Metody přípravy a analýzy vzorků steroidů, hormonů a léčiv

matrice

- Většina biochemických vyšetření se provádí z krve (plazmy, séra) a moči
  - Méně často z mozkomíšního moku, stolice, výpotku či pankreatických šťáv

Fáze analýzy

- Preanalytická – nejčastěji důvod nesprávného výsledku
  - Mimo laboratoř
    - Příprava pacienta
    - Vlastní odběr
    - Transport do laboratoře
  - V laboratoři
    - Příprava vzorku
    - Skladování
- Analytická – zásady GLP
- Postanalytická
  - Tisk, přenos dat (i telefonicky apod.)

Preanalytická fáze

- Osoba pacienta
- Odběr vzorku
- Transport vzorku
- Skladování před analýzou
- Příprava vzorku ke zpracování

Osoba pacienta

- Neovlivnitelné faktory
  - Pohlaví (počet červených krvinek)
  - Rasa, etnikum, sociální skupina (jiné geny, stravování)
  - Věk
  - Cyklické změny (cyklus ženských pohlavních hormonů, denní biorytmus)
  - Gravidita
  - Současně probíhající jiné onemocnění
  - Biologický poločas stanovované látky

- Ovlivnitelné faktory
  - Fyzická aktivita
  - Psychický stres
  - Vliv potravy, alkoholu, množství tekutin
  - Kouření
  - Léky, operace

Odběr vzorku

- Odběr venózní krve (kapilární, tepenná)
- Poloha pacienta (vstoje dochází k přesunu tekutiny do intersticia)
- Dezinfekce kůže- povrchově aktivní látky-hemolýza
- Stažení paže a „cvičení“- přesun tekutiny do intersticia, hemolýza, anaerobní metabolismus
- Nasávání krve- podtlak- hemolýza, mokrá stříkačka – osmotická hemolýza
- Odběr ze zavedené jehly- odpuštění malého množství krve
- Moč
  - Jednorázový odběr –ranní moč
  - 24 hodinový odběr

Transport a skladování

- V uzavřených odběrových nádobách
- za vhodné teploty (ne pod bod mrazu-hemolýza; někdy za teploty tajícího ledu)
- chráníme před světlem
- na delší vzdálenosti raději sérum, ne celou krev- mechanická hemolýza
- Celá krev nesnese skladování
- Oddělené sérum lze skladovat při +4°C až několik dní, popřípadě zmrazené při -20 °C, popř. -80 °C
- Při analýze látek, které podléhají metabolickým pochodům konzervační činidla, analýza co nejdříve nebo alespoň oddělení séra od krevního koláče

Referenční hodnoty

- Určují se různými způsoby (gaussova křivka)
- Někdy je důležitá jen dolní či horní hranice
- Asi 5% populace hodnoty mimo referenční rozmezí i bez patologického nálezu

Příčiny chybných výsledků

- Analytické
- Administrativní-přepis výsledků, přeslechnutí v telefonu
- Organizační- záměna vzorku- dnes se kompletně přechází na čárové kódy

Hormony

- Většina dobře rozpustná ve vodě
- Špatně rozpustné ve vodě – steroidní hormony a hormony štítné žlázy – při transportu se vážou na specifické transportní bílkoviny, což prodlužuje biologický poločas hormonu a dobu jejich účinku, koncentrace v krvi jsou ovlivněny koncentrací transportních bílkovin

Stanovení hormonů

- Nepřímé stanovení –sledujeme metabolické působení (glykémie-inzulin)
- Stanovení v moči
  - obvykle stanovujeme metabolity hormonů
  - Obsah kolísá v závislosti na sekreci hormonu během dne a koncentraci moči – obvykle se stanovuje z moči za 24 hod nebo alespoň poměr k močovému kreatininu
  - S výjimkou hCG (choriový gonadotropin) se močí nevylučují hormony bílkovinné povahy a peptidy
  - Stanovení v krvi je přesnější

- Enzymová imunoanalýza – ELISA
- Radioimunoanalýza
- |Fluoroimunoanalýza
- Chemiluminiscenční analýza
  - Dostupné komerční soupravy

ELISA

- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
  - Na povrch polystyrenových jamek je navázáno neznámé množství antigenu
  - Do jamek je napipetována specifická protilátka s navázaným enzymem
  - Promytí
  - Přidána látka, která s enzymem vytváří možnost detekce – fluorescence, zabarvení – spektrofotometr

Nepřímá ELISA

- Do jamek je napipetováno známé množství protilátky
- Přidáno sérum, které se neváže na protilátku, ale zablokuje možnost nespecifické vazby „našeho“ antigenu na plast
- Přidán roztok hledaného antigenu →naváže se na protilátku
- Přidán antigen s navázaným enzymem – obsadí dosud volná vazebná místa protilátky
- Přidán substrát enzymu umožňující kvantifikaci
- Čím větší odezva, tím méně bylo sledovaného antigenu
- Mezi jednotlivými kroky promývání

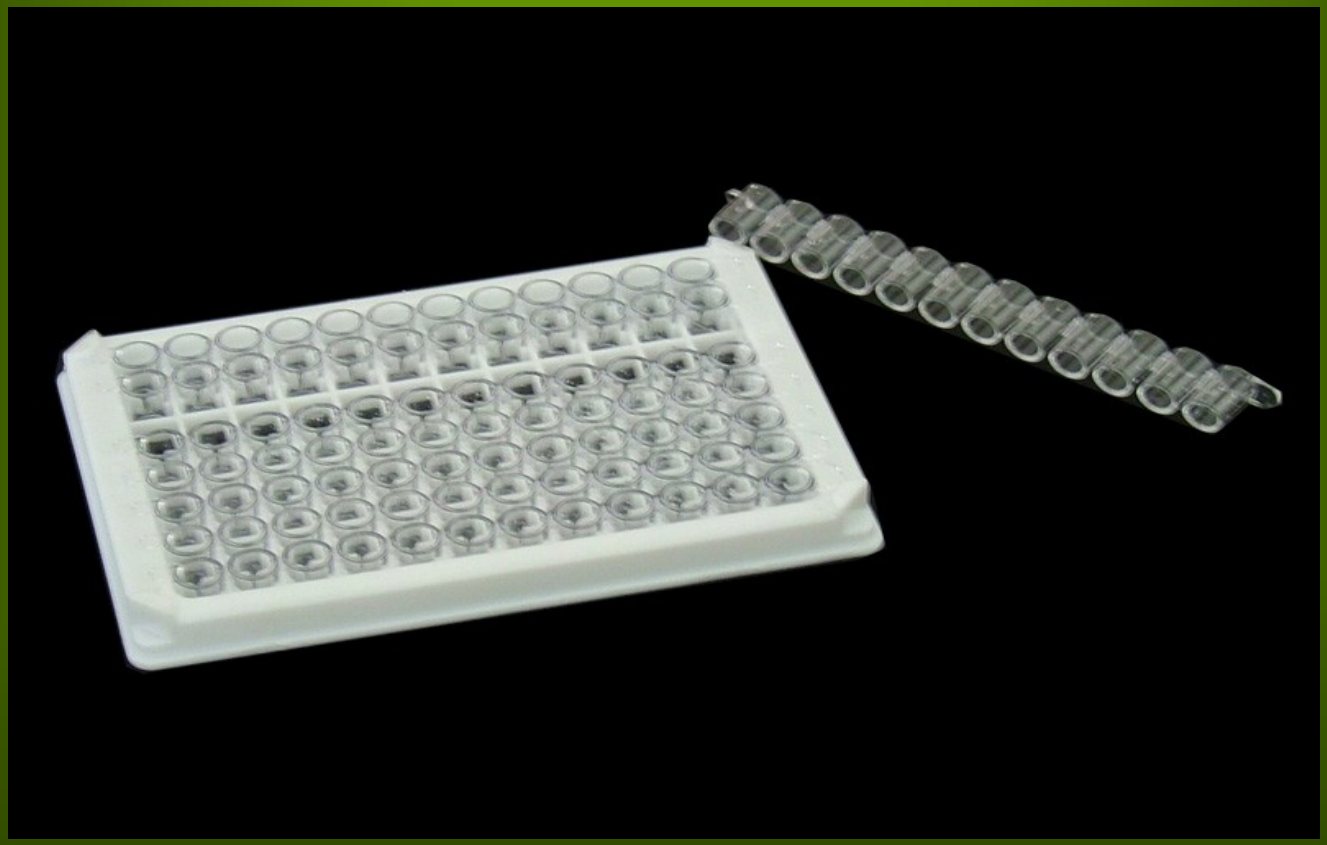
Kompetitivní ELISA

- Analyzovaný antigen je inkubován se známým množstvím protilátky
- Roztok je vpraven do jamek s navázaným antigenem – volné protilátky se navážou, protilátky s analyzovaným antigenem se vyplaví
- Přidána sekundární protilátka s konjugovaným enzymem, která se specificky váže na primární protilátku
- Přidá se substrát

Radioimunoanalýza

- Známé množství značeného antigenu (stejný jako analyzovaný) – často isotopy jódu navázaného na tyrosin
- Přidá se sérum pacienta- neznačené
- Značený a neznačený antigen kompetitivně soutěží o vazebná místa protilátky
- Volný antigen se oddělí a analyzuje množství značeného antigenu
- Podle kalibrační křivky se vyhodnotí množství antigenu pacienta

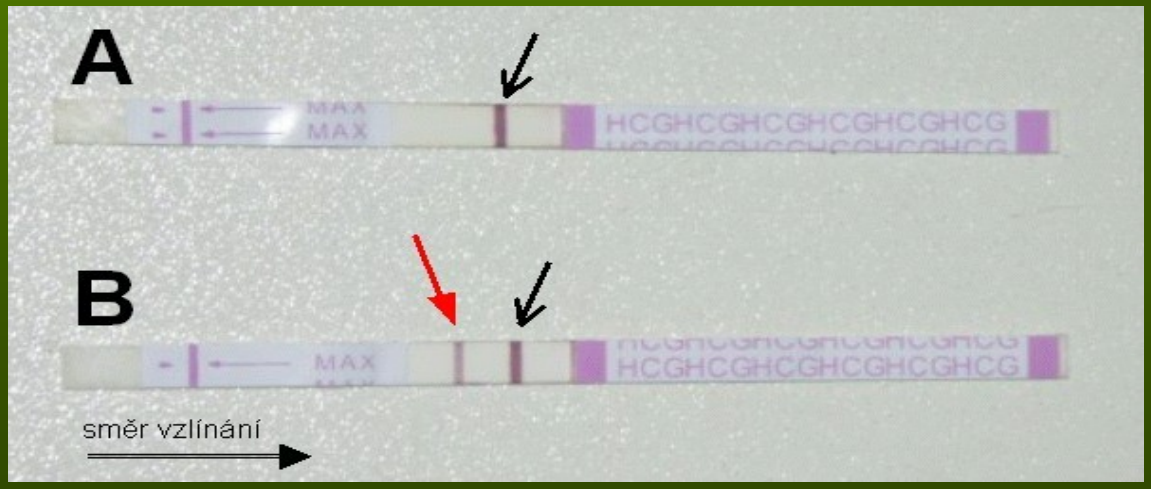
Mikrotitrovací destička pro ELISU (obvykle ve 8 X 12 jamek)



hCG

- Lidský choriový gonadotropin- těhotenský hormon.
- Zvýšená koncentrace i u některých druhů rakoviny např. varlat a vaječníků, ve druhém trimestru jeden z ukazateků možné genetické vady –např. Downův syndrom
- Produkován placentou již krátce po oplodnění – stanovitelný cca za sedm dní po oplodnění

- Test moči
  - Méně spolehlivý než ze séra
  - Využívá specifickou reakci hCG s anti-hCG monoklonální protilátkou
  - Proužek ponořen do moči, moč vzlíná po proužku, na hCG se specificky váže barevný konjugát. Ten se následně zachytí v testovací zóně na proužku fixované anti-hCG protilátky. Moč dále vzlíná a nenavázaný konjugát se zachytí v kontrolní zóně



steroidy

- Deriváty cyklopentan-o-perhydrofenantrenu
- Žlučové kyseliny, vitamin D, pohlavní hormony
- Steroidní hormony- antikoncepce, doping – umožňují přírůstek svalové hmoty až 5kg za měsíc

Steroidy v prostředí

- Hůře odbouratelné, asi 20% přečká čistírnu odpadních vod – syntetické estrogeny stabilnější než přírodní
- Vyskytují se v povrchových i podpovrchových vodách, sklony ke kumulaci v sedimentech
- Endokrinní disruptory, demaskulinizace a defiminizace ryb, snížená plodnost a hermafrodizmus vodních organismů
- možná souvislost se zvyšujícím se množstvím výskytu některých abnormalit-reprodukčního systému člověka – rakovina varlat, prsu, endometrióza,…

Analýza steroidů

- Sedimenty, kaly
  - Transport a uchovávání za nízkých teplot a nepřítomnosti světla, před uskladněním často lyofilizace
  - Extrakce - ultrazvuková nebo tlaková extrakce rozpouštědlem aceton-methanol (1:1),
  - Přečištění SPE (C18)
  - GC/MS
    - vyžaduje derivatizaci konjugátů –složitější než LC
  - (HP)LC - fluorescenční, spektrofotometrická detekce,diodovým polem
  - (HP)LCMS//MS-MS s elektrosprei ionizací nebo chemickou ionizací za atmosférického tlaku
    - Eluční činidlo : voda-methanol/ voda-acetonitril s gradientovou elucí

Estradiol, testosteron

- Estradiol- aktivita folikulů, sleduje se při umělém oplodnění, diagnostice menopauzy
- Testosteron-androgenní ženy, polycystický syndrom vaječníků
- Radioimunoanalýza
- ELISA- s kolorimetrickým nebo chemiluminiscenčním, popř. fluorimetrickým stanovením

Doping

- Testování androgeních steroidů v moči
  - Testosteron-sleduje se poměr mezi testosteron glukuronidem a epitestosteron glukuronidem (epitestosteron minoritní produkt metabolismu testosteronu a nezvyšuje se při jeho externím dodání)
  - GC-MS- sleduje se izotop. poměr $^{13}C/^{12}C$. Exogenní testosteron obsahuje méně ^{13}C než endogenní homolog (GC/C/IRMS- spalování/isotopový hmotmostní spektrometr)

- GC
  - Metabolity druhé fáze – konjugované – tepelně nestálé
  - Příprava vzorku
    - dekonjugace (hydrolýza) –chemickou nebo biologickou (enzymatickou)cestou
    - derivatizace pro lepší účinnost chromatografie
- LC
  - Nastřikují se přímo konjugáty
  - Může být ovlivněna např. matricovými efekty

Léky

- U léků vytvářejících stabilní hladiny je nejvhodnější odebírat krev před další dávkou, je nutno vyčkat rovnovážného stavu- doba 4-5poločasů eliminace
- U léků s rychlou eliminací se stanovuje koncentrace před podáním(bazální koncentrace) a maximální hladina
- Stanovení v krvi i v odpadní vodě, potravinách,…

antibiotika

- Tetracyklin-použití: širokospektrální antib. V lékařství, v živočišné výrobě –v nízkých dávkách profylakticky, popř. k potlačení infekce
- Stanovení tetracyklinu
  - Mikrobiální test – bakterie, které obsahují gen pro luciferázu, reagují na přítomnost tetracyklinu – světélkování
  - ELISA
  - Spektrofotometricky – tetracyklin reaguje v přítomnosti kyseliny sírové s Fe^{III} za vzniku barevného komplexu

- Chemiluminiscenčně
  - reakce s- N-bromsukcinimidem
    - Bromem
    - Peroxidem vodíku (katalyzováno mědnatými ionty)
- HPLC – z živočišné matrice –vysrážení proteinů
    - SPE
    - -různé detektory
    - Např.: HPLC (MF-směs kyseliny šťavelové, methanolu a acetonitrilu), kolona C18, UV detektor
    - MS/ MS-MS ,…V potravinách APCI
- CE stanovení
  - Poměrně rychlá metoda
  - Derivatizace zlepšuje stanovení
  - Extrakce chloroformem
  - S UV nebo elektrochemickou detekcí
  - Skleněná kapilára pokrytá polyakrylamidem

Děkuji za pozornost