

STANOVENÍ KONCENTRACE OSTEOKRINU V SÉRU NOVOU METODOU ELISA

DAVID STEJSKAL^a, MAREK ŠVESTÁK^a, HANA
KOTOLOVÁ^b, MICHAL KARPÍŠEK^b,
KATEŘINA ADAMCOVÁ^c, LENKA SPOROVÁ^a
a PAVEL HEJDUK^a

^a Oddělení laboratorní medicíny Nemocnice Šternberk o.z.,
Středomoravská nemocniční a.s., ^b Veterinární a farma-
ceutická fakulta Brno, Česká republika, ^c Gnosis s.r.o.,
Slovensko

david.stejskal@nemstbk.cz, michal.karpisek@email.cz

Došlo 17.9.08, přijato 10.10.08.

Klíčová slova: ELISA, metabolický syndrom, osteokrin

Úvod

Osteokrin (musclin, Ostn) je protein o velikosti 11,4 kDa (130 aminokyselin), který podléhá proteolytickému štěpení na aktivní C-terminální peptid (5 kDa). Je sekretovaný osteoblasty, buňkami kosterního svalu a vazivovými buňkami^{1,2}. Tento protein obsahuje oblast homologní s rodinou natriuretických peptidů, což umožňuje jeho vazbu na receptor natriuretických peptidů typu C (NPR-C) a inhibici jejich odbourávání^{3–5}. Přesná funkce zatím nebyla objasněna, nicméně nedávné studie naznačují, že kromě stimulace diferenciac osteoblastů (exprese Ostn v kostní tkáni se snižuje po přidání vitamínu 1,25-dihydroxyvitamínu D3 a chronické přidání Ostn ke kostní tkáni vede k inhibici mineralizace, snížené expresi osteokalcinu a kostní alkalické fosfatasy)⁴, může Ostn ovlivňovat energetický metabolismus a inzulinovou senzitivitu. Zdá se totiž, že buňky kosterního svalstva produkují řadu bioaktivních látek, které ovlivňují metabolismus podobně jako adipokiny.

Na myších modelech bylo prokázáno, že se exprese Ostn (mRNA) v příčně pruhovaném svalu snižuje po hladovění a zvyšuje se po najedení. Současně bylo zjištěno, že se exprese Ostn zvyšuje inzulinem a snižuje se adrenalinem či isoproterenolem^{1,2}. Obézní myši s rezistencí na inzulin měly vyšší expresi Ostn, a lze tedy odvodit, že osteokrin by mohl být peptid, který indukuje rezistenci k inzulinu^{1,2,5}.

V tomto kontextu je zajímavé, že Ostn snižuje inzulinem stimulované vstřebávání glukosy svalovými buňkami, syntézu glykogenu v játrech a je pravděpodobné, že osteokrin působí na celou inzulinovou signální dráhu^{1,3}.

Ačkoliv bylo nedávno provedeno několik studií, které

hodnotily expresi genu Ostn (viz výše), není stále dostupná komerční souprava pro stanovení koncentrace tohoto proteinu v biologických vzorcích. Ve většině publikací byl význam Ostn posuzován pomocí zvířecích genetických modelů (myši, krysy), případně kulturách embryonálních lidských renálních buněk (HEK 293 – Human Embryonic Kidney Cells).

Cílem naší práce byl proto vývoj, validace a klinické testování soupravy ELISA pro specifické stanovení sérové koncentrace lidského Ostn. Znalost koncentrace osteokrinu by mohla pomoci při objasnění dalších vztahů mezi kostním a energetickým metabolismem a umožnit tak další rozvoj diagnostické i léčebné péče.

Experimentální část

Příprava rekombinantního lidského osteokrinu

Sekvence mRNA genu Ostn byla získána z databáze RefSeq (Accession Number NM_1981184); příslušná sekvence byla syntetizována a optimalizována pro *E. coli*. Syntetický gen byl klonován do expresního vektoru pRSET (Invitrogen); následně byla provedena transformace bakteriálního kmene *E. coli* JM109DE3. Produkční kmen byl kultivován při teplotě 37 °C a poté byla provedena indukce exprese rekombinantního proteinu pomocí isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosidu (IPTG, Sigma). Po sonikaci produkčních buněk byl z inkluzních tělísek rozpuštěných v 6 M guanidinu, 0,1 M Tris (pH 8,6) izolován metalafinitní (NiNTA) chromatografií rekombinantní osteokrin. Protein byl následně dialyzován do prostředí 50 mM acetátového pufru (pH 4,0), čistota proteinu byla 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).

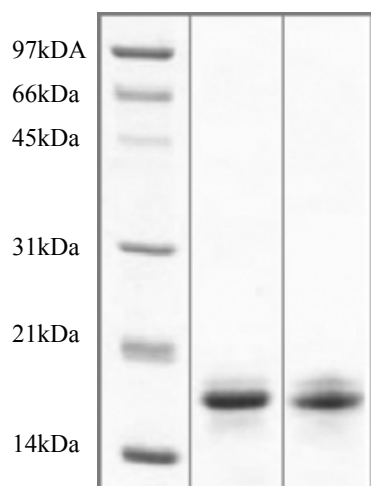
Příprava specifických protilátek

Pro sestavení soupravy byly použity 2 různé myši monoklonální protilátky připravené hybridomovou fúzí myších myelomových a B-buněk, které byly získány imunizací krysy rekombinantním myším osteokrinem (rmOsteokrin; aa 28–130; Accession No. AAQ84523). IgG frakce byla izolována ze supernatantu afinitní chromatografií s proteinem G.

Detekční protilátka byla značena modifikovaným biotinem (Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin, Pierce, katalogové číslo 21338) podle návodu od výrobce.

Vývoj sendvičového testu ELISA pro stanovení osteokrinu v lidském séru

Sestavili jsme sendvičový test ELISA pro měření osteokrinu v séru. Tento test je vysoce specifický a citlivý díky použití detekční protilátky značené biotinem.



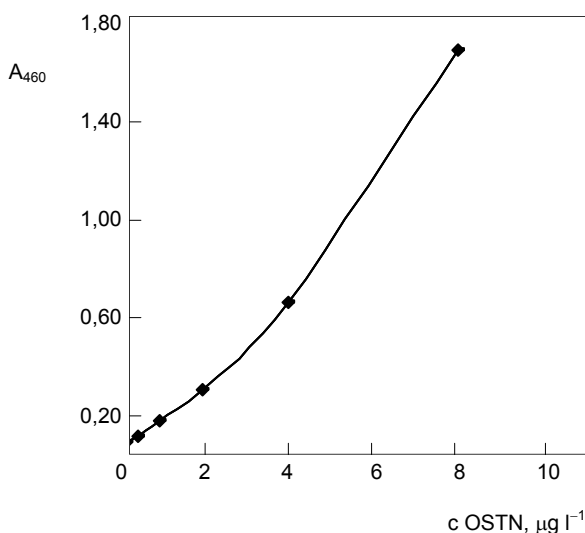
Obr. 1. Ověření čistoty proteinu elektroforézou (12% homogenní gel, SDS PAGE, metoda Laemli, barvení gelu: Coomassie blue). V levé dráze je standard tvořený proteiny o velikostech 14, 21, 31, 45, 66 a 97 kDa, v prostřední dráze je redukováný lidský osteokrin, v pravé dráze je neredukovaný lidský osteokrin

Mikrotitrační destička (Corning Costar, katalogové číslo 21338) byla potažena 0,25 μg protilátky/ jamku v 0,1 M karbonátovém pufru (pH 9,0; inkubace 16 h při 4 °C), po odsátí vazebného roztoku byly desky jednou promyty TBS (Tris pufr, pH 7,2 – 0,15 M NaCl, pH 7,2) s 0,05 % Tween 20 a do každé jamky bylo dávkováno 0,3 ml roztoku TBS (0,15 M NaCl, pH 7,2), 1,5 % BSA (hovězí sérový albumin), 4 % sacharosa a deska byla inkubována 30 min při laboratorní teplotě, aby byla zablokována nevyužitá vazebná místa na povrchu jamky. Po odsátí blokovacího roztoku byla destička usušena a pak bylo dávkováno 0,1 ml příslušného standardu nebo 4 \times zředěné sérum (všechny vzorky i standardy byly měřeny 2 \times). Po inkubaci 1 h se vzorky při laboratorní teplotě byla deska 3 \times promyta promývacím roztokem (TBS, 0,05 % Tween 20, pH 7,2) a poté inkubována 1 h při laboratorní teplotě s 0,1 ml biotinylované protilátky (0,05 $\mu\text{g ml}^{-1}$) v každé jamce. Pak byla deska opět 3 \times promyta promývacím roztokem a do každé jamky bylo nadávkováno 0,1 ml 7000 \times zředěného konjugátu neutravidin–křenová peroxidasa (Amdex, katalogové číslo RPN 4401V) a inkubováno 1 h při laboratorní teplotě. Po trojnásobném promytí promývacím roztokem byla každá jamka naplněna 0,1 ml substrátu TMB (1,2 mM tetramethylbenzidin s obsahem 3 mM peroxidu vodíku, KPL, katalogové číslo 52-00-01) a reakční směs inkubována 10 min při laboratorní teplotě. Reakce byla zastavena přidáním 0,2 M kyseliny sírové a vzniklé žluté zbarvení bylo změřeno fotometricky při vlnové délce 450 nm. Intenzita žlutého zbarvení je přímo úměrná obsahu analytu ve vzorku. Koncentrace osteokrinu

v neznámých vzorcích byly odečteny z kalibrační křivky (obr. 2), která byla získána vynesemím absorbancí standardů proti jejich známé koncentraci.

Ředícím roztokem pro standardy a vzorky byla kombinace TBS – 0,05 % Tween 20 – 0,05 % želatina. Stabilizačním roztokem pro biotinylovanou protilátku a konjugát streptavidin–křenová peroxidasa byl komerční roztok Stabilzyme (Surmodic). V testu byla použita řada standardů 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 $\mu\text{g l}^{-1}$, která vznikla naředěním rekombinantního lidského osteokrinu. Sérové vzorky byly ředěny 4 \times (1 díl vzorku + 3 díly ředícího roztoku).

Po sérii pokusů s různými polyklonálními i monoklonálními protilátkami (data nejsou prezentována) byl vybrán popsáný systém, který poskytoval nejlepší výsledky. V tomto systému jsou použity jako vazebná i detekční protilátka myší monoklonální protilátka, která je v obou případech specifická k jiné části molekuly osteokrinu.



Obr. 2. Standardní křivka pro osteokrin ELISA, A₄₆₀ (nm) – absorbance při vlnové délce 460 nm, cOSTN – koncentrace osteokrinu v $\mu\text{g l}^{-1}$

Klinické testování metody ELISA

Byla vyšetřena skupina 98 jedinců, pacientů metabolické ambulance Nemocnice Šternberk, kteří byli léčeni pro metabolický syndrom. Jako kontrolní soubor byla vybrána skupina zdravých osob, vyšetřených v rámci preventivních prohlídek (20 osob, neléčených ani nesledovaných pro žádné onemocnění). U všech byla vyšetřena hladina osteokrinu v séru a současně koncentrace cholesterolu, HDL-cholesterolu, LDL-cholesterolu, triglyceridů, intaktního proinzulinu, glukosy a vypočtena hodnota indexu rezistence k inzulinu Quicki (6).

Tabulka I
Hodnoty osteokrinu u sledovaných skupin v $\mu\text{g l}^{-1}$

Sledovaný parametr ^b	Průměr	Medián	Signifikace ^a
Muži	1,8	0,125	
Ženy	8,1	0,125	NS, $P = 0,56$
Inzulinová rezistence ANO	2,1	0,125	
Inzulinová rezistence NE	5,2	0,125	NS, $P = 0,6$
Dyslipidémie ANO	2	0,125	
Dyslipidémie NE	8,4	0,125	NS, $P = 0,4$

^a NS – nesignifikantní, P – koeficient významnosti, ^b definice rezistence k inzulinu – na základě hodnotě Quicki (jedinci s hodnotou pod 0,357 byli definováni jako osoby s rezistencí k inzulinu) (6), definice dyslipidémie – do skupiny osob s dyslipidémií byli zařazeni jedinci s minimálně dva znaky ze tří (zvýšena hodnota triglyceridů, cholesterolu nebo snížená hodnota HDL). Do skupiny jedinců bez dyslipidémie byli zařazeni pouze jedinci s normální hodnotou cholesterolu, triglyceridů i HDL

Výsledky

Analytická charakteristika metody ELISA

Pro ověření funkčnosti testu byla verifikována správnost a přesnost metody. Správnost metody byla ověřena metodou standardního přídatku a byla zjišťována výtěžnost, vyjádřená jako poměr získané/očekávané hodnoty koncentrace osteokrinu. Vzorky sér od 3 pacientů byly obohaceny o +4, +2, +1 $\mu\text{g l}^{-1}$ Ostn. Průměrná hodnota výtěžnosti byla 94 %. V testu linearity byly testovány 2 sérové vzorky, které byly sériově ředěny 4 \times , 8 \times , 16 \times ředícím roztokem, který obsahoval TBS, 0,05 % Tween 20 a 0,05 % želatiny. Průměrná hodnota výtěžku byla 120 %.

Přesnost metody byla testována jako reprodukovatelnost výsledků u 2 vzorků sér a vyjádřena jako variační koeficient (CV) v sérii a mezi sériemi ($n = 8$). Jejich hodnota byla 7 a 11 %.

Mez stanovitelnosti metody, představující nejnižší stanovitelnou koncentraci osteokrinu, činila 0,5 $\mu\text{g l}^{-1}$ (tato hodnota je vyjádřením koncentrace osteokrinu, odpovídající absorbcí vypočítané podle vzorce: průměrná absorbance slepého vzorku ($n = 16$) + 3 \times směrodatná odchylka průměru slepého stanovení).

Klinické testování výsledků osteokrinu, získaných stanovením ELISA

U sledovaných osob nebyly zjištěny žádné souvislosti mezi hodnotami osteokrinu a ostatními měřeními ukazateli. Hodnoty Ostn se nelišily ani podle pohlaví, podle výskytu rezistence k inzulinu ani výskytu dyslipidémie (tab. I).

Závěr

Závěrem lze konstatovat, že byla navržena, sestavena, validována a zavedena do klinické praxe vůbec poprvé nová metoda ELISA, sloužící ke klinickému testování pro stanovení osteokrinu v séru. Současně je však nutno říci, že nebyly potvrzeny hypotézy o souvislosti mezi koncentrací osteokrinu v séru a antropometrickými i laboratorními ukazateli energetického a glukosového metabolismu, resp. o jeho možném využití v laboratorní diagnostice nejčastějších poruch energetického metabolismu (obezita, metabolický syndrom). Tento nálezn pouze podporuje známý fakt, že exprese látek se často liší od jejich koncentrace v séru, a že řada hypotéz o možném praktickém využití koncentrace peptidů na základě znalosti jejich exprese v klinické praxi selhává.

LITERATURA

1. Nishizawa H., Matsuda M., Yamada Y., Kawai K., Suzuki E., Makishima M., Kitamura T., Shimomura I.: *J. Biol. Chem.* 279, 19391 (2004).
2. Yasui A., Nishizawa H., Okuno Y., Morita K., Kobayashi H., Kawai K., Matsuda M., Kishida K., Kihara S., Kamei Y., Ogawa Y., Funahashi T., Shimomura I.: *BBRC* 364, 358 (2007).
3. Liu Y., Huo X., Pang X. F., Zong Z. H., Meng X., Liu G. L.: *J. Int. Med. Res.* 36, 496 (2008)
4. Thomas G., Moffatt P., Salois P., Gaumont M. H., Gingras R., Godin E., Miao D., Goltzman D., Lanctôt C.: *J. Biol. Chem.* 278, 50563 (2003).
5. Moffatt P., Thomas G., Sellin K., Bessette M. C., Lafrenière F., Akhouayri O., St-Arnaud R., Lanctôt Ch.: *J. Biol. Chem.* 282, 36454 (2007).

6. Katz A., Nambi S. S., Mather K., Baron A. D., Follmann D. A., Sullivan G., Quon M. J.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 2402 (2000).

D. Stejskal^a, M. Švesták^a, H. Kotolová^b, M. Karpíšek^b, K. Adamcová^c, L. Sporová^a, and P. Hejduk^a
(^a *Department of Laboratory Medicine, Hospital, Šternberk*, ^b *Veterinary Faculty, Brno, Czech Republic*, ^c *Gnosis Ltd., Slovak Republic*): **Determination of the Serum Osteocrin Concentration by a New ELISA Method**

The osteocrin (musculin) concentration in blood serum was recently identified as a parameter of energetic homeostasis and bone modulation. At present, however, there are no valid data on osteocrin concentrations in serum and no routine method of its analysis in humans. The development and validation of a new ELISA method for osteocrin determination in serum and its testing in individuals with metabolic syndrome are described. It has been found that the osteocrin values are not able to differentiate between individuals with metabolic syndrome and controls. The serum osteocrine is probably not a useful marker for metabolic syndrome diagnosis.

Chemické listy

Vážení autoři,

vzhledem ke zvyšujícím se nákladům a v souvislosti se snahou udržet dosavadní kvalitu časopisu se vedení Chemických listů a České společnosti chemické rozhodlo upravit částku za poděkování grantovým agenturám v uveřejněných člancích na 1500 Kč za každý uvedený grant. Opatření platí od 1. 1. 2010. Věříme, že toto opatření přijmete s pochopením.

redakce časopisu
