

## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

### STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINU DICKKOPF-1 V SÉRU POMOCÍ NOVÉ METODY ELISA

MAREK ŠVESTÁK<sup>a,c</sup>, MICHAL KARPÍŠEK<sup>b</sup>,  
JANA PROCHÁZKOVÁ<sup>a</sup>, RADKA  
OCHMANOVÁ<sup>a</sup>, DANA MORAVČÍKOVÁ<sup>d</sup>  
a DAVID STEJSKAL<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Oddělení laboratorní medicíny a interní oddělení Nemocnice Prostějov, Středomoravská nemocniční a.s., Mathonova 291/1, 796 04 Prostějov, <sup>b</sup> Farmaceutická fakulta Veterinární a farmaceutické Univerzity Brno, <sup>c</sup> Ústav lékařské chemie a biochemie LF UP Olomouc, <sup>d</sup> Soukromá ambulance praktického lékaře Olomouc  
marek.svestak@nempv.cz, david.stejskal@nempv.cz

Došlo 13.1.11, přijato 26.5.11.

Klíčová slova: ELISA, Dickkopf-1, osteogeneze, osteoporóza

### Úvod

Dickkopf-1 (Dkk-1) je rozpustný protein, který byl nedávno identifikován jako komponenta přenosu signálu parathormonu. Jde o inhibitor signální kaskády Wnt/LRP5. Tato kaskáda je v lidském organismu pravděpodobně jednou z hlavních regulačních komponent osteogenetických i osteoresorpčních procesů. Informace o významu Dkk-1 jsou však rozporuplné, protože některé autorské skupiny nenalezly vztahy mezi Dkk-1 v séru, parametry kostního obratu a stavem kostní hmoty<sup>1–3</sup>. Jiní autoři však prokázali, že produkce tohoto kostního cytokinu je v kosti silně zastoupena a jeho exprese se zvyšuje v místě fragilních zlomenin. Současně vznikla hypotéza, že osoby se snížením kostní hmoty by mohly mít vzestup hladin Dkk-1 v séru. Vyšší hladiny Dkk-1 v séru byly nalezeny v experimentech především u jedinců s maligními onemocněními metastazujícími do skeletu, revmatoidní artritidou či systémovým lupus erythematoses<sup>4–7,11</sup>.

Jelikož je Dkk-1 inhibitor výše zmíněné signální kaskády, lze jej považovat za supresor kostní formace, který vede k poklesu kostní hmoty (experimentální modely). Zvýšené hodnoty Dkk-1 v séru lze nalézt také u jedinců s vyšším kostním obratem<sup>7,8</sup>. Vzhledem k výše uvedenému je zajímavé, že souvislosti Dkk-1 se změnou denzity

nebo kostními ukazateli byly popsány ojediněle a byly slabé<sup>9</sup>.

Zatím nebyly cíleně sledovány ani popsány souvislosti mezi Dkk-1 a parametry kostního obratu či kostní denzitou v několika lokalitách, vyjádřenou jako T skóre. Proto se cílem naší práce stalo navrzení, sestavení a ověření funkce testu ELISA pro rychlé stanovení Dkk-1 a ověření efektivity tohoto testu u pacientů s osteoporózou.

### Experimentální část

#### Chemikálie

Byla použita mikrotitrační deska (Costar, High Binding), na kterou byla navázána polyklonální kozi protilátka proti lidskému Dkk-1 (Biovendor laboratorní medicína a.s.), k naředění protilátky byl použit 0,1 M hydrogenuhličitanový pufr pH 7,2.

Nespecifická vazebná místa blokována roztokem TBS (Tris pufr obsahující chlorid sodný, pH 7,2), 4% sacharosu a 0,5% hovězího sérového albuminu. Standardy a vzorky byly ředěny roztokem 1% BSA, heterofilní blokovací reagentie (Scantibodies) v 0,15 M PBS (0,12 M-NaCl, 0,03 M fosforečnan sodný, pH 7,3). Značení kozi polyklonální protilátky IgG biotinem bylo provedeno soupravou od firmy Pierce. Konjugát streptavidin-křenová peroxidasa byl vyroben firmou Amdex a TMB substrát (1,2 mM tetramethylbenzidin s obsahem 3 mM peroxidu vodíku) firmou KPL. K zastavení reakce sloužil 0,2 M roztok kyseliny sírové. K měření absorbance při vlnové délce 450 nm byl použit fotometr Biotek EL808.

Mikrotitrační deska byla promyta roztokem TBS-Tw (0,05 M Tris-HCl; 0,15 M-NaCl; pH 7,2; 0,05% Tween 20) na promývače Columbus washer od firmy Tecan.

Koncentrace rekombinantního Dkk-1 byla stanovena metodou s kyselinou bicinchoninovou (BCA metoda, Sigma-Aldrich). V testu linearitě byl jako ředící roztok použit roztok TBS (pH 7,2) a 0,01% Thimerosal.

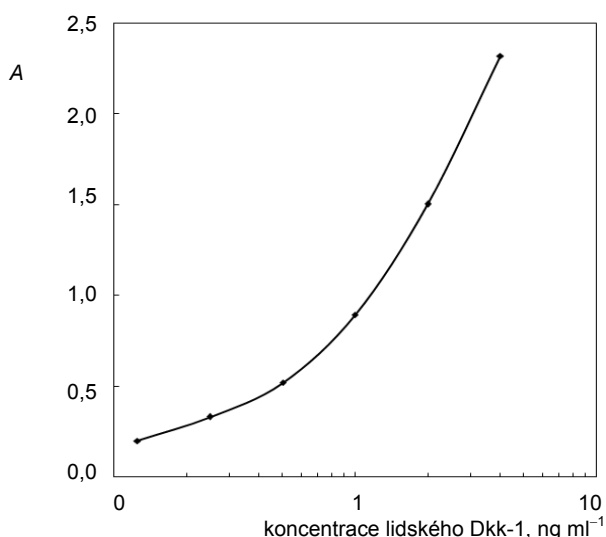
#### Vývoj metody ELISA pro stanovení Dkk-1 v lidském séru

Byla navržena a sestavena kompetitivní (sendvičová) imunoanalytická metoda pro kvantitativní stanovení lidského Dkk-1 v lidském séru. K ELISA stanovení jsme použili specifické polyklonální kozi protilátky proti lidskému Dkk-1.

Lyofilizovaná protilátka byla rekonstituována v 0,1 M hydrogenuhličitanovém pufru pH 7,2 s výslednou koncentrací 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  a do každé jamky mikrotitrační desky bylo dávkováno 0,1 ml protilátky. Následovala 12hodinová inkubace při 4 °C a poté byla deska 1× promyta po-

mocí TBS-Tw. Nespecifická vazebná místa byla zablokována roztokem TBS, 4% sacharosy a 0,5% hovězího sérového albuminu (dávkováno 0,2 ml/jamku, inkubace 30 min při 25 °C). Po odsátí blokovačeho roztoku bylo na desku dávkováno 0,1 ml příslušného standardu nebo 3× ředěného vzorku séra a všechna měření provedena v dubletu. Následně byla deska inkubována 1 h při 25 °C. Po 5násobném promytí desky promývacím roztokem bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml biotinem značené kozi polyklonální protilátky IgG a deska opět inkubována 1 h při 25 °C. Po opětovném 5násobném promytí desky bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml konjugátu streptavidin-křenová peroxidasa a deska inkubována 1 h při 25 °C. Po promytí desky bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml substrátu TMB a reakční směs inkubována 10 min při 25 °C. Reakce byla zastavena přidáním 0,2 M roztoku kyseliny sírové (0,1 ml/jamka) a vzniklé žluté zbarvení bylo změřeno fotometricky při vlnové délce 450 nm (Biotek EL808). Intenzita žlutého zbarvení je přímo úměrná obsahu analytu ve vzorku. Koncentrace Dkk-1 v neznámých vzorcích byly stanoveny z kalibrační křivky (obr. 1), která byla získána vnesením absorbancí standardů oproti jejich známé koncentraci. V testu byla použita sada standardů 4,0, 2,0, 1,0, 0,5, 0,25 a 0,125  $\mu\text{g l}^{-1}$  v pufru s kaseinem, připravená naředěním rekombinantního lidského Dkk-1.

Čistota proteinu byla analyzována elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS PAGE, data nejsou uvedena) a koncentrace rekombinantního Dkk-1 byla stanovena metodou s kyselinou bicinchinovou (BCA metoda, Sigma-Aldrich).



Obr. 1. Kalibrační křivka pro stanovení Dkk-1 v séru metodou ELISA;  $A$  – Absorbance ( $A_{450 \text{ nm}} - A_{630 \text{ nm}}$ )

## Klinické testování metody ELISA

Byly vyšetřeny dvě skupiny jedinců, pacientů metabolických a osteologických ambulancí v rámci Středomoravské nemocniční a.s., kteří byli sledováni pro podezření na osteopatie. Současně byla vyšetřena skupina zdravých osob v rámci preventivních prohlídek. Do první skupiny bylo zařazeno 11 pacientů uvedených ambulací, u kterých nebyla při dvoufotonové kostní denzitometrii (DEXa, přístroj Hologic 4500) zjištěna osteoporóza ani neměli zvýšenou kostní remodelaci odhadovanou stanovením běžných laboratorních ukazatelů. Do druhé skupiny bylo zařazeno 23 osob s osteoporózou verifikovanou pomocí DEXa (T skóre < 2,5 ve dvou lokalitách). U všech sledovaných osob byly vyšetřeny sérové hodnoty Dkk-1, PTH, osteokalcinu, kalcia, fosforu, hořčíku, kreatininu, kostního isoenzymu alkalické i kyselý fosfatasy 5a (TRAP5b), močový index DPD/kreatinin.

## Výsledky a diskuse

### Analytická charakteristika metody ELISA

Pro ověření funkčnosti testu byla ověřena přesnost a preciznost metody. Přesnost metody byla ověřena metodou standardního přídatku a byla zjišťována výtěžnost, vyjádřená jako poměr získané/očekávané hodnoty koncentrace Dkk-1. Vzorky séra od 2 pacientů (o koncentraci Dkk-1 2,19  $\mu\text{g l}^{-1}$ , resp. 3,29  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) byly obohaceny o +0,25, +0,5 a +1,0  $\mu\text{g l}^{-1}$  rekombinantního Dkk-1. Průměrná hodnota výtěžnosti byla 95 %. V testu linearity byly testovány dva vzorky séra (o koncentraci Dkk-1 3,49  $\mu\text{g l}^{-1}$  a 3,62  $\mu\text{g l}^{-1}$ ), které byly sériově ředěny ředícím roztokem, který obsahoval TBS a 0,01% Thimerosal 10×, 20×, 40× a 80×, přičemž průměrná hodnota výtěžku byla 93 %.

Preciznost metody byla testována jako reprodukovatelnost výsledků a byla vyjádřena jako variační koeficient v sérii ( $n=8$ ) i mezi sériemi měření ( $n=8$ ). Hodnota variačního koeficientu (CV) byla ve všech případech menší než 10 %.

Mez stanovitelnosti metody, představující nejnižší stanovitelnou koncentraci Dkk-1, činila 0,01  $\mu\text{g l}^{-1}$  (tato hodnota je vyjádřením koncentrace Dkk-1 odpovídající absorbanci vypočítané podle vzorce: průměrná absorbance slepého vzorku ( $n=10$ ) + 3× směrodatná odchylka průměru slepého vzorku).

### Klinické testování výsledků Dkk-1, získaných stanovením ELISA

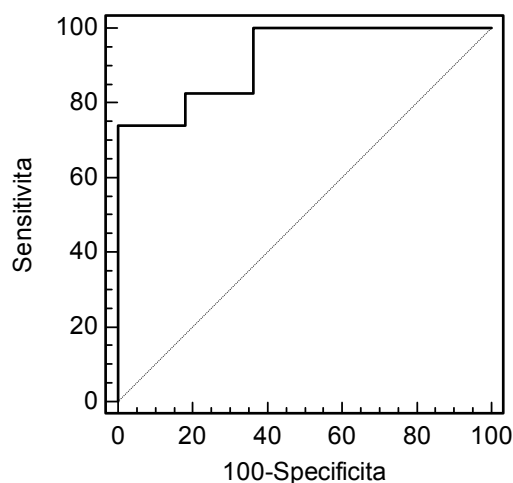
U pacientů sledovaných v uvedených ambulancích byly nalezeny významné rozdíly mezi hodnotami Dkk-1 podle přítomnosti osteoporózy (tab. I). Významnost rozdílů přetrvávala i po adjustaci na pohlaví, věk a další sledované parametry.

Tabulka I

Hodnoty Dkk-1 v  $\mu\text{g l}^{-1}$  u sledovaných pacientů dle přítomnosti osteoporózy

Stav	X	Medián	SD	Normalita	P
Osteoporóza	4,79	5,02	1,1	ano	< 0,01
Normální kostní denzita	2,79	2,61	0,75	ano	

Efektivita testu pro klinické účely byla vynikající, (plocha pod operační křivkou ROC 0,92; 95% interval spolehlivosti 0,78–0,99; senzitivita 78 %, specifická 100 %, pozitivní prediktivní hodnota 100 % při hodnotě DKK > 3,86  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) (viz obr. 2).



Obr. 2. ROC analýza pro stanovení Dkk-1 v séru u pacientů s osteoporózou

## Závěr

Závěrem lze konstatovat, že byla navržena, sestavena, validována a zavedena do klinické praxe nová metoda ELISA, sloužící ke klinickému testování pro stanovení Dkk-1 v séru. V pilotní studii bylo zjištěno, že jde o velice slibný ukazatel, pomocí něž lze diagnostikovat osteoporózu.

## LITERATURA

- Cejka D., Herberth J., Branscum A. J., Fardo D. W., Monier-Faugere M. C., Diarra D., Haas M., Malluche H. H.: *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, v tisku.
- Bodine P.V.: *Cell Res.* 18, 248 (2008).
- Pečina-Slaus N.: *Cancer Cell Int.* 10, 22 (2010).
- D'Amelio P., Roato I., D'Amico L., Veneziano L., Suman E., Sassi F., Bisignano G., Ferracini R., Gargiulo G., Castoldi F., Pescarmona G. P., Isaia G. C.: *Osteoporos Int.*, v tisku.
- Voorzanger-Rousselot N., Journe F., Doriath V., Body J. J., Garnero P.: *Calcif. Tissue Int.* 84, 348 (2009).
- Garnero P., Tabassi N. C., Voorzanger-Rousselot N.: *J. Rheumatol.* 35, 2313 (2008).
- Liu Y. Y., Long L., Wang S. Y., Guo J. P., Ye H., Cui L. F., Yuan G. H., Li Z. G.: *Chin. Med. J.* 123, 1407 (2010).
- Glantschnig H., Hampton R. A., Lu P., Zhao J. Z., Vitelli S., Huang L., Haytko P., Cusick T., Ireland C., Jarantow S. W., Ernst R., Wei N., Nantermet P., Scott K. R., Fisher J. E., Talamo F., Orsatti L., Reszka A. A., Sandhu P., Kimmel D., Flores O., Strohl W., An Z., Wang F.: *J. Biol. Chem.* 285, 40135 (2010).
- Long L., Liu Y., Wang S., Zhao Y., Guo J., Yu P., Li Z.: *J. Clin. Immunol.* 30, 669 (2010).
- Anastasilakis A. D., Polyzos S. A., Avramidis A., Toulis K. A., Papatheodorou A., Terpos E.: *Clin. Endocrinol.* 72, 752 (2010).
- Tao J., Shizhuo W., Ling H., Shulan Z.: *Int. J. Gynecol. Cancer* 19, 1177 (2009).

M. Švesták<sup>a,c</sup>, M. Karpíšek<sup>b</sup>, J. Procházková<sup>a</sup>, R. Ochmanová<sup>a</sup>, D. Moravčíková<sup>d</sup>, and D. Stejskal<sup>a,c</sup>  
<sup>a</sup>Department of Laboratory Medicine, Hospital Prostějov, <sup>b</sup>Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, <sup>c</sup>Department of Medicinal Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc, <sup>d</sup>General practicion patient Centre, Olomouc): **MEASUREMENT OF SERUM DICKKOPF-1 PROTEIN USING A NEW ELISA TEST**

Dkk-1 in human serum has a high predictive value as a potential marker (specificity 100 %, positive predictive value 100 %) in laboratory diagnosis of osteoporosis.