

MTA Izotóp Intézete, Budapest

Radio-immunoanalitikai (RIA) vizsgálatok néhány tervezési
és pontossági kérdése

Miller János, Naszódi László és Szepesvári Pál

A számítástechnikai módszerek egyre fontosabbak a klinikai kémia problémáinak megoldásában, ahová a radio-immunoanalízis módszere is tartozik. E technika immunológiai jelenségek felhasználásával alkalmas számos, a testnedvekben jelenlévő komponens mennyiségi meghatározására. Használhatóságának feltétele - mint ismeretes - az, hogy a vizsgálandó vegyület

- immunogén
- tiszta állapotban előállítható és
- sugárzó izotóppal jelezhető legyen.

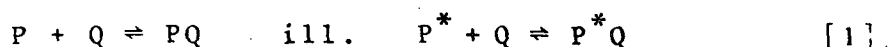
A módszer előnyeként felsorolható, hogy

- kis mennyiségek
- kis koncentrációk

páratlan szelektivitással meghatározhatók.

A radio-immunoanalízis elve és egyszerűbb modelljei

Tekintsünk egy rendszert, amely P meghatározandó antigént tartalmaz. Adjunk ehhez ismert mennyiségű P* jelzett antigént és Q antitestet. Ezek a komponensek a



reakciókban és a PQ és P*Q komplexeket képezik. A jelzett és

jelzetlen antigén egymással versengve kötődik az antitesthez, így a komplexbe kerülő /vagy a feleslegben maradt/ sugárzó izotóp mennyiségéből következtetni lehet a P mennyiségre.

A vizsgálat két részből áll.

Először ismert összetételű oldatokat használva felvesszünk egy kalibrációs görbét, amely megadja, hogy rögzített mennyiségű Q antitest és P* jelzett antigén esetén adott aktivitásnak mekkora mintabeli P antigén mennyiség felel meg.

Ezután az ismeretlen antigén tartalmu mintával hajtjuk végre a kísérletet, és a kapott aktivitáshoz a kalibrációs görbe segítségével hozzárendeljük a meghatározandó antigén mennyiséget.

Az antigén mennyiség-beütésszám összefüggés leírására több modell ismeretes.

Ha feltételezzük, hogy a PQ komplexképződés gyakorlatilag teljesen végbemegy, akkor a kötésbe kerülő izotóp, vagyis a P*Q anyagmennyiség

$$Q \cdot P^* / (P^* + P) \quad [2]$$

-vel arányos.

Egyensúlyra vezető reakciót és nem túl nagy K egyensúlyi állandót feltételezve az $x = P^*Q$ kötött jelzett antigén az

$$(1 + P^*/P)x^2 - (P + P^* + Q + 1/K)x + (Q)(P^*) = 0 \quad [3]$$

egyenlet pozitív megoldásával egyenlő. Megjegyzendő, hogy $K \rightarrow \infty$ esetén a [3] kvadratikus modell átmegy a [2] hiperbolikus modellbe.

Az irodalomban tárgyalt egyéb modellek vagy a fentiek változó-transzformációjával állíthatók elő, vagy fizikai tartalom nélküli matematikai konstrukciók, amelyek arra szolgálnak, hogy a kötött jelzett antigén mennyiségét a jelenlevő antigén mennyiségének függvényében egy jól simuló folytonos függvénnyel leírják.

Igy pl. az ún. logit-log modell, amelynek alakja

$$\text{logit}(B/B_0) = a + b \ln P, \quad [4]$$

$a = \ln P^*$ és $b = -1$ esetén visszaadja a [2] hiperbolikus modellt. /A [4] kifejezésben $\text{logit } y = \ln[y/(1-y)]$, B/B_0 pedig a P antigén aktuális és 0 koncentrációjához tartozó beütésszámok arányát jelenti.

A radio-immunoanalízis érzékenységéhez

Fontos, hogy az antigén mennyiség-aktivitás görbe érzékeny legyen, azaz kis koncentráció-változásra erősen változzék a beütésszám. Az érzékenység növelhető pl. a jelzett antigén fajlagos aktivitásának a növelésével, aminek azonban biológiai, kémiai, fizikai határai vannak.

A görbe meredekségét növelhetjük úgy is, hogy a jelzett antigén mennyiségét helyesen választjuk meg.

Az aktivitás arányos a mért fázisban /pl. a kötött fázisban/ levő jelzett anyag mennyiségével. A hiperbolikus modell szerint a görbe meredekségének abszolút értéke

$$\left| \frac{\partial}{\partial P} \frac{Q \cdot P^*}{(P^* + P)} \right| = \frac{Q \cdot P^*}{(P^* + P)^2} \quad [5]$$

-tel arányos, ami akkor maximális, ha $P^* = P$. Elmondhatjuk tehát, hogy a RIA módszerben ott érünk el maximális érzékenységet, ahol a jelzett antigén mennyisége megegyezik a mérendő antigén mennyiségével. /Ez utóbbit természetesen

nem tudjuk előre, csak a nagyságrendjét ismerjük./ A jelzett anyag mennyiségének helyes megválasztásával tehát "kiélezzhetjük" a vizsgálatot egy adott értékre.

Általában az a célunk, hogy egy adott $/P_1, P_2/$ tartományon *átlagosan* a legérzékenyebb legyen a kalibrációs görbe. Ezt fogalmazhatjuk meg az

$$\frac{1}{P_2 - P_1} \int_{P_1}^{P_2} |meredekség| dP \Rightarrow \max_{P^*} \quad [6]$$

un. I-optimális kritériummal. Ez a feltétel a

$$P^* = \sqrt{P_1 P_2} \quad [7]$$

megoldásra vezet, vagyis célszerű a jelzett komponens mennyiségét a mérési határok /az érdekes tartomány határai/ mértani közepének választani.

Egyszerűbb optimálási feltétel adódik, ha az átlagos meredekségre úgy fogalmazzuk meg követelményünket, hogy a tartománybeli maximális és minimális meredekség átlaga legyen maximális, azaz

$$[Q \cdot P^* / (P^* + P_1)]^2 + Q \cdot P^* / (P^* + P_2) / 2 \Rightarrow \max_{P^*} \quad [8]$$

Ennek megoldása

$$P^* = \sqrt{(P_1^2 + P_2^2) / 2} \quad [9]$$

vagyis az optimális jelzett mennyiség a tartományhatárok négyzetes átlaga. Összefoglalva: érdemes olyan mennyiségű *jelzett* antigénnel dolgozni, amilyen a meghatározandó dózisok /valamilyen/ átlaga. Megjegyzendő, hogy nemcsak a jelzett antigénnel, hanem az antitest mennyiséggel is befolyásolni lehet a görbe meredekségét. Belátható, hogy a

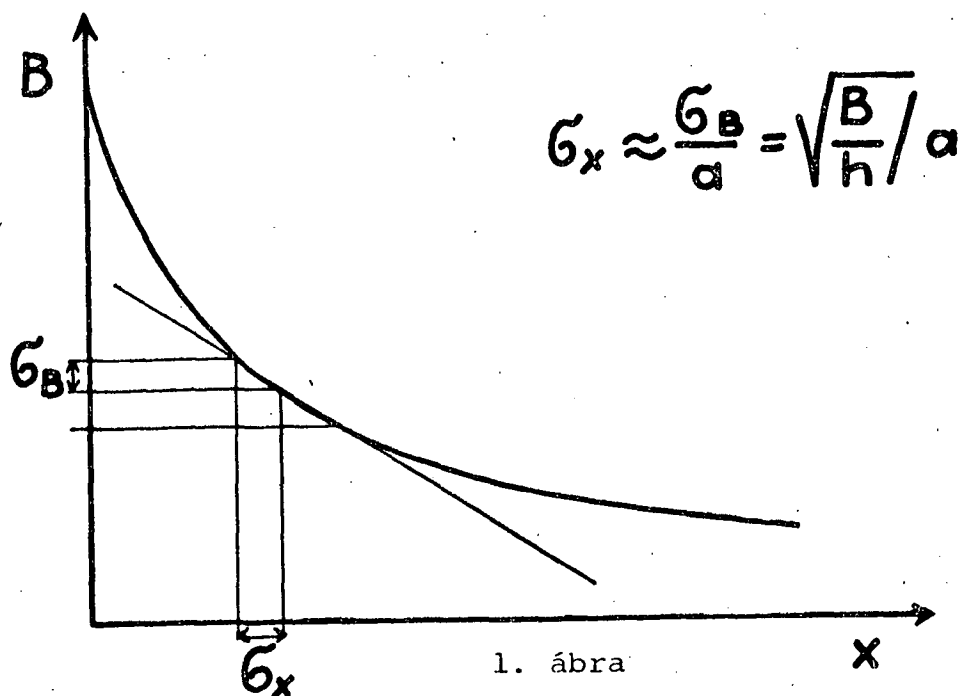
lehető legnagyobb antitest mennyiség /amely mellett az antigén még tulsulyban van/ adja a legmeredekebb görbét.

A RIA mérések hibájáról

Az eddigiekben arról volt szó, hogy a változtatható paramétereket hogyan válasszuk meg annak érdekében, hogy az antigén mennyiség-aktivitás görbe a lehető legmeredekebb legyen. A következőkben azt tárgyaljuk, hogy a már rögzített paraméterek mellett milyen mértékű hibára számíthatunk az ismeretlen P meghatározásakor. Emellett ki-mutatjuk, hogy bizonyos cégek által alkalmazott ábrázolás-mód csak látszólag javítja az eredmény pontosságát.

Egy RIA vizsgálat - mint említettük - ismert koncent-rációju antigén mintákkal történő kalibrációval kezdődik. Az abszcissa-tengelyre - a továbbiakban x-szel jelölt - antigén koncentrációt vesszük fel, ordinátaként pedig pl. az antigén-antitest komplex B-vel jelölt aktivitását vagy /rögzített ideig mért/ beütésszámát.

1. eset /1. ábra/



A kalibrációs görbe igen pontosnak tekinthető /konfidencia-sávja nagyon szűk/. Ekkor az ismeretlen meghatározásának a hibaforrása egyedül a statisztikus hibával terhelt beütésszám. Poisson-eloszlású hibát feltételezve

$$\sigma_x \approx \frac{\sigma_B}{a} = \frac{1}{a} \sqrt{\frac{B}{n}} \quad [10]$$

ahol a a kalibrációs görbe meredeksége
 B a mért beütésszámok átlaga
 n a mérések száma.

2. eset /2. ábra/

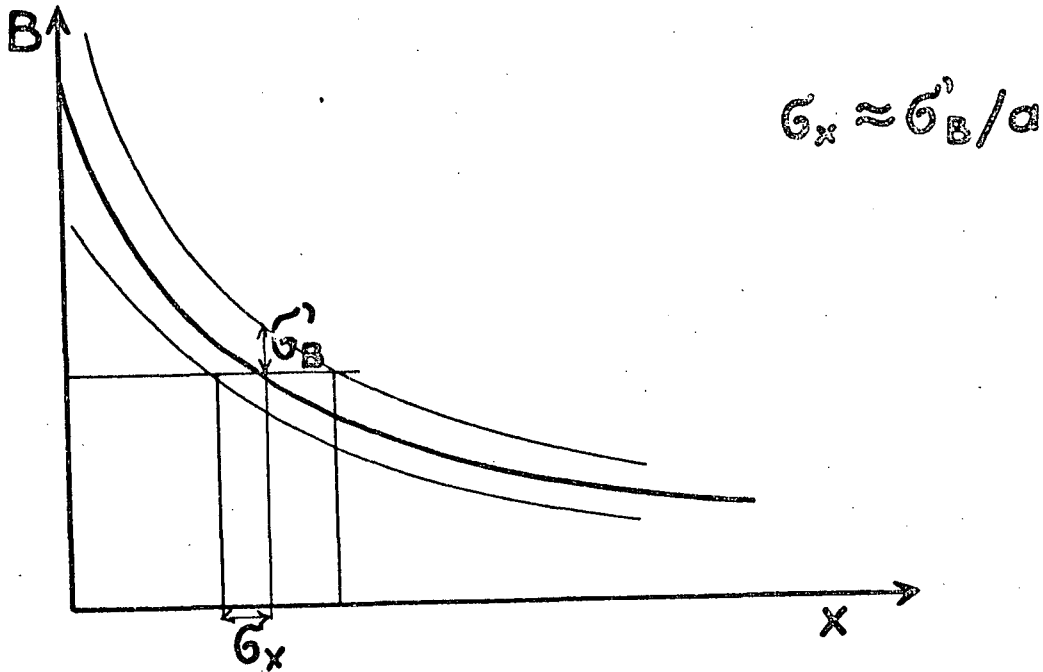
A kalibrációs görbe /B-irányú/ pontatlansága, azaz a konfidencia-sáv fél-szélessége (σ'_B) nem elhanyagolható, a meghatározáskor viszont a beütésszám-mérés igen pontos. A koncentráció meghatározás hibája a [10] képlethez hasonló:

$$\sigma_x = \sigma'_B / a \quad [11]$$

de itt σ'_B a konfidencia-sáv fél-szélessége. /A képlet helyes, ha a szokásos hibaterjedési formulák használatához szükséges feltételek teljesülnek, azaz

- a görbék deriváltjai lassan változnak, így a lineáris közelítés elfogadható a konfidencia-sávon belül;
- a hibákhoz képest az alkalmazott pontbecslés torzítása kicsi;
- a konfidencia-sáv közelítőleg szimmetrikus a (B, x) pont körül./

A RIA vizsgálatok során általában nem a B beütésszámot ábrázolják, hanem pl. a komplex B beütésszámának és az összes jelzett anyag T beütésszámának a B/T hányadosát, vagy ezen B és a O koncentrációju antigén oldathoz tartozó B beütésszám B/B_0 hányadosát. B_0 mindig kisebb, mint T a nemspezifikus reakciók miatt és amiatt,



2. ábra

hogy $P^* \geq Q$.

A hányadosok ábrázolásakor felvetődik az a probléma, hogy T és B_0 /Poisson-eloszlásu/ valószínűségi változók, ezért B/T , ill. B/B_0 hányadosoknak *nincs várhatóértéke*. Ezt a nehézséget a gyakorlatban kiküszöböljük azáltal, hogy nagyon kis és nagyon nagy mért beütésszámokat nem fogadunk el, azaz a Poisson-eloszlást csonkitjuk. A csonkitott eloszlásban már 0 valószínűségű a 0 beütésszám, ugyanakkor a Poisson-hibára jellemző $\sigma_z = \sqrt{z}$ becslés még jó marad.

Most határozzuk meg a B/T , ill. B/B_0 szórást. A szokásos hibaterjedési formula alapján

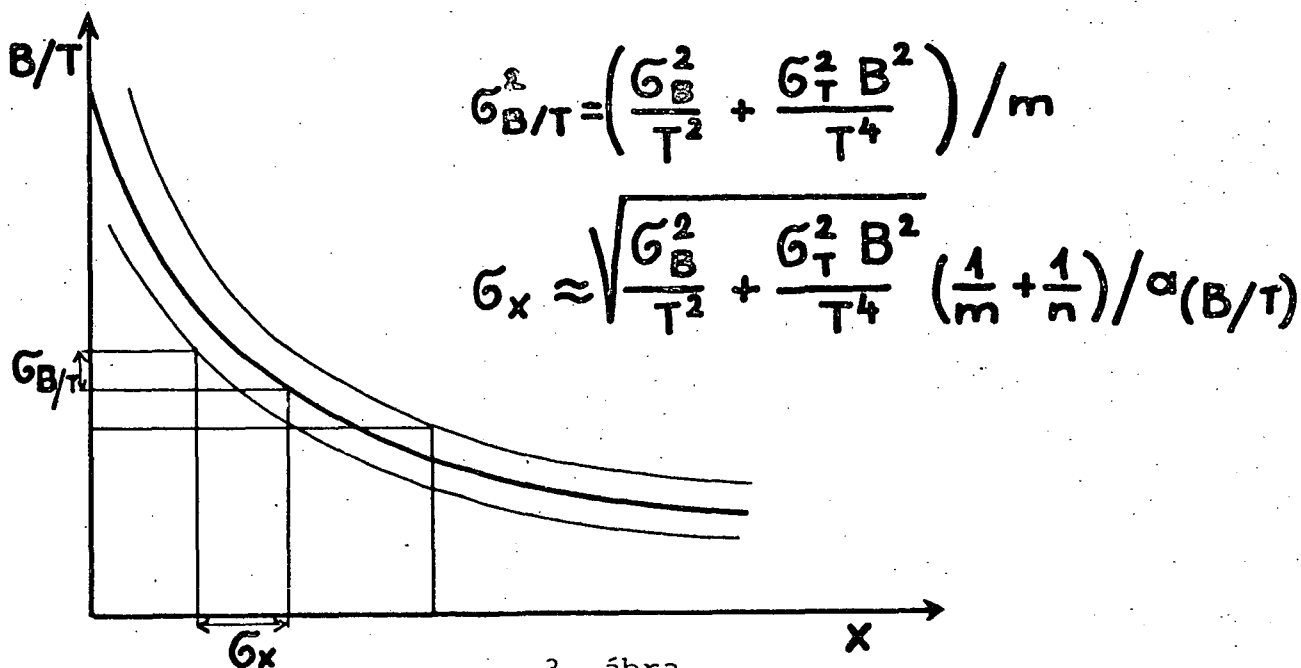
$$\sigma_{B/T}^2 \approx \left(\frac{\sigma_B^2}{T^2} + \frac{\sigma_T^2 B^2}{T^4} \right) / m \quad [12]$$

ahol m a beütésszám-mérés ismétléseinek a száma.

A meghatározás hibájában két összetevő lép fel.

a/ A [12] típusu hibával terhelt pontokból képzett kalibrációs görbe σ_y hibája /a véges szélességű konfidencia-sáv/

b/ Az ismeretlen mennyiség meghatározásakor fellépő, szintén [12] alakú hiba /3. ábra/.



3. ábra

Az ábrából leolvasható σ_x -re egy közelítő kifejezés:

$$\sigma_x \approx (\sigma_y + \sigma_{B/T}) / a_{B/T} \quad [13]$$

Pontosabb becslést kapunk a

$$\sigma_x \left(\frac{B}{T} \right) \approx \sqrt{\frac{\sigma_B^2}{T^2} + \frac{\sigma_T^2 B^2}{T^4}} \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{n} \right) / a_{B/T} \quad [14]$$

ill. B/B_0 ábrázolás esetén a

$$\sigma_x \left(\frac{B}{B_0} \right) \approx \sqrt{\frac{\sigma_B^2}{B_0^2} + \frac{\sigma_{B_0}^2 B^2}{B_0^4}} \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{n} \right) / a_{B/B_0} \quad [15]$$

kifejezéssel. A két hiba négyzetének aránya

$$\frac{\sigma_x^2 \left(\frac{B}{T} \right)}{\sigma_x^2 \left(\frac{B}{B_0} \right)} = \frac{1 + B/T}{1 + B/B_0} < 1. \quad [16]$$

Tehát a B/T ábrázolás alapján kapott koncentráció σ_x hibája mindig kisebb, mint a B/B_0 szerinti. Ez abból ered, hogy a meghatározás hibáját a B_0 -lal, ill. T -vel való leosztás esetén a meredekséget /érzékenységet/ növelő és az ordináta-irányu hibát növelő tényező együtt változik és a kettejük versengéséből az utóbbinak erősebb a hatása.