

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: Zdravotnická technika a informatika



Bc. Lenka Burešová

Stanovení hladiny AFP v plodové vodě imunoturbidimetrickou metodou

Determination of AFP level by immunoturbidimetric method in amniotic fluid

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: MUDr. Lenka Fialová, CSc.

Konzultant: doc. MUDr. Ivan Malbohan, CSc.

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 15.05.2010

LENKA BUREŠOVÁ

Podpis

BUREŠOVÁ, Lenka. *Stanovení hladiny AFP v plodové vodě imunoturbidimetrickou metodou. [Determination of AFP level by immunoturbidimetric method in amniotic fluid]*. Praha, 2012. 69 s., 1 příloha. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN. Vedoucí diplomové práce. Fialová, Lenka.

Abstrakt:

Diplomová práce se zabývá stanovením alfa-1-fetoproteinu (AFP). Otestovala jsem imunoturbidimetrickou metodu za použití polyspecifického antiséra proti AFP. Metoda je optimalizována pro stanovení koncentrace AFP v plodové vodě. Je odzkoušena na vybraných vzorcích plodové vody a výsledky získané imunoturbidimetricky jsou srovnány s výsledky dosaženými jednoduchou radiální imunodifúzí. Pro srovnání uvádím i přehled dalších imunochemických metod používaných pro stanovení AFP v plodové vodě.

Při analýze koncentrací AFP v plodové vodě za účelem odhalení patologie v těhotenství je třeba separovat data s nestandardně vysokými koncentracemi AFP. Pro snadné vyhodnocení takového souboru jsem vyvinula program schopný nalézt záznamy s patologickými hodnotami koncentrací AFP na základě výpočtu normální koncentrace AFP a odchylek jednotlivých záznamů od této hladiny.

Abstract:

Determination of alfa-1-fetoprotein (AFP) level is addressed. The immunoturbidimetric method using a polyspecific antiserum was tested to determine the level of AFP in amniotic fluid. Results are compared to those obtained by simple radial immunodiffusion. In addition, a review of immunochemical methods for determination of AFP is given.

The level of AFP is utilized as a biomarker indicating perinatal defects. To reveal pathological cases in a perinatal screening database, entries with abnormally high levels of AFP need to be found. For this purpose, a computer program was developed to point out potentially pathological cases based on calculation of the normal AFP level and deviations from this level.

Klíčová slova: alfa-fetoprotein, defekty neurální trubice, imunoturbidimetrie, imunochemické metody

Keywords: alpha-fetoprotein, neural tube defects, immunoturbidimetry, immunoassay

Poděkování

Za vznik této práce vděčím aktivnímu přístupu své vedoucí Lenky Fialové. Děkuji jí za obětavou pomoc při práci v laboratoři i za cenné připomínky při psaní práce. Docentu Malbohanovi jsem zavázána za výběr a přiblížení zajímavého tématu. Zvláštní poděkování také patří laborantce paní Miladě Petráčkové za vedení a pomoc při laboratorním měření.

Obsah

Úvod	8
1. Význam AFP	10
1.1. Fyziologická role	10
1.2. Význam AFP v klinické praxi	16
2. Imunochemické metody stanovení hladiny AFP	24
2.1. Kvantitativní metody stanovení AFP	24
2.2. Imunoturbidimetrie	30
3. Aplikace imunoturbidimetrie pro stanovení hladiny AFP	36
3.1. Materiál a metody	36
3.2. Optimalizace metody	39
3.3. Vlastní pracovní postup	44
3.4. Pracovní postup pro radiální imunodifúzi	45
3.5 Srovnání imunoturbidimetrie a radiální imunodifuze	48
4. Počítačové zpracování	55
4.1. Algoritmus	55
4.2. Uživatelské rozhraní	56
Diskuze	58
Závěr	59

Seznam použité literatury	60
Přílohy	63
1. Zdrojový kód programu	

Úvod

Alfa-fetoprotein (AFP) je fetální protein podobný albuminu. V časně fázi embryogeneze je secernován ve žloutkovém vaku a nahrazuje albumin do doby, než začnou fungovat primitivní játra. AFP zajišťuje v prenatálním vývoji transport ligandů, především bilirubinu, mastných kyselin, retinoidů a steroidů. Vedle fyziologických funkcí se AFP uplatňuje v ontogenetickém i onkogenetickém růstu. V kontextu s těmito skutečnostmi zapadá vyšetření AFP do screeningu defektů neurální trubice, aneuploidií a postoperačního tumorového monitoringu. Hladina AFP v plodové vodě je jedním z hlavních markerů díky významné korelaci mezi abnormální hodnotou koncentrace AFP a výskytem patologických jevů jako defekty neurální trubice nebo poruchy celistvosti břišní stěny. Přesné určení koncentrace AFP má tak velký význam pro odhalení prenatálních defektů v klinické praxi.

Nejpřesnější metody stanovení hladiny AFP jsou založeny na imunochemické reakci AFP se specifickou protilátkou, která vede ke změně fyzikálních vlastností vzorku. Jednotlivé metody se pak liší fyzikální veličinou, kterou měří (optické vlastnosti a difúzní vzdálenost), nebo způsobem její detekce. V praxi se nejčastěji užívá optická metoda ELISA, ale i radiální imunodifúze založená na měření difúze AFP v gelu obsahující antisérum. V této práci jsme vyzkoušeli použití imunoturbidimetrie, kde se měří stupeň zákalu vzorku způsobený přítomností nerozpustného imunokomplexu, který se vytvoří reakcí AFP s protilátkou. Přestože imunoturbidimetrie patří k běžným metodám využívaným v sérologii, její aplikace na stanovení hladiny AFP v plodové vodě dosud byla opomíjena.

Test hladiny AFP jakožto markeru při prenatálním screeningu spočívá v porovnání stanovené hladiny AFP v daném vzorku plodové vody s normální hladinou. Vzorky s abnormální odchylkou od normální hladiny jsou postoupeny další lékařské analýze. Normální hladina však není úplně přesně definovaný pojem, protože i u zdravých jedinců může mít hladina AFP značný rozptyl a její hodnota se navíc významně mění v průběhu gestace. Laboratoře analyzující koncentrace AFP berou za normální hladinu pro daný gestační týden střední hodnotu z rozsáhlého souboru vzorků a testují jednotlivé vzorky, zda se významně neodlišují od spočtené normální hladiny (obvykle hodnoty menší než 0,4- nebo větší než 2,5-násobku normální hladiny). Součástí této práce byla počítačová analýza takového souboru

vzorků. Byl vyvinut program, který spočte normální hladinu v daném týdnu těhotenství pomocí všech přítomných hladin AFP změřených v této fázi gestace, a vyhodnotí, zda se jedná o potenciálně patologické těhotenství. V našem případě jsme normální hladinu spočetli jako medián hladin AFP v příslušném týdnu těhotenství, neboť medián je méně citlivý na přítomnost abnormálních dat než středních hodnota, a tudíž je vhodný i pro středně rozsáhlé statistické soubory.

Práce je členěna do kapitol následovně. V první kapitole je popsána molekula AFP, jeho fyziologická role a souvislost s prenatálními patologiemi a nádorovým onemocněním. V druhé kapitole je uveden přehled imunochemických metod pro stanovení hladiny AFP a je představena imunoturbidimetrie. Třetí kapitola se zabývá aplikací imunoturbidimetrie pro stanovení hladiny AFP. Výsledky metody jsou porovnány s měřením pomocí radiální imunodifúze. Ve čtvrté kapitole je představen počítačový program vyvinutý pro automatické vyhledávání potenciálně patologických případů v databázích obsahujících údaje o gestaci a hladině AFP. V závěru jsou shrnuty nejdůležitější fakta a výsledky.

1. kapitola

Význam AFP

Význam AFP můžeme rozdělit do dvou hlavních rolí. V první řadě je to fyziologická role, která se uplatňuje při látkovém transportu během fetálního vývoje. Druhá role je cenná z hlediska klinické praxe. AFP je totiž používán jako marker, neboli indikátor možných patologií při prenatalním screeningu a screeningu nádorových onemocnění.

1.1. Fyziologická role

¹AFP je fetální protein syntetizovaný genem z tzv. nadrodiny albuminoidního genu, který předává typické znaky společné všem čtyřem členům této rodiny. Patří k nim AFP, vitamin D-vázající protein, albumin a alfa-albumin. Sdílejí podobnou strukturu, která je charakterizována cysteinovými zbytky a jejich můstky svazujícími řetězec aminokyselin do smyček a do finální podoby se třemi doménami a homologními úseky aminokyselin. Všechny čtyři albuminoidní geny jsou společně umístěny na 4. chromozomu uvnitř 4q11 - q22 regionu a přepis genetické informace se uskutečňuje z 15 exonů. Pouze Gc-protein (vitamin D-vázající protein) je kódován 13 exony, proto má kratší 3. doménu a nižší molekulovou hmotnost.

Hlavní funkcí členů rodiny albuminoidního genu je vazba a transport ligandů. Podílejí se ale navíc na řadě dalších procesů, jako např. chemotaxe, odklizení volných kyslíkových radikálů, adherence leukocytů a vázání těžkých kovů, mastných kyseliny a aktinu.

AFP modeluje mnoho procesů a zastává významné biologické funkce ve vyvíjejícím se plodu. AFP přenáší do buněk endocytózou kupř. vyšší mastné kyseliny, které potřebují vyvíjející a rostoucí embryonální buňky [35]. Za

¹ Následující údaje o fyziologické roli AFP a jejich souvislosti se strukturou AFP jsou výtahem z review od G. J. Mizijewski [7].

intrauterinního života jsou kladeny nároky na rychlost růstu nových buněk, mastné kyseliny jsou tak inkorporovány do fosfolipidové vrstvy pro stavbu cytoplazmatické membrány. Nenasycené mastné kyseliny importované AFP buňkám nervového systému umožňují proces myelinizace [50]. AFP také přenáší bilirubin, retinoidy a steroidy, těžké kovy, barviva, flavonoidy, fytoestrogeny, dioxin a další látky.

AFP chrání zárodek před účinky estrogenu z matčina těla v době, kdy ještě není vytvořena placentární bariéra [35]. Molekuly estrogenu jsou vychytávány AFP, který přitom změnil konformaci a stává se inaktivní pro navázání na buněčné receptory.

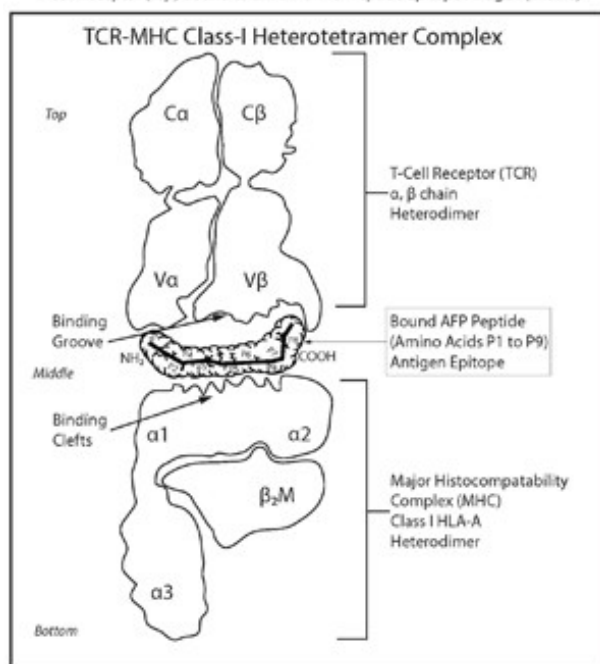
Účinek na cílové buňky se realizuje prostřednictvím vazby na AFP receptor a endocytózou. AFP receptor se přirozeně vyskytuje na embryonálních buňkách a v menší míře na monocytech, T-lymfocytech, reprodukčních buňkách a na některých tumorových buňkách.

Jako regulátor růstu spouští kaskádu buněčných dějů cestou cAMP-proteinkináza A a ovlivňuje proliferaci a diferenciaci buněk. Udržuje kontrolovaný růst plodu po celou dobu těhotenství. V případě stresových situací (ischémie plodu, anoxie plodu, glukózový šok, vysoké koncentrace steroidů apod.) je růst fetálních tkání pozastaven, dokud není znovu obnovena homeostáza. Za přetrvávajících stresových podmínek plod stagnuje ve vývoji a v takových případech dochází přinejmenším k IUGR (intrauterinní růstové retardaci) či snížení porodní hmotnosti.

AFP se účastní imunoregulace. Imunosuprese vyvolaná AFP je vysvětlována tím, že molekula fetoproteinu obsahuje identické aminokyselinové sekvence s MHC (Major histocompatibility complex ²).

² MHC slouží jako „podstavec“, na který se vážou náhodně vybrané peptidy pocházející zevnitř buňky a vystavují je ke kontrole buňkám imunitního systému. Prostřednictvím MHC je imunitní systém schopen rozeznávat tělu vlastní proteiny od materiálu cizího původu. Receptor T-lymfocytu (TCR) identifikuje antigenní determinantu (epitop), která je přichycena a exponována na MHC molekule.

Figure-4. The MHC-HLA Class-I Heterodimer Cluster (Bottom) interfaced with a T-cell Receptor (Top) bound to an AFP 8-mer Peptide Epitope Antigen (Middle)



Obrázek 1 : rozhraní MHC – TCR s uprostřed navázaným AFP. Obrázek převzat z [51]

AFP obsadí receptory T-lymfocytů (TCR), čímž blokuje rozpoznání cizího materiálu - viz obr.1. Účinek imunosuprese je zapotřebí zacílit především na přechod placenta – děloha. Plod (1/2 chromozomů od otce) představuje cizí objekt uvnitř matčina těla a naopak imunoglobuliny pocházející od matky je nutné ochránit před degradací imunokompetentními buňkami fétu.

Molekula AFP má dvě volné SH-skupiny, které řadí tento protein mezi antioxidanty. Eliminují škodlivý účinek nadbytku reaktivních forem kyslíku a dusíku. Chrání tak vývoj embrya v nejrannějších stádiích vůči škodlivinám přicházejících z cirkulace matky [35].

Struktura

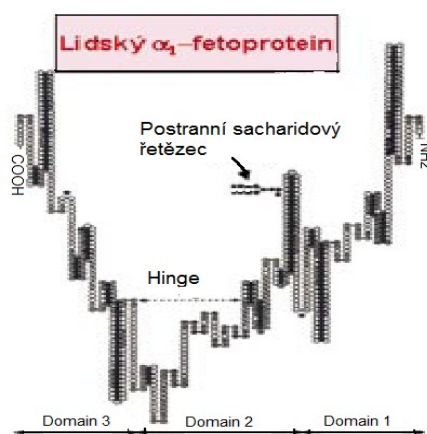
AFP je glykoprotein o molekulové hmotnosti přibližně 67–72 kDa, obsahující 4% sacharidů. Kostru molekuly AFP tvoří jednoduchý polypeptidový řetězec (590 aminokyselin), v němž se nachází 32 cysteinových zbytků. Cysteinové zbytky se vzájemně propojují disulfidovými můstky a skládají polypeptidový řetězec AFP do

smyček až do výsledné podoby písmene „V“ či „U“ – viz obrázek 2. Celý řetězec se obvykle dělí na tři domény, mezi kterými se vytváří polypeptid, tzv. hinge segment, dovolující doménám flexibilní pohyb a umožňující vazbu nebo uvolnění možných ligandů.

První doména začíná NH_2 koncem a podle ní se dá určit, zda se jedná o např. krysí AFP nebo lidskou formu. Z hlediska imunanalýzy je právě první doména podstatná, neboť obsahuje epitopy, na které se váže protilátka. Proto zkrácené formy AFP [kratší než 67 – 72 kD (2,2 kb)], kterým chybí první doména, nemohou být zachyceny při imunochemickém stanovení. První a druhá doména dále disponují vazebnými místy pro mastné kyseliny a bilirubin.

Druhá doména se vyznačuje charakteristickou posloupností aminokyselin, která umožňuje přichycení k buňkám nebo do extracelulární matrix. To má význam pro diferenciaci, proliferaci, migraci a regeneraci buněk. V rozsahu druhé domény se také vyskytuje asparagin vážící postranní sacharidový řetězec, který dodává proteinu větší stabilitu a odolnost v krevním oběhu (ovlivňuje poločas rozpadu). Jak zmíníme ještě dále, struktura sacharidového řetězce pomáhá určit původ produkce a typ AFP. To je významný předpoklad pro rozlišení např. fetálního a tumorového AFP, přestože jsou oba překládány ze stejných 2,2-kb transkriptů a oba vykazují stejné imunologické reakce.

Třetí doména vlastní většinu hydrofobních vazebných míst a předkládá dimerizační motiv. Např. forma AFP překládaná z 1,35 transkriptu je značně redukováná, zůstává jí jen celá třetí doména a 2/3 z druhé domény. Tato zkrácená verze fetoproteinu má podobně krátkou strukturu jako steroidní receptor, a proto mohou spolu dimerizovat.



Obrázek 2: Struktura AFP. Převzato z [6].

Varianty molekuly AFP – mikroheterogenita

Různorodost molekuly AFP je známa už od r. 1970 a je vázána na určité podmínky a faktory. Mezi nejdůležitější heterogenity AFP se počítají sacharidové isoformy lišící se strukturou postranního sacharidového řetězce a pH-isoformy lišící se konformací. Nutno poznamenat, že se jedná o varianty odlišné z fyzikálně-chemického hlediska, mající podobné složení aminokyselin v peptidovém řetězci.

Sacharidové isoformy jsou důležitými identifikátory tkáně, z jaké daná molekula AFP pochází. Sacharidový řetězec totiž není geneticky kódován, ale je závislý na glykosylačních enzymech přítomných v endoplasmatickém retikulu nebo Golgiho komplexu dané buňky. Protože jednotlivé tkáně se vyznačují specifickou výbavou glykosylačních enzymů, lze rozlišit např. AFP pocházející ze žloutkového váčku a AFP z jaterních buněk. Ke zjištění struktury sacharidového řetězce se sleduje schopnost lektinů se specificky vázat na daný cukr. Tato tzv. lektin-separační metoda dokáže odhalit fetální defekty a určit různé typy nádorů. Například poškození neurální trubice lze odvodit z poměru Con-A-vázající a Con-A-nevázající glykoformy AFP v plodové vodě, kde pro poruchu svědčí úbytek Con-A-nevázající formy.

pH isoformy se liší konformací peptidového řetězce. Odlišné prostorové uspořádání molekuly ovlivňuje především lokální hustotu náboje a polarizaci a tím schopnost izomeru vázat další molekuly. Jednotlivé pH izomery se stanovují na základě odlišných izoelektrických bodů (4,8 a 5,2 isoforma).

³Kromě uvedených dvou typů isoform existují ještě genetické varianty, které jsou kódované transkripty mRNA o rozdílné délce kilobází – 2,2, 1,7, 1,6 a 1,35. S tím přímo souvisí výsledná velikost polypeptidového řetězce, kdy menší formy AFP jsou postupně zkracovány od amino-terminálního konce (první doména). Z pokusů na myších se zjistilo, že exprese konkrétní genetické varianty závisí na věku a je specifická pro nádorové bujení nebo pro regeneraci jater. Fetální AFP mRNA se přepisuje z 2,2-kb transkriptu, který produkuje molekulu o 68-72 kD. Transkripty 1,7 dávají vzniknout AFP proteinu o velikosti 50 – 65 kD, který se vyskytuje v poslední čtvrtině gestace. U novorozence přetrvává na dobu 4 až 8 týdnů po narození 1,5-kb

³ Následující údaje o genetických variantách AFP jsou výtahem z review od G. J. Mizijewski [7].

mRNA, prezentovaná 48-kD molekulou. V dospělosti lze zaznamenat pouze mizivé stopy 2,2-kb a jen minimum 1,7-kb, 1,5 kb a 1,35-kb transkriptu. Kombinace zvýšeného 2,2-kb a nepatrného množství 1,7-kb poukazuje na hepatom nebo regeneraci jater.

AFP molekula může měnit konformaci ve vztahu ke změnám prostředí. Do krevního oběhu se vylučuje nativní (rigidní) forma AFP, kdežto AFP uvnitř buněk se nachází v mírně denaturovaném (nesbaleném) stavu v tzv. Molten Globule Form (MGF). Cytoplazma buňky je často vystavena extrémním vlivům uvnitř živého organismu. Vysoké koncentrace proteinů a nukleových kyselin mohou snížit intracelulární pH až na hodnotu 4,5. K dalším výkyvům intracelulárního prostředí vedou teplotní a osmotický šok, variabilní elektrostatická pole a velký počet membránových rozhraní (organely). Všechny tyto faktory působí přestavbu nativního AFP do MGF podoby, kdy původně kryté hydrofóbní segmenty uvnitř záhybů molekuly AFP, jsou obnaženy okolnímu prostředí. Flexibilní forma MGF dodává proteinu vyšší přizpůsobivost vůči změnám uvnitř buňky (vazbou na chaperony⁴), váže hydrofóbní ligandy (barviva), projevuje afinitu k membránám, podílí se na translokaci proteinů⁵ a dovoluje transmembránový přestup AFP. Například kolem membrány se udržuje nižší pH, které navodí transformaci nativního AFP do MGF. Zvýší se tím přitažlivost mezi pozitivně nabitým proteinem a negativně nabitou membránou. Protein začleněný do lipidové dvojvrstvy se znovu poskládá do nativního stavu [7].

⁴ chaperony interagují s MGF a omezují tak tvorbu toxických forem, které vznikají agregací neposkládaných MGF.

⁵ translokace představuje děj, při kterém jsou proteiny díky obsahu signální sekvence doručeny na správnou adresu - organelu vybavenou speciálním receptorem. Všechny necytoplasmatické proteiny musí být translokovány. Rozpoznání signální sekvence je založeno na rozložení náboje, polaritě a sekundární struktuře, ne na specifické sekvenci aminokyselin.[53]

1.2. Význam AFP v klinické praxi

Vývoj poznatků o AFP

Úvahy o rozdílném složení a množství plazmatických bílkovin u fětů a novorozeňat oproti jedincům v pozdějších etapách života postupně vedly až k objevu AFP. Průkaz proteinu specifického pro peri- a časný postnatální věk se odvíjí od technologických možností dané doby.

- První důkaz předložil Pedersen [1] r. 1944. Z krve plodů a čerstvě narozených telat získal ultracentrifugací protein, který nazval fetuin.

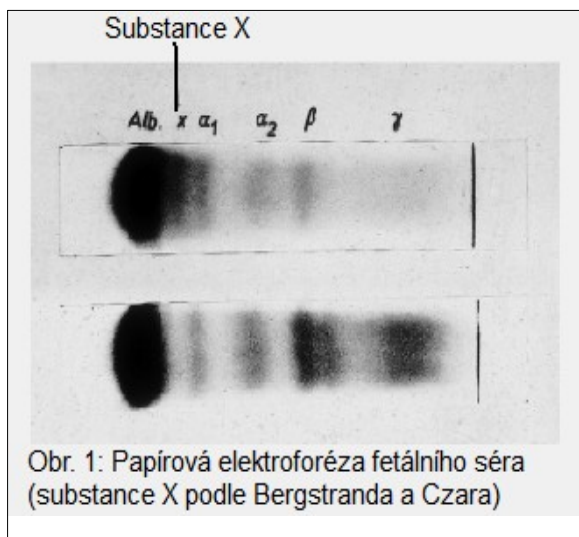
- S dalším nálezem se ohlásili Bergstrand a Czar [2] v r. 1956, kteří papírovou elektroforézou detekovali neznámou frakci (mezi albuminem a α 1-globulinem) a dali jí jméno substance X. Touto metodou byla přítomnost substance X prokázána pouze v krvi plodů, nikoli už v krvi po narození.

- Po zavedení Grabarovy imuno elektroforézy se dařilo dosáhnout detailnějšího záznamu jednotlivých bílkovinných složek. Roku 1963 Abelev [3] s použitím této techniky zjistil, že embryospecifický α 1-globulin se vyskytuje jen u myších embryí, u zdravých dospělých jedinců není přítomen a znovu se objevuje u myši s hepatomem.

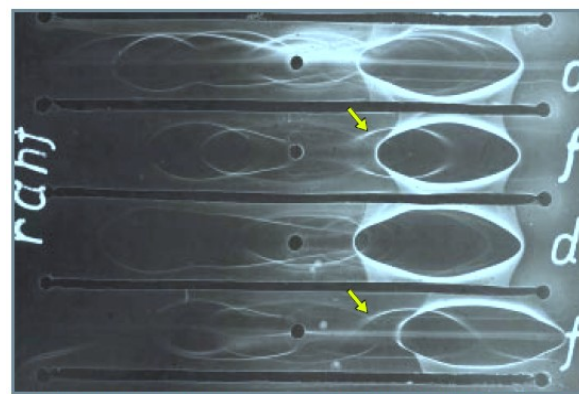
- Masopust a kol. [4] roku 1965 vedl výzkum s použitím lidského materiálu. Imuno elektroforetickou analýzou séra pupečnickové krve v agarovém gelu se docílilo vykreslení precipitační křivky v oblasti α -globulinů, která se však v séru matky nevyskytovala.

- Elektroforetickými postupy byly nalezeny další fetální proteiny pohybující se v oblasti α ₂, β a γ -globulinu. Ale práce Gitlina a Boesmana [5] (1967) označila α ₁-fetoprotein za typického představitele fetálních proteinů s charakteristickým průběhem koncentrace před a po narození. Odtud se zavedl pojem α ₁-fetoprotein (AFP).

- V roce 1969 organizace WHO-IARC zabývající se výzkumem rakoviny definovala AFP jako ontogeneticky první α -globulin, který je dominantním sérovým proteinem v embryonálním období, který po narození prakticky vymizí, ale který se objevuje znovu u dospělých jedinců s hepatomem.



Obrázek 3: Obrázek převzat z [6].



Obrázek 3: Imunoelktroforéza séra lidského fétu. Šipky označují specifickou frakci mezi albuminem a α_1 -globulinem. Obrázek převzat z [6].

V následujícím období se výzkum zaměřil na souvislost AFP s patologií v prenatálním vývoji a na navrhování metod stanovení AFP v plodové vodě. Nejdůležitější výsledky shrnuje tabulka 1.

rok	pozorovaný vztah hladiny AFP k patologii detekované při prenatálním screeningu	reference
1972	zvýšená hladina AFP v plodové vodě indikující defekt neurální trubice	[17]
1973	zvýšená hladina AFP v mateřském séru (MS-AFP) indikující defekt neurální trubice	[18]
1980	časná antenatální diagnostika defektu břišní stěny	[19]
1981	vliv hmotnosti matky na hladinu MS-AFP	[20]
1981	diagnóza neurálního defektu plynoucí z vyšetření ACHE v plodové vodě a hladiny AFP	[21]
1984	nízké koncentrace MS-AFP diagnostikující Downův syndrom	[22]
1987	vliv kombinace věku matky a MS-AFP hladiny určující Downův syndrom	[23]
1989	screening Downova syndromu pomocí Triple testu (AFP, E3, hCG)	[24]
1990	Použití Triple testu k detekci trisomie 18.chromosomu	[25]
1991	nízké koncentrace MS-AFP u vrozených srdečních a diafragmatických vad	[26]
1992	prenatální screening v MS s použitím mnoha markerů k určení vad plodu	[27]
1994	Quad test - 4 markery pro odhalení Downova syndromu: AFP, estriol, hCG, inhibin-A	[28]

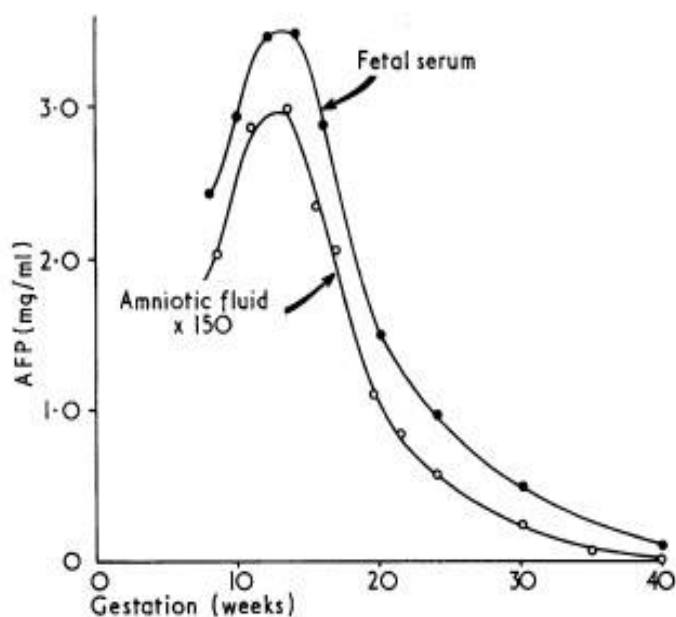
rok	pozorovaný vztah hladiny AFP k patologii detekované při prenatalním screeningu	reference
2003	porovnání Triple testu a Quad testu ve screeningu Downova syndromu	[29]
2003	integrované testování v prvním a druhém trimestru pro Downův syndrom (SURUSS trials)	[30]
2004	kombinovaný (sekvenční) screening v I. a II. trimestru pro Downův syndrom s použitím stanovení PAPP-A, B-hCG, následované AFP Triple testem	[31]
2004	Stanovení PAPP-A a B-hCG v 1. trimestru, srovnávání hladin s velikostí nuchální translucence při screeningu Downova syndromu (FASTER trials)	[32]
2005	kombinace screeningu Downova syndromu v I. a II. trimestru (studie FASTER)	[33]

Tabulka 1: Přehled souvislostí AFP s patologií v prenatalním screeningu. Použité zkratky: MS – mateřské sérum; ATP – alfa-fetoprotein; hCG – human chorionic gonadotrophin; ACHE – acetylcholinesteráza; PAPP-A – pregnancy-associated plasma protein-A; B-hCG - beta-hCG; SURUSS – Serum, Urine and Ultrasound Screening Study; FASTER – First and Second Trimester Evaluation of Risk

Hladina AFP

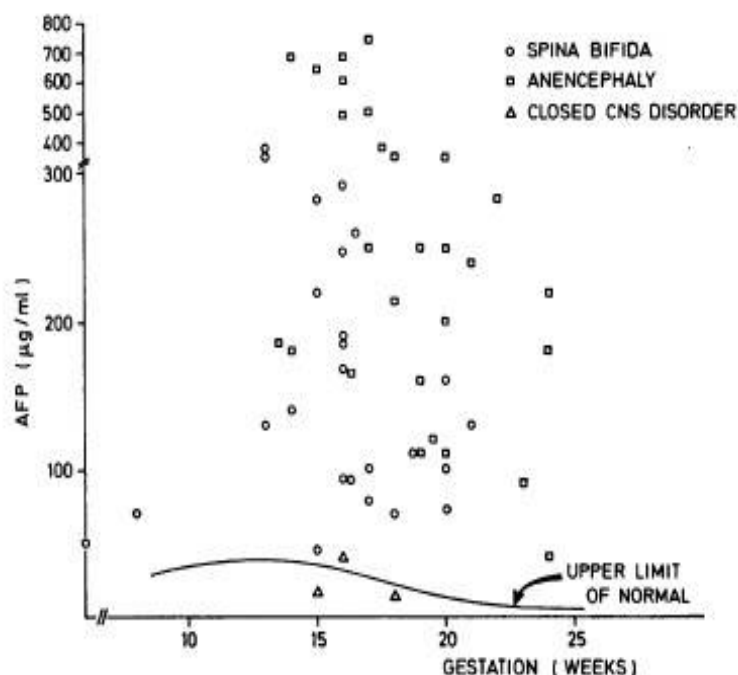
Z hlediska klinické praxe je nejdůležitější charakteristikou při analýze AFP jeho samotná koncentrace. Abnormální hodnoty koncentrace AFP poukazují na přítomnost patologie. Proto se stanovení AFP v plodové vodě využívá jako jeden z markerů při prenatalním screeningu. Podobně výskyt AFP v krvi dospělého jedince indikuje nádorové onemocnění.

Koncentrace AFP u fetálního vývoje má svůj charakteristický vývoj v závislosti na gestačním stáří. Nejvyšších hodnot dosahuje na začátku druhého trimestru v plodové vodě (~20 mg/l) a v séru matky se zpožděním v 16. až 18. týdnu, jak ukazuje obrázek 4. Zobrazená závislost je tzv. normální koncentrace AFP získaná jako střední hodnota koncentrací z rozsáhlého statistického souboru. Konkrétní hladiny AFP u vybraných vzorků se mohou značně lišit; nicméně abnormálně vysoké či nízké hodnoty byly pozorovány u těhotenství, u kterých byly diagnostikovány patologie [8]. V takových případech může hladina AFP překročit normální hladinu o stovky procent, viz obrázek 5.



Obrázek 4: Vývoj normální hladiny AFP v plodové vodě v závislosti na gestaci. Obrázek převzat z [9].

Ukazuje se, že výjimečně nízké hodnoty koncentrace AFP v plodové vodě i v séru matky jsou korelovány s chromozomálními abnormalitami jako Downův, Turnerův a Edwardův syndrom, hydrocefalus, diaphragmatická hernie nebo omezený růst plodu [8]. Snížené hodnoty koncentrace AFP také často doprovází nízkou hmotnost plodu, perinatální smrt, spontánní potraty a SIDS (syndrom náhlého úmrtí). Abnormálně vysoké koncentrace AFP zase indikují přítomnost anatomické léze jako poruchy neurální trubice (anencephalie, spina bifida), výhřez břišní stěny, atrézie gastrointestinálního traktu, renální anomálie, polyhydramnion, oligohydramnion, teratomy, blastomy, cystické hygromy a porušení placentální bariery.



Obrázek 5: Hladina AFP v plodové vodě u patologických těhotenství. Horní limit normálního rozmezí koncentrací je zobrazen linií. Obrázek převzat z [9].

Downův syndrom

Downův syndrom (DS) je charakterizován nízkou hladinou AFP (až 20% normální hladiny) v plodové vodě i v mateřském séru. Ve skutečnosti je DS spojen s poruchou tvorby správně organizované terciární struktury molekuly AFP, kdy vzniká molekula v biologicky neaktivní formě, která zároveň uniká sérologické detekci, což způsobuje nízkou naměřenou koncentraci [7,8]. Schopnost polypeptidu se skládat do unikátní, funkční, tří-dimenzionální struktury je dána jeho sekvencí aminokyselin, chaperony* a enzymy, které katalyzují skládání. V případě DS disponuje syntetizovaný polypeptid na ribosomech obnaženými hydrofóbními místy, které mají tendenci k agregaci. Agregované bílkoviny se mohou abnormálně kupit kolem buněk a působit toxicky jako např. amyloidní plaky u Alzheimerovy nemoci (AD). Takovým stavům přirozeně zabraňují chaperony, které se váží na hydrofóbní zbytky a spouští

* chaperony jsou bílkoviny podílející se na sbalování jiných bílkovin a dávají tak vzniknout prostorově uspořádaným proteinům. Narozdíl od enzymů nekatalyzují reakci, pouze napomáhají správnému skládání. Jejich syntéza bývá indukovaná celulárním stresem při změnách teploty, pH, účinkem toxických látek atd. Odtud synonymum pro chaperony - heat shock proteins (HSP). Syntézou chaperonů se buňka brání denaturačním dějům a jejich následkům.

na úrovni endoplazmatického retikula proces „balení“ tvarující protein do terciární struktury.

Je známo, že kumulace proteinu, který prošel defektním procesem skládání či nebyl vůbec dotčen fází skládání, bude hrát klíčovou roli v mnoha lidských chorobách. Následky lze jmenovat ve vztahu nemoc - („neposkládaná“ bílkovina): Downův syndrom (AFP), cystická fibróza (CF-TMCR), Marfanův syndrom (fibrilin), rakovinné bujení (P53), Alzheimerova choroba (amyloid) a mnoho dalších. Chybování při skládání fetálního proteinu nastává již během syntézy v jaterních buňkách nebo transplacentálním přenosem z plodu do matčiny krve.

U DS je 21. chromosom, kde je lokalizován pro-amyloidní prekursor, přítomen hned třikrát (trisomie 21. chromosomu). Spuštění těchto genů vede k nadměrnému koncentrování amyloidů uvnitř endoplazmatického retikula, které v reakci na stresový signál vybudí produkci chaperonů a enzymů dodávající bílkovině finální 3D úpravu. Patologické děje probíhající na chaperonech jsou následně přeneseny i na bílkoviny. Agregované pro-amyloidní a amyloidní fibrily se pak postupně kumulují v mozkových buňkách.

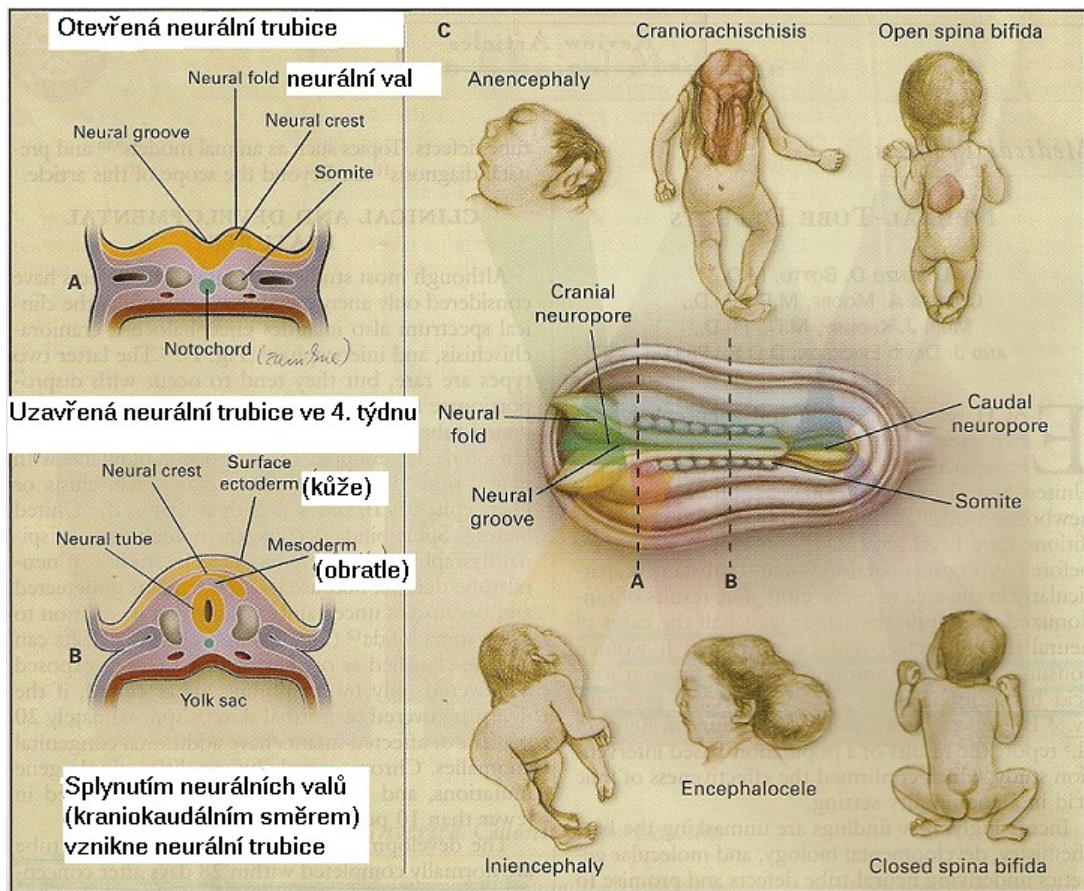
Defekty neurální trubice

Bílkovina AFP je zpočátku produkována žlutkovým váčkem, játry a v malém množství i gastrointestinálním traktem. Na konci I. trimestru přechází veškerá tvorba AFP na játra. Analýzou AFP v plodové vodě u fětu s defektem neurální trubice (NTD) se však zjistilo, že zdrojem AFP je zde i mozkomíšní mok fětu [10].

U otevřených NTD (obr.6) alfa-fetoprotein přímo uniká z nekrytých částí neurální trubice do plodové vody, tím zvedá celkovou koncentraci AFP v amniotickém prostoru a po dosažení krevního oběhu matky stoupne jeho koncentrace i v mateřském séru.

NTD mohou být doprovázeny dalšími anatomickými anomáliemi. V tom případě je zdrojem zvýšené hladiny AFP v plodové vodě gastrická tekutina, mekonium (smolka), žluč nebo moč. Jedná se např. o transudaci AFP do plodové vody z odhalených krevních cév při výhřezu vnitřností z dutiny břišní, urychlenou filtraci proteinů (AFP) a jejich přestup do moči při vrozené nefróze, nebo o artrézii (zneprůchodnění) v oblasti gastrointestinálním traktu, kdy fětu není umožněno

polykání či trávení plodové vody a normální odstraňování AFP z plodové vody selhává.



Obrázek 6: Vývoj neurální trubice a souvisejících defektů.

Panel A zobrazuje změny na neurální ploténce v procesu uzavírání budoucí neurální trubice.

Panel B ukazuje příčný řez již uzavřené neurální trubice se základy kožního (ektoderm) a kostního (mesoderm) krytí.

Panel C představuje hlavní znaky NTD. Schématický obrázek uprostřed znázorňuje dorzální pohled na vyvíjející se embryo, kde ve středním spinálním segmentu je kompletně uzavřená neurální trubice, ale na kranálních a kaudálních koncích je stále otevřená. Přerušované čáry značené A a B odpovídají příčným řezům v panelu A a B. Stínový pás spojuje region na neurální trubici s odpovídajícím defektem. Horní tři vyobrazení představují defekty s obnaženou nervovou tkání, zatímco spodní tři jsou kryté minimálně kůží.

Tumorový screening

Alfa-fetoprotein je bílkovina syntetizovaná především nezralými jaterními buňkami plodu a jeho hladina dosahuje ke konci 14. týdne hodnot až 3000 mg/l v séru fětu. V krvi dospělých zdravých osob se AFP pohybuje v koncentraci pod 10 µg/l. Vysoké hladiny AFP (např. 500 mg/l) u dospělých poukazují na přítomnost nádorového bujení. Nižší až střední hodnoty AFP (100 mg/l) lze pozorovat u pacientů s akutní/chronickou jaterní lézí (hepatitida B, cirhóza) nebo ve stádiu regenerace jaterní tkáně.

Znovu aktivovaná syntéza AFP po narození je znakem patologie. Exprese genu pro AFP probíhá opět v buňkách, které se derivovaly z buněk, které v období fetálního vývoje byly primárním zdrojem jeho produkce (játra, žloutkový váček a v malém množství primitivní střevo). V souvislosti s tím se nacházejí AFP pozitivní nádory v játrech (hepatoblastom, hepatocelulární karcinom), ve vaječnicích, varlatech, zřídka v pankreatu, žaludku a ve střevě.

Hodnota AFP parametru se vyšetřuje při podezření na nádory jater, vaječnicků a varlat. Užitečná je i pro sledování průběhu a účinnosti léčby nádorů jater, varlat a vaječnicků, pro pravidelné sledování dynamiky změn AFP u pacientů s chronickým onemocněním jater (cirhóza, chronická hepatitida B, C) pro riziko vzniku nádoru jater a v případě léčby nádorového onemocnění jater, varlat, vaječnicků v minulosti [41]. Stanovení diagnózy nádorového onemocnění se nezakládá pouze na znalosti hladiny AFP, ale musí být doplněna dalšími testy a zobrazovacími technikami.

2. kapitola

Imunochemické metody stanovení hladiny AFP

Imunochemické metody stanovení hladiny určité látky jsou obecně založeny na reakci se specifickou protilátkou, při níž dochází ke vzniku imunokomplexu s odlišnými fyzikálními a chemickými vlastnostmi než měl původní vzorek. Tato změna je charakterizována změnou měřitelných veličin, jejichž hodnota je úměrná koncentraci imunokomplexu a tedy koncentraci stanovované látky. Jednotlivé metody se liší veličinou, kterou měří nebo způsobem jejího měření. Jednoduchou, ale spolehlivou metodou je radiální imunodifuze, která je založená na měření transportních vlastností – difuze. Mezi optickými metody je nejcitlivější ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), která měří barevnou změnu mezi původním vzorkem a imunokomplexem se značenou protilátkou.

V této kapitole jsou představeny běžné metody stanovení koncentrace AFP používané v klinické praxi. Navíc je zde popsána imunoturbidimetrie, která také patří mezi imunochemické metody stanovení koncentrace látek využívaná v serologii, avšak její aplikace na AFP byla dosud opomíjena. Za tematicky nejbližší práci považujeme [34].

2.1. Kvantitativní metody stanovení AFP

Seznam užívaných technik pro kvantitativní hodnocení hladiny AFP je uveden v tabulce 2. Další část je věnovaná hrubému popisu základních mechanismů u několika vybraných metod. Lze je rozdělit podle charakteru probíhajícího děje na precipitační (radiální imunodifuze, raketová elektroimunodifuze) a neprecipitační, neboli imunoanalýzy (ELISA, chemilumiscence, radioimunoesej). Imunoanalýzy se opírají o reakci antigenu s protilátkou, kde se již neuplatňuje tvorba imunoprecipitátu, ale určuje se pouze obsah vzniklých imunokomplexů. Imunoanalytické metody lze použít i pro měření velmi nízkých koncentrací, kdy nelze vytvořit z antigenu a protilátky precipitát. Řešení pro velmi nízké koncentrace spočívá v aplikaci značky na reaktant s dostatečně intenzivní odezvou v signálu.

Metody kvantitativní (v biologických tekutinách)	Citlivost	Autor (použití pro AFP)
Radiální imunodifuze (<i>Mancini</i>)	2,5 mg/l	Komerční soupravy
Elektroimmunomigrace	2 mg/l	Masopust, J., Tomášová, H., 1966
Elektroimmunodifuze (<i>Laurell</i>)	0,5 mg/l	
Radioimunoesej	25 µg/l	Ruoslahti, E. et Seppälä, M., 1972
RIEP	20 µg/l	Norgaard-Pedersen, B., 1973
ELISA		
"Flow injection" chemiluminiscence	0,5 µg/l	Lin, J., 2004
"Flow injection" amperometric enzyme-immunoassay	0,07 µg/l	Della Ciana, L., 1996
Immunochromatographic strip assay (semikvantitativní)		Chuang, L. et al., 2004
Flow-injection chemifluorescent immunoassay	2,7 µg/l	Fu, Z. et al., 2006
Multi-array immunoassay based on insert-plug model of piezoelectric immunosensor	20-640 µg/l	Zhang, B. et al., 2007
Tandem bioluminescent immunoassay (BLIA) using aequorin labeled Fab fragment and bionylated firefly luciferase	1,95-1000 µg/l	Ito, K. et al., 2007
Electrochemical immunoassay on a micro-fluidic device with sequential injection and flushing function	Detection limit: 0,1 ng	Nashida, N. et al., 2007
Ag/SiO ₂ core-shell nanoparticle-based surface-enhanced Raman probes for sandwich-immunoassay	Detection limit 11,5 pg/l	Gong, J.L. et al., 2007

Tabulka 2 : Přehled metod pro kvantitativní stanovení AFP [35].

Radiální imunodifuze (RID)

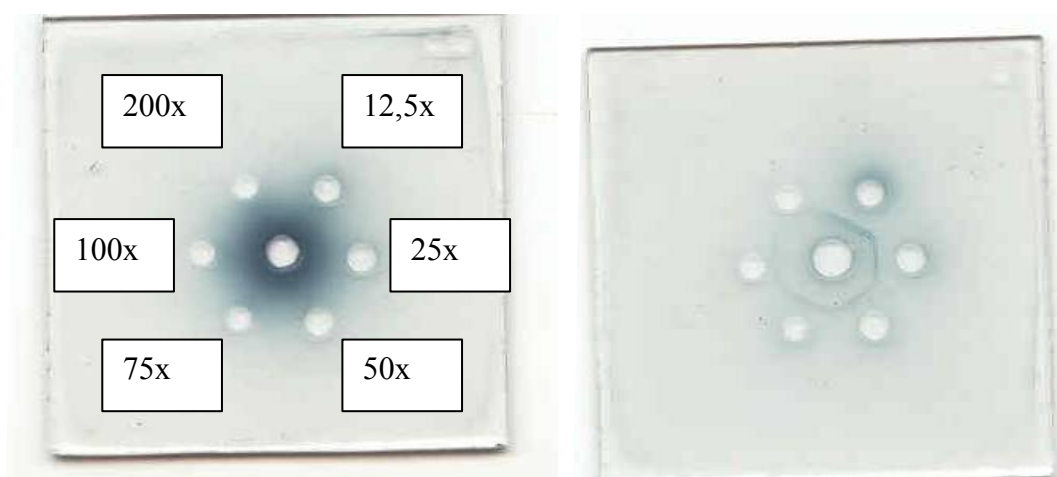
Vlastní imunochemický proces se uskutečňuje na destičkách pokrytých vrstvou agaru/agarózy s konstantně rozptýlenou protilátkou. Do gelu se vykrajují jamky, do kterých se nanáší antigen (AFP). Rozpustný antigen difunduje do okolí, přičemž jeho difuze je podle Fickova zákona [12] přímo úměrná gradientu koncentrace, tj. slabne se vzdáleností od místa startu. Po dosažení ekvivalence mezi antigenem a protilátkou se migrace antigenu zastaví definitivně, neboť difúze vzniklého imunokomplexu je zanedbatelná. Vzniklé precipitáty identifikujeme jako bílé prstence kolem jamek, jak je znázorněno na obrázku 7. Průměr kruhu se měří pomocí speciálního měřítka. Plocha kruhu (popř. čtverec jeho průměru) proporcionálně odpovídá gradientu koncentrace, čili i množství analytu [11]. Popsaný postup ve skutečnosti odpovídá tzv. jednoduché radiální imunodifúzi.

Jinou imunodifuzní metodu je dvojitá radiální imunodifúze. Zde se do gelu vykrojí centrální jamka pro antigen a kolem ní navíc další jamky uspořádané do kruhu, které se naplní různě naředěným antisérem, viz obrázek 8. Na destičce s gelem se od centra jamek uskuteční pohyb obou reaktantů po koncentračním gradientu. V místě střetu odpovídajícího množství antigenu a protilátky se vytvoří

precipitační linie. Poloha precipitační linie mezi jamkami závisí na koncentraci reaktantů. Linie bude tedy ležet blíže té jamky, v níž je reaktant v nižší koncentraci [11].



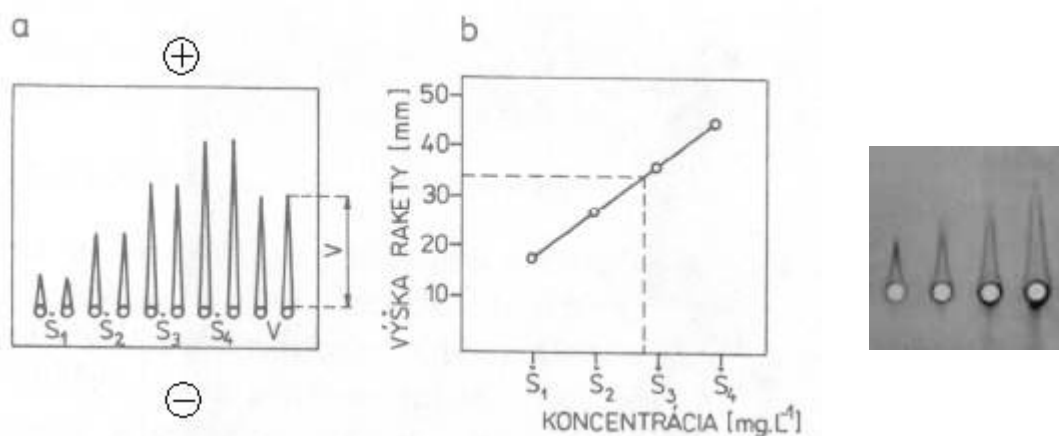
Obrázek 7: Příklad zpracované desky jednoduché radiální imunodifúze pro stanovení AFP v plodové vodě



Obrázek 8: Vlevo: Centrální jamka s plodovou vodou je obklopena jamkami s různě řaděným antisérem proti AFP. Vpravo: Výsledná precipitační linie.

Raketová elektroimunodifúze podle Laurella (RIEF)

RIEF je v podstatě jednoduchá radiální imunodifúze (obr.9) urychlená stejnosměrným elektrickým proudem (20mA). Reakce probíhá na destičce potažené vrstvou agarózového gelu (1%) s rovnoměrně rozptýlenou protilátkou. Antigen je unášen elektrickým proudem do gelu až do okamžiku, kdy je veškerý antigen vyvázan specifickou protilátkou – bod ekvivalence mezi oběma reaktanty s viditelnou imunoprecipitační linií ve tvaru rakety. Koncentrace antigenu je úměrná velikosti rakety a jeho hodnota se určí ze vzdálenosti mezi vrcholem a startem. RIEF se řadí mezi jedny z nejpřesnějších kvantitativních difúzních technik.

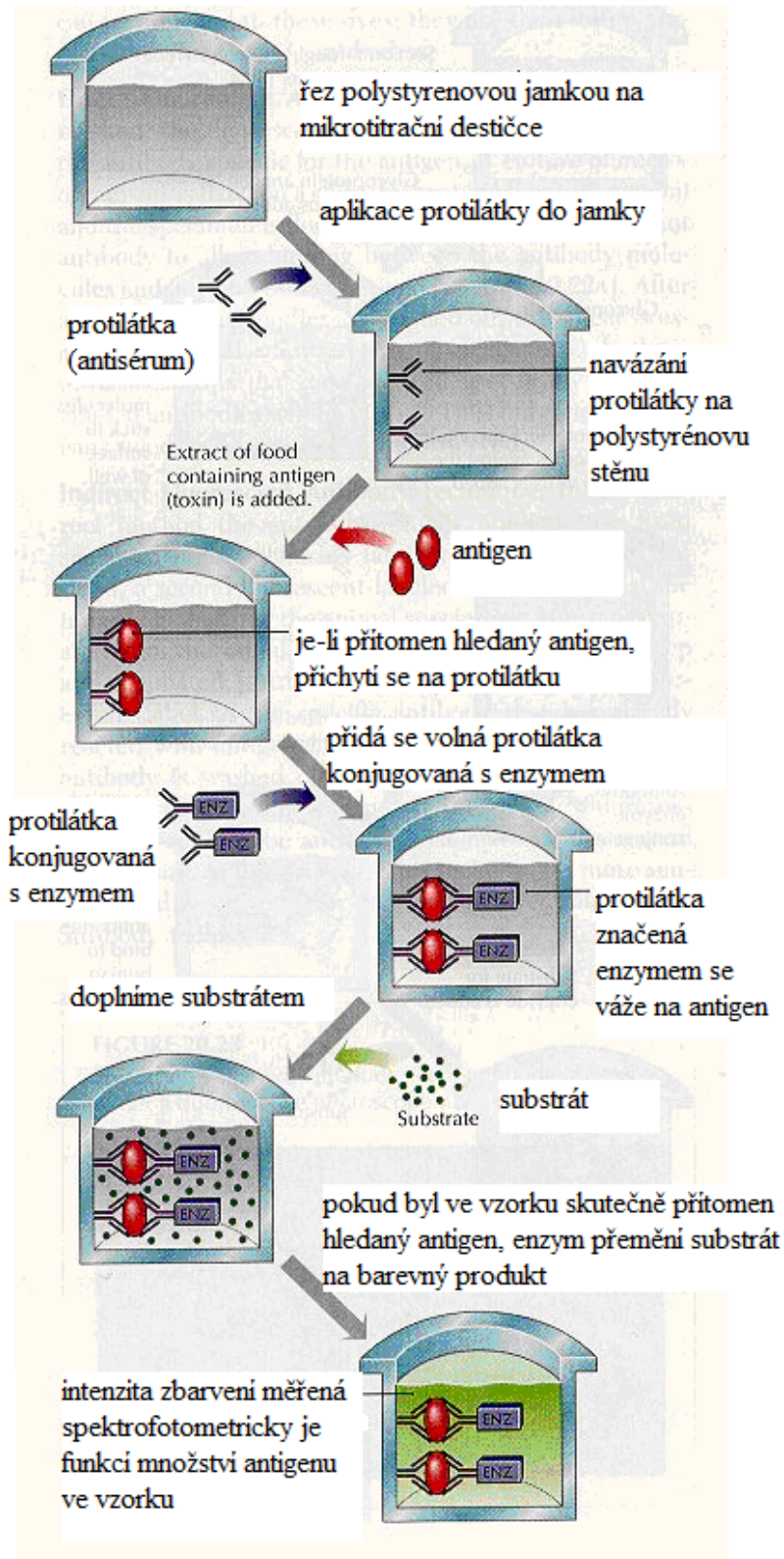


Obrázek 9: Vlevo: a) ukázka měření výšky rakety standardů a vzorku, b) kalibrační křivka pro vyhledání koncentrace vzorku. Obr. získán z [16]. Vpravo: fotografie RIEF na agarózové destičce. Obr. převzat z [36].

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

ELISA metoda pro stanovení antigenu spočívá v kvantitativní detekci antigenu pomocí protilátky značené enzymem. Enzym katalyzuje chemickou přeměnu substrátu na barevný produkt. Barevná změna se pak vyhodnocuje spektrofotometricky a je úměrná koncentraci analytu. V ELISA technice se uplatní hned dvě vlastnosti protilátek spočívající ve schopnosti vytvářet kovalentní vazbu (na Fc-koncích imunoglobulinů) s plastovými povrchy (zakotvení na dně mikrotitrační destičky) a s enzymy (nejčastěji peroxidáza nebo alkalická fosfatáza). Efekt ukotvené protilátky se projeví při vymývání, kdy se separuje přebytek nenavázaných reaktantů. Fixovaný zůstatek vede k barevné přeměně přidaného

substrátu a je předmětem měření. Na obrázku 10 je zachycen průběh metody ELISA v chronologickém sledu. Mezi jednotlivými kroky se jamky destičky promývají promývacím roztokem.



Obrázek 10: Princip metody ELISA, Obrázek převzat z [37].

Chemilumiscence (Flow-injection chemilumiscent immunoassay system based on a novel transparent immunoaffinity reactor)

Tato imunoesej představuje vysoce senzitivní a specifickou metodu s širokým lineárním rozsahem a spolehlivou reprodukovatelností. Přínos metody je porovnatelný s radioimuno-metrickým měřením.

Systém stanovení AFP kombinuje imunoafinitní kolonu s boronátem*, který vychytává glykovaný antigen, a flow-injection chemilumiscenci (průtokovou chemilumiscenci). Skleněná kolona je potažena souvislou vrstvou sepharózového⁶ gelu, který fixuje boronát k povrchu kolony. Díky interakci glykan (antigen)-boronát je AFP efektivně imobilizován na sepharózovou matrix. Dalším krokem v pořadí je nastříknutí kolony protilátkou, která je značená křenovou peroxidázou (HRP-anti-AFP, horseradish peroxidase-labeled AFP antibody). Volné HRP-anti-AFP jsou vychytávány imobilizovaným antigenem (AFP) uvnitř kolony a detekovány cestou chemilumiscence díky reakci mezi luminolem⁷ a peroxidem vodíku [38].

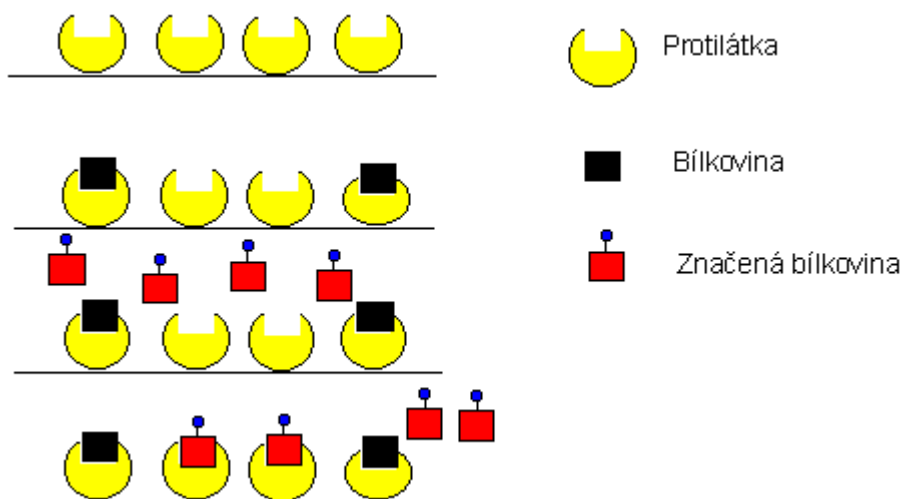
Radioimunoesej (RIA)

RIA se zakládá na kompetici mezi radioaktivně značeným a neznačeným (I^{125} , I^{131}) antigenem o místo na protilátce. Protilátka je fixována na pevný povrch a antigen ze vzorku soutěží se standardem značeným radioaktivně. *Čím více vazebných míst na protilátkách je obsazeno stanovovanou bílkovinou, tím více radioaktivního proteinu zůstane v roztoku. Koncentrace stanovovaného proteinu v roztoku je tedy přímo úměrná naměřené radioaktivitě v roztoku* [39]. Princip je schematicky ukázán na obrázku 11.

* boronát je kyselina borová substituovaná alkylem/arylem. Její vítanou vlastností pro imunoanalýzu je schopnost vytvářet kovalentní komplexy s cukernými zbytky antigenu (na glykovaném antigenu).

⁶ sepharóza je extrahována z mořských řas. Název je odvozen od Separation - Pharmacial-Agarose. Umožňuje stabilní přichycení ligandů pro očištění od ostatních příměsí.

⁷ luminol je známý tvorbou intenzivního modrého světla po interakci s vhodným oxidačním činidlem.

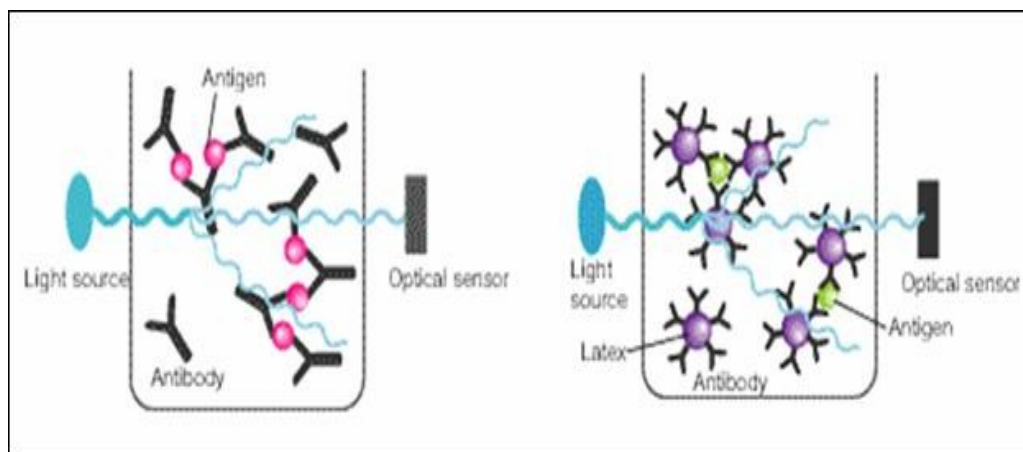


Obrázek 11: Soutěž stanovené bílkoviny (antigenu) o vazbu na protilátku s radioaktivním standardem [39].

2.2. Imunoturbidimetrie

Imunoturbidimetrie je optická metoda, která spočívá v měření světla zeslabeného rozptylem na částicích imunokomplexu. Reakcí antigenu (bílkovina AFP) s protilátkou (beranní antisérum) se vzorek přemění na nerozpustný agregát – imunokomplex. Při průchodu světla takovým vzorkem dochází k rozptylu světla, který pozorujeme jako zákal. Míru zákalu – turbiditu vyhodnocujeme na foto-, spektrofoto-, turbidi- a nefelometrických přístrojích, které zaznamenávají množství pohlceného světla, tzv. absorpenci. Ta je úměrná koncentraci analytu (AFP).

Světelné paprsky procházející kyvetou se na částicích mohou odrážet, mohou skrze částice procházet a měnit svůj směr. Část světla se tak absorbuje či rozptýlí a zbytek se zachytí na detektoru přístroje. Turbidimetrie (narozdíl od nefelometrie) měří absorpenci světla v přímém směru, tedy ve směru, kudy světelné paprsky do soustavy vstupují (obr. 12).



Obrázek 12: Princip turbidimetrie. Světlo produkované světelným zdrojem s přesně definovanými parametry je zeslabeno při průchodu vzorkem rozptylem na částicích vzorku. Intenzita, kterou měří optický detektor umístěný za vzorkem, tak přímo souvisí s koncentrací rozptylových částic ve vzorku. Obrázek převzat z [40].

V klinické biochemii se lze setkat s celou řadou postupů založených na měření stupně zákalu (turbidity) a nejvýznamnější z nich se využívají ke stanovení specifických proteinů (sérových bílkovin) - C3, C4, CRP, haptoglobin, IgA, IgG, IgM, RF a transferrin).

Imunoprecipitační křivka

Imunoprecipitační křivka vykresluje vzájemný vliv poměru antigenu a protilátky na tvorbu imunokomplexu a poukazuje na možnost chybování při interpretaci výsledků. Charakteristický průběh křivky pro konstantní obsah protilátky je zobrazen na obrázku 13, tak jak jej popsali Heidelberger a Kendall [13].

Pro zónu nadbytku protilátky platí, že se zvyšujícím se množstvím antigenu vzrůstá precipitát. Po interakci antigen-protilátka se během několika sekund obsadí všechna vazebná místa na antigenu protilátkami a ve vzorku vzniknou malé, rozpustné imunokomplexy. Tyto se vzájemně ale nepropojují. Oblast nadbytku protilátky je zajímavá pro imunoturbidimetrické, nefelometrické měření a u nekompetitivních imunoanalýz.

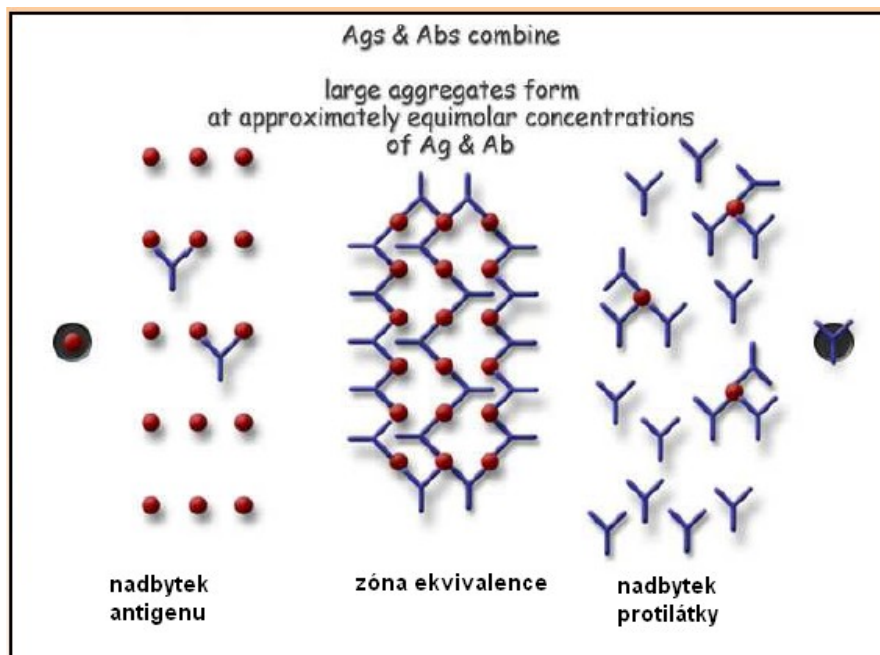
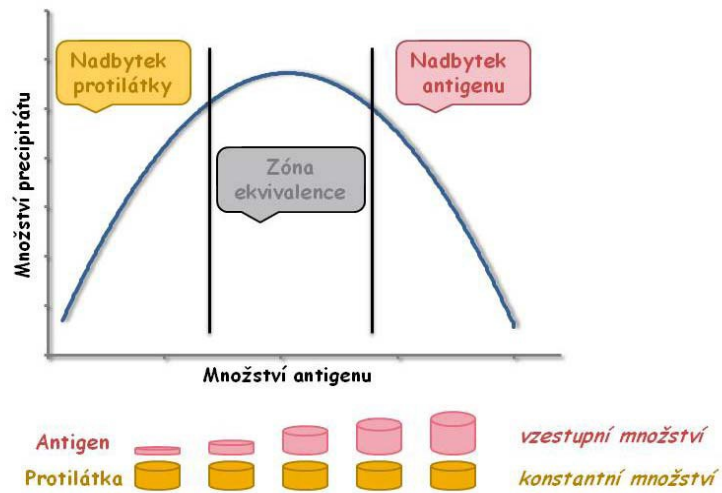
Zóny ekvivalence se může být dosaženo s odstupem času (minuty), kdy primární imunokomplexy zvolna polymerují na agregáty. Polymerace vyžaduje volné antigenní determinanty (epitopy) a vazebná místa v primárních komplexech, jen tak je vyhověno předpokladu pro vznik prostorové mřížky. Po dosažení určité velikosti

této mřížky, agregáty ztrácejí rozpustnost a precipitují v roztoku. Podmínkou imunoprecipitace je tedy reakce antigenu s více epitopy (polyvalentní antigen) s protilátkami, které s těmito epitopy reagují. Pokud tato podmínka není splněna, imunoprecipitace se neuskuteční. Proto hapteny, které jsou vybaveny pouze jedním epitopem, nemohou precipitovat. Podobně monoklonální protilátky, které jsou namířeny pouze proti jednomu epitopu, nejsou vhodné pro imunoprecipitační reakce. V oblasti ekvivalence jsou vzorky zpracovávány imunodifúzními metodami.

V zóně nadbytku antigenu bývají všechna vazebná místa protilátek vysycená antigenem. Zaniká mřížková struktura, agregáty se rozpadají a na místo nich se formují malé rozpustné komplexy. Oblast nadbytku antigenu se využívá v kompetitivních imunoanalýzách.

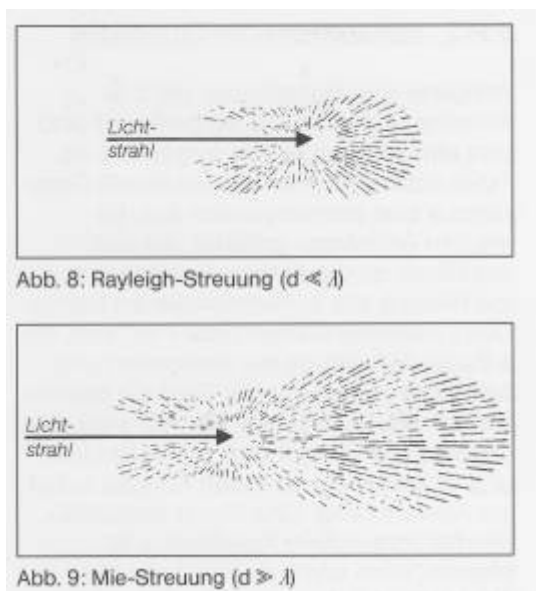
Pro laboratorní měření je výhodné se pohybovat v rozmezí koncentrací, kde platí lineární vztah mezi absorbancí a množstvím antigenu. Výhodou imuniturbidimetrie je, že takového nastavení lze jednoduše dosáhnout regulací množství protilátky (antiséra) tak, aby bylo v dostatečném nadbytku nad množstvím antigenu.

Imunoprecipitační křivka



Obrázek 13: Reakce antigen-protilátka ve vztahu ke vzájemným koncentracím obou reaktantů. Nahoře: imunoprecipitační křivka s rozdělením na tři zóny. Obrázek převzat z [11]. Dole: grafické provedení vazby imunokomplexů (vpravo,vlevo) a precipitátu (uprostřed). Obrázek převzat z [16].

Důležitou součástí experimentálního nastavení imunoturbidimetrie je volba světelného zdroje, neboť rozptyl světla závisí na jeho vlnové délce a velikosti rozptylových částic. Rozhodujícím faktorem je poměr vlnové délky světelného zdroje a velikosti rozptylových částic. Čím menší je tento poměr, tím roste úhlová disperze záření. Z obrázku 14 lze vypožorovat, že částice výrazně menší než je vlnová délka světla působí jen mírný rozptyl, zatímco částice podobně velké či větší než je vlnová délka světla mají značný rozptylový efekt. Abychom při měření turbidity získali co největší poměr signálu ku šumu, je proto důležité volit vlnovou délku světelného zdroje tak, aby byla menší nebo srovnatelná s velikostí rozptylových částic. Proto se např. specifické proteiny, které vytvářejí shluky o velikosti řádově 0,1 μm , často stanovují při nejkratší vlnové délce dosažitelné standardním fotometrem, tj. při 340 nm. Krátkovlnnější světlo, zasahující do UV oblasti, nelze použít, protože bývá pohlceno nezreagovanými bílkovinami, což zkresluje měření zákalu [14]. U standardní imunoturbidimetrie se tak za světelný zdroj volí modré světlo (435-480 nm), neboť zajišťuje největší citlivost a je schopno dosáhnout v daném rozmezí vlnových délek větší intenzity ve srovnání s halogenovou žárovkou.



Obrázek 14: Rozptyl světla na částici o velikosti výrazně menší než vlnová délka (nahore) a částici větší než vlnová délka (dole).Obrázek převzat z[52].

Z uvedeného jsou zřejmé zároveň i nevýhody použití imunoturbidimetrie. Měřená složka musí být ve vzorku přítomna ve formě jemně rozptýlených částic vhodné velikosti. Pokud částice koagulují v různých velikostech, může se stát, že část komplexu se vyskytuje ve formě příliš malých částic, které téměř nepřispívají k absorpaci a výsledky měření jsou tak zkreslené. Dále je nutné, aby reakce měřené složky byla jediným jevem, který ovlivňuje zákal, neboť jen tak bude změřená absorbance převeditelná na koncentraci měřené látky. Nemalým problémem pro imunoturbidimetrické měření může být i nestálost analytu, kdy vzorek podléhá změnám v průběhu získávání dat, např. dochází-li k příliš rychlé sedimentaci. Suspenze se stabilizuje ochranným polymerem polyethylenglykolem, který řeší problém sedimentace imunokomplexu v roztoku během záznamu hodnot absorbance [14].

Na druhou stranu je imunoturbidimetrie vysoce univerzální a rychlá metoda. Pokud jsou splněny výše diskutované podmínky, lze tuto metodu použít v širokém rozmezí koncentrací. Další předností je to, že umožňuje kvantifikovat sraženinu bez jejího oddělení od roztoku.

3. kapitola

Aplikace imunoturbidimetrie pro stanovení hladiny AFP

Otestovali jsme možnost použití imunoturbidimetrie na stanovení hladiny AFP v plodové vodě použitím beraního antiséra proti AFP coby specifické protilátky. Při reakci AFP s beraním antisérem vzniká imunokomplex, který vytváří v roztoku zákal, jehož míru můžeme změřit pomocí imunoturbidimetrie a převést ji na koncentraci AFP podle kalibrační křivky. Metodu jsme optimalizovali volbou vlnové délky světelného zdroje a množství antiséra. V poslední části této kapitoly porovnáváme výsledky získané imunoturbidimetricky s výsledky jednoduché radiální imunodifuze.

3.1. Materiál a metody

Přístrojové vybavení

Spektrofotometr WPA Biowave II

jednopaprskový UV-Vis spektrofotometr

Rozsah vlnových délek: 190 - 1100 nm

Fotometrický rozsah: -0,300 až 2 500A

Firma: Biochrom Ltd (Cambridge)

Čtení: endpoint, kinetické měření a skenování spektra

Detekce: absorbance

Světelný zdroj: záblesková xenonová výbojka

Detektor: 1024 CCD pole

Držák kyvet: pro jednu kyvetu (Microcell 10 mm)

Přesnost měření vlnových délek: +/- 2nm

Fotometrická přesnost: +/- 0,003A až 0 – 0,5A při 546 nm



Obrázek 15: Spektrofotometr WPA Biowave II [46].

Třepačka WiseMix VM-10 - horizontální kruhový pohyb

Multifunkční třepačka typu vortex pro třepání zkumavek a jiných nádob

Firma: Vitrum

Frekvence kmitů: 0 – 3300



Obrázek 16: Třepačka WiseMix VM-10 [47].

pH metr Denver Ultra Basic UB 10

Firma: Denver Instrument

Módy: pH/mV/teplota

pH rozsah: 0 – 14

pH rozlišení: 0,01

Přesnost měření pH: 0,005

Teplotní rozsah: 0 - 100.0° C



Obrázek 17: pH metr Denver UB 10 [48].

Ostatní vybavení

automatické pipety + špičky

stojan na zkumavky

skleněné nádoby: zkumavky, kádinky, odměrné baňky

stříčka s destilovanou vodou

buničina

rukavice

Materiál

Fosfátový pufr 0,01 mol/l, pH 7,2 + 0,9% NaCl

5% PEG 6000

Berání antisérum (polyklonální protilátky) – dar doc. Malbohana

Vzorky plodové vody o neznámé koncentraci

Standardy – plodová voda s uvedenou koncentrací

Příprava fosfátového pufru

Chemikálie:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ $M_r = 385,14$ 3,851g do 100ml \rightarrow 0,1 mol/l

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $M_r = 156,01$ 1,560g do 100ml \rightarrow 0,1 mol/l

Pipetujeme 28 ml $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ o látkové koncentraci 0,1mol/l a 72 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ o látkové koncentraci 0,1mol/l do společné nádoby. Doplníme do konečného objemu 1000 ml destilovanou vodou. Do hotového pufrovacího roztoku rozpustíme 9g NaCl (PBS) a přidáme doporučené množství azidu sodného (<0,1% z celkového obsahu reagensů).

Požadovanou pH hodnotu (7,2) pufru ověříme na pH metru a případnou odchylku od pH upravíme postupným přikapáváním kyseliny chlorovodíkové (1 mol/l) nebo hydroxidu sodného (1mol/l).

Příprava 5% polyethylenglykolu 6000 v PBS

Rozpuštění PEGu v PBS trvá zhruba 12 hodin. Roztok se připravuje vždy čerstvý a použitelný je po dobu 24 hodin. Uchovává se při teplotě 4°C .

Odběr a příprava vzorků plodové vody

Odběr vzorku plodové vody provádí lékař gynekologického oddělení zavedením jehly skrze břišní stěnu za neustálé ultrazvukové kontroly. Amniocentézu podstupují těhotné ženy v indikovaných případech (věk > 35, pozitivní screening v I. trimestru, apod.) od ukončeného 15. týdne⁸ gravidity. Získaný materiál v množství 20 ml⁹ se

⁸ Touto dobou je v amniotickém obalu fyziologicky větší množství plodové vody (207 ± 92 ml), proto lze výkon dobře provést a minimalizuje se riziko poranění plodu. Teoreticky je možné provést zákrok již dříve (tzv. *časná amniocentéza*), ale dá se získat menší množství tekutiny (od 11. do 14. týdne gravidity je možné odebrat pouze tolik mililitrů plodové vody, jaké je gestační stáří plodu v týdnech) [43].

⁹ což je asi 5% celkového množství plodové vody, která se během několika hodin po odběru opět doplní [44].

plní do sterilních plastových zkumavek s dobře těsnícím šroubovatelným víčkem. Plodová voda se odebírá bez přídavných látek [42].

Vzorky jsou odeslány do laboratoře, zcentrifugují se, sediment se naloží na kultivaci amniocytů pro pozdější karyotypizaci (chromozomální vyšetření buněk) a supernatant se otestuje na koncentraci AFP (popř. na další biomarkery jako je ACHE, GGT)¹⁰.

Pro imunoturbidimetrické zpracování jsme měli k dispozici zmražené vzorky plodové vody. Tento materiál, který již předtím posloužil účelům prenatalního screeningu, poskytla Laboratoř speciální imunochemie (Ústav lékařské biochemie a lékařské diagnostiky VFN a 1.LF UK v Praze). Vzorky plodové vody vydrží stabilní dva dny při 2-8 °C a jeden rok při -20 °C [45]. Po rozmrazení vzorku při pokojové teplotě (20 – 25 °C) je doporučeno vzorek zpracovat přibližně do dvou hodin (s ohledem na možné odpařování roztoků).

3.2. Optimalizace metody

Při pohledu na precipitační křivku, obrázek 13, je jasné, že vztah mezi absorbancí vzorku a koncentrací antigenu (AFP) není jednoznačný. Stejně hodnotě absorbance odpovídají dvě rozdílné koncentrace analytu – jedna v oblasti nadbytku protilátky, druhá v oblasti nadbytku antigenu. Abychom mohli změřeným absorbancím jednoznačně přiřadit množství AFP, musíme zajistit, aby poměr mezi antigenem a protilátkou se pohyboval pouze jedné oblasti. Standardně se volí oblast nadbytku protilátky, kde pro nízké koncentrace antigenu dostáváme lineární závislost absorbance.

Abychom mohli absorbanci převést na koncentraci imunokomplexu, resp. AFP, ve vzorku, je nutné, aby absorbance byla dána pouze příspěvkem od imunokomplexu. Proto se u každého vzorku provádí tzv. slepá zkouška, kdy měříme absorbanci samotné plodové vody a samotného antiséra, které mohou také pohlcovat

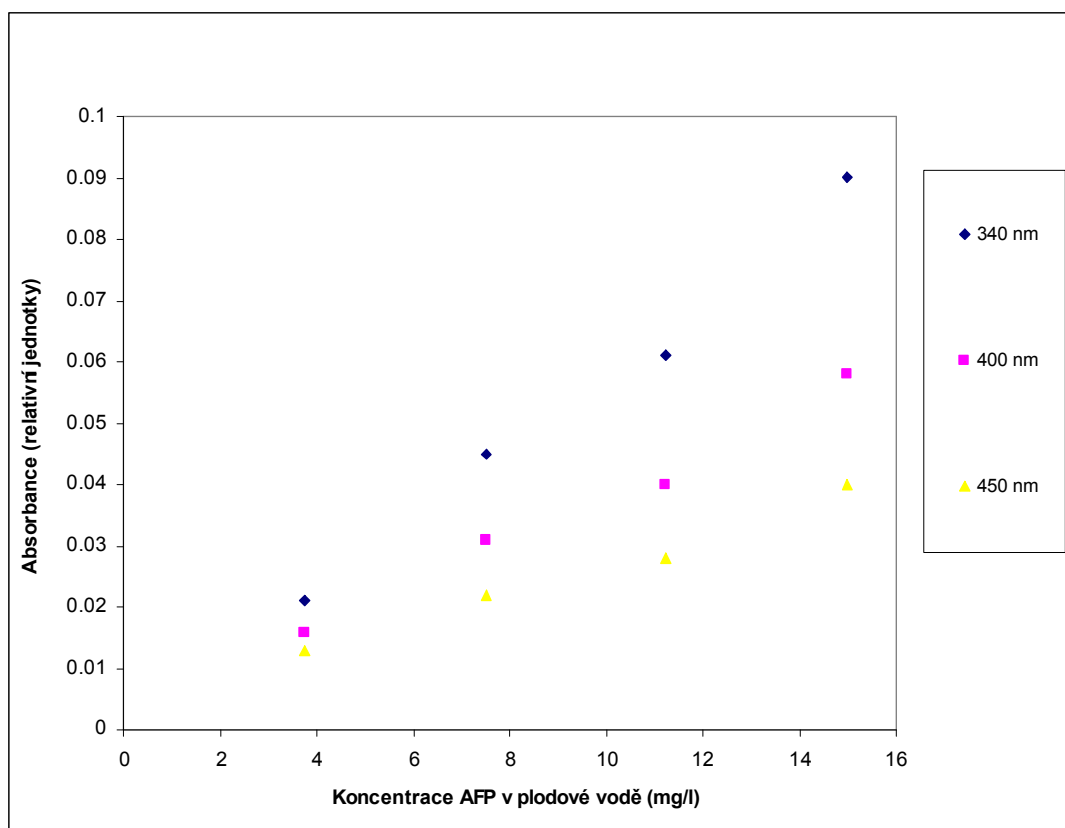
¹⁰ ACHE – acetylcholinesteráza je enzym přítomný v nervovém systému, GGT je γ -glutamyltransferáza ukazující na cystickou fibrózu.

dopadající záření. Od absorbance vzorku po smíchání plodové vody a antiséra odečteme součet obou slepých zkoušek, abychom eliminovali vliv pozadí.

Částice imunokomplexu se mohou navzájem shlukovat a shluky rozpadat než se mezi těmito procesy ustaví rovnováha. Velikost shluků přitom má vliv na úhlovou závislost rozptylu světla a tedy i na změřenou absorbanci. Měření absorbance je proto třeba provést až po ustanovení rovnováhy. Měřením jsme zjistili, že po ~15 minutách od smíchání plodové vody s antisérem se hodnota absorbance ustálí. Všechna měření jsme proto prováděli až po 20 minutách od přípravy směsi plodové vody a antiséra. Pro stabilizaci roztoku proti sedimentování jsme použili polyethylenglykol.

Světelný zdroj

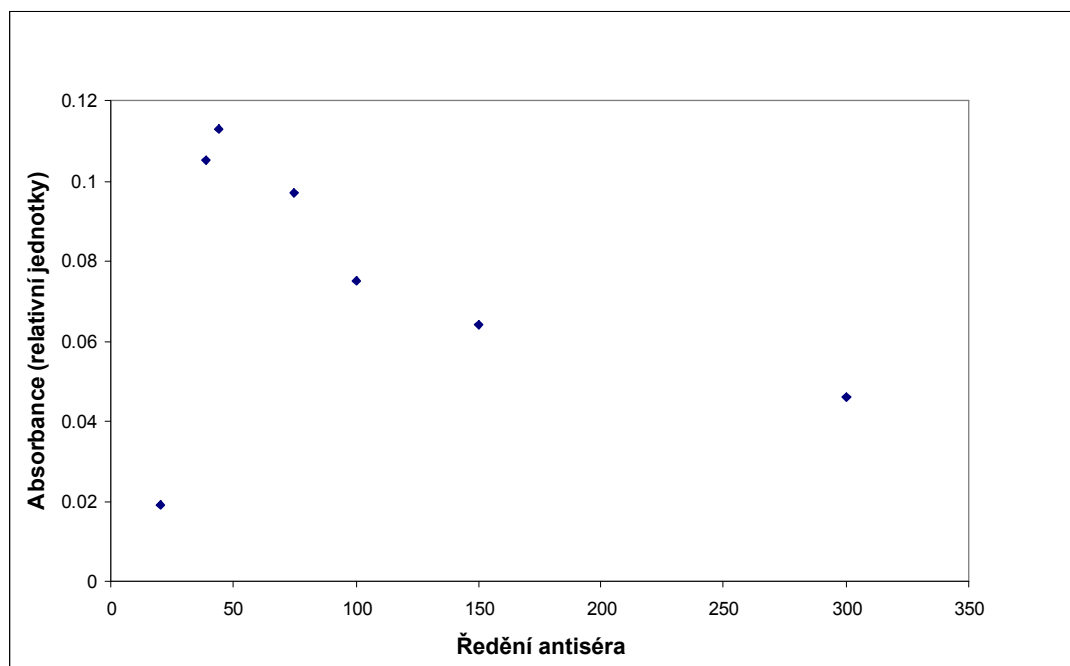
V přípravné fázi, která předcházela vlastnímu měření, bylo nutné zjistit jaká vlnová délka světelného zdroje bude optimální pro zaznamenávání hodnot absorbance. Pokusně jsme proměřili vzorky o známé koncentraci AFP při vlnové délce 340, 400 a 450 nm. Z obrázku 18 lze vyčíst, že nejcitlivějšího rozlišení dosáhneme při 340 nm, kdy je směrnice nejstrmější a dává nejvýraznější odezvu na změnu koncentrace. Nejlepší citlivosti tedy dosáhneme použitím viditelného světla v blízkosti fialového okraje spektra. Postupovat dále do UV oblasti nemá smysl, protože se zde začne projevovat absorpce nezreagovanými bílkovinami, která ruší signál od imunokomplexu.



Obrázek 18: Závislost absorbance na koncentraci AFP pro různé vlnové délky dopadajícího světla.

Ředění antiséra

Jak je vidět z obrázku 13, vzájemné koncentrace antigenu a protilátky zodpovídají za to, v jakém rozsahu se vytvoří precipitát v roztoku. Množství antiséra, s nímž smícháme vzorek plodové vody, tak ovlivňuje míru zákalu. Abychom vybrali optimální koncentraci antiséra, postupně jsme ředili antisérum pufrem, čímž jsme snižovali jeho množství vzhledem ke konstantnímu množství plodové vody. Typický průběh absorbance v závislosti na ředění je zobrazen na obrázku 19. Pro nízký počet zředění, kdy koncentrace antiséra výrazně převyšuje koncentraci AFP v plodové vodě, roste absorbance lineárně. Maximum křivka nabývá, když se koncentrace antiséra a AFP vyrovnají. Dalším ředěním antiséra je jeho množství v nedostatku vůči AFP a absorbance klesá. Pro kalibraci a následné měření jsme vybrali takovou titraci, která odpovídá lineární závislosti absorbance a zároveň dává vysokou absorbanci.

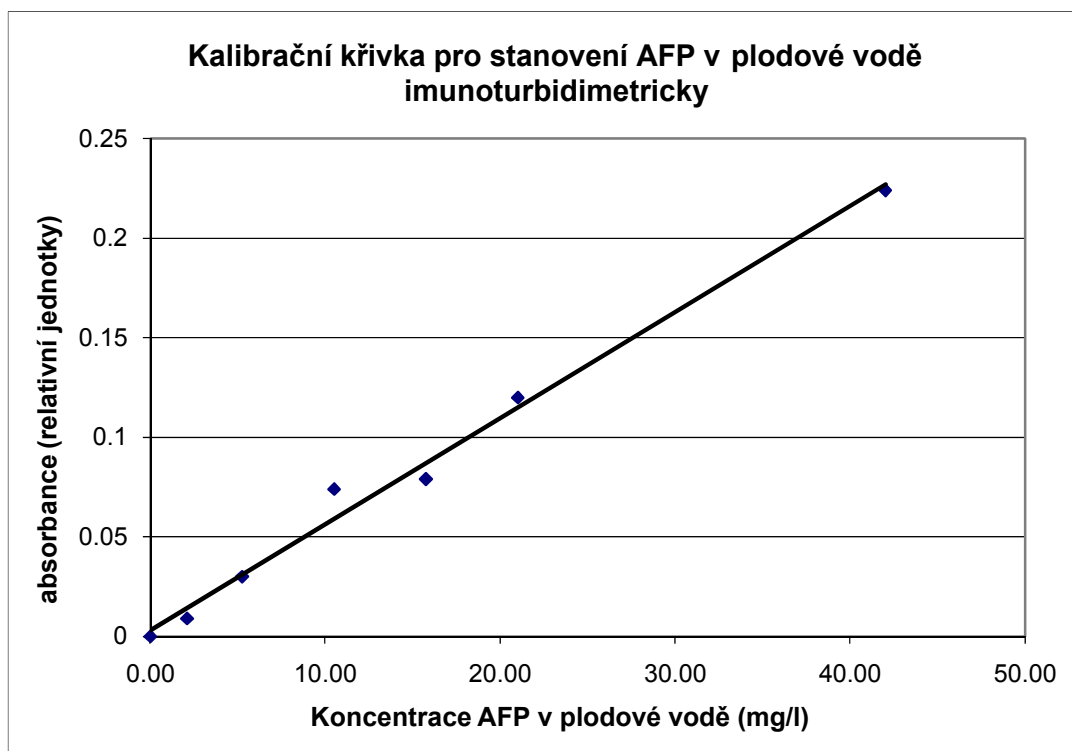


Obrázek 19: Závislost absorbance na ředění antiséra.

Kalibrační křivka

Standardy o známé koncentraci AFP jsme smíchali s konstantním množstvím antiséra tak, aby antisérum bylo v přebytku u všech koncentrací standardů. Koncentrační rozpětí standardů jsme volili, aby s rezervou pokrylo typické koncentrace AFP v plodových vodách v uvažovaném týdnu těhotenství. Závislost absorbance na koncentraci AFP změřená pro standardy pak slouží jako převodní funkce, z níž určujeme koncentrace neznámých vzorků plodové vody na základě změřené absorbance. Vzorky plodové vody jsme zpracovávali vždy současně se standardy, aby byly zachovány stejné podmínky analýzy včetně případných nepřesností, např. při pipetování. Pro každou sadu měření jsme proto provedli vlastní kalibraci.

Příklad takové kalibrace je uveden v tabulce 3 a na obrázku 20. Zde jsme data proložili přímkou, podle níž jsme v následných měřeních určovali vztah mezi absorbancí A a koncentrací AFP c . Je třeba mít na paměti, že tato závislost mezi absorbancí a koncentrací je relevantní v oblasti nadbytku antiséra. Pokud nemáme ani hrubý odhad koncentrace měřeného vzorku, je třeba ověřit, zda je antisérum ve vzorku opravdu v přebytku. To lze ověřit přidáním antiséra, které by mělo vést k poklesu absorbance podél kalibrační křivky.



Obrázek 20: Kalibrační křivka.

c [mg/l]	1.	2.	avg	slepá AG	slepá AS	absorbance
42,00	0,638	0,627	0,633	0,085	0,329	0,219
21,00	0,493	0,493	0,493	0,044	0,329	0,120
15,75	0,440	0,440	0,440	0,032	0,329	0,079
10,50	0,415	0,410	0,413	0,010	0,329	0,074
5,25	0,372	0,368	0,370	0,011	0,329	0,030
2,10	0,341	0,345	0,343	0,005	0,329	0,009

Tabulka 3: Absorbance pro postupně řaděný standard. Od průměru z dvojice následných měření (1., 2.) je odečtena absorbance vzorku bez antisera (slepá AG) a absorbance samotného antisera (slepá AS).

3.3. Vlastní pracovní postup

1. Postupné ředění standardu ($c = 15 \text{ mg/l}$) aritmetickou řadou podle schématu:

Připravit 2X (v dubletu)

	Pufr bez PEG	Plodová voda (PV)	koncentrace
1	0	0,100 ml	100%
2	0,025 ml	0,075 ml	75%
3	0,050 ml	0,050 ml	50%
4	0,075 ml	0,025 ml	25%

Tabulka 4

2. Příprava 100 ml 50 x ředěného beranního antiséra proti AFP

Ředění 1: 50 znamená, že k 1 dílu ředěného antiséra (AS) přidáme 49 dílů rozpouštědla.

$$100 \times 1/49 = 2 \text{ ml AS}$$

Antisérum doplnit 98 ml 5 % PEG v PBS

3. Smíchání reagensů podle návodu v tabulce

	St 1	St 2	St 3	St 4	PV1	PV2	Slepá (AS)
Vzorek	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-
Pufr	-	-	-	-	-	-	0,1
Antisérum	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Tabulka 5

Ke každému vzorku i standardu je nutné znát hodnotu absorpance slepé zkoušky, abychom vyloučili případné interference činidel. Při konečném vyhodnocování z výsledků odečteme slepou zkoušku vzorku (standardu) a slepou zkoušku antiséra.

	St 1	St 2	St 3	St 4	PV1	PV2
Vzorek	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
5 % PEG v PBS	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Tabulka 6

4. Po smíchání plodové vody s antisérem, ponecháme zkumavky inkubovat 20 minut při pokojové teplotě. Vše proměříme proti destilované vodě při vlnové délce 340 nm.

3.4. Pracovní postup pro jednoduchou a dvojitou radiální imunodifúzi

Technické vybavení

Dia-skla o rozměrech 85 x 85 mm
Šablona pro vykrajování jamek pro jednoduchou radiální imunodifúzi /SEVAC/
Raznice na vykrajování jamek pro dvojitou radiální imunodifúzi /SEVAC/
Zabroušené jehly o průměrech 1,75mm, 2,0mm a 3,0 mm /SEVAC/
Horizontální nalévací stolek
Vodováha
Vlhká komora
Pravítko pro měření precipitačních prstenců /SEVAC/

Materiál

Agaróza čistá /Lachema/
Kyselina chlorovodíková p.a. /Lachema/
Kyselina octová koncentrovaná p.a. /Lachema/
Kyselina 5,5-dietylbarbiturátová p.a. a 5,5-dietylbarbiturát sodný /Lachema/
Chlorid sodný p.a. /Lachema/
Azid sodný /Lachema/
Amidočern 10B /Merck/
Metanol p.a. /Lachema/
Antisérum proti AFP /dar doc. Malbohana, ÚLB, 1.LF UK/

Roztoky

Barbitálový pufr I, pH 8,6, iontová síla 0,1

Barbitálový pufr II, pH 8,6

V destilované vodě za tepla rozpustit 3,68 g kyseliny 5,5-dietylbarbiturové, po ochlazení přidáme 20,6 g 5,5-dietylbarbiturátu sodného a dolijeme do 1000ml destilovanou vodou.

Fyziologický roztok c /NaCl/ = 9,0 g/l

Roztok Amidočerně 10 B

0,1 g Amidočerně 10 B a 10 ml koncentrované kyseliny octové mírně povaříme za stálého míchání a po ochlazení přidáme 90 ml metanolu a roztok zfiltrujeme.

Vypírací roztok

Připravíme ho smísením 500 ml metanolu, 100 ml koncentrované kyseliny octové a 400 ml destilované vody.

Příprava desek s agarózovým gelem (Ouchterlony)

1,3 g agarózy necháme nabobtnat v 67 ml destilované vody, pak přidáme 33,5 ml barbitálového pufru II a rozvaříme na vodní lázni. Pro konzervaci přidáme 10 mg azidu sodného. Potom na dobře očištěná a odmaštěná dia-skla umístěná přesně ve vodorovné poloze nalijeme pomocí pipety 8 ml rozvařené agarózy a necháme při pokojové teplotě alespoň 20 minut utuhnout ve vlhké komoře. Zbylý agarózový gel můžeme uchovávat několik dní při 4°C.

Příprava desek s agarózovým gelem obsahujícím protilátku (Manciniová)

0,19 g agarózy v 15 ml barbitálového pufru I rozvaříme na vodní lázni. Po ochlazení na 54°C smícháme s 0,06 ml vhodně ředěného antiséra proti AFP vytemperovaného v termostatu rovněž na 54°C. Po dokonalém promíchání nalijeme směs agarózy s antisérem na dobře očištěná a odmaštěná dia-skla umístěná ve vodorovné poloze a necháme při pokojové teplotě utuhnout ve vlhké komoře.

Provedení a hodnocení jednoduché RID dle Manciniové

Provedení:

Do vrstvy agarózového gelu obsahující antisérum proti AFP vykrojíme podle šablony pomocí zabroušené jehly o průměru 1,8 mm jamky, vzdálené od sebe 12 mm. Pomocí automatické pipety nanášíme přesně po horní okraj do prvních 4 – 6 jamek standardní roztoky a do ostatních vyšetřované vzorky plodové vody. Po nanesení vzorků uložíme desku přesně ve vodorovné poloze do vlhké komory a necháme při pokojové teplotě 48 hodin precipitovat. Potom desku 12 – 16 hodin

promýváme ve fyziologickém roztoku a 0,5 hodiny v destilované vodě. Po promytí desku volně sušíme zabaleno do filtračního papíru. Po usušení odstraníme filtrační papír a desku barvíme v roztoku Amidočerně 10 B po dobu 3-5 minut. Přebytečné barvivo odstraníme v lázni s vypíracím roztokem a usušíme při pokojové teplotě v kolmé poloze.

Hodnocení:

Průměr precipitačního prstence měříme pravítkem SEVAC. Z druhých mocnin průměrů precipitačních prstenců standardních roztoků sestojíme kalibrační křivku, ze které odečítáme koncentraci AFP ve vyšetřovaných vzorcích.

Dvojitá RID dle Ouchterlonyho

Provedení

Do ztuhlého agarózového gelu vykrojíme pomocí raznice jamky v hexagonálním uspořádání s centrálně umístěnou jamkou. Do periferních jamek nanašíme postupně řaděné antisérum proti AFP. Do centrální jamky naneseme plodovou vodu nebo sérum dospělého muže. Deska se uloží ve vodorovné poloze do vlhké komory a nechá se 20 – 24 hodin precipitovat. Poté se deska promývá 16 hodin ve fyziologickém roztoku a 0,5 hodiny v destilované vodě. Postup při barvení a sušení je stejný jako u jednoduché RID.

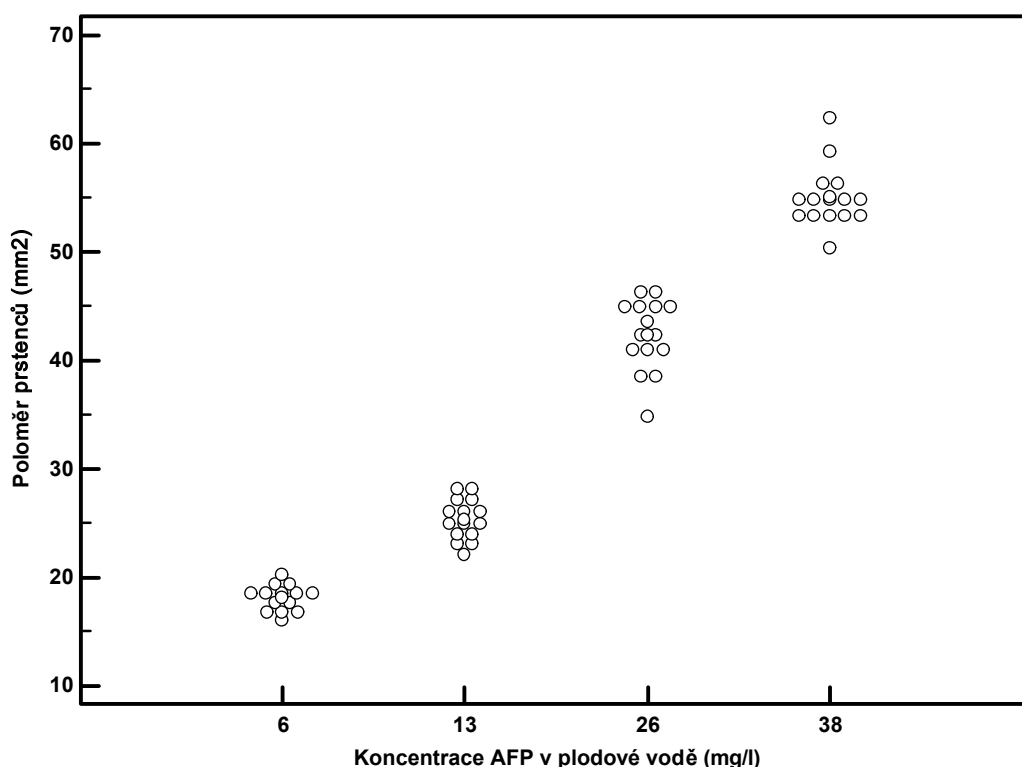
Hodnocení

Pozitivní reakce se projeví precipitační výraznou linií. Při negativní reakci není vidět žádná precipitační linie.

3.5. Srovnání imunoturbidimetrie a radiální imunodifúze

Radiální imunodifúze

Před měřením vzorků plodové vody pomocí RID bylo třeba tuto metodu okalibrovat. Koncentrace standardů jsme přitom volili ve stejném rozmezí jako v případě imunoturbidimetrie. Abychom odhadli vliv náhodných chyb měření spojených především s přípravou pracovní desky a její nehomogenitou, provedli jsme kalibraci na celkově 15 deskách. Pro srovnání jsme poté na každé desce změřili vzorky o známých koncentracích použitím příslušné kalibrace, viz obrázek 21. Zatímco střední hodnoty koncentrace odpovídají koncentracím vzorků (6, 13, 26 a 38 mg/l), rozptyl výsledků měření je relativně velký - viz tabulka 7, tak že krajní hodnoty pro sousední koncentrace se téměř překrývají. Další měření jsme proto prováděli na několika deskách, přičemž jsme měření opakovali i v rámci jedné desky, a výsledky nakonec zprůměrovali.



Obrázek 21: Měření vzorků o koncentraci AFP 6, 13, 26, a 38 mg/l na 15 samostatně zkalibrovaných deskách.

Koncentrace AFP vzorku (mg/l)	6	13	26	38
Kvadrát průměru prstence (mm ²)	18,0	25,3	42,3	55,0
SD	1,24	1,77	3,17	2,74
Variační koeficient %	6,89	7,00	7,49	4,98

Tabulka 7: Hodnocení 15 kalibračních křivek pro jednoduchou radiální imunodifúzi.

Opakovatelnost jsme kvantifikovali pomocí statistické analýzy. Pro opakovaná měření jsme spočetli průměr, směrodatnou odchylku a variační koeficient. Hodnoty charakterizující opakovatelnost v sérii, tj. v rámci jedné desky, ukazuje tabulka 7, opakovatelnost mezi seriemi, tj. při následných měření na různých deskách, udává tabulka 5. Výsledky naznačují, že rozptyl hodnot je menší pro měření na jedné desce (variační koeficient < 5 %) než při srovnání měření z různých desek (variační koeficient > 5 %). To potvrzuje, že příprava desky vnáší do měření náhodnou chybu, a je proto nutné výsledky průměrovat přes měření na několika deskách.

Vzorek č.	Počet měření	Průměrná koncentrace AFP (mg/l)	Směrodatná odchylka (mg/l)	Variační koeficient %
1	9	6,22	0,31	4,9
2	9	15,22	0,25	1,64
3	9	24,67	0,21	0,85

Tabulka 8: Opakovatelnost v sérii (v rámci jedné desky) pro RID.

Vzorek č.	Počet měření	Průměrná koncentrace AFP (mg/l)	Směrodatná odchylka (mg/l)	Variační koeficient %
2	15	16	1,03	6,43

Tabulka 9: Opakovatelnost mezi seriemi (na různých deskách) pro RID.

Imunoturbidimetrie

Imunoturbidimetrickou metodu stanovení AFP jsme otestovali validačními postupy. Opakovatelnost jsme určili z 6 následných měření pomocí průměru, standardní odchylky a variačního koeficientu, viz tabulka 10. U obou vzorků byl variační koeficient menší než 10 %. Výsledky naznačují, že směrodatná odchylka je v intervalu uvažovaných koncentrací pomalu se měnící veličinou. Z toho plyne, že variační koeficient roste s klesající koncentrací AFP ve vzorku.

Vzorek č.	Počet měření	Průměrná koncentrace AFP (mg/l)	Směrodatná odchylka (mg/l)	Variační koeficient %
1	6	8,19	0,58	7,04
2	6	16,12	0,49	3,06

Tabulka 10: Opakovatelnost v sérii pro imunoturbidimetrii.

Linearitu závislosti koncentrace AFP na absorbanci jsme otestovali ředěním analytů v poměru 1:2. Výsledné hodnoty včetně výtěžnosti R , definované jako

$$R = \text{naměřená hodnota} / \text{očekávaná hodnota} \cdot 100 [\%]$$

jsou uvedeny v tabulce 11.

Vzorek č.	Ředění	Naměřená koncentrace AFP (mg/l)	Očekávaná koncentrace AFP (mg/l)	Výtěžnost
1	neředěný	25,11	-	
	1:2	12,98	12,55	103,4 %
2	neředěný	19,5		
	1:2	11,0	9,75	112,8 %
3	neředěný	6,63	-	
	1:2	3,19	3,32	96 %

Tabulka 11: Test linearity pomocí dilučního pokusu.

Měřením „slepých“ vzorků (blank) jsme stanovili mez detekce a mez stanovitelnosti. Mez detekce udává minimální koncentraci, při které lze zachytit signál, jež je výrazně odlišný od šumu. Pro výpočet se užívá vzorce

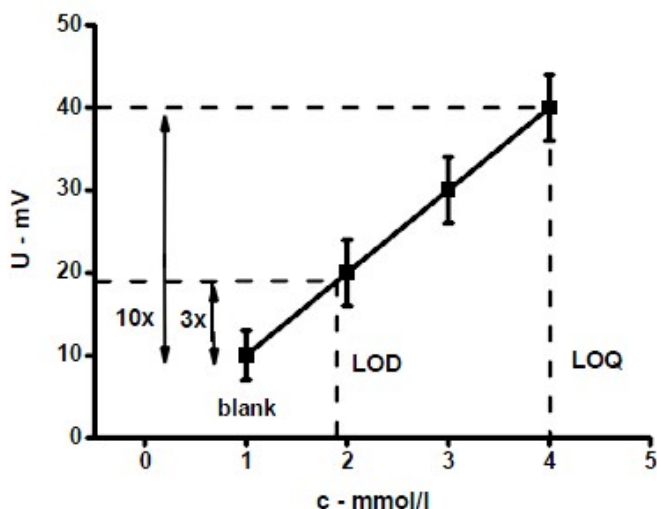
$$\text{LOD} = 3 * \text{SD}(\text{blank})$$

kde $\text{SD}(\text{blank})$ je standardní odchylka měření slepé zkoušky. Pokud určíme přítomnost látky na hranici LOD a za předpokladu, že všechna měření mají normální rozdělení se stejnými parametry, prokázali jsme přítomnost látky na 95 %.

Mez stanovitelnosti představuje nejmenší množství látky, které lze již spolehlivě kvantifikovat. Je definována jako desetinásobek směrodatné odchylky slepé zkoušky.

$$\text{LCQ} = 10 * \text{SD}(\text{blank})$$

Mez detekce z 10 měření blanku antiséra je 1,2 mg/l, mez stanovitelnosti 4 mg/l.

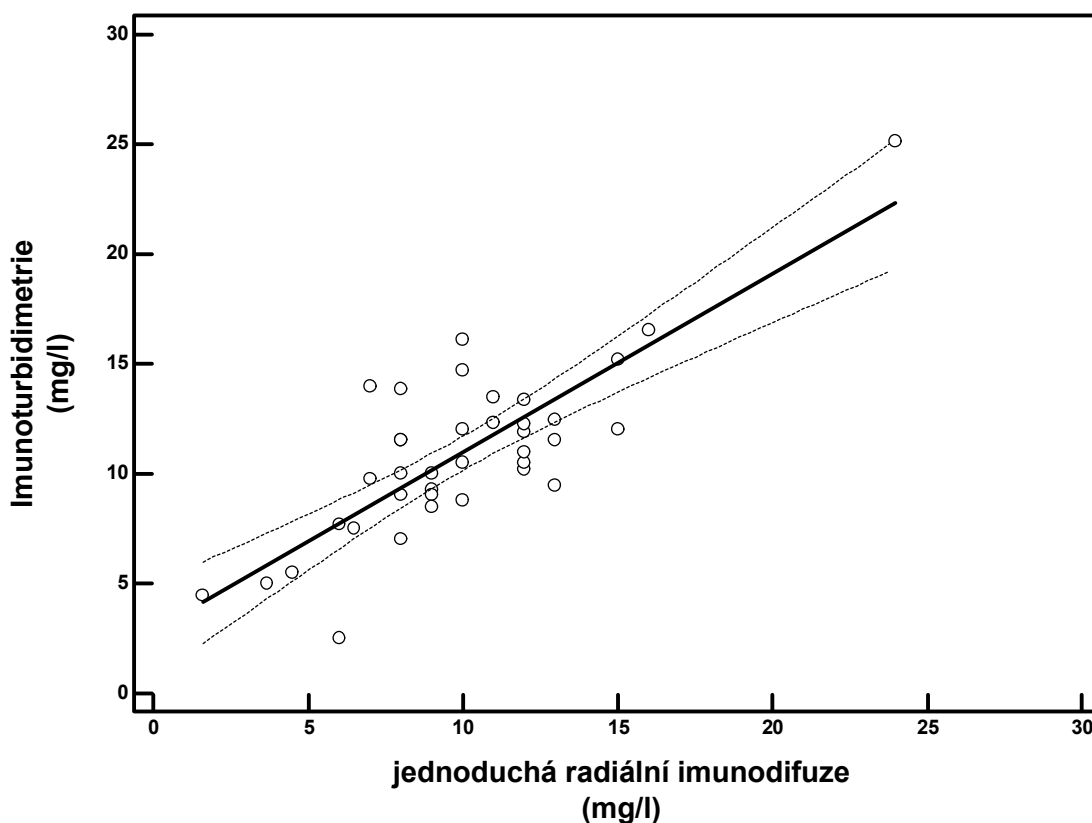


Obrázek 22: Příklad určení limitu detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ). Pro ilustraci byla zvolena potenciometrie jako modelová metoda. Měření slepé zkoušky odpovídá prvnímu bodu v grafu. LOD a LOQ jsou určeny jako body na ose x odpovídající trojnásobku a desetinásobku směrodatné odchylky na ose y .

Srovnání imunoturbidimetrie a radiální imunodifuze

Sadu vzorků plodových vod jsme změřili oběmi metodami. Výsledky jsou vyneseny na obrázku 23. V grafu je vyznačena také regresní přímka a její 95 % interval

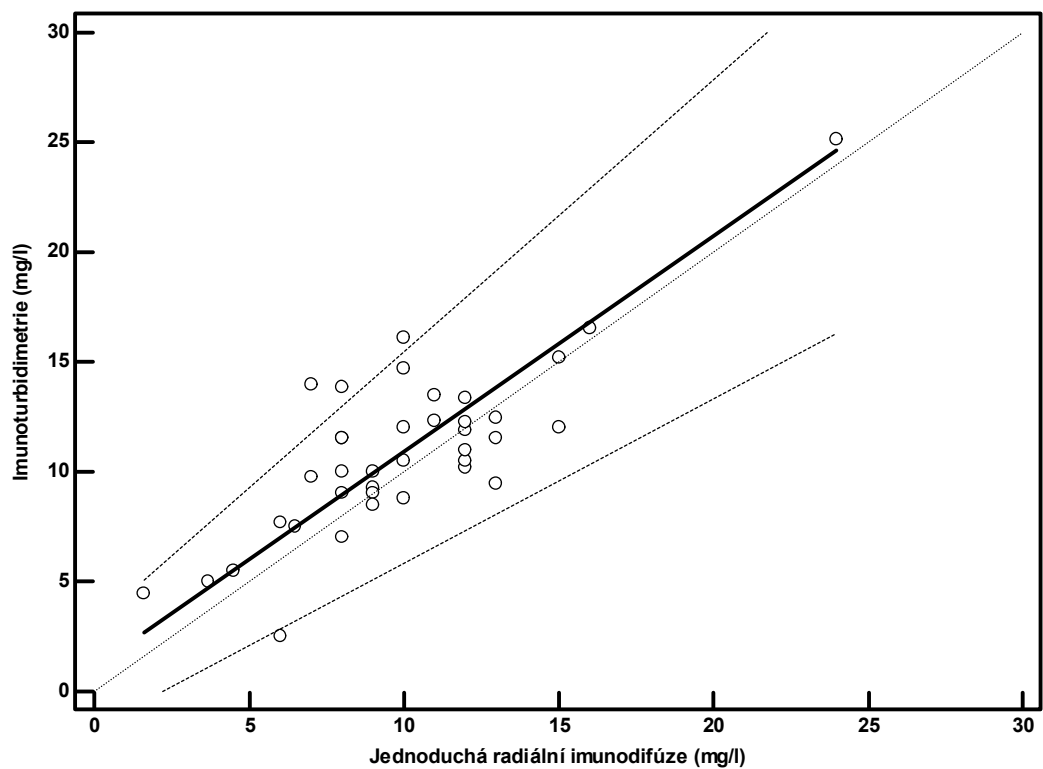
spolehlivosti. Jak můžeme vidět, několik bodů leží výrazně mimo interval spolehlivosti, což naznačuje nesoulad mezi měřeními pocházejícími z obou metod. Na druhou stranu je směrnice regresní přímky blízká jedné, což naznačuje, že průměrné koncentrace z obou metod jsou podobné.



Obrázek 23: Koncentrace AFP v plodové vodě měřená pomocí imunoturbidimetrie a jednoduché radiální imunodifuze. Plná čára je regresní přímka, čárkovaná čára je 95 % interval spolehlivosti.

Tomuto závěru nasvědčuje i obrázek 24, kde regresní přímka je spočítána Passing-Bablokovou metodou¹¹ [Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.49]. V tomto případě už většina dat spadá do intervalu spolehlivosti.

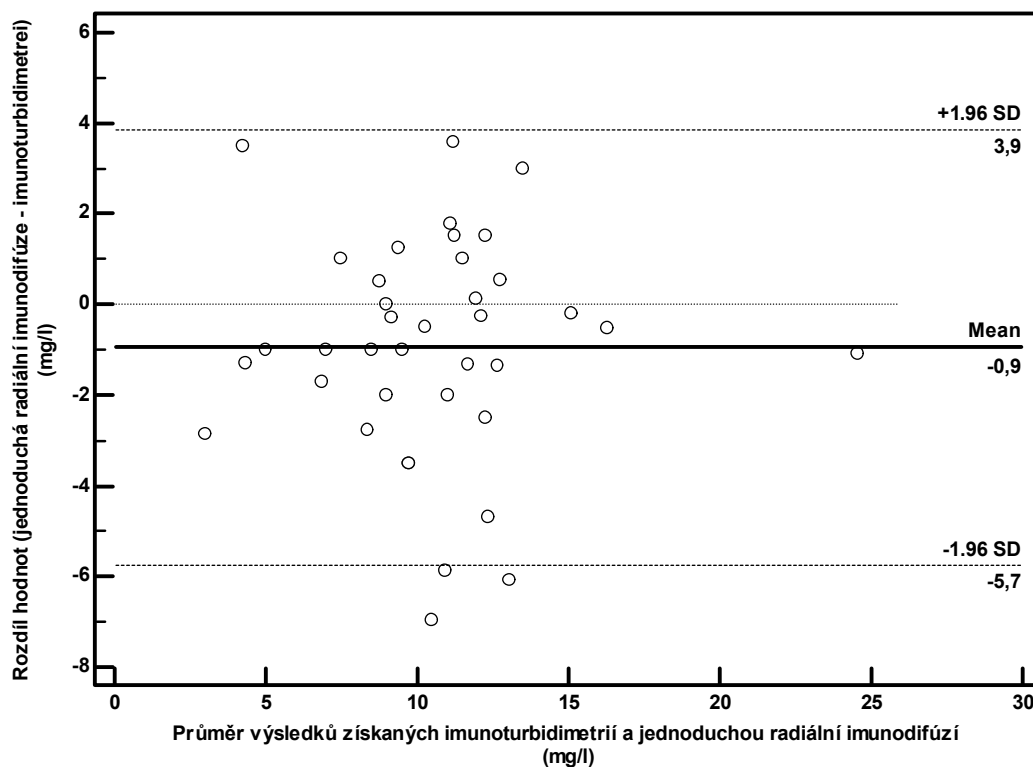
¹¹ Vyhodnocení bylo provedeno pomocí statistického programu MedCalc (Mariakerke , Belgie)



Obrázek 24: Porovnání jednoduché radiální imunodifúze a imuniturbidimetrie Passing-Bablokovou metodou.

Rozdílnost obou metod vystihuje Bland-Altmanův¹² graf, obrázek 25, kde vynášíme rozdíl výsledků obou metod versus jejich průměr pro jednotlivá měření. I zde vidíme, že střední hodnota rozdílů měření je blízká nule.

¹² Vyhodnocení bylo provedeno pomocí statistického programu MedCalc (Mariakerke , Belgie)



Obrázek 25: Bland-Altmanův graf průměrů a rozdílů měření metodami imunoturbidimetrie a jednoduché radiální imunodifúze.

Základem přístupu Blanda a Altmana je zvážení diferencí mezi oběma metodami. Z pohledu správnosti není mezi RID a imunoturbidimetrií výrazný systematický rozdíl (rozdíly jsou symetricky rozloženy kolem nuly). Přesnost je vymezena intervalem spolehlivosti jednotlivých rozdílů mezi těmito dvěma metodami.

4. kapitola

Počítačové zpracování

V klinické praxi bývá často za potřeby srovnat změřenou koncentraci AFP v plodové vodě s normální koncentrací typickou pro danou gestaci a vyhodnotit, zda se změřená koncentrace příliš neliší od normální. Pro tyto účely jsme vytvořili počítačový program, který umožňuje nalézt potenciálně patologická těhotenství v databázi obsahující údaje o hladině AFP v plodové vodě a době trvání těhotenství.

4.1. Algoritmus

Kriteriem, zda je těhotenství potenciálně patologické, je test, zda je hladina AFP v daném týdnu těhotenství vyšší než jistý násobek normy. Pokud koncentrace AFP v plodové vodě překročí normální hladinu vícekrát než je tento patologický násobek, udávaný pod zkratkou MOM, je těhotenství vyhodnoceno jako potenciálně patologické a mělo by být postoupeno další lékařské analýze. Pro aplikaci kritéria v programu je nutné pouze definovat normální hladinu AFP a MOM.

Hodnota MOM je nastavitelná uživatelem, pro testování programu jsme použili běžně užívanou hodnotu $MOM = 2.5$. Obtížnější je volba normální hladiny AFP. Normální hladina není přesně definovanou veličinou, neboť její rozptyl je značný i u plodových vod odebraných u zdravých plodů. Její hodnota se obvykle volí jako střední hodnota koncentrace AFP pro danou gestaci z velkého počtu vzorků plodových vod, které má klinická laboratoř k dispozici. V našem programu jsme normální hladinu určovali jako medián koncentrací stanovených v daném týdnu těhotenství. Medián není tak citlivý na přítomnost abnormálních hodnot jako střední hodnota, takže se tato volba hodí i pro méně obsáhlé databáze. Přesto by si měl být uživatel vědom toho, že u nízkého počtu zadaných vzorků roste šance falešné detekce.

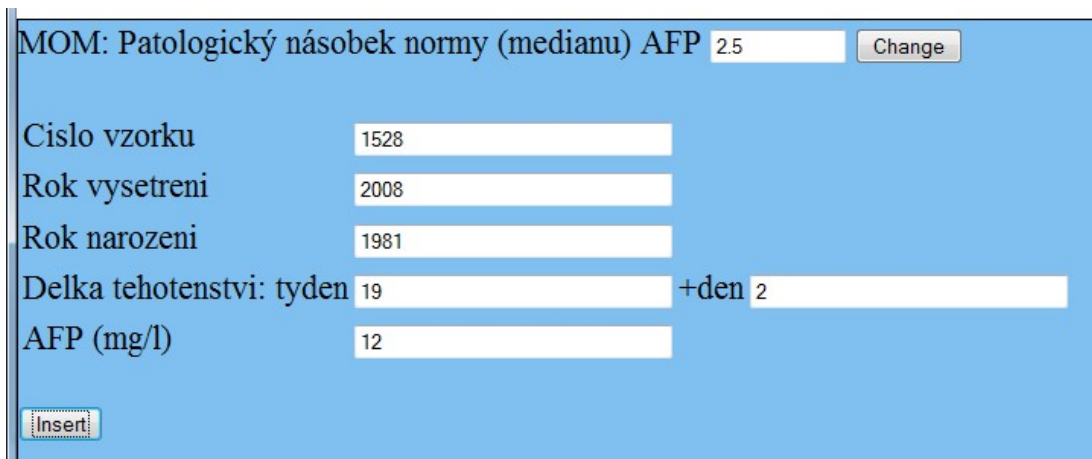
Při vkládání či odebírání údajů z databáze se medián vzorků u příslušného týdne těhotenství aktualizuje. Následně je přepočítán násobek nově určené normální

hladiny u vzorků se shodným týdnem těhotenství a určení patologie je znovu vyhodnoceno.

4.2. Uživatelské rozhraní

Algoritmus byl naprogramován v jazyce PHP, který umožňuje komunikaci přes uživatelsky příjemné rozhraní ve formě internetové stránky. Zdrojový kód je uveden v příloze. Zadávání vstupních údajů a zobrazování výsledků probíhá přes stránku http://lenulin.yc.cz/AFP_main.php.

Vstupní údaje jsou tvořeny relevantními informacemi o vzorku plodové vody. Především je to týden těhotenství a koncentrace AFP, která v tuto dobu byla změřena. Dále jsou to rok vyšetření a rok narození matky, z nichž je určen věk matky v době vyšetření, číslo vzorku a upřesnění delky těhotenství na dny. Tyto údaje sice neslouží k vyhodnocování patologie těhotenství, ale usnadňují orientaci v databázi a představují zajímavá fakta vhodná pro případné další statistické zpracování. Dalším nastavitelným parametrem je hodnota MOM. Ukázka formuláře pro zadávání vstupních dat je zobrazena na obrázku 26.



MOM: Patologický násobek normy (medianu) AFP 2.5

Cislo vzorku

Rok vysetreni

Rok narozeni

Delka tehotenstvi: tyden +den

AFP (mg/l)

Obrázek 26: Formulář pro zadání údajů o vzorku plodové vody.

Výsledné údaje po vyhodnocení vstupních informací jsou zapisovány do tabulky na téže stránce. Na základě vstupních údajů je vypočten věk matky a gestace ve dnech. Pro každý zadaný týden těhotenství je spočten medián všech vzorků se shodným týdnem gestace. U každého vzorku je pak zobrazen příslušný medián,

pomocí něhož byla vyhodnocena patologie. Ta je uvedena ve sloupci STAV a může nabývat hodnot NORMAL a PATOLOGIE. Každý řádek výsledné databáze je vybaven možností smazání. Snapshot výsledkové tabulky je ukázán na obrázku 27.

cislo vzorku	vysetrena	narozena	vek	gravidita (tyden)	gravidita (celk. dnu)	AFP (mg/l)	median	stav	
1528	2008	1981	27	19	135	12	13	NORMAL	Smazat
1529	2008	1973	35	16	117	10	14	NORMAL	Smazat
1556	2008	1975	33	17	119	15	19.5	NORMAL	Smazat
1557	2008	1982	26	19	139	11	13	NORMAL	Smazat
1558	2008	1974	34	18	127	14	10	NORMAL	Smazat
1559	2008	1980	28	22	154	8	8	NORMAL	Smazat
1560	2008	1973	35	17	119	22	19.5	NORMAL	Smazat
1325	2008	1972	36	17	120	18	19.5	NORMAL	Smazat
1326	2008	1968	40	17	120	17	19.5	NORMAL	Smazat
1327	2008	1973	35	13	91	8	8	NORMAL	Smazat
1328	2008	1972	36	17	119	21	19.5	NORMAL	Smazat
1329	2008	1969	39	16	118	21	14	NORMAL	Smazat
1330	2008	1984	24	21	152	18	18	NORMAL	Smazat
1102	2008	1968	40	15	111	25	26.5	NORMAL	Smazat
1105	2008	1973	35	16	112	15	14	NORMAL	Smazat
1106	2008	1976	32	16	112	14	14	NORMAL	Smazat
1108	2008	1975	33	15	108	300	26.5	PATOLOGIE	Smazat
943	2008	1975	33	18	132	10	10	NORMAL	Smazat
944	2008	1976	32	15	111	28	26.5	NORMAL	Smazat
1028	2008	1986	22	19	133	14	13	NORMAL	Smazat
1029	2008	1973	35	17	119	500	19.5	PATOLOGIE	Smazat
545	2008	1986	22	18	132	7	10	NORMAL	Smazat
546	2008	1966	42	19	135	16	13	NORMAL	Smazat
613	2008	1971	37	15	107	14	26.5	NORMAL	Smazat
647	2008	1972	36	16	112	12	14	NORMAL	Smazat
505	2008	1973	35	20	142	6	8	NORMAL	Smazat
539	2008	1982	26	20	143	10	8	NORMAL	Smazat

Obrázek 27: Ukázka vyhodnocení údajů o plodových vodách. Porovnáním hodnot AFP a jejich medianu pro daný týden těhotenství se určí stav NORMAL nebo PATOLOGIE.

Uvedená ukázka zachycuje testování programu, kdy jsme vyhodnocovali data plodových vod, která byla pořízena a analyzována různými lékaři. Otestovali jsme aktualizaci údajů při přidávání či odebrání dat, a také při změně hodnoty MOM. Přestože vytvořená databáze obsahuje jen několik málo údajů pro každý zadaný týden těhotenství, patologie byly odhaleny v souladu s lékařskými vyšetřeními.

Diskuze

Vyšetření plodové vody slouží k odhalení některých závažných vrozených vad plodu u těhotné ženy. Vyšetření se provádí v době, kdy je v souladu s platnou legislativou ještě možné těhotenství přerušit (do 24.týdne), a tím zabránit narození vážně postiženého dítěte. Matka na základě kompletních informací (diagnóza, prognóza, poradenství v sociální oblasti, apod.) rozhodne o dalším postupu. Jedná se o závažné a citlivé téma z mnoha úhlů pohledu a jsou tedy kladeny nároky na jednoznačnost a spolehlivost diagnózy, která se opírá o genetická vyšetření buněk plodu a biochemický průkaz markerů z plodové vody.

V naší práci jsme se zaměřili na stanovování významného biochemického markeru obsaženého v plodové vodě - AFP. Spolu s dalšími ukazateli (ACHE, GGT) je schopný přesvědčivě vypovídat o anatomických anomáliích. Ačkoli v současné době se vedle biochemické analýzy nabízí možnost diagnostiky strukturních vývojových vad podrobným ultrazvukovým vyšetřením s vysokým rozlišením, biochemické markery plodu budou stále signifikantní pro detekci některých metabolických poruch (např. cystická fibróza).

V laboratorní praxi se AFP může vyšetřovat metodou RID, která je poměrně náročná na provedení. Cílem našeho snažení bylo dosáhnout porovnatelných výsledků s RID jednodušší a rychlejší turbidimetrickou metodou. Následovala série vyladění (optimalizace) metody, vlastních experimentů, ověřování postupu dle doporučení pro validaci/verifikaci metod a posouzení shody mezi výsledky měření RID a imunoturbidimetrií. Z grafů srovnávající metody lze mezi výsledky pozorovat poměrně dobrou korelaci. Parametry přesnost¹³ a správnost¹⁴ obou měření vykazují srovnatelné hodnoty. S ohledem na tato zjištění, lze uvažovat o imunoturbidimetrii jako o další metodě vhodné pro stanovení AFP z plodové vody.

¹³ Přesnost je charakterizována rozptylem hodnot kolem průměru

¹⁴ Správnost znamená, že hodnoty dvou různých měření pro jednu jedinou koncentraci spolu korespondují.

Závěr

Otestovali jsme použití imunoturbidimetrie pro stanovení hladiny AFP. Metodu jsme optimalizovali pro aplikaci na stanovení koncentrace AFP v plodové vodě výběrem vlnové délky světelného záření a koncentrace specifického antisera. Ukázali jsme, že imunoturbidimetrie poskytuje srovnatelné výsledky jako jednoduchá radiální imunodifuze. Imunoturbidimetrie je navíc rychlejší a vhodnější pro automatizaci, radiální imunodifuze je příliš pracná. Přesnost obou metod není vysoká - variační koeficient je 5-10 % - avšak narozdíl od citlivějších metod jako ELISA (měření na úrovni ng/l) je vhodnější pro měření vyšších koncentrací AFP v mg/l množstvích. Mez detekce a mez stanovitelnosti imunoturbidimetrie jsme určili jako 1,2 mg/l a 4 mg/l.

Abychom mohli efektivně vyhledávat potenciálně patologická těhotenství, u nichž je v plodové vodě přítomna abnormální koncentrace AFP, vyvinuli jsme program, který srovnává koncentrace AFP u vyhodnocovaného vzorku s referenční hladinou. Tato referenční hladina není vstupním parametrem, nýbrž je počítána programem po každém přidání / odebrání vzorku plodové vody jako medián koncentrací AFP všech vzorků analyzovaných ve shodném týdnu těhotenství jako přidání / odebraný vzorek. Dle této definice, má referenční hladina při velkém počtu vzorků význam normální hladiny AFP v daném týdnu těhotenství.

Seznam použité literatury

1. Pedersen KO (1944) Fetuin, a new globulin isolated from serum. *Nature* 154: 575.
2. Bergstrand CG, Czar B (1956) Demonstration of a new protein fraction in serum from the human fetus. *Scand J Clin Lab Invest.* 8:174.
3. Abelev GI, Perova SD, Khramkova NI, Postnikova ZA, Irlin IS (1963) Production of Embryonal α -Globulin by Transplantable Mouse Hepatomas. *Transplantation* 1:174.
4. Masopust J, Kotal L (1965) *Ann Paediatr.* 204:138.
5. Gitlin D, Boesman M (1967) *Comp. Biochem. Physiol.* 21: 327.
6. Masopust J (2007) Alfa-fetoprotein – historie a význam jeho objevu. *Labor Aktuell* 02/07:8.
7. Mizejewski GJ (2001) Alpha-fetoprotein Structure and Function: Relevance to Isoforms, Epitopes and Conformational Variants. *Exp Biol Med* 226(5): 377.
8. Mizejewski GJ (2007) Physiology of Alpha-Fetoprotein as a Biomarker for Perinatal Distress: Relevance to Adverse Pregnancy Outcome. *Exp Biol Med* 232(8):993.
9. Brock DJH (1976) Alphafetoprotein and neural tube defects. *J Clin Pathol Suppl* 10:157-164.
10. Botto LD et al. (1999) Medical Progress: Neural-Tube Defects. *N Engl J Med* 341:1509.
11. Fialová L (2010) Vybrané imunochemické metody – Blok praktických cvičení z lékařské biochemie, <https://el.lf1.cuni.cz/p85879387/>
12. Taylor R, Krishna R (1993) Multicomponent mass transfer. John Wiley and sons: New York.
13. Heidelberger M, Kendall FE (1935) *J. Exp. Med.* 61:563–591.
14. Štern P. (2006) Současné možnosti turbidimetrie a nefelometrie. *Klin. Biochem. Metab.* 14:146.
15. Pohanka M (2010) Základy statistiky laboratorních experimentů. *Vojenské zdravotnické listy* 2:60,

http://www.vojenskaskola.cz/skola/uo/fvz/fakulta/Documents/VZL/2010/2_2010/5_Pohanka.pdf

16. <http://biochemie.upol.cz/doc/skripta/imch/>
17. Brock DJH et al. (1972) *Lancet* 2:191-194.
18. Leek AE et al. (1973) *Lancet* 2:385-386
19. Wald NJ et al. (1980) *Lancet* 1:368
20. Haddow JE et al. (1981) *Clin.Chem.* 27:133
21. Collaboration Study (1981) *Lancet* 2:321
22. Merkatz IR et al. (1984) *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 148:886
23. Cuckle HS et al. (1987) *Brit. J. Obstet. Gynecol.* 94:387
24. Wald NJ (1989) *Amer. J. Hum.Genet.* 44:586
25. Canick JA et al. (1990) *Prenat. Diag.* 10:546
26. Resta RG (1991) *Amer. J. Med. Genet.* 40:129
27. Haddow JE et al. (1992) *New Eng. J. Med.* 327:588
28. Wald NJ (1994) *Prenat. Diagn.* 14:707
29. Wald NJ et al. (2003) *Lancet* 361:835
30. Wald NJ et al. (2003) *Health Technol. Assess* 7(11):1
31. Platt LD et al. (2004) *Obstet. Gynecol.* 104:661
32. Dugoff L et al. (2004) *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 191:1446
33. Malone FD et al. (2005) *New Eng. J. Med.* 353:2001
34. Shulman G, Paul EM, Demers LM (1980) Amniotic fluid alpha-fetoprotein measurements by laser immunonephelometry. *Clin Chim Acta.* 108(1): 151-6
35. Masopust J. (2007) Alfa-fetoprotein – historie a význam jeho objevu (2.část). *Labor Aktuell* 03/07, ROCHE s.r.o. Diagnostics Division, 4 – 9
36. http://www.sci.muni.cz/ofiz/documents/imun_cvika.pdf
37. Pelczar J, Chan ECS, Krieg NR (1993) *Microbiology - Concepts and applications.* McGraw-Hill, Inc.
38. Wu Y, Liu S (2009) Immunosensing system for alpha-fetoprotein through boronate immunoaffinity column in combination with flow injection chemiluminescence. *Analyst.* 134(2):230-5.
39. http://orion.chemi.muni.cz/zakladni_pojmy_z_biochemie/page0184.htm
40. <http://www.bhlinc.com/CIRM/16/image008.jpg>
41. <http://www.toplekar.cz/laboratorni-hodnoty/afp-nadorovy-marker.html>

42. http://www.pathology.cz/media/laboratorni-prirucky/c-p-2_laboratorni_prirucka_cytogenetika.pdf
43. http://www.wikiskripta.eu/index.php/Amniocent%C3%A9za#cite_note-2
44. <http://www.pronatal.cz/prilohy/LP-02-SP-GL-01%20Laboratorn%C3%AD%20p%C5%99%C3%ADru%C4%8Dka%20GL.pdf>
45. <http://ukb.lf1.cuni.cz/web/lab-vysetreni/metody.html?task=detail&cid=464>
46. <http://www.biochrom.co.uk/product/24/biochrom-wpa-biowave-ii-uv-visible-spectrophotometer-with-life-science-methods.html>
47. http://www.vitrum.cz/trepacka-wisemix-vm-10-horizontalni-kruhovy-pohyb_k1192_p3378.html
48. http://www.denverinstrument.com/denverusa/electrochemistry/UltraBasic_benchmark_top_meters.php
49. http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/publik/Kap_6_Passing-Bablok.pdf
50. Mizejewski GJ (2004) Biological Roles of Alpha-Fetoprotein During Pregnancy and Perinatal Development. *Exp Biol Med* 229(6):439
51. <http://atlasgeneticsoncology.org/Deep/MappingAFPID20077.html>
52. http://www.google.de/imgres?q=Rayleigh-Streuung+Mie-Streuung&start=336&hl=cs&biw=1280&bih=639&tbm=isch&tbnid=HgVq_O7z3D2ZM:&imgrefurl=http://www.labexchange.com/en/buy-devices/d/%3Fsn%3D14250&docid=c9v1OIJWPDnpjM&imgurl=http://www.labexchange.com/products/technical/08442-image006.jpg&w=474&h=296&ei=ikWzT8X4CKml0QW2zuyTCQ&zoom=1&iact=hc&vpx=693&vpy=4&dur=70&hovh=177&hovw=284&tx=114&ty=103&sig=106195474370701002941&page=16&tbnh=112&tbnw=180&ndsp=22&ved=1t:429,r:19,s:336,i:148
53. <http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/MBIOZ/3%20Proteosynteza.pdf>

Přílohy

1. Zdrojový kód programu

```
<!DOCTYPE html PUBLIC "-//W3C//DTD XHTML 1.0 Strict//EN"
"http://www.w3.org/TR/xhtml1/DTD/xhtml1-strict.dtd">
<html xmlns="http://www.w3.org/1999/xhtml" xml:lang="cs" lang="cs">
<head>
  <meta http-equiv="content-type" content="text/html; charset=windows-
1250">
  <meta name="author" content="Lenka Burešová" />
  <meta http-equiv="copyright" content="©2010 LeBure" />
  <link rel="stylesheet" type="text/css" href="st.css"/>

  <title>main</title>
</head>

<!--<? echo '<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>' ?>
<!DOCTYPE html PUBLIC "-//W3C//DTD XHTML 1.0 Strict//EN"
"http://www.w3.org/TR/xhtml1/DTD/xhtml1-strict.dtd">
<html xmlns="http://www.w3.org/1999/xhtml" xml:lang="en" lang="cz">
  <head>
    <meta http-equiv="content-type" content="text-html; charset=utf-8" />
    <meta http-equiv="author"
content="Lenka Burešová" />
    <meta http-
equiv="copyright" content="©2010 LeBure" />
    <title>main</title>
  </head>    -->

<body>
<div id="stranka">

<?
function ValidujCislo($cislo)
{
    if (!is_numeric($cislo))
    {
        echo '<p>Promenná
'.htmlspecialchars($cislo).' musí být číslo. </p>';
        return 0;
    }
    else
    {
        return 1;
    }
}

function median($arr) {
```

```

        if (!is_array($arr))
            $arr = func_get_args();
        sort($arr);
        $count = count($arr); //total numbers in array
        $middleval = floor(($count-1)/2); // find the middle value, or the lowest
middle value
        if($count % 2) { // odd number, middle is the median
            $median = $arr[$middleval];
        } else { // even number, calculate avg of 2 medians
            $low = $arr[$middleval];
            $high = $arr[$middleval+1];
            $median = (($low+$high)/2);
        }
        return $median;
    }
?>

<?
$tlac="";
$error=1;
$vzorek="";
$rokv="";
$rokn="";
$tyden="";
$den="";
$AFP="";

if (isset($_REQUEST['tlac']))
{
    $tlac=$_REQUEST['tlac'];
}

if (isset($_REQUEST['mom'])){
    $mom=$_REQUEST['mom'];
    if(!ValidujCislo($mom)){
        $mom=2.5;
        echo "MOM nastaven na hodnotu ", $mom;
    }
}
else{
    $mom=2.5;
}

if ($tlac=="insert"){
    if (isset($_REQUEST['vzorek'])){
        $vzorek=$_REQUEST['vzorek'];
        // $error=$error*ValidujCislo($vzorek);
    }
}

```



```

else{
    echo "vzorek je povinná promenná";
    $err=0;
}
if (isset($_REQUEST['rokv'])){
    $rokv=$_REQUEST['rokv'];
    // $err=$err*ValidujCislo($rokv);
}
else{
    echo "rokv je povinná promenná";
    $err=0;
}
if (isset($_REQUEST['rokn'])){
    $rokn=$_REQUEST['rokn'];
    // $err=$err*ValidujCislo($rokn);
}
else{
    echo "rokn je povinná promenná";
    $err=0;
}
if (isset($_REQUEST['tyden'])){
    $tyden=$_REQUEST['tyden'];
    $err=$err*ValidujCislo($tyden);
}
else{
    echo "tyden je povinná promenná";
    $err=0;
}
if (isset($_REQUEST['den'])){
    $den=$_REQUEST['den'];
    $err=$err*ValidujCislo($den);
}
else{
    echo "den je povinná promenná";
    $err=0;
}
if (isset($_REQUEST['AFP'])){
    $AFP=$_REQUEST['AFP'];
    $err=$err*ValidujCislo($AFP);
}
else{
    echo "AFP je povinná promenná";
    $err=0;
}
if($err){
    // nacteni dat pro novy median
    $soubor= fopen("tabulka.csv", "r");
    $array=file('tabulka.csv');
    $j=-1; $md=array();
    for ($i=0; $i<count($array); $i++):

```

```

    if (trim($array[$i])!=""):
        $pole= explode(';', $array[$i]);
        if($pole[3]==$tyden): // tyden radku se shoduje s tydnom nove
pridavaneho radku
            $j=$j+1;
            $md[$j]=$pole[5];
        endif;
    endif;
endfor;
fclose($soubor);
$md[$j+1]=$AFP;
$med=median($md);
// aktualizace dat
$soubor= fopen("tabulka.csv", "r+");
$array=file('tabulka.csv');
for ($i=0; $i<count($array); $i++):
    if (trim($array[$i])!=""):
        $pole= explode(';', $array[$i]);
        if($pole[3]==$tyden):
            $radek=
$pole[0].';'. $pole[1].';'. $pole[2].';'. $pole[3].';'. $pole[4].';'. $pole[5].';'. $med.';';
            else:
                $radek=
$pole[0].';'. $pole[1].';'. $pole[2].';'. $pole[3].';'. $pole[4].';'. $pole[5].';'. $pole[6].';';
                //$radek= trim($array[$i]);
            endif;
            fwrite($soubor,$radek."\\r\\n");
        endif;
    endfor;
    $radek= $vzorek.';'. $rokv.';'. $rokn.';'. $tyden.';'. $den.';'. $AFP.';'. $med.';';
    fwrite($soubor,$radek."\\r\\n");
    fclose($soubor);
    echo "Data inserted into the table";
}
else{
    $tlac="correct";
}
}

if($tlac=="del"):
    $id=$_REQUEST['id'];
    $soubor= fopen("tabulka.csv", "r");
    $array=file('tabulka.csv');
    $imax=count($array);
    $j=-1;
    for ($i=0; $i<$imax; $i++): // prvni prohledka pro ziskani tydne tehotenstvi
odstranovaneho radku
        if (trim($array[$i])!=""):
            //echo $array[$i];
            $j=$j+1;

```

```

    if ($j==$id):
        $pole= explode(';', $array[$i]);
        $tyden=$pole[3];
    endif;
endif;
endfor;
$j=-1; $k=-1; $md=array();
$soubor2= fopen("temp.csv", "w");
for ($i=0; $i<$imax; $i++):
    if (trim($array[$i])!=""):
        $j=$j+1;
        if ($j!=$id):
            $pole= explode(';', $array[$i]);
            $radek=
            $pole[0].';'. $pole[1].';'. $pole[2].';'. $pole[3].';'. $pole[4].';'. $pole[5].';'. $pole[6].';' ;
            fwrite($soubor2, $radek. "\r\n");
            if ($pole[3]==$tyden): // tyden radku se shoduje s tydnom nove
            pridavaneho radku
                $k=$k+1;
                $md[$k]=$pole[5];
            endif;
        endif;
    endif;
endfor;
fclose($soubor);
fclose($soubor2);
$med=median($md);
$soubor= fopen("tabulka.csv", "w");
$soubor2= fopen("temp.csv", "r");
$array=file('temp.csv');
for ($i=0; $i<count($array); $i++):
    if (trim($array[$i])!=""):
        $pole= explode(';', $array[$i]);
        if ($pole[3]==$tyden):
            $radek=
            $pole[0].';'. $pole[1].';'. $pole[2].';'. $pole[3].';'. $pole[4].';'. $pole[5].';'. $med.';' ;
        else:
            $radek=
            $pole[0].';'. $pole[1].';'. $pole[2].';'. $pole[3].';'. $pole[4].';'. $pole[5].';'. $pole[6].';' ;
            //$radek= trim($array[$i]);
        endif;
        fwrite($soubor, $radek. "\r\n");
    endif;
endfor;
fclose($soubor2);
fclose($soubor);
echo "Data successfully deleted.";
endif;
?>
<form method="get" action="AFP_main.php">

```

```

MOM: Patologický násobek normy (medianu) AFP <input name="mom"
value="<?echo $mom?"size="10"/>
<button type="submit" >Change</button>
</form>
<br/>

```

```

<?if($tlac=="correct"):
?>
<form method="get" action="AFP_main.php">
<table border=0>
<tr><td>Cislo vzorku</td><td><input name="vzorek" value="<?echo
$vzorek?"size="30"/></td></tr>
<tr><td>Rok vysetreni</td><td><input name="rokv" value="<?echo
$rokv?"size="30"/></td></tr>
<tr><td>Rok narozeni</td><td><input name="rokn" value="<?echo
$rokn?"size="30"/></td></tr>
<tr><td>Delka tehotenstvi: tyden</td><td><input name="tyden"
value="<?echo $tyden?"size="30"/></td><td>+den</td><td><input
name="den" value="<?echo $den?"size="30"/></td></tr>
<tr><td>AFP (mg/l)</td><td><input name="AFP" value="<?echo
$AFP?"size="30"/></td></tr>
</table>
<p>
<button type="submit" >Insert</button>
<input type="hidden" name="tlac" value="insert"/>
</p>
</form>
<?else:
?>
<form method="get" action="AFP_main.php">
<table border=0>
<tr><td>Cislo vzorku</td><td><input name="vzorek"size="30"/></td></tr>
<tr><td>Rok vysetreni</td><td><input name="rokv" size="30"/></td></tr>
<tr><td>Rok narozeni</td><td><input name="rokn" size="30"/></td></tr>
<tr><td>Delka tehotenstvi: tyden</td><td><input
name="tyden"size="30"/></td><td>+den</td><td><input
name="den"size="30"/></td></tr>
<tr><td>AFP (mg/l)</td><td><input name="AFP" size="30"/></td></tr>
</table>
<p>
<button type="submit" >Insert</button>
<input type="hidden" name="tlac" value="insert"/>
</p>
</form>
<?endif;
?>

```

```

<table border=1 width="\80%" >
<thead>
<tr>

```

```

        <td>cislo vzorku</td>
        <td>vysetrena</td>
        <td>narozena</td>
        <td>vek</td>
        <td>gravidita (tyden)</td>
        <td>gravidita (celk. dnu)</td>
        <td>AFP (mg/l)</td>
        <td>median</td>
        <td>stav</td>
        <td></td>
    </tr>
</thead>
<tbody>
<?
    $soubor= fopen("tabulka.csv", "r");
    $array=file('tabulka.csv');
    for ($i=0; $i<count($array); $i++):
        if (trim($array[$i])!=""):
            //echo $i," ",$array[$i];
            $pole= explode(';', $array[$i]);
            $vek= $pole[1]-$pole[2];
            $gravtot= 7*$pole[3]+$pole[4];
            if($pole[5]>$mom*$pole[6]):
                $stav="PATOLOGIE";
            else:
                $stav="NORMAL";
            endif;
            echo " <tr><td width=\"8%\" align=\"right\">$pole[0]</td>
                <td width=\"8%\" align=\"right\">$pole[1]</td>
                <td width=\"8%\" align=\"right\">$pole[2]</td>
                <td width=\"8%\" align=\"right\">$vek</td>
                <td width=\"8%\" align=\"right\">$pole[3]</td>
                <td width=\"8%\" align=\"right\">$gravtot</td>
                <td width=\"8%\" align=\"right\">$pole[5]</td>
                <td width=\"8%\" align=\"right\">$pole[6]</td>
                <td width=\"8%\" align=\"center\">$stav</td>
                <td width=\"8%\" align=\"center\"><a
href=\"AFP_main.php?tlac=del&id=$i\">Smazat</a></td>
                </tr>";
            endif;
        endfor;
    fclose($soubor) ;
?>
</tbody>
</table>

</div>
</body>
</html>

```