

50 LET RADIOIMUNOANALÝZY

OLDŘICH LAPČÍK

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6

Oldrich.Lapcik@vscht.cz

Klíčová slova: radioimunoanalýza, inzulin, hormon, medicína, přírodní vědy

Počátky endokrinologie provázely zásadní nedostatek analytických metod. Hormony bylo možné identifikovat v endokrinních žlázách, některé metabolity i v moči, o několik řádů nižší koncentrace v krvi však byly chemickými metodami nedostupné. Biologické testy byly pracné, nákladné a náročné na zkušenost experimentátora. Diabetologie nebyla výjimkou.

Objev inzulinu a jeho přípravy ze slinivky jatečných zvířat (F. Banting a Ch. Best, 1921) zlepšil životní vyhlídky milionů pacientů. Vývoj léčebných metod ale nebyl snadný. Inzulin u mnoha pacientů ztrácel po čase účinnost, ke kompenzaci diabetu bylo nutné podávat dávky mnohonásobně převyšující produkci pankreatu zdravých osob. Příčina tohoto jevu byla záhadou. Přitom bylo zřejmé, že její odhalení může být klíčem ke zlepšení léčby.

Jako pravděpodobná se na počátku 50. let jevila představa, že by mohlo jít o důsledek zvýšené aktivity dosud nepopsaného enzymu, inzulinasy¹. Vzhledem k tomu, že techniky pro sledování koncentrace inzulinu v krvi neexistovaly, nebylo zpočátku možné tuto hypotézu testovat. Ve stejné době získávali zkušenosti s využitím radioaktivity k řešení biologických problémů pracovníci izotopové laboratoře nemocnice Veterans Administration v Bronxu, absolventka jaderné fyziky Rosalyn Yalowová a lékař Solomon Berson. S pomocí dostupných izotopů (²⁴Na, ³²P, ⁴²K, ⁸²Br, ¹³¹I) zkoumali distribuci iontů v extracelulárním prostoru, metabolismus erytrocytů, příjem jodu štítnou žlázou a metabolický obrát sérového albuminu². V roce 1954 obrátili svoji pozornost k inzulinu. Záhy vyladili techniku značení tak, že jejich preparát nesl půl až jeden atom jodu ¹³¹I v molekule a přitom si plně zachoval biologické vlastnosti. Značený inzulin aplikovali nitrožilně dobrovolníkům – pacientům i zdravým kontrolám. Použili dávky v rozmezí 0,1 do 7,0 jednotek, které představovaly 0,56 až 7,4 MBq radioaktivity³. Pokud by příčinou snížení účinnosti inzulinu u diabetiků bylo rychlejší odbourávání, musel by se jim z krve ztrácet rychleji. Ve skutečnosti tam ale radioaktivita zůstávala podstatně déle než u kontrol a zadržovali ji i probandi, jimž byl v minulosti inzulin aplikován z psychiatrických důvodů (používal se k vyvolání hypoglykemického šoku při léčení schizofrenie). Chování radioaktivity při frakcionacích séra různými metodami

(precipitace proteinů trichloroctovou kyselinou, vysolování síranem sodným, elektroforéza, ultracentrifugace) Bersona s Yalowovou přivedlo k závěru, že příčinou delšího setrvání inzulinu v krvi pacientů a zároveň důvodem jeho inaktivace jsou protilátky, jež se vytvořily po injekcích inzulinu zvířecího. První verze připraveného článku u recenzentů tvrdě narazila. Představa, že tak malá molekula, nadto téměř totožná s lidským inzulinem, může vyvolat tvorbu protilátek, byla příliš originální. Aby dosáhli alespoň uveřejnění svých experimentů, ustoupili Yalowová s Bersonem na čas od navrženého výkladu. Pozorovaný protein nazvali prostě „inzulin vázající globulin“^{3,4}. Doplnění důkazů toho, že jde o protilátky, jim zabralo další dva roky⁵. Kromě sér pacientů používali i séra morčat imunizovaných podkožní aplikací hovězího inzulinu. Při porovnávání jejich vazebných vlastností vytvořili, jaksi nad původní záměr, systém schopný měřit v té době nepředstavitelně nízká množství hormonu, kompetitivní radioimunoanalýzu (RIA). První krátká zpráva, v níž popsali princip metody a poprvé uvedli koncentrace inzulinu měřené v krvi dvou zdravých osob nalačno a po stimulaci sto gramy glukosy, spatřila světlo světa v časopisu *Nature* 21. listopadu 1959 (cit.⁶). Plný článek, jenž vedle podrobného popisu metody obsahoval výsledky zátěžového testu u 30 kontrol a 66 pacientů, vyšel o osm měsíců později, v červencovém čísle *Journal of Clinical Investigation*⁷.

První RIA byla v porovnání s dnešními podobami imunoanalýzy poměrně zdlouhavá a pracná. Inkubace protilátky se směsí vzorku či standardu s radioligandem při teplotě +4 °C trvala čtyři dny. K oddělení volné a vázané frakce sloužila papírová elektroforéza, která také zabrala několik hodin. Pak bylo nutné pro každý vzorek vyhodnotit distribuci radioaktivity na elektroforeogramu⁷. Proti dostupným biologickým testům to však byla metoda jednoduchá, reprodukovatelná a hlavně o několik řádů citlivější. Yalowová s Bersonem si uvědomovali, že v první řadě jde o metodu imunochemickou. Jako by předjímal i možnost jiného značení, používali ve svých pracích termín *immunoassay* bez předpony *radio*-.

Bylo zřejmé, že obdobné metody založené na soutěži značeného a nezačeného antigenu o vazebná místa, bude možné vypracovat i pro další analyty. Yalowová s Bersonem chtěli tuto možnost poskytnout celému světu, a proto své poznatky uveřejnili bez patentové ochrany⁸.

V následujících letech se zaměřili na vývoj a využití RIA pro další peptidové hormony (1963: růstový hormon a parathormon; 1968: adrenortikotropin; 1970: gastrin; 1975: somatomedin) a detekci viru hepatitidy B (1970). Škála analytů se díky jejich následovníkům záhy rozrostla o množství hormonů, léčiv, vitaminů, sérových proteinů, diagnostických markerů a dalších látek. Dostupnost analýz umožnila rozvinout diagnostiku řady chorob a metabolických poruch, zlepšit zdravotní péči a uskutečnit rozsáhlé

skriningové programy. Rosalyn Yalowová nijak nepřeháněla, když při přebírání Nobelovy ceny v roce 1977 přirovnala prostor, který RIA otevřela medicíně a vědám o životě k tomu, jenž se před mikrobiologií a astronomií rozprostřel po vynálezech mikroskopu a teleskopu⁴.

Rosalyn Yalowová (roz. Susmanová) se narodila 19. července 1921 v New Yorku. Na střední škole se nadchla pro chemii a fyziku. Okouzila ji životopis Marie Curie a přednášky Enrica Fermiho, jichž se účastnila v roce 1939. Navzdory dobovým předsudkům se přihlásila ke studiu jaderné fyziky na Univerzitě v Illinois. V roce 1942 získala titul MSc. a v roce 1945 doktorát. V letech 1945 až 1950 vyučovala fyziku a přitom pracovala jako dobrovolnice na Columbia University, kde získala praktické zkušenosti s aplikací radioaktivity v medicíně. Ty v letech 1948 až 1949 uplatnila jako konzultantka při zakládání radioizotopové laboratoře nemocnice Veterans Administration v Bronxu, kam nakonec v lednu 1950 přešla na plný úvazek. O několik měsíců později zde potkala svého nejvýznamnějšího spolupracovníka, Solomona Bersona. Ve společné laboratoři strávili osmnáct let a jejich spolupráce pokračovala i poté, co Berson odešel na místo vedoucího katedry na newyorské Mt Sinai School of Medicine. Ukončila ji až jeho náhlá smrt v roce 1972. Po ní Yalowová prosadila přejmenování jejich pracoviště na Laboratoř Solomona Bersona – do konce své aktivní dráhy tak mohla psát jeho jméno na všechny publikace alespoň v adrese. V roce 1977 Rosalyn Yalowová obdržela za vývoj radioimunoanalýzy pro peptidové hormony Nobelovu cenu. Výzkumnou činnost ve Veterans Administration ukončila v roce 1991, v dalším desetiletí působila jako profesorka na Mount Sinai School of Medicine. Nyní žije na odpočinku ve svém domě v Bronxu.

Solomon Berson (22.4.1918 – 11.4.1972) se narodil v roce 1918 v New Yorku, jako nejstarší ze tří dětí ruského imigranta, podnikatele v barvení kožešin. Jeho cesta ke studiu medicíny nebyla snadná – dříve než uspěl na newyorské univerzitě, skončilo jedenadvacet přihlášek na různé lékařské fakulty zamítnutím. Lékařský diplom získal v roce 1945. V letech 1946–1948 sloužil v armádě. Poté přešel do nemocnice Veterans Administration v Bronxu. V roce 1950 zde začala jeho dlouholetá spolupráce s Rosalyn Yalowovou, jejímž výsledkem byla řada zásadních objevů v diabetologii a endokrinologii. (Např. objev proti-

látek proti inzulinu, jehož vedlejším produktem byl vývoj RIA metodik, přispěl k objasnění autoimunitních procesů a etiologie diabetu II. typu.) V roce 1968 Berson přijal místo profesora na Mount Sinai School of Medicine. Za své objevy získali s Yalowovou řadu ocenění. Toho nejprestižnějšího, Nobelovy ceny, se ale Solomon Berson nedožil. V dubnu 1972 zemřel na srdeční infarkt.

LITERATURA

1. Mirsky I. A.: Recent Progr. Horm. Res. 7, 437 (1952).
2. Rall J. E., Solomon A. Berson, v: *Biographical Memoirs*. National Academy of Sciences 59, 54 (1990). (http://books.nap.edu/openbook.php?record_id=1652&page=54)
3. Berson S. A., Yalow R. S., Bauman A., Rotschild M. A., Newerly K.: J. Clin. Invest. 35, 170 (1956).
4. Yalow R. S.: Nobel Lecture, 8 December 1997 (http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1977/yalow-lecture.pdf)
5. Berson S. A., Yalow R. S.: J. Clin. Invest. 38, 1996 (1959).
6. Yalow R. S., Berson S. A.: Nature 84, 1648 (1959).
7. Yalow R. S., Berson S. A.: J. Clin. Invest. 39, 1157 (1960).
8. Straus E.: The Mount Sinai Journal of Medicine 67, 54 (2000).

O. Lapčík (*Institute of Chemical Technology, Prague*): **50 Years of Radioimmunoassay**

The invention of radioimmunoassay techniques by Rosalyn Yalow and Solomon Berson 50 years ago opened new horizons for many branches of medicine and life sciences. Their first paper, describing quantitative immunoassay of plasma insulin in human subjects and overwhelming the then used analytical methods by several orders of magnitude in terms of sensitivity and accuracy, was published in an issue of *Nature* that appeared on 21st November 1959. The spectrum of applications of RIA methodology spread promptly into many areas – such as analysis of hormones, drugs, vitamins, serum proteins, diagnostic markers, viruses and bacteria. For the development of RIA of peptide hormones, Rosalyn Yalow was awarded the Nobel Prize in 1977.