

Az immunanalitikai módszerek kialakulásának áttekintése

Az immunanalitikai módszerek közül legrégebben a *radioimmunoassay* (RIA) használatos. Megteremtése *Yalow* és *Berson* nevéhez fűződik [1, 2]. *Yalow* a radioimmunoassay felfedezéséért 1977-ben orvosi-fiziológiai Nobel-díjat kapott. Az elmúlt húsz év alatt a RIA methodiaki téren igen nagymértékben fejlődött. Jelentősen bővült alkalmazási területe is. Amíg ez kezdetben jórészt az endokrinológiai kutatásokra korlátozódott, addig jelenleg több száz hormon, gyógyszer és más vegyület rendszeresen végzett meghatározására terjed ki. Különösen olyan esetekben nélkülözhetetlen analitikai módszer, amikor kis térfogatú mintákban pikogramnyi-nanogramnyi anyagmennyiséget kell meghatározni.

A hatvanas évek közepe táján terjedtek el a kereskedelmi forgalomban a RIA készletek, amelyek az adott vegyület meghatározásához szükséges összes reagenst tartalmazzák. Jelenleg százánál többre tehető azoknak a cégeknek a száma, amelyek RIA készleteket hoznak forgalomba.

A hetvenes évek elején jelentek meg a nem radioizotópos immunanalitikai eljárások, pl. az *enzimmunoassay*, *fémimmunoassay*, *fluoreszcencia- és spinimmunoassay*. Ezek egy része csupán elméleti jelentőségű vagy pedig csak speciális területeken alkalmazható, számottevő gyakorlati jelentőséggel jelenleg csak az *enzimmunoassay* rendelkezik.

Az alkalmazási terület nagysága, az elterjedtség és érzékenység tekintetében a RIA jelentősége kiemelkedő. Kevés kivételtől eltekintve a nem radioizotópos eljárások alapelve megegyezik a RIA alapjával.

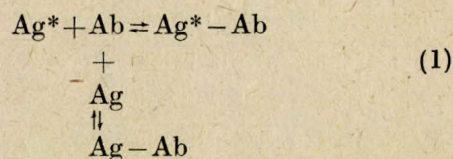
A radioimmunalitikai módszerek elméleti alapjai

A radioimmunoassay s egyben a radioimmunanalitika kialakulása 1959—60-ra tehető. Ekkor jelent meg *Yalow* és *Berson* közleménye a humán inzulin meghatározására alkalmas új módszerről [1, 2]. Ez azon a felismerése alapult, hogy

- A humán inzulint az ellene képződött antitest megköti.
- A ^{131}I -dal jelzett inzulin ugyancsak kötődik az antitesthez.
- A jelzett és nem jelzett inzulin vetélkedik az antitest kötőhelyeiért, s a vetélkedés eredménye képpen az antitesthez kötött, ^{131}I -dal jelzett inzulin mennyisége a nem jelzett inzulin mennyiségének növekedésével csökken.
- A kötött és szabad, ^{131}I -dal jelzett inzulin arányából az ismeretlen mennyiségű inzulint tartalmazó minta inzulintartalma meghatározható.

* MTA Izotóp Intézete, Budapest

Az inzulin és a radiojóddal jelzett inzulin vetélkedését az antitest kötőhelyeiért az (1) egyenlet szemlélteti:



amelyben Ab az antitest, Ag az antigént, jelen esetben az inzulint jelenti, Ag* pedig a radiojóddal jelzett antigént.

Antigénnek, esetenként immunogénnek azokat az anyagokat nevezik, amelyek valamely szervezetbe kerülve a fehérjeszintézist oly módon változtatják meg, hogy az élettani körülmények között keletkező fehérjék mellett az adott antigént specifikusan megköti fehérjék (antitestek) is keletkeznek. Az antitest-antigén reakció megfordítható, egyensúlyra vezető folyamat, a keletkező komplex stabilitási állandója:

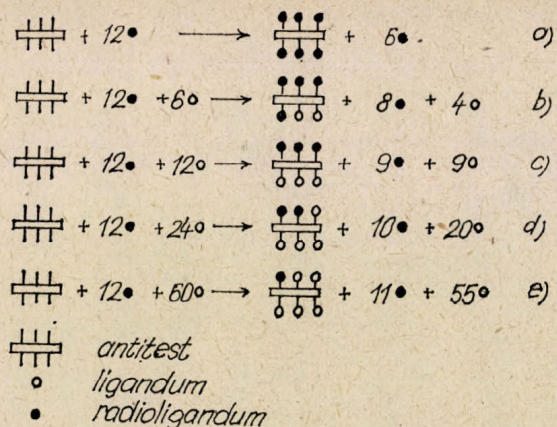
$$K_s = \frac{(\text{Ag} - \text{AB})}{(\text{Ag})(\text{Ab})} \quad (2)$$

rendszerint igen nagy, sok esetben eléri a 10^9 — 10^{10} l/mol-t is.

Az immunanalitika jellegzetessége, hogy a meghatározandó vegyület és az azt specifikusan megköti reagens egymással antigén—antitest kapcsolatban áll. Az antitest valamely kísérleti állatnak (nyúl, tengerimalac stb.) az antigénnel történő immunizálása révén állítható elő. Sikeres immunizálás esetén a kísérleti állat vére több millió meghatározáshoz elegendő antitestet tartalmaz.

Kis relatív molekulatömegű anyagok nem váltanak ki immunválaszt, hatásukra antitest nem keletkezik. Nagyobb hordozó molekulához (pl. polilizin, albumin stb.) kapcsolva azonban olyan antitest képződését váltják ki amely mind a hordozó molekulát, mind pedig az ahhoz kapcsolt ún. hapént specifikusan megköti.

Az antigén és a radioaktív izotóppal jelzett antigén vetélkedését az antitest szubsztöchiometrikus mennyiségű kötőhelyeiért szemléletesen az 1. ábra mutatja be. Ezen azt az esetet tüntettük fel, amikor 6 antitest-kötőhely 12 molekula jelzett antigénnel és növekvő mennyiségű nem jelzett antigénnel lép kölcsönhatásba. A nem jelzett antigén mennyiségének növelésével csökken az antitesthez kötött jelzett antigén mennyisége. A kötött jelzett antigén mennyiségét a nem jelzett antigén mennyiségének függvényében ábrázolva a 2. ábrán bemutatott görbét kapjuk, amelyet kalibrációs, standard vagy dózis-válasz görbének neveznek. A dózis-válasz görbe ordinátáján válaszparaméterként a kötött jelzett antigén aktivitását szokás feltüntetni cpm-ben vagy pedig a zérus antigénmennyiséghez tartozó aktivitás százalékában. Az ismeretlen antigénmennyiséget úgy kapják meg, hogy a minta esetében mért válaszpara-

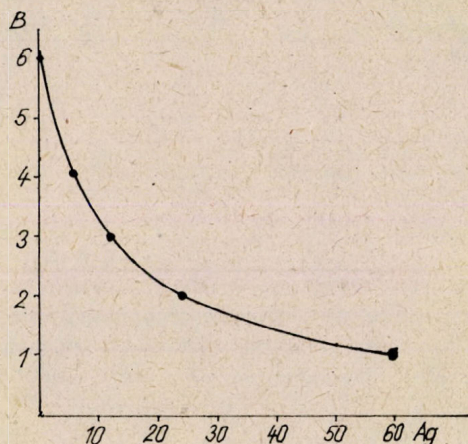


1. ábra. A radioimmunoassay elvi vázlata
 Állandó mennyiségű antitest kötőhelyeiért állandó mennyiségű radioligandum és növekvő mennyiségű ligandum vetélkedik

méterhez tartozó antigénmennyiséget a kalibrációs görbéről leolvassák.

A RIA alapelve nem korlátozódik az antigén—antitest kölcsönhatáson alapuló eljárásokra, hanem kiterjeszhető olyan rendszerekre is, amelyekben az antitestet olyan szérumfehérje helyettesíti, amelyik a meghatározandó vegyületet specifikusan megköti. Az első ilyen, *vetélkedő fehérjekötési analízisnek* nevezett eljárást *Ekins* dolgozt ki a tiroxin meghatározására [3]. A tiroxint specifikusan megkötő reagensként tiroxinkötő globulint alkalmazott.

A radioimmunanalitikai eljárások elnevezése terén a szakirodalom nem egységes. Különösen az angol nyelvű irodalom alkalmaz esetenként eltérő nevet azonos módszerekre, ami sok esetben félreértés forrása lehet. Nem szerencsés a *vetélkedő fehérjekötési analízis* elnevezés sem, hiszen az antitest is fehérje, s ezért elvileg a RIA is a CPBA egyik változata lenne. Újabban egyre gyakrabban alkalmazzák a *radioligandassay* elnevezést a RIA elvén alapuló eljárásokra, függetlenül attól, hogy a meghatározandó vegyületet specifikusan megkötő fehérje antitest-e vagy sem [4]. Utóbbi gyűjtőneve *recep-*

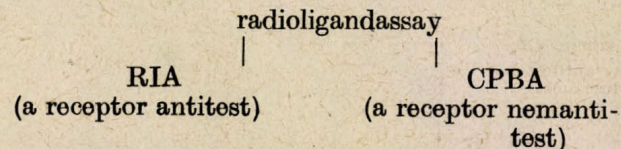


2. ábra. Az 1. ábrán bemutatott piktogram alapján számított kalibrációs görbe

Az ordinátán az antitesthez kötött, radioaktív izotóppal jelzett antigén mennyiségét (B) tüntettük fel a nem jelzett antigén mennyiségének (Ag) függvényében

tor, a meghatározandó vegyületé *ligandum*, ennek radioaktív izotóppal jelzett változatáé pedig *radioligandum*.

A radioligandassay elnevezés egyrészt utal arra, hogy a módszer radioaktív izotóp alkalmazásán alapszik, másrészt pedig lehetővé teszi az elhatárolást a nem radioizotóppal jelzett ligandumot alkalmazó eljárásoktól. A radioligandassay, RIA és CPBA kapcsolatát az alábbi vázlat szemlélteti:



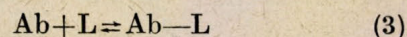
Általában a radioligandassay körébe egyensúlyi eljárások tartoznak, a nem egyensúlyi módszereket megkülönböztető névvel jelölik.

A nem egyensúlyi eljárások egy része csupán annyiban különbözik az egyensúlyi módszerektől, hogy a receptorhoz kötött és szabad ligandum elválasztása az (1) egyenletben feltüntetett folyamatok egyensúlyának elérése előtt történik. Az inkubációs idő csökkenését szolgáló nem egyensúlyi módszereknél az inkubációs időt minden egyes mintánál szigorúan azonos értéken kell tartani. Ez a feltétel speciális készülékkel biztosítható. Ilyen pl. a UNION CARBIDE CENTRIA készüléke, amelyik a minták inkubálását pillanatszerűen egyazon időben állítja le, s így a meghatározás időigénye néhány órától 10—15 percre csökkenthető.

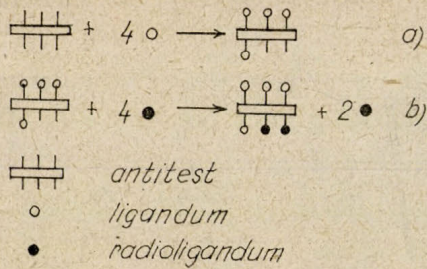
A RIA, ennek nem egyensúlyi változata (CENTRIA) és a CPBA vetélkedő eljárások a ligandum és a radioligandum azonos eséllyel vetélkedik a receptor kötőhelyeiért. Következésképpen a ligandum—radioligandum arány a receptorhoz kötött és szabad állapotban azonos.

Szekvenciális telítési analízis

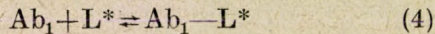
Elsőként *Hales* és *Randle* között olyan radioimmunanalitikai eljárást, amelyben a ligandum és radioligandum nem vetélkedik az antitest kötőhelyeiért [5]. A módszert *szekvenciális telítési analízisnek* nevezik. Ellentétben az előzőekben ismertetett eljárásokkal (RIA és CPBA) ez esetben a ligandum és radioligandum nem egyidejűleg, hanem egymást követően reagál az antitesttel. Első lépésben a vizsgált mintában levő ligandum megkötődik a főlegben alkalmazott antitest kötőhelyein (3a ábra), majd ezt követően a reakcióelegyhez adott radioligandum elfoglalja az előző lépésben szabadon maradt kötőhelyeket (3b ábra). A ligandum mennyiségét ez esetben is kalibrációs görbe segítségével kapjuk meg, amelyen az antitesthez kötött radioligandum aktivitását ábrázoljuk a ligandum mennyiségének függvényében. A szekvenciális telítési analízis nem egyensúlyi eljárás. Az első lépésben lejátszódó



folyamat, amelyben L a ligandumot jelöli, megfordítható és egyensúlyra vezető. Mivel az $\text{Ab} - \text{L}$ komplex disszociációja igen lassú a második lépésben lejátszódó kölcsönhatás



3. ábra. A szekvenciális telítési analízis elvi vázlata
 a) az antitest kötőhelyein a szubsztöchiometrikus mennyiségű ligandum megkötődik;
 b) a radioligandum telíti az antitest szabad kötőhelyeit, s a főlőleg szabadon marad



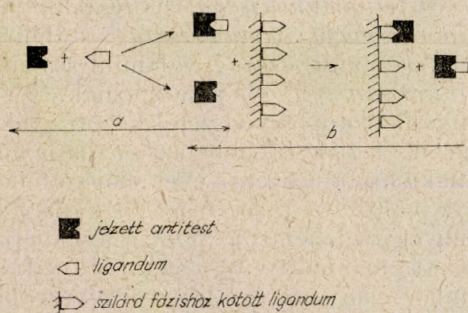
egyensúlyának kialakulásához szükséges idő alatt az $Ab-L$ komplex nem disszociál. A (4) egyenletben L^* a radioligandumot jelenti, Ab_1 pedig a nem jelzett ligandum által el nem foglalt antitestet. Következésképpen — amint azt a 3. ábra is szemlélteti — csak a radioligandum oszlik meg az antitesthez kötött és nem kötött állapot között, a ligandum teljes mennyisége az antitesthez kötődik.

A szekvenciális telítési analízis esetében a kalibrációs görbe meredeksége nagyobb, mint az egyensúlyi módszereknél (RIA vagy CPBA), ami együtt jár a legkisebb kimutatható mennyiség csökkenésével, azaz az érzékenység növekedésével.

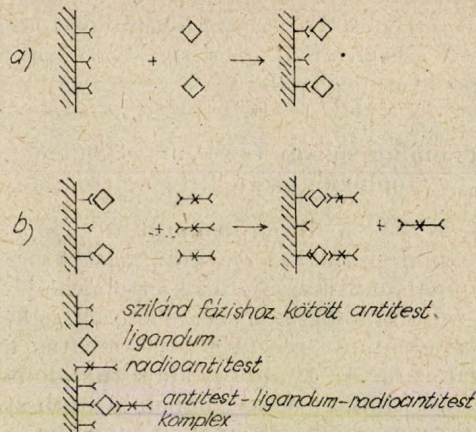
Immunoimmunoanalízis

Az IRMA egyik jellegzetessége, hogy nem a ligandumot, hanem az antitestet jelzik radioizotóppal. A módszer elvét a 4. ábra szemlélteti. Első lépésben a meghatározandó ligandum radioantitest feleslegével reagál, az egyensúly beállta után ligandum—radioantitest komplex és szabad radioantitest van jelen a reakcióelegyben (4a ábra). Második lépésben szilárd fázishoz kapcsolt ligandum feleslegét adják a rendszerhez, amely megköti a szabad radioantitestet (4b ábra). A szilárd fázis eltávolítása után a mintában jelenlevő ligandumhoz kötött radioantitest marad oldatban. Az oldat aktivitása ily módon a ligandum mennyiségével növekszik, a kalibrációs görbe lefutása ezért fordítottja a 2. ábrán bemutatottnak.

Az IRMA egyik változata a „szendvics” IRMA, amelynél a mintát először szilárd fázishoz kapcsolt



4. ábra. Az immunoimmunoanalízis elvi vázlata
 a) a ligandum megkötődik a főlőlegben levő, radioaktív izotóppal jelzett antitesten;
 b) a szabadon maradt, radioaktív izotóppal jelzett antitestet a szilárd fázishoz kapcsolt ligandum megköti



5. ábra. A „szendvics” immunoimmunoanalízis elvi vázlata

a) a ligandum megkötődik a főlőlegben alkalmazott, szilárd fázishoz kötött antitest kötőhelyein;
 b) a rendszerhez adott radioantitest az előzőleg a szilárd fázishoz kapcsolt antitesteken megkötött ligandumhoz kapcsolódik

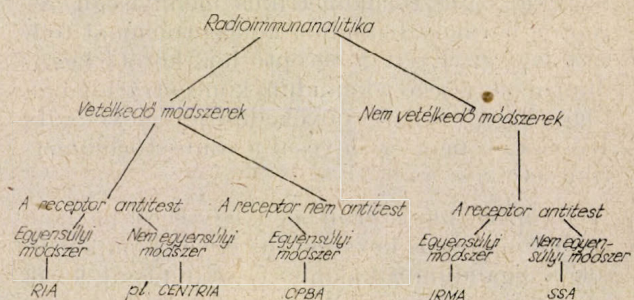
antitest feleslegével inkubálják, amely során a ligandum a szilárd fázishoz kapcsolt antitesthez kötődik (5a ábra). A folyadékfázis eltávolítása után a szilárd fázist radioantitest oldatával hozzák érintkezésbe, amikor is a radioantitest az előző lépésben megkötött ligandumhoz kapcsolódik (5b ábra). A módszer elnevezése utal arra, hogy a ligandumot a szilárd fázishoz kapcsolt antitest és radioantitest szendvicsszerűen fogja közre. A módszer egyik előnye, hogy az első inkubáció után a minta, s ezzel együtt az abban jelenlevő, a meghatározást zavaró anyagok (pl. proteolitikus enzimek stb.) a szilárd fázison kivált ligandumtól elkülöníthetők. Az IRMA és a „szendvics” IRMA egyensúlyi, nem vetélkedő eljárás.

A radioimmunoanalitikai eljárások csoportosítása

A radioimmunoanalitikai módszereket rendszert az alábbi szempontok szerint csoportosítják:

- A ligandum-receptor kölcsönhatás egyensúlyra vezet-e vagy sem.
- A ligandum vetélkedik-e a radioligandummal a receptor kötőhelyeiért, ill. az antitest vetélkedik-e a radioantisszel a ligandumokért.
- A receptor antitest-e vagy más fehérje.

A radioimmunoanalitikai eljárásoknak a fenti szempontok szerint végzett csoportosítását a 6. ábra mutatja be. Említésre érdemes, hogy az



6. ábra. A radioimmunoanalitikai módszerek csoportosítása

egyes módszerek sokszor nem határolhatók el élesen egymástól, ezért az ábrán feltüntetett csoportosítás sok esetben csak idealizált határesetnek tekinthető.

A radioimmunoassay és a szubsztöchiometrikus izotóphígításos analízis kapcsolata

Az 1. és a 3—5. ábrán bemutatott és az ezekhez hasonló piktogramokat gyakran használják a radioimmunanalitikai eljárások értelmezésére. Jól lehet a piktogramok igen szemléletesek, nem alkalmasak a ligandum—receptor kölcsönhatás kvantitatív leírására. Az 1. ábra például tulajdonképpen nem a radioimmunoassay, hanem a szubsztöchiometrikus izotóphígításos analízis modellje.

A szubsztöchiometrikus módszer a meghatározandó vegyületet specifikusan megkötő reagensnek a sztöchiometrikusnál kisebb mennyiségben történő alkalmazása, amely lehetővé teszi, hogy a reagens különböző koncentrációjú mintákból azonos mennyiséget kössön meg. Ha m_x jelenti a meghatározandó ligandum mennyiségét, m_0 a radioligandum mennyiségét A_0 és A_x pedig a radioligandum aktivitását, illetve a receptor által megkötött radioligandum aktivitását, akkor a szubsztöchiometrikus izotóphígításos analízisre érvényes az alábbi összefüggés:

$$m_x = m_0 \left[\frac{A_0}{A_x} - 1 \right]. \quad (5)$$

Sorra behelyettesítve az (5) egyenletbe az 1. ábrán feltüntetett példákhoz tartozó m_0 , A_0 és A_x értékeket, megkapjuk az ezen értékhármasokhoz tartozó ligandum mennyiségét:

$$m_x = 12 \left[\frac{6}{4} - 1 \right] = 6 \quad (1b. \text{ ábra}) \quad (6)$$

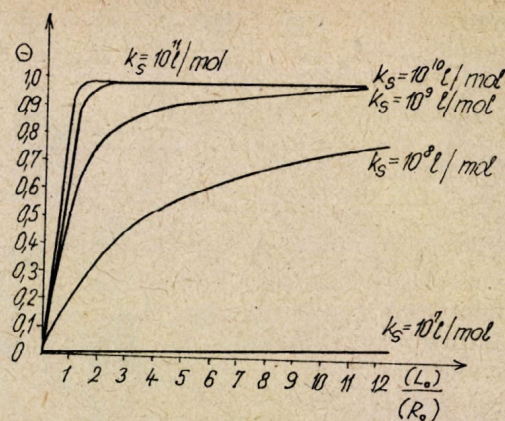
$$m_x = 12 \left[\frac{6}{3} - 1 \right] = 12 \quad (1c. \text{ ábra}) \quad (7)$$

$$m_x = 12 \left[\frac{6}{2} - 1 \right] = 24 \quad (1d. \text{ ábra}) \quad (8)$$

$$m_x = 12 \left[\frac{6}{1} - 1 \right] = 60 \quad (1e. \text{ ábra}) \quad (9)$$

összhangban azzal, hogy az 1. ábra a szubsztöchiometrikus izotóphígításos analízis modelljét mutatja be. A radioligandassay ettől a modelltől az alábbiakban tér el:

- A receptor-ligandum komplex stabilitási állandója rendszerint nem elegendő nagy ahhoz, hogy a szubsztöchiometrikus mennyiségű receptor bármely ligandum-koncentrációnál telített legyen. Ezért a receptorhoz kötött ligandum mennyisége a ligandum koncentrációjának függvénye, annak növekedésével növekszik. Ily módon nem érvényesül a szubsztöchiometrikus elv.
- A receptor rendszerint nem egységes, ha nem több komponens keveréke, az egyes komponensek a ligandumot különböző affinitással kötik meg. Így nem egy, hanem több, eltérő stabilitású receptor—ligandum komplex alakul ki.



7. ábra. A receptor telítettség (Θ) a ligandum és receptor koncentráció hányadosának függvényében

(L_0) = a ligandum koncentrációja
 (R_0) = a receptor koncentrációja
 Kl = a receptor-ligandum komplex stabilitási állandója

- A radiojódval jelzett ligandum és a receptor között kialakuló komplex stabilitása gyakran eltér a receptor—ligandum komplexétől

A receptor telítettségét (Θ) a ligandum- és a receptorkoncentráció hányadosának függvényében a 7. ábra mutatja be. Ebből kitűnik, hogy a telítettség csak 10^{10} — 10^{11} l/mol stabilitási állandó esetében közelíti meg az egységet. A radioimmunoassay csak olyan esetekben tekinthető szubsztöchiometrikus izotóphígításos analízisnek, amikor

- a ligandum-receptor komplex stabilitási állandója $\cong 10^{10}$ l/mol,
- a ligandum és radioligandum kémiai viselkedése azonos és
- a kötött és szabad radioligandum kvantitatíve elválasztható.

Ezen feltételek egyidejű teljesülése igen ritka. Mivel a ligandum jelzésére csaknem kivétel nélkül ^{125}I -ot használnak, a ligandum és radioligandum kémiai azonossága a jódtironinokra korlátozódik. Yalow szerint a RIA éppen abban múlja felül a szubsztöchiometrikus izotóphígításos analízist, hogy olyan esetekben is alkalmazható, amikor a ligandum és radioligandum nem azonos kémiai összetételű [6].

Nem radioizotópos immunanalitikai eljárások

Enzimimmunoassay (EIA)

A ligandum jelzésére radioaktív izotópon kívül enzimet (enzimimmunoassay), fluoreszkáló vegyületet (fluoreszcencia immunoassay), stabilis fémizotópot (fémimmunoassay), valamint szabad gyököt (spinimmunoassay) is alkalmaznak.

A nem radioizotópos módszerek között gyakorlati szempontból legjelentősebb az enzimimmunoassay. Kialakulása a hetvenes évek elejére tehető [7, 8]. Egyik változata a heterogén enzimimmunoassay, amely egyik jellemzője, hogy a nyomjelzőként alkalmazott enzim aktivitása nem változik meg a ligandumhoz vagy antitesthez történő kapcsolás során. A ligandum—receptor komplex kialakulása után az antitesthez kötött és szabad ligandumot, csakúgy mint a RIA és CPBA esetében el kell választani. A meghatározni kívánt ligandum mennyi-

ségére akár a szabad, akár a kötött ligandumhoz kapcsolt enzim aktivitásából következtethetünk. Nyomjelzőként leggyakrabban peroxidázokat, glükóz-oxidázt vagy acetil-kolin-észterázt alkalmaznak.

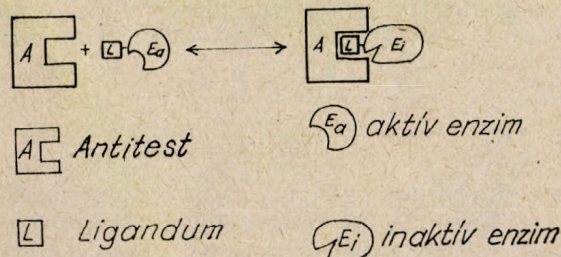
A radioimmunoassay enzimatiskus megfelelője a *vetélkedő enzimimmunoassay*. Az eljárás elvének szemléltetésére az 1. ábra azzal a változtatással alkalmazható, hogy ez esetben a radioligandum helyett enzimmel jelzett ligandum értendő. Az enzimmel jelzett és nem jelzett ligandum vetélkedik az antitest kötőhelyeiért. A ligandum mennyiségére akár a szabad, akár pedig a kötött, enzimmel jelzett ligandum enzimaktivitásából következtethetünk. Az enzim aktivitását valamely szubsztrátum színváltozásából fotometriás úton kaphatjuk meg.

Az SSA enzimatiskus megfelelője az *enzimatiskus szekvenciális telítési analízis*, az IRMA enzimatiskus változata az *immunoenzimometrikus analízis*, a „szendvics” IRMA-nak a „szendvics” *immunoenzimometrikus analízis* felel meg. Ezen eljárások elvének a szemléltetésére a 3.—5. ábra azzal a változtatással alkalmazható, hogy azokon radioligandum helyett enzimmel jelzett ligandumot, radioantitest helyett pedig enzimmel jelzett antitestet értünk.

A *homogén enzimimmunoassay* sajátja, hogy a nyomjelzőként alkalmazott enzim aktivitása vagy a ligandumhoz történő kapcsolás következtében, tehát a ligandum jelzése során, vagy pedig a jelzett ligandumnak az antitesthez történő kötődése során megváltozik. A 8. ábra azt az esetet szemlélteti, amikor az enzim a ligandum jelzése során megtartja aktivitását, a jelzett ligandum — antitest komplex kialakulásakor azonban az enzimaktivitás megszűnik. Mivel a jelzett és nem jelzett ligandumok vetélkednek az antitest kötőhelyeiért, az enzimaktivitás a minta ligandumtartalmaival növekszik. A 9. ábra a homogén enzimimmunoassay másik változatát mutatja be. Ez esetben az enzimaktivitás a ligandum jelzése során megszűnik, helyreáll viszont a ligandum-antitest komplex kialakulásakor. Így az enzimaktivitás a ligandum mennyiségének növelésével csökken. A homogén enzimimmunoassaynek nincs radioizotópos megfelelője.

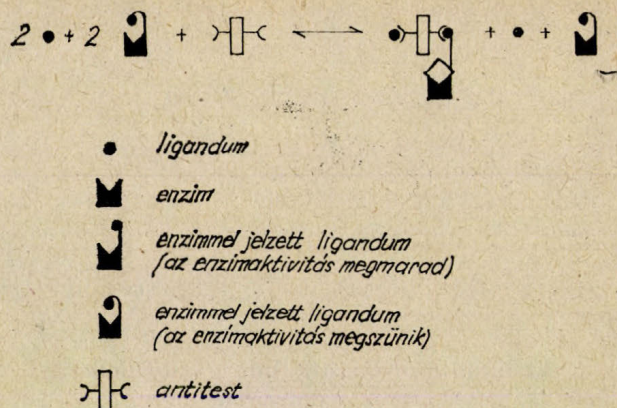
Fémimmunoassay

Lényege, hogy a ligandumot inaktív fémmel (pl. platina, ródium) jelzik, majd az antitest—ligan-



8. ábra. A homogén enzimimmunoassay egyik változatának elvi vázlata

A ligandum jelzésére alkalmazott enzim aktivitása a jelzés során nem csökken, a jelzett ligandum (L— E_a) és az antitest között kialakuló komplexben (A—L— E_i) azonban az enzim elveszti aktivitását



9. ábra. A homogén enzimimmunoassay egyik változatának elvi vázlata

A ligandum jelzésére alkalmazott enzim a jelzés során elveszti aktivitását, az enzimaktivitás helyreáll a jelzett ligandum—antitest komplex kialakulásakor

dum komplex kialakulása után akár a szabad, akár pedig a kötött ligandum fémtartalmát spektroszkópai, elektrokémiai módszerekkel vagy pedig neutronaktivációs analízissel határozzák meg [9]. Alkalmazási területe jelenleg néhány szteroid meghatározására korlátozódik.

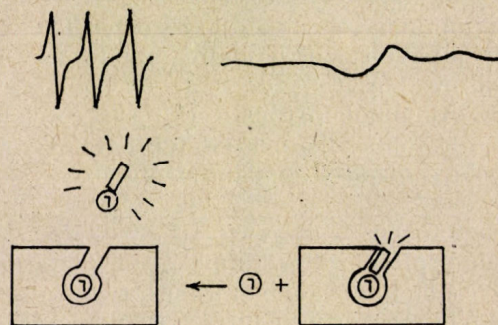
Fluoreszcencia immunoassay (FIA)

A ligandum jelzésére fluoreszkáló vegyületet, pl. fluorescamint alkalmaznak. A szabad és kötött ligandum elválasztása után azok fluoreszcenciájának mértékéből következtetnek a meghatározni kívánt ligandum mennyiségére [10]. A FIA előnye az EIA-val szemben, hogy elmarad az enzim-szubsztrátum reakcióhoz szükséges inkubáció.

Spinimmunoassay

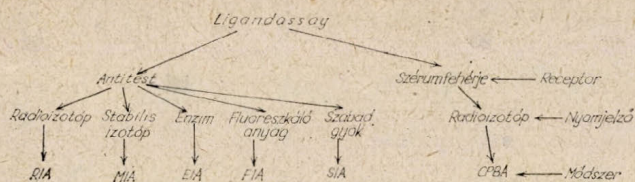
A ligandum jelzésére szabad gyököt alkalmaznak, amely oldatban általában egyszerű, három vonalból álló ESR spektrumot mutat. A spektrum nem változik meg a kis ligandummolekula és a szabad gyök összekapcsolása következtében, jelentős vonalszélesedés következik be azonban akkor, amikor a szabad gyökkel jelzett ligandumot az antitest megköti [11]. A módszer elvét a 10. ábra szemlélteti.

A radioizotópos és nem radioizotópos immunanalitikai módszereket a nyomjelző és a receptor minő-



10. ábra. A spinimmunoassay elvi vázlata

jobb alsó ábra: a szabad gyökkel jelzett ligandum ESR spektruma
 bal alsó ábra: az antitest-szabad gyökkel jelzett ligandum komplex ESR spektruma



11. ábra. Az immunanalitikai módszerek csoportosítása sége szerint csoportosítva a 11. ábra mutatja be [12].

Az immunalitika alkalmazási területe

A radioligandassay alkalmazási területe a hatvanas évek elején gyakorlatilag hormonok, főleg peptidhormonok és a tiroxin meghatározására korlátozódott. A hetvenes évek elején jelentek meg a szteroidok meghatározására alkalmas radioizotópos eljárások, részben RIA, részben pedig CPBA alakjában. Ezt követően számos gyógyszer, kábítószer, vírusantigén, antibiotikum stb. meghatározására alkalmas RIA, CPBA és IRMA készlet került kereskedelmi forgalomba. Ezek közül a legfontosabbakat az 1. táblázatban tüntettük fel. A több előállító által forgalmazott készletek közül csak egyet választottunk ki, általában azt, amelyik érzékenysége a legnagyobb. Mind az érzékenység, mind pedig a normál tartomány tekintetében az előállítók adataira támaszkodtunk. Ezek egy 1978-ban készült összeállításban jelentek meg [13], így még többnyire az SI rendszer bevezetése előtt használatos egységeket találjuk meg a táblázatban. Az SI által javasolt mol/l-re történő átszámítást a feltüntetett relatív molekulatömegek lehetővé teszik. Olyan esetekben, amikor a meghatározandó vegyület relatív molekulatömege nem ismert, a nemzetközi egységek alkalmazása feltehetően az SI rendszer mellett még jó ideig létezni fog. A táblázatban megadott normál tartomány az adott készletre vonatkozik, a különböző gyártmányú készletek normál tartománya általában jelentősen eltérő lehet.

A nem radioizotópos eljárások között az *enzimimmunoassay* a legelterjedtebb. A fontosabb enzimimmunoassayeket a 2. táblázatban tüntettük fel [14].

A homogén enzimimmunoassay előnye, hogy nincs szükség az antitesthez kötött és szabad ligandum elválasztására, ami jelentősen megkönnyíti a meghatározás automatizálását. A homogén enzimimmunoassay alkalmazási területe ugyanakkor jórészt kismolekulájú ligandumok meghatározására korlátozódik, s az érzékenység többnyire csak nmol tartományig terjed. A homogén eljárások főbb alkalmazási területe gyógyszerek terápiás szintjének, valamint kábítószerek meghatározása.

A heterogén módszer egyaránt alkalmas kis- és nagymolekulájú ligandumok meghatározására, nem kerülhető el azonban a kötött és szabad frakció elválasztása, ami egyrészt a feldolgozás idejét növeli, másrészt viszont kiküszöböli a mintában jelenlevő, a fotometriás kiértékelést esetleg zavaró anyagok hatását.

A *spinimmunoassay* alkalmazási területe kábítószerek, valamint gyógyszerek meghatározása olyan esetekben, amikor a mintavételt követő legrövidebb időn belül szükség van az eredményre. Széles körű alkalmazását gátolja jelentős műszerezettség igénye (ESR spektrométer). A spinimmunoassay felhasználására néhány példát a 3. táblázat mutat be [15].

A felsorolt öt vegyületcsoport közül négy a kábítószerekhez tartozik, így a 3. táblázatban megadott ligandumok jórészt olyan vegyületek, amelyek gyors meghatározása a vizeletben egyes kábítószert fogyasztó országokban rutinfeladattá vált.

Az ópium-alkaloida spinimmunoassay esetében alkalmazott antitest specifikitása nem korlátozódik a morfinra, az antitest közel azonos mértékben megköti a morfin-glukuronidot, amely a heroin fő metabolitja a vizeletben, valamint a diacetil-morfint (heroin) is. Az amfetamin és a barbiturát spinimmunoassay ezzel szemben az analóg vegyületeket is méri, így csoportmeghatározásra alkalmas. A kokain spinimmunoassay viszont a főmetabolitot, a benzoil-ekgonint határozza meg, ami lehetővé teszi a kokainfogyasztás kimutatását 24–28 óra elteltével is.

Az 1.–3. táblázatból kitűnik, hogy

- a RIA gyakorlatilag minden ligandum meghatározására alkalmazható, amely ellen antitest képezhető;
- a legnagyobb érzékenységgel a RIA rendelkezik,
- a homogén EIA csak kismolekulájú ligandumok meghatározására alkalmazható és
- a SIA felhasználási területe mindeddig csupán néhány kábítószer és gyógyszer meghatározására korlátozódik.

A RIA, homogén és heterogén EIA, valamint a SIA összehasonlító értékelésre alkalmas néhány jellemzőjét a 4. táblázatban tüntettük fel.

A radioimmunalitikai fejlődési irányai

A radioimmunalitika fejlődése két irányban tapasztalható, ill. várható. Az egyik a már kidolgozott, a mindennapi gyakorlatban alkalmazott kereskedelmi forgalomban kapható RIA készletek feldolgozásának egyszerűsítése, a feldolgozás idő- és munkaigényének csökkentése. A másik a mindeddig jórészt humán diagnosztikára és endokrinológiai kutatásokra korlátozódó alkalmazás kiterjedése más területekre (pl. állattenyésztés, toxikus szennyezők meghatározása élelmiszerekben, radiojóddal jelzett vegyületek fajlagos aktivitásának meghatározása stb.).

A kereskedelmi forgalomban levő RIA készletek korszerűsítése főként az antitesthez kötött és szabad ligandum elválasztására alkalmazott eljárások terén jelentkezik. *Yalow* és *Berson* ma már csupán történelmi jelentőségű papírelektroforetikus módszere, a szabad ligandum aktív szénen bekövetkező adszorpcióján alapuló elválasztás, valamint a hosszú, rendszerint egymást követően két

Fontosabb, kereskedelmi forgalomban kapható RIA és CPBA készletek

Ligandum	Relatív molekulatömeg	Érzékenység	Normál tartomány
q. ACTH	4 756	25 pg	50—100 ng/l
2. Alfa-fötöproteín	~ 65 000	5 ng	—
3. Aldoszteron	360	5 pg	12—300 ng/l
4. Amfetamin	135	250 ng	—
5. Androszteron	290	25 pg	200—800 ng/l
6. Androszténdion	286	0,1 pg	10—200 µg/l
7. Angiotenzin I.	1 290	15 pg	0,2—4,0 µg/l/óra
8. B ₁₂ vitamin (CPBA)	1 355	15 pg	0,2—1,1 ng/ml
9. B ₁₂ vitamin	1 355	25 pg	0,3—1,0 ng/ml
10. Barbiturátok	~ 250	0,5 µg/l	—
11. CEA	~ 200 000	0,5 µg/l	0—2,5 µg/l (nemdohányzók) 0—5,0 µg/l (dohányzók)
12. Ciklikus adenozinmonofoszfát (cAMP)	329	5 fmol	—
13. Ciklikus guanozinmonofoszfát (cGMP)	345	5 fmol	—
14. C-peptid	3 018	0,25 ng	0,5—3 ng/ml
15. Dehidroepiandrosteron	288	50 ng	150—600 ng/ml (férfiak) 20—280 ng/ml (nők)
16. Digitoxin	781	10 pg	—
17. Digoxin	780	150 pg	—
18. Dihidrotesztozteron	402	100 pg	30—240 ng/l (nők) 300—900 ng/l (férfiak)
19. Fenobarbital	232	1 µg	—
20. Fenytoin	252	500 pg	—
21. Ferritin	~ 440 000	0,3 pg	10—500 ng/ml
22. Folsav	441—473	500 ng	—
23. FSH	~ 30 000	2 mIU	4—20 mIU
24. Gastrin	2096—3900	5 pg	50—500 pg/ml
25. Gentamicin	543	1 ng	—
26. Glukagon	3 483	80 pg	0,15—0,35 ng/ml
27. hCG	~ 30 000	3,1 mIU	91 mIU
28. Hepatitis B antigén	—	δ	δ
29. HGH	~ 21 500	40 pg	0—10 ng/ml
30. 17α-hidroxi-progeszteron	331	2 pg	0,25—3,0 ng/ml
31. HPL	~ 22 000	62 ng	—
32. Inzulin	5 734	10 µIU	> 30 µIU/ml
33. Kalcitonin	3 420	20 pg	—
34. Kortikoszteron	346	5—10 pg	0,1—4,6 µg/l (férfiak)
35. Kortizol	362	2 ng	50—250 ng/ml
36. LH	~ 26 000	0,05 ng	—
37. LSD	323	0,95 pmol	—
38. Mioglobín	17 000	0,1/ng/ml	8—80 ng/ml
39. Morfin	285	25 ng/ml	—
40. Ösztradiol	272	5 pg	—
41. Ösztriol	288	3 pg	—
42. Ösztron	270	1,6 pg	30—100
43. Pregnenolon	316	50—100 pg	—
44. Progeszteron	314	7 pg	—
45. Prolaktin	~ 20 000	27 µIU/ml	100—500 µIU/δl
46. Proszttaglandin E ₂	352	10 pg	—
47. Proszttaglandin F _{2α}	354	5 pg	—
48. PTH	~ 10 000	50 pg	200—1000 pg/l
49. TBG	~ 60 000	1/µg/l	90—200 µg/l
50. Tesztoszteron	288	2,5 pg	3—7 ng/ml (férfiak) 0,2—0,5 ng/ml (nők) 4,7—10,7 µg/dl
51. Tiroxin (CPBA)	776	—	4,4—11,2 µg/dl
52. Tiroxin	776	0,5 µg/dl	—
53. Tobramicin	—	1 ng	—
54. Trijód-tironin	651	15 pg	1—2 ng/ml
55. 3,3',5'-trijód-tironin (reverse T3)	651	30 ng/l	90—350 ng/l
56. TSH	~ 25 000	1 µIU	0,5—5 ng/ml

inkubálást igénylő kettős antitest módszer nagyszámú minta vizsgálatára nem igen alkalmas. A vizsgálatok számára két példa: 1982-ben a hazai egészségügyi izotóplaboratóriumokban várhatóan 150 000 tiroxin (T₄) és 75 000 trijód-tironin (T₃) meghatározást végeznek.

A szabad és kötött ligandum elválasztásának munka- és időigénye jelentősen csökkenhet az antitesthez kötött ligandum polietilén glikolos kicsapásával vagy szilárd fázishoz kötött antitest alkalmazásával.

A finomszemcsés cellulózhoz, polisztirolhoz vagy üvegporthoz kötött antitestet igen sok kereskedelmi forgalomban levő készletben alkalmazzák. Előnye, hogy a nem specifikus kötés csekély, hátránya viszont, hogy inkubáció alatt gondoskodni kell a szemcsék lebegtetéséről, majd inkubálás után a szemcséket centrifugálással kell elkülöníteni. Szükségtelenné teszi az inkubációs elegy rotálását nem ülepedő műanyagszemcsék alkalmazása (pl. az RCC Amerlex készleteiben). A műanyagcsövek belső felületéhez kötött antitest (bevona-

2. táblázat
Fontosabb enzimimmunoassayk

Ligandum	Relatív molekulatömeg	Érzékenység, fmol/l
1. AFP	~ 70 000	10—90**
2. Amphetamin	135	3 · 10 ⁶
3. Ausztrál antigén	—	0,09—0,16*
4. Barbiturátok	—	4—20 · 10 ⁶
5. CEA	~ 200 000	25—50
6. Difenilhidantoin	252	9 · 10 ⁶ **
7. Digoxin	780	130***
8. Gentamicin	543	3,7 · 10 ⁶ **
9. hCG	~ 30 000	80
10. IgG	~ 150 000	300*
11. Inzulin	5 734	250*
12. Kodein	299	1000
13. Kortizol	362	2800
14. Methadon	309	1,4 · 10 ⁶ **
15. Morfin	285	10 000
16. Ösztriol	288	2000
17. Progeszteron	314	500
18. Tiroxin	777	2,6 · 10 ⁵
19. TSH	~ 25 000	110

*Az érzékenység közel azonos a RIA érzékenységével
**Az érzékenység a RIA esetében 1,5—7,5-szer nagyobb
***Az érzékenység kb. 120-szor kisebb, mint a RIA esetében

3. táblázat
Fontosabb spinimmunoassayk

Spinimmunoassay	Ligandum	Érzékenység, µg/ml
Ópiumalkaloid	Kodein	0,1
	Morfin	0,5
	Morfin-glukuronid	1,5
Methadon	Heroin	1,5
	Methadon	0,50
	Acetil-methadol	0,50
Amphetamin	Amphetamin	3,0
	Metamphetamin	4,4
Kokain	Benzoil-ekgonin	1,0
	Ekgonin	12,0
Barbiturát	Secobarbital	2,0
	Phenobarbital	2,8
	Pentobarbital	4,5
	Amobarbital	6,8
	Butobarbital	13,0

4. táblázat
A RIA, homogén és heterogén EIA és SIA néhány jellemzőjének összehasonlítása

	RIA	Homogén EIA	Heterogén EIA	Spinimmunoassay
Közepes Érzékenység	igen nagy	kicsi	közepes	közepes
Közelítő időigény	óra	perc	óra	perc
Műszerigény	szcintillációs szám-láló, mintaváltó	termosztált küvetta- val felszerelt fotomé- ter	fotométer vagy szabad szem	ESR spektrométer
Automatizálási lehetőségek	nagy	igen nagy	nagy	nagy
Reagensok stabilitása	közepes	nagy	nagy	nagy

tos falú cső, coated tube) alkalmazása jelentős idő- és munkamegtakarítást tesz lehetővé. Az antitesthez kötött ligandum az inkubációt követően igen egyszerűen, az inkubációs elegy kiöntésével elválasztható a szabad ligandumtól.

A kézirat beérkezett: 1982. febr. 9.

A szövegben alkalmazott rövidítések jelentése és azok leggyakrabban használt szinonimái:

- CPBA — vetélkedő fehérjekötési analízis
competitive protein binding assay
- CEIA — vetélkedő enzimimmunoassay
competitive enzyme-immunoassay
- EIA — enzimimmunoassay
enzyme-immunoassay
enzymatic-immunoassay
enzymo-immunoassay
enzyme labelled immunoassay
immunoenzymatic assay
enzyme-linked immunosorbent
assay (ELISA)
- EMIT — heterogén EIA
enzyme multiplied immunoassay
technique
enzyme inhibition immunoassay
- FIA — fluoreszcencia immunoassay
fluorescent immunoassay
- IRMA — immunoradiometrikus analízis
immunoradiometric assay

- MIA — fémimmunoassay
metalloimmunoassay
- RIA — radioimmunoassay
saturation analysis
- SIA — spinimmunoassay
- SSA — szekvenciális telítési analízis
sequential saturation analysis
non-equilibrium analysis
delayed addition analysis
two-step analysis
- Szendvics IRMA — két kötőhelyes IRMA
two site IRMA

IRODALOM

- [1] Yalow, R. S.—Berson, S. A.: Nature (London) 184, 1648 (1959).
- [2] Yalow, R. S.—Berson, S. A.: J. Clin. Invest. 39, 1157 (1960).
- [3] Ekins, R. P.: Clin. Chim. Acta 5, 453 (1960).
- [4] Thorell, J. I.—Larson, S. M.: Radioimmunoassay and related techniques. The C. V. Mosby Company, Saint Louis, 1978.
- [5] Hales, C. N.—Randle, P. J.: Biochem. J. 88, 137 (1963).
- [6] Yalow, R. S.: Science 200, 1236 (1978).
- [7] Weemen, B. K.—Schuur, A. H. W. M.: Febs Letters 15, 232 (1971).
- [8] Engvall, E.—Perlmann, P.: J. Immunol. 109, 129 (1972).
- [9] Cais, M. et al: Nature 270, 534 (1977).

- [10] Aalberse, R. C.: Clin. Chim. Acta 48, 109 (1973).
 [11] Leute, L. K.—Ullmann, E. F.—Goldsteine, A.—Herzenberg, L. A.: Nature 236, 253 (1971).
 [12] Sokolowski, G.—Wood, W. G.: Radioimmunoassay in Theorie und Praxis, Schnetzor Verlag, Konstanz, 1981.
 [13] Clin. Chem. 24, 1223 (1978).
 [14] Schuurs, A. H. W. M.—Van Weemen, B. K.: Clin. Chim. Acta 81, 1 (1977).
 [15] Mulé, S. J.—Sunshine, I.—Braude, M.—Willette, R. E.: Immunoassays for drugs subject to abuse, CRC Press, 1974.

РЕЗЮМЕ

Рассматриваются иммунологические анализы, использованные в наши дни. Сопоставляются их главные характеристики, а также представляются области использования.

SUMMARY

A survey of the immunoassays used nowadays is given by the author. Their main characteristics are compared and the application fields are dealt with as well.

Könyvismertetés

Vállalkozók zsebkönyve 1982.

(A szerkesztő bizottság tagjai: Erdős Ákos, Juhász András (elnök) Vince Mátyás) Alkotó Ifjúság Egyesülés, 1982. (366 oldal).

A könyv szép példája a vállalkozásnak. Annak a vállalkozásnak, amelyről reméljük, hogy — a korábbi évektől eltérően — érvényre juttatja a kezdeményezőket és amely elősegíti gazdaságunk versenyképességét. Természetesen annak fenntartásával, hogy gazdaságunk súlypontja továbbra is a nagyüzemi gazdálkodás.

Alig néhány hónappal az új vállalkozási formákról szóló rendeletek hatálybalépése után az Alkotó Ifjúság Egyesülés vállalkozott a fellépő új szükségletek, az új vállalkozási formák ismertetésére és megjelentette a 366 oldalas vállalkozók zsebkönyvét.

A zsebkönyv alapvető célja, hogy elősegítse a rejtett tartalékok kiaknázását, melyek a szocialista gazdasági viszonyok kisüzemi alkalmazásában, a vállalatok, a szövetkezetek és a kisártermelő szervezetek gazdálkodásának célszerű összekapcsolásában rejlenek.

A zsebkönyv szerkesztői felismerték, hogy nem elégséges csak a lehetőségek megadása, hanem azok ösztönzése és irányítása szükséges. Ennek megfelelően a zsebkönyv igen hasznos mindazoknak, akik foglalkoznak bármilyen vállalkozás létrehozásának illetve abban való részvétel gondolatával és nagyon hasznos azoknak is, akik igénybe akarják venni ezeket a vállalkozásokat. A zsebkönyv három fő részből áll.

Az első rész a vállalkozási formákat taglalja. A vállalkozási formák ismertetésének tanulmányozása alkalmas arra, hogy egy-egy ötletet, elképzelést milyen konkrét vállalkozási formában a legcélszerűbb megvalósítani. Ismertetésre került a kisipar, a magánkereskedelem, a polgárjogi társaság, a közkereseti társaság, a gazdasági munkaközösség, a vállalati gazdasági munkaközösség, az ipari és a szolgáltató szövetkezeti szakcsoport, a mezőgazdasági szakcsoport, a kisszövetkezet, a vállalatok egyes részlegeinek szerződéses üzemeltetése, a kiskereskedelmi és vendéglátóipari üzletek szerződéses üzemeltetése, az átalány elszámolásos rendszer, az ipari és a szolgáltató egységek bérlete, a kisvállalat, a leányvállalat.

Minden egyes formánál külön foglalkoznak a szerzők az alapítás feltételeivel és módjával, a résztvevők számával (alkalmazott, családtag!), az ellenőrzés és a felelősség kérdéseivel. Részletesen ismertetik az iparjogositvány, a magánkereskedői jog megszerzésének módját, mely szükséges a kisiparosi magánkereskedői működési engedély kiváltásához. A polgárjogi társaság, a közkereseti társaság, a gazdasági munkaközösség és a vállalati gazdasági munkaközösség ismertetésénél ges jól követhetők az egyes formákból eredő előnyök-

hátrányok, így mindenki az adott célnak legjobban megfelelő formát tudja választani. Ismertetik a választott forma cégbejegyzését, a vállalat létrehozásának bejelentését, nyilvántartási módját, a szervezet, jövedelem-szabályozás és a megszűnés lehetőségeit. Az ipari és szolgáltató szövetkezeti szakcsoport, a mezőgazdasági szakcsoport, a kisszövetkezet tevékenységi körének leírása mellett részletezik a létrehozók minimális számát is. Részletesen foglalkoznak a vagyoni hozzájárulás meghatározásával, a szervezettel és képviselő módjával. A vállalatok egyes részlegeinek szerződéses üzemeltetése lehetőségeinek tárgyalásánál kitértek arra, hogy egy vállalat kikkel és milyen korlátok között köthet szerződést az üzemeltetésre. Ugyancsak tárgyalja a jövedelmeket, a vállalkozások díjait és annak forrását. A zsebkönyv taglalja az ipari és a szolgáltató egységek bérletének lehetőségeit és a bérléshez szükséges szakképzettségi igényt. A kisvállalat és a leányvállalat alapításáról szóló részt a főhatóságok szakemberei is érdeklődéssel olvashatják, hiszen létrehozásukhoz az ő engedélyük szükséges.

A második rész hasznos általános tudnivalókat tartalmaz. Ilyenek többek között a szerződéskötés, társadalombiztosítás, biztosítás, helységigénylés, számvitel és nyilvántartás, árszabályozás stb. Az általános tudnivalókban az adózási kérdés kidolgozása még nem teljes, ez azonban nem csak a szerzőkön múlott, hanem egyes kérdések szabályozása még nem kiforrott.

A harmadik rész a címjegyzék. Itt minden intézmény címe, telefonszáma megtalálható, melyre egy vállalkozónak szüksége van a vállalkozás alapításánál, a vállalkozás lebonyolításánál, anyagbeszerzésnél stb. Külön is kiemelhető, hogy azon vállalatoknál, ahol a fiatal műszakiak és közgazdászok ill. a fiatal agrárszakemberek tanácsa működik, a címjegyzék tartalmazza a titkár nevét. A titkárok a vállalkozni szándékozókat mindenben segítik. Ezzel is szeretnék bebizonyítani, hogy az FMKT és FAT bármikor kész a tudományos kutatás, a műszaki fejlesztési és termelési feladatok hatékonyabb végrehajtásában. A könyv készítői tudatában voltak annak, hogy az új vállalkozási formák működésének minden részlete még nem kidolgozott, de a vállalkozási kedv elősegítése érdekében vállalták — igen dicséretes módon — a tévedések kockázatát.

Ezért a kötet végén hibaigazító és információküldő lapokat helyeztek el. Az információk és a kialakuló vállalkozási gyakorlat tapasztalatai alapján a vállalkozók zsebkönyvét időről-időre friss adatokkal és ismerettel bővíteni kívánják.

Dr. Jakabos Áron