

## Radioimunoanalýza (RIA)

**Radioimunoanalýza (RIA)** neboli **radioimunologická stanovení** zahrnují takové metody radioizotopové mikroanalýzy, jejichž základem je imunochemická reakce **antigenu** se specifickou **protilátkou** (Ab), prováděná *in vitro* v přítomnosti vhodné radioaktivně značené sloučeniny jako **radioindikátoru**, který umožňuje kvantifikaci stanovení na základě určení distribuce aktivity. Nejčastěji se doposud používá radioimunoanalýza v klasickém uspořádání, jak je původně v roce 1959 popsali Berson a Yalow, kteří za tento průlomový objev obdrželi Nobelovu cenu. V tomto případě je určovaná látka antigenem (Ag) a radioindikátorem je značený antigen (Ag\*). Při vhodné volbě koncentrací základních substancí a za optimálních reakčních podmínek dochází ke konkurenční – **kompetitivní reakci** značeného a neznačeného antigenu s omezeným množstvím specifické protilátky. Po dosažení rovnováhy se pomocí vhodné **separační metody** oddělí volný antigen od antigenu vázaného protilátkou a určí se aktivita jedné nebo obou frakcí. Podíl vázané aktivity klesá následkem konkurenční reakce s rostoucím obsahem neaktivního antigenu, t.j. určované látky v reakční směsi. Její obsah v měřených vzorcích se určí z kalibrační závislosti, získané pomocí řady **standardních vzorků** se známými koncentracemi. Mimořádná afinita a specifita protilátek ve spojení s enormní citlivostí radioindikátorových technik jsou zárukou vynikajících kvalitativních parametrů radioimunologických stanovení.

Vedle klasické rovnovážné RIA byla vyvinuta a široce se používá tzv. **sekvenční technika RIA**, při které se provádí preinkubace neznačeného antigenu se specifickou protilátkou a teprve dodatečně přidání značeného antigenu. Přínosem je výrazné zvýšení citlivosti stanovení.

Kromě klasického uspořádání, při kterém se RIA provádí v homogenní fázi v roztoku se nyní používá řada variant tzv. **solid-phase RIA**, při kterých jsou protilátky nebo antigeny vázané na pevné fázi – **imunosorbenty**. Použití značené protilátky místo značeného antigenu v kombinaci s imunosorbenty vedlo ke vzniku **imunoradiometrických stanovení (IRMA)**. Jejich další vývojovou fází jsou tzv. **sandwichové metody**, při kterých se užívá dvou protilátek, z nichž jedna je vázána na pevnou fázi a druhá je značená.

Současně s radioimunoanalýzou se vyvíjely i další příbuzné metody radioizotopové mikroanalýzy. Jejich společným rysem je užití vhodných značených sloučenin jako radioindikátorů a měření distribuce radioaktivity ke kvantifikaci stanovení, avšak liší se typem interakce určované látky se specifickým činidlem, která je jejich základem. Základem metod **kompetitivní vazby na proteiny (CPBA)** je specifická vazba ligandu (menší molekuly) na

proteiny (zpravidla větší molekula), která však nemá charakter imunologické reakce. Jako radioindikátoru se užívá značeného ligandu. Specifickými činidly jsou v tomto případě obvykle přírodní plasmatické proteiny lidské i zvířecí, např. TBG ke stanovení thyroxinu, těhotenská plasma ke stanovení androgenů a j. Ve srovnání s RIS mají CPBA zpravidla menší citlivost a horší specifitu. **Radioreceptorová analýza (RRA)** je metoda, při které se jako specifické vazebné činidlo užívá tkáňový receptor (t.j. buněčná vazebná bílkovina) a jako radioindikátor značený ligand. Značný praktický význam mají opačné postupy, t.j. stanovení koncentrace (počtu vztaženému na buňku) receptorů ve tkáních, např. stanovení receptorů pro estrogény v nádorových tkáních. Předností radioreceptorových analýz je fakt, že jejich výsledky jsou v relaci s biologickou aktivitou určovaných látek.

Všechny tyto metody mají příbuzné i z druhé strany, tzn. že ke kvantifikaci stanovení lze užít i **neizotopově značené indikátory**, nejčastěji pomocí enzymů, např. **ELISA** (t.j. enzyme-linked immunosorbent assay). [Rozlišovat od **radioenzymatických stanovení** (t.j. stanovení enzymových aktivit s použitím radioaktivně značených substrátů)!].

### **Charakteristika základních substancí pro RIA**

**Specifická antiséra:** Protilátky jsou vysokomolekulární sérové bílkoviny patřící do skupiny imunoglobulinů G, jejichž prostorové uspořádání je vysoce specifické. Při imunologické reakci jsou divalentní. Jsou produkovány lymfocyty jako imunologická odezva na podání imunogenů. Zpravidla dobrými imunogeny jsou polypeptidy s molekulovou hmotností nad 4 000 Da, výjimečně od 1 000 do 4 000 Da. Nízkomolekulární oligopeptidy a látky nebílkovinné povahy mohou být antigeny, ale zpravidla nemají imunogenní vlastnosti. K přípravě protilátek se pak užívá jejich konjugátů s vhodnými vysokomolekulárními nosiči a jejich použití je základem tzv. hapténových RIA. Konjugace musí být provedena tak, aby změny ve struktuře haptenu a maskování jeho specifických funkčních skupin bylo minimální.

**Radioindikátory:** RIA a příbuzné metody patří mezi metody radioizotopové zředovací analýzy a vlastnosti užitého radioindikátoru musí vyhovovat určitým obecným požadavkům: 1. Maximální měrná aktivita. 2. Identita jeho vlastností s vlastnostmi určované látky. 3. Zachování jeho integrity během celého stanovení. Vlastnosti užitě značené látky výrazně ovlivňují praktické uspořádání RIA a rovněž její citlivost, přesnost a správnost. Ke značení lze užít řadu radionuklidů:  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{75}\text{Se}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ; výběr je závislý na charakteru určované látky. Bezsporně největší význam má radioizotop  $^{125}\text{I}$ , a to nejen k přípravě značených peptidů a sloučenin vhodných pro přímou inkorporaci radiojodu jako jsou

thyroidální hormony, ale díky vývoji nových konjugačních technik i ke značení takových nízkomolekulárních látek jako jsou steroidy a léčiva.