

Metoda: Radioimunoanalýza

Kateřina Urbánková, ZL3

Školitelé: RNDr. Marie Karlíková, Ph.D.

Radioimunoanalýza, známá též pod zkratkou RIA, je imunoanalytická metoda, která využívá imunochemické reakce [antigenu](#) se specifickou [protilátkou](#). Je prováděná in vitro v přítomnosti vhodné radioaktivně značené sloučeniny.

Princip:

Radioimunoanalýzu řadíme do kategorie kompetitivních metod. Tyto metody jsou charakteristické tím, že značený antigen soupeří s neznačeným antigenem o volná vazebná místa na protilátce, která se v reakční směsi vyskytuje pouze v omezeném množství. Látka, kterou chceme stanovit je v tomto případě neznačený antigen. Další, vhodně zvolený antigen značíme radioaktivním prvkem. Jako značky můžeme použít radioizotopy, fluoreskující látky, enzymy, substráty, komplexy těžkých kovů, cheláty lanthanoidů. Pro proteinové antigeny je vhodné použití např. radioaktivní izotop jodu ^{125}I nebo ^{131}I , pokud není možné použít jod, použijeme ^3H . Pro nízkomolekulární látky se používá ^{14}C .

Po proběhnutí reakce získáváme dva komplexy, a to komplex značeného antigenu s protilátkou a komplex neznačeného antigenu s protilátkou. Mezi množstvím značeného a neznačeného komplexu panuje nepřímá úměra, což znamená, že čím více stanovované látky se ve vzorku nachází, tím menší množství značeného komplexu vzniká a tím slabší je výsledný signál. Je tomu tak proto, že se značené antigeny nevážou na protilátku, jelikož vazebná místa jsou obsazena antigenem neznačeným.

Uplatnění metody:

Hlavní výhody RIA metody spočívají v její vysoké citlivosti. Je vhodná pro stanovení koncentrací menších, než 1 mg/l a možnosti snadné automatizace. Její uplatnění je poměrně široké. Využití nalezne v endokrinologii, kde se používá při stanovování hormonů. Dále pak v toxikologii, kde se používá při průkazu přítomnosti drog v krvi. Využijeme ji i při podávání krevních transfuzí k detekci povrchového antigenu hepatitidy B v darované krvi. Můžeme ji využít i v imunologii k detekci anti-DNA protilátek u systémového onemocnění lupus erythematoses.

Úskalí metody:

Jednoznačnou nevýhodou RIA metody jsou nákladné zařízení nutné pro provádění této metody a rizika spojená s manipulací s radioaktivní látkou. V potaz se musí brát jejich toxicita a radioaktivní záření, které vydávají. Při manipulaci s radioaktivními látkami, musíme brát ohled také na jejich poločas rozpadu. Další nevýhodou je i krátká expirační doba souprav.

Přístrojové vybavení:

Přístroje vhodné pro měření vzorků značených RIA metodou, musí být schopny pracovat se zářením, vyvolaným radioaktivními látkami. Vhodnými přístroji jsou scintilační detektory, což je zařízení pro detekci ionizujícího záření založené na principu excitace elektronu do vyššího energetického stavu zářením, přičemž návrat elektronu do základního stavu se projeví jako světelný záblesk, který registruje fotonásobič.

Odběr a transport:

RIA metodou zpracováváme krevní vzorky. Pro jejich odběr platí všeobecné zásady. Musí být odebráno správné množství do předem označené zkumavky a musí být správně vyplněná žádanka.

Porovnání stanovení exprese znaku CD 69 pomocí nové metody Pheno-Immuno Computing a průtokové cytometrie u aktivovaných lymfocytů

Patrik Zmij (3. ročník LDZ)

Školitel: Ing. Tomáš Vlas

XENO Cell Innovations s.r.o. (NTIS), Ústav imunologie a alergologie FN Plzeň

Východisko: Pheno-Immuno Computing je informační technologie, která je nyní ve vývoji. Tato technologie je postavená na nejrozšířenějším průmyslovém organismu, pekařském droždí. To umožňuje bezkonkurenční diagnostický výkon s neuvěřitelnou nákladovou efektivitou. Pomocí PIC metody je možné podrobně analyzovat buňky v suspenzi. Průtoková cytometrie je metoda analyzující buněčné populace, které je schopná je odlišit na základě vlastností jednotlivých buněk. Průtokový cytometr je přizpůsoben k třídění buněčných subpopulací na bázi fluorescence a rozptylu světla.

Cíl: Cílem této práce je porovnat stanovení exprese znaku CD 69 za pomoci nové výzkumné metody Pheno-Immuno Computing s rutinní průtokovou cytometrií u aktivovaných lymfocytů. Hodnocení spočívá v porovnání shodnosti výsledků stanovení znaku CD 69 u aktivovaných lymfocytů stejných vzorků naměřených metodou PIC a průtokovou cytometrií a jejich interpretace.

Metodika: Výzkum probíhal na vzorcích plné krve dobrovolníků, které byly odebrány do zkumavek s heparinem. Ze vzorků plné krve byly separovány čisté kultury T lymfocytů, které byly použity pro následnou kultivaci s PHA-L. Stanovení exprese znaku CD 69 u aktivovaných T lymfocytů byla provedena za pomoci metody PIC a byla porovnána s měřením na průtokovém cytometru. Při měření PIC metody jsem použil dva odlišné pracovní postupy nazvané PIC-LONG a PIC-SHORT. Dle zvoleného postupu se odvíjelo také stanovení na průtokovém cytometru a zejména ve volbě protilátky, kterou byl měřený vzorek obarven. Odběr plné krve, separace vzorků a finální měření na průtokovém cytometru probíhalo na Ústavu imunologie a alergologie Fakultní nemocnice Plzeň. Kultivace vzorků, provedení a vyhodnocení PIC metody bylo provedeno na výzkumném centru NTIS. Při stanovení porovnání metody PIC-SHORT s FC se sledoval znak CD 25 kvůli absenci biomarkerů pro stanovení znaku CD 69.

Výsledky: Při porovnání výsledků stanovení exprese znaku CD 69 a CD 25 u aktivovaných T lymfocytů metodou Pheno-Immuno Computing a průtokovou cytometrií s použitím grafů jsem zjistil, že metody korelují. U stanovení CD 69 metodou PIC-LONG a průtokovou cytometrií jsem získal korelační koeficient $R^2 = 0,9851$. U stanovení CD 25 metodou PIC-SHORT a průtokovou cytometrií jsem získal korelační koeficient $R^2 = 0,9972$.