

STANOVENÍ KONCENTRACE KLUSTERINU POMOCÍ NOVÉ METODY ELISA

DAVID STEJSKAL^a, MICHAL KARPÍŠEK^b
a ZUZANA HANULOVÁ^c

^a Oddělení laboratorní medicíny Nemocnice Šternberk p.o., Jívavská 20, 785 16 Šternberk, ^b Veterinární a farmaceutická fakulta Brno, Česká republika, ^c Gnosis s.r.o., Bratislava, Slovensko,
david.stejskal@quick.cz, michal.karpisek@email.cz,
hanulova@biovendor.com

Došlo 20.2.06, přijato 27.4.06.

Klíčová slova: klusterin, ELISA, karcinom močového měchýře, apoptóza

Úvod

Klusterin je heterodimerický glykoprotein (synonymum ApoJ, Rmh 49 kDa), který byl nalezen v řadě biologických tkání. V organismu se vyskytují dvě formy: první se vyskytuje extracelulárně a druhá v cytoplasmě a jádře. Extracelulární forma má cytoprotektivní efekt a vykazuje inhibiční účinky na apoptózu (inhibuje tzv. programovanou smrt buněk). Je zvýšeně regulována při buněčném stresu, např. u osob s maligními nádory^{1–4,6}, neurodegenerativními chorobami nebo pacientů v sepsi či šoku^{5,7,9}. Intracelulární forma má naopak proapoptotický efekt (aktivuje programovanou smrt buněk).

Tento protein má také řadu fyziologických účinků – např. reguluje komplement, chrání buněčné membrány, ovlivňuje transport lipidů, maturaci spermií, iniciaci apoptózy, endokrinní sekreci, inhibuje účinek metaloproteinase⁸.

Zdá se, že z patologických chorob má klusterin význam především při vzniku glomerulonefritid, polycystických ledvin, renálních tubulárních onemocnění, neurodegenerativních chorob či infarktu myokardu^{15–17}.

Zvýšenou hladinu klusterinu nacházíme v cévách i krvi u osob s generalizovanou aterosklerózou, pravděpodobně jako reakci na generalizovaný stres. V tomto případě se však hovoří o tom, že zvýšení klusterinu by mohlo být známkou a silným prediktorem cévního postižení obecně^{11–12}. Gen pro klusterin je také považován za jeden z kandidátních genů pro aterosklerózu¹⁰.

Samotné zvýšení klusterinu má významný antiaterogenní efekt. Zvýšení klusterinu, ke kterému dochází v cévách díky laminárnímu proudění, totiž odstraňuje komplement indukovanou prozánětlivou odpověď endotelií a zvyšuje eflux cholesterolu do jater^{13–14}.

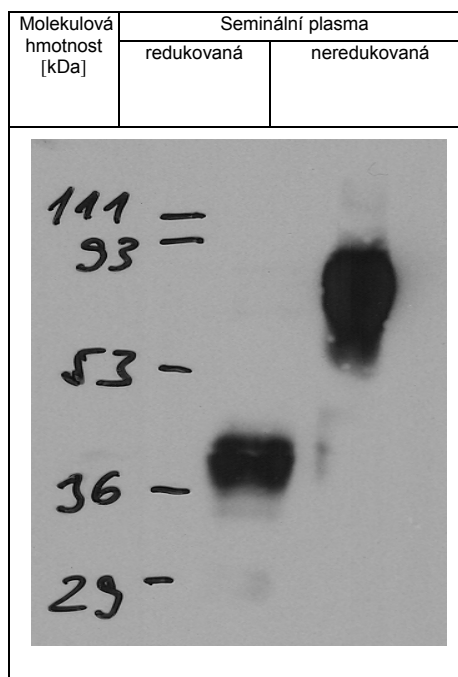
Stanovení klusterinu v biologických tekutinách je potenciálním ukazatelem řady onemocnění. V poslední době se hovoří o možném využití tohoto stanovení v krvi v rámci diagnostiky malignit a efektivity protinádorové terapie i v rámci hodnocení rizika vzniku aterosklerózy. Existují hypotézy o možném stanovení v likvoru v diagnostice neurodegenerativních onemocnění mozku nebo v moči v diagnostice tubulopatií^{12,17–19}. Zatím však nebyla měřicí souprava, která by stanovovala jeho koncentraci za standardních podmínek, dostupná.

Experimentální část

Příprava specifických protilátek, použitý kalibrátor

Na desky byla navázána monoklonální protilátka proti lidskému klusterinu (Murine Monoclonal Anti-human SP40, 40 [Clusterin], klon G7).

Jako detekční protilátka byla použita monoklonální protilátka proti lidskému klusterinu (Biovendor, Anti-Human Clusterin Mouse Monoclonal Antibody, klon Hs-3, RD182034110-H3). Specifičnost protilátky byla testována pomocí Western-blotu vzorků seminální plasmy při redukováných a neredukovaných podmínkách (obr. 1). Vzorky seminální plasmy byly následně použity jako kalibrátor pro klusterin v testu ELISA.



Obr. 1. Analýza Hs-3 myší monoklonální protilátky; lyzát seminální plasmy byl separován v SDS-PAGE při redukováných a neredukovaných podmínkách. Po přenosu na PVDF membránu byl blot inkubován s testovanou Hs-3 mAb a na vývoj byl použit anti-myší HRP konjugát a chemiluminiscenční detekční systém (Amersham)

Protílátka byla poté značena biotinem firmy Pierce (Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin, katalogové číslo 21338) podle návodu od výrobce.

Popis metody ELISA pro stanovení klusterinu v lidském séru a moči

V mikrotitrační desce (Corning Costar, High Binding, katalogové číslo 52-00-02) bylo vázáno 0,2 mg protilátky/jamku v 0,1 M hydrogenkarbonátovém pufru pH 8,5 (inkubace 18 h při 4 °C).

Po odsátí vazného roztoku a promytí promývacím roztokem (TBS, 0,05 % Tween 20, pH 7,2) byla deska zablokována roztokem TBS (Tris Buffered Saline, pH 7,2), 0,5 % BSA (Bovine Serum Albumin), 4 % sacharosy (dávkování 0,2 ml/jamka, inkubace 60 min při teplotě 25 °C).

Po odsátí blokovacího roztoku bylo na desku dávkováno 0,1 ml příslušného kalibrátoru, 2500× ředěného sérového vzorku a nebo 5× ředěného močového vzorku (všechna měření byla prováděna 2×) a následně byla deska inkubována 1 h při laboratorní teplotě.

Po 5-násobném promytí desky promývacím roztokem (TBS, 0,05 % Tween 20, pH 7,2) bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml monoklonální protilátky značené biotinem (200 µg l⁻¹) a deska opět inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě.

Po druhém 5-násobném promytí desky bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml konjugátu streptavidin-HRP (Roche, katalogové číslo 1 089 153) ředěného 20 000 × a deska inkubována 30 min při teplotě 25 °C.

Po třetím 5-násobném promytí desky promývacím roztokem bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml substrátu TMB (KPL, katalogové číslo 52-00-01) a reakční směs inkubována 10–15 min při teplotě 25 °C.

Reakce byla zastavena přidávkou 0,1 M roztoku kyseliny sírové a vzniklé žluté zbarvení (produkt) bylo změřeno fotometricky při vlnové délce 450 nm, přičemž intenzita žlutého zbarvení je přímo úměrná obsahu analytu ve vzorku.

Hodnoty klusterinu v neznámých vzorcích byly stanoveny z kalibrační křivky (obr. 2), která byla získána vynesím absorbančí kalibrátorů oproti jejich známé koncentraci.

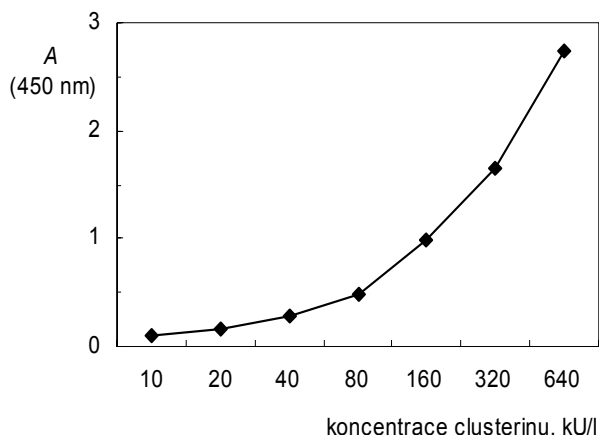
Ředícím roztokem pro kalibrátory a vzorky byl roztok TBS (pH 7,2), 1 % BSA, 0,01 % thimerosal; pro biotinem značenou protílátku a pro konjugát streptavidin-HRP roztok TBS (pH 7,2), 0,2 % BSA, 0,01 % thimerosal.

V testu byla použita sada kalibrátorů o koncentracích klusterinu 640, 320, 160, 80, 40, 20 a 10 kU l⁻¹.

Sérové vzorky byly ředěny 2500× ve dvou krocích podle schématu:

- ředění A: 5 µl vzorku + 245 µl ředícího roztoku,
- ředění B: 5 µl ředění A + 245 µl ředícího roztoku.

Vzorky moče byly ředěny 5× podle schématu 50 µl vzorku + 200 µl ředícího roztoku.



Obr. 2. Kalibrační křivka pro metodu Klusterin ELISA

Klinické testování metody ELISA

Byly vyšetřeny tři skupiny probandů:

- a) 53 vysoce asymptomatických rizikových jedinců s podezřením na myokardiální ischemii, u kterých byl proveden SPECT (jednofotonová emisní počítačová tomografie) myokardu jako diagnostický prostředek pro odhad myokardiální ischemie; klusterin byl odebrán před, na vrcholu a po 30 i 60 min od ukončení testu²¹,
- b) 93 pacientů s podezřením na karcinom močového měchýře, u kterých byla provedena cystoskopie s cytologickým hodnocením a stanovením klusterinu v moči²²,
- c) 29 pacientů s podezřením na postižení parenchymu ledvin, u nichž byla stanovena hodnota klusterinu v moči²³.

Výsledky a diskuse

Funkční charakteristika metody ELISA

Křížová reaktivita v testu ELISA nebyla zjištěna u sér následujících zvířat: králík, koza, ovce, prase, myš, kůň, kráva a krysa.

Pro ověření funkčnosti testu ELISA byla testována také správnost a přesnost metody, a to jak pro sérum, tak pro moč.

Sérum

Správnost metody byla ověřena metodou standardního přídatku a v testu linearity. Sérové vzorky od 3 pacientů byly obohaceny o +40, +80 a +160 U klusterinu a byla zjišťována výtěžnost, vyjádřená jako poměr získané/

očekávané hodnoty koncentrace klusterinu. Průměrná hodnota výtěžnosti byla 95 %.

V testu linearity byly testovány 3 sérové vzorky, které byly ředěny 500×, 1000×, 2000× a 4000× a průměrná hodnota výtěžku byla 94 %.

Přesnost metody byla testována jako opakovatelnost výsledků u 3 sérových vzorků o různé koncentraci klusterinu a vyjádřena jako variační koeficient v sérii ($n=8$) i reprodukovatelnost výsledků mezi sériemi měření ($n=8$). Hodnota variačního koeficientu (CV) byla ve všech případech < 9 %.

Mez stanovitelnosti metody byla definována jako nejnižší stanovitelná koncentrace klusterinu, (tato hodnota je vyjádřením koncentrace klusterinu, odpovídající absorbanci vypočítané podle vzorce: průměrná absorbance slepého vzorku ($n=6$) + 3× směrodatná odchylka průměru slepého vzorku). Tato koncentrace odpovídala hodnotě 5 kU l^{-1} . Mez detekce (CV < 10 %), představující nejnižší měřitelnou koncentraci klusterinu s uspokojivými analytickými charakteristikami, byla 50 kU l^{-1} (vzorky s hodnotami klusterinu vyššími měly hodnoty CV < 10 %).

Moč

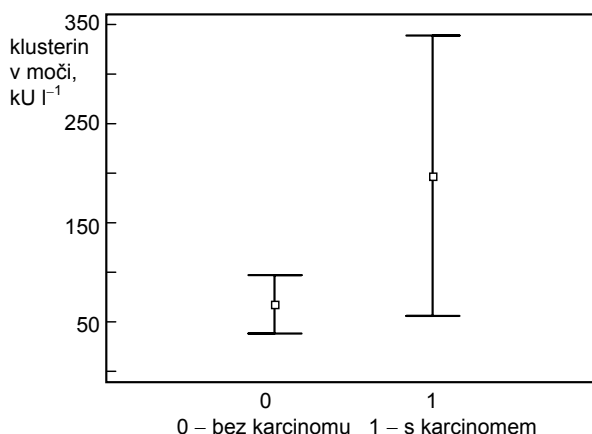
Vzorky moče vykazovaly v testu linearity a výtěžnosti uspokojivé hodnoty (80–120 %), opakovatelnost i reprodukovatelnost byla za stejných podmínek jako v případě séra < 8 %. Mez stanovitelnosti v moči odpovídala hodnotě 5 kU l^{-1} , mez detekce hodnotě 50 kU l^{-1} .

Klinické testování metody ELISA

Při klinickém testování stanovení klusterinu v diagnostice myokardiální ischemie bylo zjištěno, že klusterin nelze využít v diagnostice latentní myokardiální ischemie, jelikož se jeho hodnoty u jedinců s ischemií významně v průběhu testu nelišily od osob bez ní (mediány klusterin v kU l^{-1} : 157069 vs. 171764 v náběru 1; 182392 vs. 181882 v náběru 2; 161564 vs. 152347 v náběru 3; 164429 vs. 157777 v náběru 4). Celkem byla myokardiální ischemie zjištěna u 18 osob (37 %). Vstupní hodnoty klusterinu nesouvisely s věkem, pohlavím ani parametry SPECT, rozložení dat klusterinu nebylo normální²¹.

U jedinců s podezřením na karcinom močového měchýře byl naopak klusterin v moči ukazatelem vysokou diagnostickou senzitivitou. Jedinci s karcinomem měli průměr hodnot 197,2 kU l^{-1} ($n=43$; normální rozložení), jedinci bez něj medián 167,74 kU l^{-1} ($n=50$; normální rozložení; $P < 0,01$). Senzitivita stanovení při cut-off $> 50 \text{ kU l}^{-1}$ činila 49 % a specifita 92 % (AUC ROC 0,75, LR+ 6,1, PPV+ 84 %) (cit.²², obr. 3).

U osob s podezřením na postižení renálního parenchymu nebyla diagnostická efektivita klusterinu dostatečná (především nízká senzitivita 33 %), nicméně za zmínku stojí 100% specifita při jakékoliv hodnotě vyšší než 50 kU l^{-1} (jakákoliv detegovatelná hodnota klusterinu byla spojena s přítomností postižení ledvinového parenchymu).



Obr. 3. Klusterin v moči u pacientů podle přítomnosti karcinomu prostaty; na grafu jsou znázorněny průměrné hodnoty s 95% intervalem spolehlivosti

Tento údaj by mohl podpořit využití stanovení klusterinu pro potvrzení přítomnosti onemocnění ledvinových tubulů v nejasných diagnostických případech²³.

Závěrem ke klinickému testování pro validaci metody, jak v séru, tak v moči, lze říci, že byly potvrzeny hypotézy o tom, že jedinci s karcinomem močového měchýře mají vyšší hodnoty klusterinu než osoby bez něj. Klusterin z tohoto pohledu vykazuje dostatečnou diagnostickou efektivitu. Bylo také zjištěno, že stanovení klusterinu v moči má vysokou pozitivní prediktivní hodnotu pro přítomnost postižení renálního parenchymu, nicméně diagnostická efektivita tohoto stanovení nesplňovala všechna kritéria správné diagnostiky (AUC $< 0,7$). Přesto lze očekávat, že stanovení klusterinu by mohlo přispět k odhadu přítomnosti renálního tubulárního postižení. Nepodařilo se však prokázat, že by stanovení klusterinu v séru mělo nějaký význam v odhadu latentní myokardiální ischemie.

Závěr

Byla navržena a optimalizována diagnostická souprava ELISA na stanovení klusterinu. Jde o první soupravu svého druhu vůbec. 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 (IVD).

První výsledky klinického testování jsou velice zajímavé a odpovídají hypotézám o tom, že klusterin v moči by mohl být (i přes svou nespecifitu) významným ukazatelem pro stanovení diagnózy monitorování efektu terapie vybraných tumorů a ukazatelem pro potvrzení přítomnosti vybraných onemocnění ledvin.

LITERATURA

1. Kruger S., Mahnken A., Kausch I., Feller A. C.: *Urology* 67, 105 (2006).
2. Kim B. M., Kim S. Y., Lee S., Shin Y. J., Min B. H., Bendayan M., Park I. S.: *Diabetologia* 13, 1 (2006).
3. Gleave M., Chi K. N.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1058, 1 (2005).
4. So A., Sinnemann S., Huntsman D., Fazli L., Gleave M.: *Mol. Cancer Ther.* 12, 1837 (2005).
5. Loison F., Debure L., Nizard P., Le Goff P., Michel D., Le Drean Y.: *Biochem. J.* 9, 112 (2005).
6. Jackson J. K., Gleave M. E., Gleave J., Burt H. M.: *Angiogenesis* 8, 229 (2005).
7. Ishikawa T., Zhu B. L., Li D. R., Zhao D., Michiue T., Maeda H.: *Biochem. J.* 9, 197 (2005).
8. Hatters D. M., Wilson M. R., Easterbrook-Smith S. B., Howlett G. J.: *Angiogenesis* 8, 235 (2005).
9. Miwa Y., Takiuchi S., Kamide K., Yoshii M., Horio T., Tanaka C., Banno M., Miyata T., Sasaguri T., Kawano Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 1587 (2005).
10. Trougakos I. P., Poulakou M., Stathatos M., Chalikia A., Melidonis A., Gonos E. S.: *Exp. Gerontol.* 37, 1175 (2002).
11. Millis A. J., Luciani M., McCue H. M., Rosenberg M. E., Moulson C. L.: *J. Cell. Physiol.* 186, 210 (2001).
12. Urbich C., Fritzenwanger M., Zeiher A. M., Dimmeler S.: *Circulation* 101, 352 (2000).
13. Ishikawa Y., Akasaka Y., Ishii T., Komiyama K., Masuda S., Asuwa N., Choi-Miura N. H., Tomita M.: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18, 665 (1998).
14. Mackness B., Hunt R., Durrington P. N., Mackness M. I.: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 1233 (1997).
15. Navab M., Hama-Levy S., Van Lenten B. J., Fonarow G. C., Cardinez C. J., Castellani L. W., Brennan M. L., Lusis A. J., Fogelman A. M., La Du B. N.: *J. Clin. Invest.* 99, 2005 (1997).
16. Rosenberg M. E., Silkens J.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27, 6333 (1995).
17. Fink T. M., Zimmer M., Tschopp J., Etienne J., Jenne D. E., Lichter P.: *Genomics* 16, 526 (1993).
18. Krijnen P. A., Cillessen S. A., Manoe R., Muller A., Visser C. A., Meijer C. J., Musters R. J., Hack C. E., Aarden L. A., Niessen H. W.: *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289, 193 (2005).
19. Polihronis M., Paizis K., Carter G., Sedal L., Murphy B.: *J. Neurol. Sci.* 115, 230 (1993).
20. Hidaka S., Kranzlin B., Gretz N., Witzgall R.: *Cell Tissue Res.* 310, 289 (2002).
21. Kadalová L., Jánošová M., Solichova P., Adamovská S., Lačňák B., Prošková J., Stejskal D.: 27. *Imunologické dny, Praha, 21. března 2006*. Sborník abstrakt, P3, str. 50.
22. Stejskal D., Fiala R.: *Neoplasma*, v tisku.
23. Solichova P., Ochmanová R., Hanulová Z., Stejskal D.: 27. *Imunologické dny, Praha, 21. března 2006*. Sborník abstrakt, P9, str. 56.

D. Stejskal^a, M. Karpíšek^b, and Z. Hanulová^c
^a Department of Laboratory Medicine, Hospital, Šternberk, ^b Veterinary and Pharmaceutical Faculty, Brno, Czech Republic, ^c Gnosis Ltd., Bratislava, Slovakia):
Measurement of Clusterin Concentration by a New ELISA Method

Development, validation and clinical testing of a routine method for determination of clusterin by ELISA is presented. Clinical tests suggest using the concentration for diagnosis and monitoring of therapy of bladder cancer. The method may be also useful in diagnosis of other renal diseases. The method failed in diagnosis of asymptomatic myocardial ischemia.