A byla připravena imunizací 2 zvířat nativním lidským fetuinem-A, který byl izolovaný z lidské plasmy (Athens Research & Technology) (obr. 1). Po opakované imunizaci zvířat ($5 \times 0,5$ mg proteinu, cyklus 1 měsíc) bylo odebráno anti-sérum, z něhož byla precipitací síranem amonným izolována imunoglobulinová frakce obsahující protilátky proti lidskému fetuinu-A. Z tohoto imunoglobulinového preparátu byl následnou dialýzou proti 0,1M fosfátovému pufru (pH 7,2) odstraněn zbytkový síran, roztok byl stabilizován přidávkem azidu sodného na výslednou koncentraci 0,15 mM, naředěn fosfátovým pufrům na původní objem antiséra a používán pro turbidimetrii. Kalibrátor byl připraven ředěním nativního lidského fetuinu-A na koncentraci $12,5 \text{ mg l}^{-1}$ v 0,1 M fosfátovému pufru (pH 7,2).



Obr. 1. Detekce fetuinu-A pomocí imunoblotu; Gel: 14 % PAGE, neredukující. Primární protilátka: polyklonální koží protilátka proti lidskému fetuinu-A, ředění 1 mg l^{-1} . Sekundární protilátka: konjugát křenové peroxidasy a polyklonální králičí protilátka proti koží protilátce (DAKO), ředění $0,5 \text{ mg l}^{-1}$. Substrát: 0,08% roztok diaminobenzidinu (DAB), 0,3% peroxid vodíku. Popis vzorků: 1) fetuin-A: purifikovaný protein 1 mg/dráha , 2) fetuin-A: purifikovaný protein $0,1 \text{ mg/dráha}$, 3) lidské sérum: ředěno 200 \times , 4) lidské sérum: ředěno 400 \times , 5) lidské sérum: ředěno 800 \times

Popis turbidimetrické metody pro stanovení fetuinu-A v lidském séru a moči

Fetuin-A byl stanoven imunoturbidimetricky na analyzátoru Ilab600 (Instrumentation Laboratory, Itálie). Do květy bylo pipetováno 340 μl (reakční fosfátový pufr se 7% obsahem polyethylenglykolu 6000) a 40 μl protilátky (1 mg ml^{-1}). Vzniklý zákal byl měřen „two point end“ metodou (měření v 5. a 10. minutě), primární vlnová délka 340 nm, sekundární vlnová délka 700 nm. Sérové vzorky byly ředěny 10 \times a vzorky moče byly měřeny neředěné. Pro analýzy bylo použito 10 μl vzorku.

Klinické testování nefelometrické metody

Byly vyšetřeny čtyři skupiny osob: A) 27 vysoce rizikových jedinců s anamnézou koronární příhody, B) 41 obézních pacientů s diagnózou diabetes mellitus 2. typu a rezistencí na inzulin, C) 19 osob zdravých, bez obezity, D) 36 pacientů s recidivující urolitiázou v anamnéze ve srovnání s 20 osobami s negativní urologickou anamnézou.

Výsledky a diskuse

Funkční charakteristika imunoturbidimetrické metody

V imunoturbidimetrickém testu nebyla zjištěna křížová reaktivita u vzorků sér následujících zvířat: myš, krysa, králík, ovce, koza, kráva, prase, kůň.

Pro ověření funkčnosti metody byla zjištěna její správnost a přesnost jak při použití vzorků séra, tak i moče.

Sérum

Správnost metody byla ověřena testem standardního přídatku (spiking recovery) a v testu linearitě ředění (dilution linearity). Sérové vzorky dvou pacientů byly obohaceny o +5, +10 a +20 mg l^{-1} fetuinu-A, současně s ředěním 10 000 \times , a byla zjišťována zpětná výtěžnost, vyjádřená jako poměr získané/očekávané hodnoty koncentrace fetuinu-A. Rozmezí výtěžnosti bylo 93,9–98,5 %. V testu linearitě ředění byly testovány dva sérové vzorky, které byly nejprve ředěny 10 000 \times , a následně dále ředěny 20 000 \times , 40 000 \times a 80 000 \times . Rozmezí výtěžnosti bylo 96,0–109,7 %.

Přesnost metody byla testována jako opakovatelnost výsledků u 4 vzorků séra o různé koncentraci fetuinu-A a vyjádřena jako variační koeficient v sérii (intra-assay; $n=8$) i reprodukovatelnost výsledků mezi sériemi měření (inter-assay; $n=5$). Hodnota variačního koeficientu (CV) byla pro intra-assay < 5,0 % a pro inter-assay < 7,5 %.

Mez stanovitelnosti metody je definována jako nejnižší stanovitelná koncentrace fetuinu-A; tato hodnota

vyjadřuje koncentrace fetuinu-A, která odpovídá absorbanci vypočítané podle vzorce: průměrná absorbance slepého vzorku ($n=6$) $\pm 3 \times$ směrodatná odchylka průměru slepého vzorku. Tato koncentrace odpovídala hodnotě 0,35 mg l^{-1} . Mez detekce (CV < 10 %), představující nejnižší měřitelnou koncentraci fetuinu-A, byla 0,5 mg l^{-1} .

Moč

Vzorky moče vykazovaly v testu linearitě ředění i v testu standardního přídatku uspokojivé hodnoty výtěžnosti (85–120 %), opakovatelnost i reprodukovatelnost byla za stejných podmínek jako v případě séra < 8 %. Mez stanovitelnosti v moči odpovídala hodnotě 0,4 mg l^{-1} , mez detekce pak hodnotě 0,6 mg l^{-1} .

Klinické testování imunoturbidimetrické metody

Při klinickém sledování sérového fetuinu-A v diagnostice kardiovaskulárního rizika bylo zjištěno, že osoby s anamnézou koronární příhody mají hodnoty významně nižší než kontrolní skupina (mediány fetuinu-A v g l^{-1} : 0,4 vs. 0,7; $P < 0,01$).

U jedinců s obezitou a metabolickým syndromem byl fetuin-A v séru také ukazatelem s vysokou diagnostickou senzitivitou. Jedinci s metabolickým syndromem měli hodnoty fetuinu-A významně vyšší (medián hodnot byl 1,1 g l^{-1} ; $P < 0,01$).

U osob s recidivující urolitiázou byla diagnostická efektivita fetuinu-A taktéž dostatečná (senzitivita 82 %, specificita 80 % při cut-off hodnotě < 0,6 mg l^{-1}). Jedinci s recidivující urolitiázou v anamnéze měli nižší hodnoty fetuinu-A v moči ve srovnání s osobami bez anamnézy urolitiázy (mediány 0,65 mg l^{-1} vs. 4,1 mg l^{-1} ; $P < 0,01$).

Závěrem ke klinickému testování pro validaci metody, jak v séru, tak v moči, lze říci, že byly potvrzeny hypotézy o tom, že jedinci s metabolickým syndromem mají vyšší hodnoty fetuinu-A v séru (1, 5, 6, 7) než osoby bez něj a osoby s kardiovaskulárními komplikacemi mají hodnoty výrazně nižší (2, 3, 4). Fetuin-A z tohoto pohledu vykazuje dostatečnou diagnostickou efektivitu. Vůbec poprvé jsme prokázali, že stanovení fetuinu-A v moči by mohlo mít diagnostický význam u osob s recidivující urolitiázou.

Závěr

Byla navržena a optimalizována diagnostická souprava na turbidimetrické stanovení fetuinu-A v séru i moči. Analytické charakteristiky metody jsou uspokojivé a v současné době byla ukončena validace pro získání značky CE, po jejímž získání bude tato souprava k dispozici k rutinnímu diagnostickému testování.

První výsledky klinického testování jsou velice zajímavé a odpovídají hypotézám o tom, že fetuin-A v moči by mohl být významným ukazatelem pro stanovení dia-

gnózy monitorování efektu terapie jedinců s recidivující urolitiázou a v séru ukazatelem pro potvrzení přítomnosti metabolického syndromu, resp. rizika kardiovaskulárních komplikací.

LITERATURA

1. Mathews S. T., Singh G. P., Ranalletta M., Cintron V. J., Qiang X., Goustin A. S., Jen K. L., Charron M. J., Jahnen-Dechent W., Grunberger G.: *Diabetes* 51, 2450 (2002).
2. Ketteler M.: *The Lancet* 361, 827 (2003).
3. Stenvinkel P., Wang K., Qureshi A. R., Axelsson J., Pecoits-Filho R., Gao P., Barany P., Lindholm B., Jogestrand T., Heimbürger O., Holmes C., Schalling M., Nordfors L.: *Kidney Int.* 67, 2383 (2005).
4. Wang A. Y., Woo J., Lam C. W., Wang M., Chan I. H., Gao P., Lui S. F., Li P. K., Sanderson J. E.: *Nephrol. Dial. Transplant* 20, 1676 (2005).
5. Ix J. H., Shlipak M. G., Brandenburg V. M., Ali S., Ketteler M., Whooley M. A.: *Circulation* 113, 1760 (2006).
6. Lehtinen A. B., Burdon K. P., Lewis J. P., Langefeld C. D., Ziegler J. T., Rich S. S., Register T. C., Carr J.

J., Freedman B. I., Bowden D. W.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 127, 1232 (2006).

7. Mathews S. T., Rakhade S., Zhou X., Parker G. C., Coscina D. V., Grunberger G.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350, 437 (2006).

D. Stejskal^a, M. Karpíšek^b, L. Šprongl^c, L. Kotková-Veselá^d, P. Seitlová^a, L. Kadalová^a, and P. Solichová^a (^a Department of Laboratory Medicine, Hospital, Šternberk, ^b University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Brno, ^c Central Laboratory, Hospital, Šumperk, ^d Biovendor Laboratory Medicine, Modřice): **Assessment of Fetuin-A Concentration by a New Immunoturbidimetric Method**

Development, validation and clinical testing of a routine immunoturbidimetric method of fetuin-A measurement are presented. First results of its clinical testing confirm the hypotheses on the use of serum fetuin A for the diagnostics of metabolic syndrome and cardiovascular atherogenic complications. Fetuin-A measurement in urine is used in recurrent form of urolithiasis.

Firma **ZN Software** nabízí všem čtenářům Chemických listů počítačový program **CHEMLISTY**. Program **CHEMLISTY** je databáze názvů článků vyšlých v Chemických listech od roku 1997. Nad databází je komfortní vyhledávací program, umožňující vyhledávání podle klíčových slov a/nebo podle autorů a/nebo podle slov v názvu článku.

Pro předplatitele Chemických listů je cena programu 500,- Kč za jednu instalaci, aktualizace programu a databáze zdarma. Pro ostatní čtenáře je cena programu 1000,- Kč a aktualizace programu a databáze na požádání.

Více informací najdete na www.znsoftware.cz