

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

POSOUZENÍ KLINICKÉ RELEVANCE HODNOTY VILIP-I V SÉRU U PACIENTŮ S DIAGNÓZOU MOZKOVÉ PŘÍHODY POMOCÍ VLASTNÍ METODY ELISA

MAREK ŠVESTÁK^a, LENKA SPOROVÁ^a, JANA
PROCHÁZKOVÁ^a, MICHAL KARPÍŠEK^b,
LAVINIA GABRIELA DRAGUSIN^d,
DANA MORAVČÍKOVÁ^a a DAVID STEJSKAL^{a,c}

^a Oddělení laboratorní medicíny Nemocnice Prostějov, Mathonova 291/1, Prostějov, ^b Oddělení humánní farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1–3, 612 00 Brno, ^c Ústav lékařské chemie a biochemie LF UP Olomouc, Hněvotníská, 772 00 Olomouc, ^d Biovendor laboratorní medicína a.s., Evropská 873, 644 42 Modřice
marek.svestak@nempv.cz, michal.karpisek@email.cz,
david.stejskal@nemsne.cz, dragusin@biovendor.com

Došlo 5.8.10, přijato 11.11.10.

Klíčová slova: Vilip-I, cévní mozková příhoda, ELISA, poškození mozku

Úvod

Diagnostika chorob centrální nervové soustavy (CNS) je často obtížná (především pro lékaře první linie – mozkové příhody, Alzheimerova nemoc, traumata centrální nervové soustavy, atp.). Jde o závažný zdravotně sociální problém. Např. mozkové příhody jsou třetí nejčastější příčinou smrti po chorobách kardiovaskulárního systému a nádorových onemocněních¹.

Ideální biomarker poškození centrální mozkové soustavy, který by bylo možno vyšetřit v periferní krvi a splňoval by podobné nároky jako splňují např. srdeční tropoiny nebo natriuretické peptidy při postižení myokardu¹, nemáme zatím k dispozici, nicméně probíhá intenzivní snaha o jeho hledání.

Nedávno bylo zjištěno, že existuje více než 29 genů, jejichž produkty nacházíme v CNS ve vyšší koncentraci¹. Jedním z nich je právě VILIP-I (Visin like protein I), který je potenciálním a velice slibným biomarkerem postižení CNS (jde o cytoplasmatický protein s nízkou relativní molekulární hmotností, který je téměř absolutně specifický

pro CNS, vyskytuje se v mozku ve vysoké koncentraci nezávisle na lokalizaci a typu buněk)^{2,5}.

VILIP-I je členem rodiny neuronálních senzorkých kalciových proteinů (existuje VILIP-1/2/3), který účinkuje zvýšením cAMP v buňkách; jeho funkční role není však zcela jasná a jde pravděpodobně o signální protein (spekuluje se o tom, že ve slinivce vede ke zvýšení sekrece insulinu; v mozku zvyšuje expresi nikotinových acetylcholinových receptorů a v organismu obecně účinkuje jako „tumor supresor“ inhibicí buněčné proliferace, adheze a invazivity)^{2–7}.

V současné době nebyla zatím provedena studie, která by hodnotila koncentraci VILIP-I u jedinců s mozkovou příhodou. Bylo popsáno pouze několik in-house diagnostických souprav na stanovení koncentrace tohoto proteinu, ne však metodou ELISA. Naším cílem byl vývoj, validace a klinické testování soupravy ELISA pro specifické stanovení sérové koncentrace lidského VILIP-I.

Experimentální část

Příprava rekombinantního lidského VILIP-I

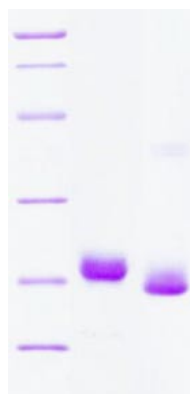
Sekvence mRNA genu VILIP-I byla získána z databáze RefSeq (Accession Number NM_001442); příslušná sekvence byla syntetizována a optimalizována pro *E.coli*. Syntetický gen byl klonován do restričních míst expresního vektoru pRSET (Invitrogen) s následnou transformací bakteriálního kmene *E. coli* BL21DE3. Produkční kmen byl kultivován při teplotě 37 °C a exprese rekombinantního proteinu byla indukována isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosidem (IPTG, Sigma). Po rozbití produkční kultury ultrazvukem byl ze supernatantu izolován gelovou chromatografií rekombinantní VILIP-I (obr. 1).

Protein byl dialyzován do prostředí 50 mM NaH₂PO₄ (pH 7,2), čistota proteinu analyzována elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (12% homogenní gel, SDS PAGE) a koncentrace bílkoviny stanovena metodou s kyselinou bicinchoninovou (BCA metoda, Sigma, katalogové číslo BCA1-1KT).

Vývoj sandwich ELISA testu

Hodnoty sérové ani tkáňové koncentrace VILIP-I nebyly známy, proto jsme se zaměřili na vývoj sandwich ELISA testu, který představuje při použití biotinem značené detekční protilátky vysoce citlivou a specifickou metodu. K ELISA stanovení jsme použili specifické polyklonální králičí protilátky proti lidskému VILIP-I (Biovendor laboratorní medicína a.s.).

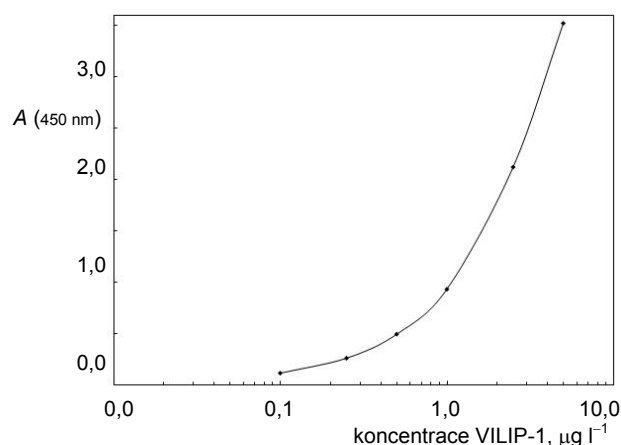
V mikrotitrační desce (NUNC, Maxisorp) bylo vázáno 0,1 ng protilátky/jamku v 0,1 M karbonátovém



Obr. 1. Čistota proteinu byla ověřena elektroforézou (12% homogenní gel, SDS PAGE, metoda: Laemmli, barvení gelu: Coomassie blue). V levé dráze je standard připravený z proteinů o velikostech 14, 21, 31, 45, 66 a 97 kDa; v pravé dráze je izolovaný rekombinantní lidský VILIP-I (redukovaný a zahřátý vzorek a neredukovaný a nezahřátý vzorek, koncentrace 5 mg/dráhu). Čistota proteinu je větší než 98 %

pufru pH 9,0 (inkubace 12 h při 4 °C) a po odsátí vazného roztoku bylo do desky dávkováno 0,2 ml/jamku roztoku TBS (0,05 M Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,2), 0,5 % BSA (hovří sérový albumin), 4% sacharosa a deska inkubována 30 min při laboratorní teplotě pro zablokování nevyužitých vazebných míst na povrchu jamky. Po odsátí blokovačím roztoku (promývačka Columbus, Tecan) bylo na desku dávkováno 0,1 ml příslušného standardu nebo 3× ředěného sérového vzorku. K ředění byl použit pufr s 1,4% kaseinem v 0,15 M PBS (0,12 M NaCl, 0,03 M fosfát sodný, pH 7,3) a všechna měření byla realizována 2×. Následně byla deska inkubována 1 h při 25 °C. Po 5násobném promytí desky promývacím roztokem (TBS, 0,05% Tween 20, pH 7,2) bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml biotinem značené králičí polyklonální protilátky IgG (Biovendor, proces byl realizován na soupravě od firmy Pierce) a deska opět inkubována 1 h při 25 °C. Po 5násobném promytí desky bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml konjugátu streptavidin-křenová peroxidasa (Amdex) a deska inkubována 1 h při 25 °C. Po promytí desky promývacím roztokem bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml substrátu TMB (1,2 mM tetrametylbenzidin s obsahem 3 mM peroxidu vodíku, KPL, katalogové číslo 52-00-01) a reakční směs inkubována 10 min při 25 °C. Reakce byla zastavena přidáním 0,1 M roztoku kyseliny sírové (0,1 ml/jamka) a vzniklé žluté zbarvení (produkt) bylo změřeno fotometricky při vlnové délce 450 nm. Intenzita žlutého zbarvení je přímo úměrná obsahu analytu ve vzorku (ELISA reader Biotek EL808).

Hodnoty VILIP-I v neznámých vzorcích byly stanoveny z kalibrační křivky (obr. 2), která byla získána vynesením absorbancí standardů oproti jejich známé koncentraci.



Obr. 2. Standardní křivka VILIP-1 ELISA. Pro určení hodnoty VILIP-1 v neznámých vzorcích byla sestavena kalibrační křivka, která byla získána vynesením absorbancí standardů (A) oproti jejich známé koncentraci (měřeno při 450nm; ELISA reader Biotek EL808)

Ředícím roztokem pro standardy, vzorky, biotinem značenou protilátku a konjugát steptavidin-křenová peroxidasa byl roztok TBS, 0,2 % BSA, 0,01 % thimerosal.

V testu byla použita sada standardů 6, 3, 1,5, 0,6, 0,15, 0,06 a 0,03 $\mu\text{g l}^{-1}$ v pufru s kaseinem (viz výše), připravená ředěním rekombinantního lidského VILIP-I.

Sérové vzorky byly ředěny 10× podle schématu 1 díl vzorku + 9 dílů ředícího roztoku.

Popsaným způsobem byly testovány všechny kombinace, které plynou z možnosti použití králičí specifické protilátky v sandwich ELISA testu (data nejsou prezentována). Všechny kombinace poskytly srovnatelné výsledky, proto byla vybrána ekonomicky nejvýhodnější varianta, která navíc minimalizuje riziko případné křížové reaktivity: na desku byla vázána králičí specifická protilátka a pro detekci byla používána biotinem značená králičí specifická protilátka.

Klinické testování ELISA testu

Bylo vyšetřeno 10 jedinců s mozkovou příhodou. Jako kontrolní skupina byl využit soubor 10 osob bez poruch metabolismu glukosy, neurologického nebo maligního onemocnění. U všech byla provedena lumbální punkce s analýzou buněk, vyšetření hematolikorové bariéry, lokální imunoreakce a známek zánětu pomocí specifických proteinů (indexy albuminu, imunoglobulinů, ApoAI, ApoB a CRP v séru a likvoru). U všech jedinců bylo provedeno i vyšetření mozku počítačovou tomografií, ev. bylo doplněno vyšetřením nukleární magnetické rezonance. V séru byla u všech osob stanovena koncentrace VILIP-I.

Výsledky

Funkční charakteristika testu ELISA

V testu ELISA nebyla zjištěna žádná křížová reaktivita v sérech následujících zvířat: králík, koza, ovce, prase, myš, kůň, křeček, slepice, tur a krysa. Výsledky testů tak ukazují na jeho specifitu pro lidský VILIP-I.

Pro ověření funkčnosti VILIP-I ELISA byla testována také správnost a přesnost metody. Správnost metody byla ověřena metodou standardního přídávku a byla zjišťována výtěžnost, vyjádřená jako poměr získané/očekávané hodnoty koncentrace VILIP-I. Sérové vzorky od 2 pacientů (0,8 a 0,3 $\mu\text{g l}^{-1}$) byly obohaceny o +0,5, +1 a +2 $\mu\text{g l}^{-1}$ VILIP-I. Průměrná hodnota výtěžnosti byla 98 %. V testu linearit byly testovány další 2 sérové vzorky (2,1 a 1,8 $\mu\text{g l}^{-1}$), které byly sériově ředěny 10 \times , 20 \times , 40 \times a 80 \times , přičemž průměrná hodnota výtěžku byla 93 %.

Přesnost metody byla testována jako opakovatelnost výsledků u 3 sérových vzorků a vyjádřena jako variační koeficient v sérii ($n=8$) i reprodukovatelnost mezi sériemi měření ($n=3$). Hodnota variačního koeficientu (CV) byla ve všech případech < 10 %.

Mez stanovitelnosti metody, představující nejnížší stanovitelnou koncentraci VILIP-I, byla 0,01 $\mu\text{g l}^{-1}$ (tato hodnota je vyjádřením koncentrace VILIP-I, odpovídající absorbcí vypočítané podle vzorce: průměrná hodnota absorpce slepého vzorku ($n=8$) + 3 \times směrodatná odchylka průměru slepého vzorku). Mez detekce (CV < 10 %) byla 0,1 $\mu\text{g l}^{-1}$.

Klinické testování ELISA testu

Při klinickém testování stanovení VILIP-I bylo zjištěno, že osoby s mozkovou příhodou ($n=10$) měly vyšší hodnoty VILIP-I než osoby bez neurologického postižení CNS (všichni jedinci s CMP měli hodnoty VILIP-I > 0,05 $\mu\text{g l}^{-1}$; $P < 0,01$), jedinci bez postižení CNS měli hodnoty < 0,05 $\mu\text{g l}^{-1}$ (senzitivita 85,7 %, specifita 100 %).

V naší studii byl potvrzen předpoklad, že pacienti s mozkovou příhodou mají vyšší hodnoty VILIP-I než osoby bez neurologického postižení. První výsledky tedy podporují nedávno publikovanou hypotézu, že VILIP-I by mohl být vysoce efektivním sérovým biomarkerem přítomnosti mozkové příhody.

Závěry

Byla navržena a validována diagnostická souprava (ELISA) na stanovení sérové koncentrace VILIP-I. Základní analytické charakteristiky testu splňují podmínky pro použití v laboratořích klinické biochemie a navíc v současné době byla ukončena externí validace pro získání CE značky (IVD).

LITERATURA

1. Laterza O. F., Modur V. R., Crimmins D. L., Olander J. V., Landt Y., Lee J. M., Ladenson J. H.: *Clin. Chem.* 52, 1713 (2006).
2. An W. F., Bowlby M. R., Betty M., Cao J., Ling H. P., Mendoza G., Hinson J. W., Mattsson K. I., Strassle B. W., Trimmer J. S., Rhodes K. J.: *Nature* 403, 553 (2000).
3. Bahi N., Friocourt G., Carrie A., Graham M. E., Weiss J. L., Chafey P., Fauchereau F., Burgoyne R. D., Chelly J.: *Hum. Mol. Genet.* 12, 1415 (2003).
4. Bernstein H.G., Braunewell K.-H., Spilker C., Danos P., Baumann B., Diekmann S., Gundelfinger E. D., Bogerts B.: *NeuroReport* 23, 393 (2002).
5. Braunewell K.-H. and Gundelfinger E. D.: *Cell Tissue Res.* 295, 1 (1999).
6. Braunewell K.-H., Brackmann M., Schaupp M., Spilker C., Anand R., Gundelfinger E. D.: *J. Neurochem.* 78, 1277 (2001).
7. Burgoyne R. D., O'Callaghan D. W., Hasdemir B., Haynes L. P., Tepikin A. V.: *Trends Neurosci.* 27, 203 (2004).

M. Švesták^a, L. Sporová^a, J. Procházková^a, M. Karpíšek^b, L. G. Dragusin^d, D. Moravčíková^a, and D. Stejskal^{a,c} (^aDepartment of Laboratory Medicine, Hospital, Prostějov, ^bDepartment of Human Pharmacology and Toxicology, Veterinary and Pharmaceutical University, Brno, ^cDepartment of Medicinal Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, Palacký University, Olomouc, ^dBiovendor Laboratory Medicine, Modřice): **Evaluation of Clinical Relevance of the VILIP-I Values in Serum of Patients with Cerebrovascular Accident Diagnosis by a New ELISA Method**

Development, validation and clinical relevance of an own ELISA method for measurement of Vilip-I serum and Csf concentration is presented. First results of clinical tests suggest using this parameter in diagnosis of stroke.