

STANOVENÍ KONCENTRACE SOLUBILNÍHO LEPTINOVÉHO RECEPTORU (Ob-Re) POMOCÍ NOVÉ METODY ELISA

DAVID STEJSKAL^a a IVAN SVOBODA^b

^a Oddělení laboratorní medicíny Nemocnice Šternberk, Jívavská 20, 785 16 Šternberk, ^b Biovendor laboratorní medicína a.s.

david.stejskal@quick.cz, svoboda@biovendor.com

Došlo 16.1.06, přijato 27.4.06.

Klíčová slova: leptinový receptor, ELISA, leptin, obezita

Úvod

Tukové buňky produkují řadu látek, které významným způsobem ovlivňují energetickou homeostázu, vznik diabetu mellitu, aterogeneze a účastní se mnoha dalších fyziologických i patologických pochodů i regulací v organismu. Jednou z těchto látek je leptin, který účinkuje přes leptinový receptor snížením chuti k jídlu a zvýšením energetického výdeje. Leptinový receptor se dělí na sekreční (ObRe), dlouhou (ObRb) a krátké formy (ObRa, ObRc, ObRd, ObRf). Pouze ObRb je plně biologicky funkční; ostatní receptory mají význam pro přestup leptinu do mozku a vazbu leptinu v cirkulaci (ObRe). Regulace leptinu v organismu jsou velice složité a závisí na řadě faktorů (vliv hormonů a chemokinů, vliv maturace organismu, tukové tkáně, věku, typu a množství potravy, kouření, alkoholu, atp.).

Jelikož nebyla ještě před několika lety komerčně dostupná souprava na stanovení koncentrace ObRe v krvi (byly popsány pouze možnosti stanovení exprese Db genu – např. pomocí PCR, Western blottingu, hybridizace *in situ*, imunohistochemie, atp.) a několik prací, které se měřením jeho koncentrace v cirkulaci zabývalo používalo různě problematické metody stanovení (tzv. in-house metody), stalo se cílem naší práce sestavení, optimalizace a validace ELISA soupravy na stanovení ObRe.

Experimentální část

Příprava protilátek

Rekombinantní lidský leptinový receptor pro imunizaci byl získán od výrobce Research Diagnostics, Inc. Šlo o fúzní protein složený z extracelulární domény leptin receptoru a Fc regionu lidského imunoglobulinu G (ObRe/Fc).

Dvě BALB/c 6–8 týdnů staré myši byly intradermál-

ně injikovány v 3-týdenních intervalech. Imunizační dávku představovalo 25 µg rekombinantního antigenu v suspenzi PBS/Freundovo adjuvans (0,1 M fosforečnan sodný, 0,1 M NaCl, pH 7,2) s Freundovým adjuvans v objemovém poměru 1:1). Po páté imunizaci byly myši utráceny a izolované slezinové buňky byly fúzovány s myelomovou linií Sp2/0. Vzniklé hybridomy byly selektovány v selekčním médiu HAT (hypoxantin/aminopterin/thymidin) a poté kultivovány v DMEM médiu s 15 % FCS (kultivační médium, které obsahuje 15 % fetální telecí sérum v DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium – Cambrex, s obsahem glukosy 1 g l⁻¹ a přidavkem L-glutaminu 366 mg l⁻¹). Buňky produkující požadované protilátky byly vybírány metodou nepřímé ELISA. Vybrané monoklonální protilátky byly dále produkovány jako ascitické tekutiny v BALB/c myších stimulovaných pristanem a purifikovány na koloně s imobilizovaným proteinem G.

Nepřímá ELISA

Rekombinantní ObRe/Fc byl rozpuštěn v 0,1 M karbonátovém pufru, pH 8,5 v koncentraci 1 µg ml⁻¹ a vázán přes noc při 4–8 °C na mikrotitrační destičky Corning Costar, High Binding. Destičky byly promyty roztokem TBS-Tween 20 (0,05M Tris, 0,1M NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,2) a případná volná vazebná místa byla zablokována roztokem TBS-Tween 20-želatina. Do jamek bylo pipetováno 100 µl média s protilátkami (případně 300× ředěná ascitická tekutina), po 1 h inkubaci a následném promytí bylo přidáno 100 µl vhodně naředěného konjugátu kozí protilátky proti myšimu imunoglobulinu G s křenovou peroxidasou (Dako). Destičky byly inkubovány 1 h při pokojové teplotě, promyty a bylo přidáno 100 µl TMB substrátu (1,2 mM tetrametylbendidin s obsahem 3 mM peroxidu vodíku, KPL, katalogové číslo 52 00 01), enzymová reakce byla zastavena přidavkem 100 µl 0,2 M H₂SO₄ do každé jamky a byla změřena absorbance při 450 nm. Imunoglobulinová frakce získaná srážením směsného lidského séra síranem amonným byla rozpuštěna v 0,1 M karbonátovém pufru, pH 8,5 v koncentraci 10 µg ml⁻¹ a vázána na mikrotitrační destičky Corning Costar, High Binding přes noc při 4–8 °C.

Výběr pozitivních klonů

Jako pozitivní klony byly vybrány ty, které produkovaly protilátky, které dávaly v nepřímé ELISA vysokou absorbanci (typicky více než 3,0) na desce s navázaným ObRe/Fc (1 µg l⁻¹) a současně nízkou absorbanci (typicky méně než 0,3) na desce s navázaným lidským imunoglobulinem G (10 mg l⁻¹).

Sandwich ELISA

Monoklonální protilátky proti ObRe byly značeny křenovou peroxidasou (HRP, Boehringer Mannheim) standardní jodistanovou metodou. Purifikované monoklonální

protilátky byly vázány na mikrotitrační desky stejným způsobem jako antigen pro nepřímou metodu ELISA, používané koncentrace pro vazbu se pohybovaly v rozmezí 1 až 5 mg l⁻¹. Destičky s navázanými protilátkami byly promyty (0,05 M Tris, 0,1 M NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,2) a zablokovány (roztok TBS – 0,05 M Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,2; 0,5 % BSA (hovězí sérový albumin); 4 % sacharosa). Rekombinantní ObRe/Fc byl ředěn ve vhodném pufru (TBS-Tween-želatina, Leptin Diluent Buffer – BioVendor) a 100 µl roztoku bylo pipetováno do jamek mikrotitrační desky. Po 1 h inkubaci a následném promytí bylo přidáno 100 µl vhodně naředěného konjugátu anti ObRe monoklonální protilátky s křenovou peroxidasou. Desky byly inkubovány 1 h při pokojové teplotě, promyty a bylo přidáno 100 µl TMB substrátu (1,2 mM tetrametylbendizidín s obsahem 3 mM peroxidu vodíku, KPL, katalogové číslo 52 00 01). Enzymová reakce byla zastavena přidáním 100 µl 0,2 M H₂SO₄ do každé jamky a byla změřena absorbance při 450 nm.

Klinické testování soupravy

Technika odběru vzorku krve a stanovení ObRe

Odběr na stanovení ObRe byl proveden v polosedě z periferní žíly. Vzorek byl po odběru na 60 min uložen v pokojové teplotě. Poté byl centrifugován (10 min, 1100xg, 4 °C) a sérum bylo po stažení zamraženo při teplotě –80 °C. Stanovení ObRe bylo provedeno max. do 6 týdnů od odběru materiálu. Všechny vzorky byly vyšetřeny dvojmo.

Byl vyšetřen soubor 568 osob (217 mužů a 351 žen). Šlo o osoby sledované v rámci preventivních prohlídek ve spádů Nemocnice Šternberk; podmínkou zařazení osob do studie byla skutečnost, že nebyli léčeni svými lékaři v posledních 6 týdnech pro žádné onemocnění. Cílem této studie mělo být zjištění normálních hodnot ObRe v populaci a vztah k leptinu, event. ukazatelům metabolismu glukosy a lipoproteinů.

Statistické zpracování dat

Data byla zpracována pomocí software Medcalc (Belgie).

Výsledky a diskuse

Příprava protilátek

Slezinné buňky izolované ze dvou myší imunizovaných ObRe/Fc antigenem byly fúzovány s Sp2/0 myelomovými buňkami. První fúze byla neúspěšná; hybridomy rostly ve 30 % jamek, ale při screeningu metodou nepřímé ELISA nebyl nalezen žádný klon, který by produkoval protilátky proti ObRe (tedy byl průkazně pozitivní na desce s imobilizovaným ObRe/Fc a negativní na desce s imobilizovaným lidským Ig). Po druhé fúzi rostly hybridomy v 50 % jamek kultivačních destiček. Při screeningu

bylo vybráno 14 pozitivních klonů. Buňky byly překlonovány, namnoženy a injikovány intraperitoneálně do stimulovaných BALB/c myši.

Monoklonální protilátky produkované v myších jako ascitické tekutiny byly purifikovány metodou HPLC na koloně s imobilizovaným proteinem G a purifikované protilátky byly konjugovány s křenovou peroxidasou (HRP).

Vývoj sandwich ELISA byl zahájen testováním veškerých kombinací monoklonálních protilátek navázaných na povrchu jamek mikrotitračních destiček a použitých jako HRP konjugáty. Ze vzniklých 196 kombinací reagovalo 150 párů s rekombinantním ObRe/Fc proteinem, přičemž citlivost se pohybovala v rozmezí 1–250 µg l⁻¹; u 46 variant nebyla pozorována žádná odezva. Na základě tohoto výsledku byly vybrány 4 protilátky (pro vazbu) a 10 konjugátů. Kombinace těchto komponent byly detailněji testovány na limitovaných souborech sér.

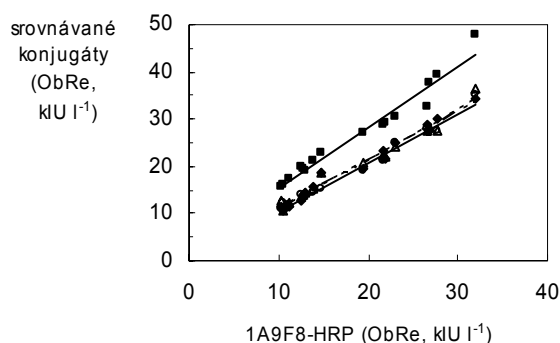
Definice jednotek standardu

Pro kalibraci ELISA byl použit rekombinantní ObRe/Fc protein (homodimer), který se strukturou a pravděpodobně i imunoreaktivitou odlišoval od nativního ObRe v cirkulaci. Protože byl odlišný od receptoru leptinu v séru, byla použita k vyjádření ObRe jednotka 1 IU, která odpovídá 2 ng rekombinantního standardu.

Kritéria výběru protilátek, resp. páru vazebná protilátka/ konjugát:

- limit detekce pro rekombinantní ObRe/Fc nižší než 2 µg l⁻¹,
- robustnost klonu produkujícího danou protilátku – stabilita, dobrá kultivovatelnost, dobré produkční vlastnosti,
- nejlepší výsledky v základních analytických parametrech (opakovatelnost v sérii i mezi sériemi, variační koeficienty, linearita, výtěžnost) u většího počtu vzorků sér (20 pro každý parametr),
- robustnost metody – minimální vliv teploty, inkubační doby, změny složení ředícího roztoku (byly testovány roztoky o různých koncentracích inertního proteinu, TBS-Twen 20-želatina, TBS-Twen 20-BSA a Leptin ELISA Dilution Buffer (0,05 M Tris, 0,1 M NaCl, 0,5 % BSA, 0,01 % thimerosal),
- stabilita komponent (protilátky imobilizované na mikrotitrační destičce, případně konjugátu).

Z obr. 1 je zřejmé, že konjugáty 1A9F8-HRP, 8C3-HRP, 8D8-HRP, 6B9-HRP a 1A9F8-HRP vydávají ve vzorcích prakticky totožné koncentrace ObRe, zatímco hodnoty získané s konjugátem 4C6-HRP byly o 30 % vyšší. Na základě uvedených parametrů byla pro vazbu vybrána monoklonální protilátka 7B3H9 a konjugát připravený z protilátky 1A9F8, se kterým byla prováděna konečná optimalizace metody; pro ředění vzorků byl zvolen Leptin ELISA Diluent – BioVendor (pro svou schopnost potlačovat případné nespecifické interakce). Bylo ověřeno,



Obr. 1. Srovnání koncentrací ObRe, naměřených v sérech s použitím navázané protilátky 7B3H9 a pěti HRP konjugátů; konjugáty $\blacklozenge$ 8C3-HRP, $\blacksquare$ 4C6-HRP, $\blacktriangle$ 8D8-HRP a $\circ$ 6B9-HRP jsou porovnávány s konjugátem 1A9F8-HRP
 8C3-HRP: $y = 1,0477x + 0,4405$; $R^2 = 0,9815$;
 4C6-HRP: $y = 1,2807x + 2,6368$; $R^2 = 0,9634$;
 8D8-HRP: $y = 1,0203x + 1,0163$; $R^2 = 0,9739$;
 6B9-HRP: $y = 1,0226x + 0,3122$; $R^2 = 0,9824$

že všechny komponenty jsou stabilní nejméně 12 měsíců při 2–8 °C.

Optimalizovaný postup

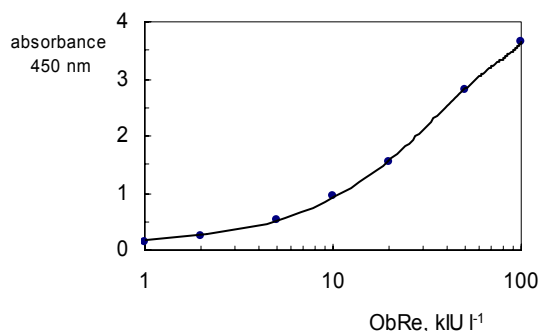
Purifikovaná monoklonální protilátka 7B3H9 byla rozpuštěna v 0,1 M karbonátovém pufru, pH 8,5, v koncentraci 2–5 mg l⁻¹ a vázána na mikrotitrační destičky Corning Costar, High Binding přes noc při 4–8 °C. Mikrotitrační destičky byly promyty roztokem TBS-Tween 20 a případná volná vazebná místa byla zablokována roztokem TBS-BSA-sacharosa (0,05 M Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,2; 0,5 % BSA – hovězí sérový albumin; 4 % sacharosa).

Vzorky, standardy a kontrolní séra se ředí v poměru 1:3 ředícím roztokem.

100 μ l naředěných standardů (2, 5, 10, 20, 50, 100 kIU l⁻¹, kontrolních sér a vzorků se pipetuje do příslušných jamek na mikrotitrační desce. Mikrotitrační destička se inkubuje při pokojové teplotě po dobu 1 h za současného třepání na orbitální třepačce. Následuje promytí jamek promývacím roztokem TBS-Tween 20 (0,05 M Tris, 0,1 M NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,2; 3 $\times$ 0,35 ml každou jamku).

Přidá se 100 μ l roztoku konjugátu 1A9F8-HRP (koncentrace 0,4 ng l⁻¹) ve stabilizačním roztoku. Deska se inkubuje při pokojové teplotě po dobu 1 h za současného třepání na orbitální třepačce. Následuje promytí jamek promývacím roztokem TBS-Tween 20 (0,05 M Tris, 0,1 M NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,2; 3 $\times$ 0,35 ml každou jamku).

Přidá se 100 μ l roztoku substrátu TMB/H₂O₂ (1,2 mM tetrametylbenzidín s obsahem 3 mM peroxidu vodíku, KPL, katalogové číslo 52 00 01) a deska se inkubu-



Obr. 2. Typická kalibrační křivka ObRe

je 5–10 min při pokojové teplotě (asi 25 °C; pokud je reakční teplota 20 °C a méně, může být inkubační doba prodloužena až na 20 min).

Enzymová reakce se ukončí přidávkou 100 μ l zastavovacího roztoku (0,2 M H₂SO₄) a změří se absorbance při 450 nm.

Koncentrace ObRe ve vzorcích se odečte z kalibrační křivky (obr. 2)

Analytické charakteristiky soupravy ELISA pro stanovení ObRe

Pro ověření funkčnosti Ob-Re ELISA byla testována také správnost a přesnost metody. Správnost metody byla ověřena metodou standardního přídatku a byla zjišťována výtěžnost, vyjádřená jako poměr získané/očekávané hodnoty koncentrace Ob-Re. Ke čtyřem vzorkům séra byl přidáván rekombinantní ObRe/Fc a následně byly vzorky změřeny. Průměrná hodnota výtěžnosti byla 85,1 %. V testu linearit byly testovány další tři sérové vzorky, které byly sériově ředěny 2 $\times$, 4 $\times$ a 8 $\times$, přičemž průměrná hodnota výtěžku byla 101 %.

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 < 7,5 %.

Mez stanovitelnosti metody, představující nejnížší stanovitelnou koncentraci Ob-Re, byla 1 kIU l⁻¹ (tato hodnota je vyjádřením koncentrace Ob-Re, odpovídající absorbanci vypočítané podle vzorce: průměrná hodnota absorbance slepého vzorku ($n=8$) + 3 $\times$ směrodatná odchylka průměru slepého vzorku). Mez detekce (CV < 10 %), byla 5 kIU l⁻¹ (vzorky s hodnotami Ob-Re vyššími měly hodnotu CV < 10 %).

Vliv leptinu na hodnoty ObRe v séru byl testován přidávkou 1000 mg l⁻¹ leptinu ke standardům nebo k séru; tento přírůstek neovlivnil hodnoty ObRe.

Klinické testování soupravy

V rámci tohoto testování byl vyšetřen soubor 568 osob (217 mužů a 351 žen), průměrného věku 43,4 let (minimum 1 rok, maximum 91 let). Jedince bylo možno charakterizovat jako osoby s mírnou hypercholesterolemií, hraniční glykemií a hraniční hodnotou BMI.

50 % hodnot ObRe u dospělé populace se pohybovala mezi 20–127 kIU l⁻¹ s mediánem 30,8 kIU l⁻¹ (nenormální rozložení).

Jediné významné souvislosti, které byly u ObRe nalezeny, byly negativní korelace mezi koncentrací ObRe a insulinem ($-0,43$; $P = 0,02$) a ObRe a aterogenním indexem plasmy (AIP, cit.⁶) ($0,4$; $P = 0,02$). ObRe však vysvětloval pouze 19 % variability AIP, proto jej nebylo možno pro predikci využít. Nebyly zjištěny korelace mezi ObRe a leptinem. Nepodařilo se nalézt významné rozdíly v koncentraci ObRe mezi muži a ženami.

Po rozdělení pacientů podle věku bylo zjištěno, že po narození byly hodnoty ObRe velice nízké, poté stoupaly s vrcholem mezi 5.–10. rokem věku a poté opět klesaly; změny však nebyly statisticky významné.

Závěrem lze říci, že námi zjištěné nálezy odpovídají literárním informacím a v současné době probíhá CE certifikace soupravy pro rutinní klinické použití.

Závěr

Byla navržena, optimalizována a validována diagnostická souprava na stanovení ObRe.

V době přípravy naší práce nebyl k dispozici žádný komerčně dostupný rutinní postup na stanovení koncentrace solubilního leptinového receptoru ELISA v krvi. Existovaly pouze možnosti stanovení exprese Db genu (např.

pomocí PCR, Western blottingu, hybridizace *in situ*, ev. imunocytohistochemie). V soupravě bylo použito dvou protilátek proti intaktnímu ObRe, což bylo v době vývoje soupravy ojedinělé.

Z klinického testování vyplývá, že leptinový receptor pravděpodobně hraje společně s leptinem a dalšími působky tukové tkáně významnou úlohu při vzniku poruch energetické homeostázy.

LITERATURA

1. Axelsson J., Heimburger O., Lindholm B., Stenvinkel P.: J. Ren. Nutr. 15, 131 (2005).
2. Barr V. A., Lane K., Taylor S. I.: J. Biol. Chem. 274, 21416 (1999).
3. Belouard S., Delcroix D., Rouille Y.: J. Biol. Chem. 279, 28499 (2004).
4. Friedman J. M.: Eur. J. Med. Res. 2, 7 (1997).
5. Yang G., Ge H., Boucher A.: Mol. Endocrinol. 18, 1354 (2004).
6. Dobiášová M., Frohlich J.: Vnitř. Lék. 46, 152 (2000).

D. Stejskal^a and I. Svoboda^b (^a*Department of Laboratory Medicine, Hospital, Šternberk*, ^b*Biovendor, Brno*):
Analysis of Soluble Leptin Receptor by a New ELISA Method

The article deals with the development, composition, validation and clinical testing of the first ELISA method for leptin receptor serum analysis. First results of clinical testing suggest that the receptor could be one of the diagnostic keys for metabolic homeostasis.