

Određivanje koncentracije hormona

Osobine hormona (značajno za razumevanje analitike):

Hormoni su antigeni (reaguju sa proizvodima imunske reakcije tj antitelima)

Svi hormoni su antigeni ali samo neki su **imunogeni** (izazivaju imunski odgovor) dok su neki **hapteni** (...imaju osobinu **antigenosti** tj da reaguju sa proizvodima imunske reakcije ali nemaju osobinu **imunogenosti**...ne izazivaju imunsku reakciju..

dakle..

moraju da se vežu za nosač da bi postali imunogeni)..

Steroidi su hapteni

Proteinski hormoni su imunogeni

Princip testova za određivanje hormona je **Ag-At reakcija**

Princip dobijanja antitela za test je imunizacija laboratorijske životinje hormonom (mora biti imunogen)

Osobine hormona (značajno za razumevanje analitike):

Hormoni su u cirkulaciji u vrlo niskim koncentracijama

(jer imaju visoku potentnost u delovanju)

Kortizol: 6 do 20 ng/ml

Tiroksin: 1 do 6 µg/dl

Trijod tironin: 60 do 145 ng/dl

Insulin: 10 do 60 mIU/L...

Za određivanje koncentracija hormona

Koriste se metode koje karakteriše visoka osetljivost (ne hemijske metode)

Osetljivost metode

...dodatno, kao info...

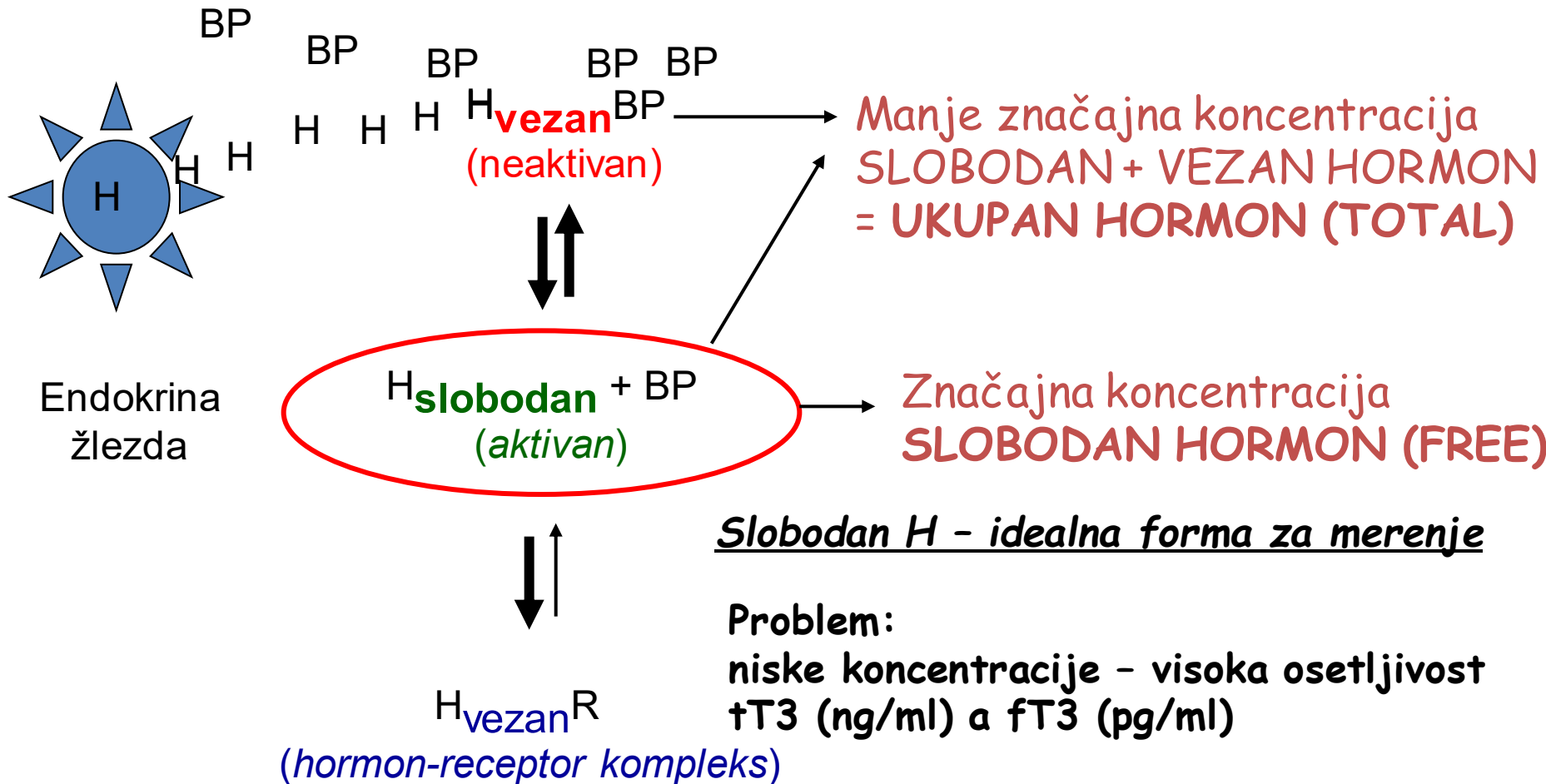
Konverzija u jedinice SI sistema (podaci iz literature)

http://www.unc.edu/~rowlett/units/scales/clinical_data.html

Osobine hormona (značajno za razumevanje analitike):

Hormoni se u cirkulaciji su slobodni i vezani (za nosače)

Serum vezujući proteini (BP- binding proteins)



Osobine hormona (značajno za razumevanje analitike):

U cirkulaciji su slobodni i vezani (za nosače)

U mleku...koliko se luči ili koliko je aktivno za novorođenče

Insulin je vezan za kazein

IGF je vezan za IGFBP

Progesteron je vezan za mast...

odvojimo mast a odvojimo i progesteron ali koliko

Osobine hormona (značajno za razumevanje analitike):

Hormoni mogu da izgube biološku potentnost
a zadrže hemijsku građu

Denaturacija proteinskih hormona
Proteoliza hormona

U slučaju preterane stimulacije žlezde ona
luči hormone koji su nedovršeni tako da mogu imati AK koje
reaguju sa AT - antigenost, ali ne i one koji reaguju sa R -
biološka aktivnost

Osobine hormona (značajno za razumevanje analitike):

Iako imaju različite funkcije **mogu biti slične hemijske građe**

Primer: ACTH i β MSH, insulin i IGF

Hormoni **različitih vrsta** mogu biti slični po strukturi odnosno hemijskoj građi (proteinski, dok su derivati aminokiselina i steroidni isti)

Unakrsne reakcije (Cross reactivity)

reagovanje antitela sa istim antigenim determinantama na različitim molekulima

POZITIVNO - humani kitovi se mogu koristiti za određivanje kod životinja

NEGATIVNO - unakrsne reakcija sa sličnim molekulima u serumu ispitivane jedinke

Specifičnost metode (unakrsne reakcije)

Određivanje koncentracije hormona

Biološke metode

Bioesej

Radiološke metode

Radioimunološka analiza - RIA (radioimmunoassay)

Kompetetivno vezivanje za protein - CPBA
(competitive protein binding assay)

Imunoradiometrijska analiza - IRMA
(immunoradiometric assay)

Radioreceptorske, radioenzimatske...

Enzimske metode

ELISA.....

Određivanje koncentracije hormona

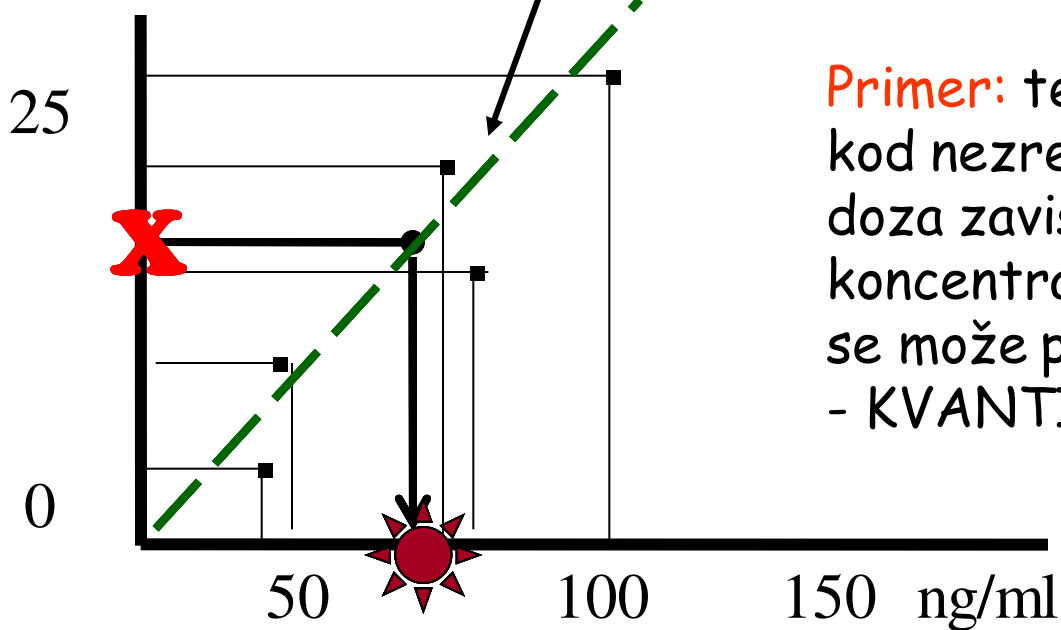
Biološke metode

Bioesej

Ispituje se koncentracija nepoznatog hormona aplikacijom biološkom sistemu (životinja, organ, tkivo, ćelija) nakon čega se prati biološki efekat prethodno je napravljene standardna kriva: poznata koncentracija hormona, biološki efekat

Biološki efekat

STANDARDNA KRIVA - najbolje prilagođena kriva



Primer: testosteron stimuliše rast prostate kod nezrelih ili kastriranih pacova na doza zavistan način - koncentracija androgena u uzorku se može porediti sa testosteronom - KVANTIFIKACIJA ali retko

Ukupna koncentracija testosterona

Određivanje koncentracije hormona

Bioesej - PRIMERI

Dijagnostika graviditeta kod kobila

PMS-SŽK

50 ml krvi (25 ml seruma)
42 -150 dana po parenju

Svakih pola sata
0,4mL 5 puta

120 ml krvi
42 -135 dana
po parenju

Jedanput 2 mL

50 ml urina
120 dana
po parenju

Svakih pola sata
0,2mL 5 puta s.c



Za 4 do 5
dana
sazrevanje
folikula
98 %



Za 1 do 2
sata
izbaci
ikru/spermu
90 do 100 %



Za 4
dana
promene u
vagini
98 %

Estrogen u mokraći

Određivanje koncentracije hormona

Biološke metode

Bioesej

Prednost: ne meri samo koncentraciju hormona već i njihovu biološku aktivnost (biološki aktivnu formu)

Nedostak: težak za izvođenje, skup nedovoljna preciznost (zbog individualnih razlika među životinjama) mali kapacitet metode (jedan uzorak - jedna laboratorijska životinja)

Radioimunoesej - RIA

1960. godina:

obeležen insulin sporije isčezava iz pacijeneta lečenih prethodno insulinom

Osnova je reakcija **ANTIGEN- ANTITELO**, koja je **VRLO SPECIFIČNA**
Antitela su se dobijala na laboratorijskim životinjama imunizacijom
(na zamorcima dobijena antitela imunizacijom svinjskim insulinom)

Komponente RIA sistema

obeleženi ANTIGEN (obeležen bilo kojim **RADIOAKTIVNIM IZOTOPOM** koji se može ugraditi u molekul a da ne ošteti njegovu strukturu).

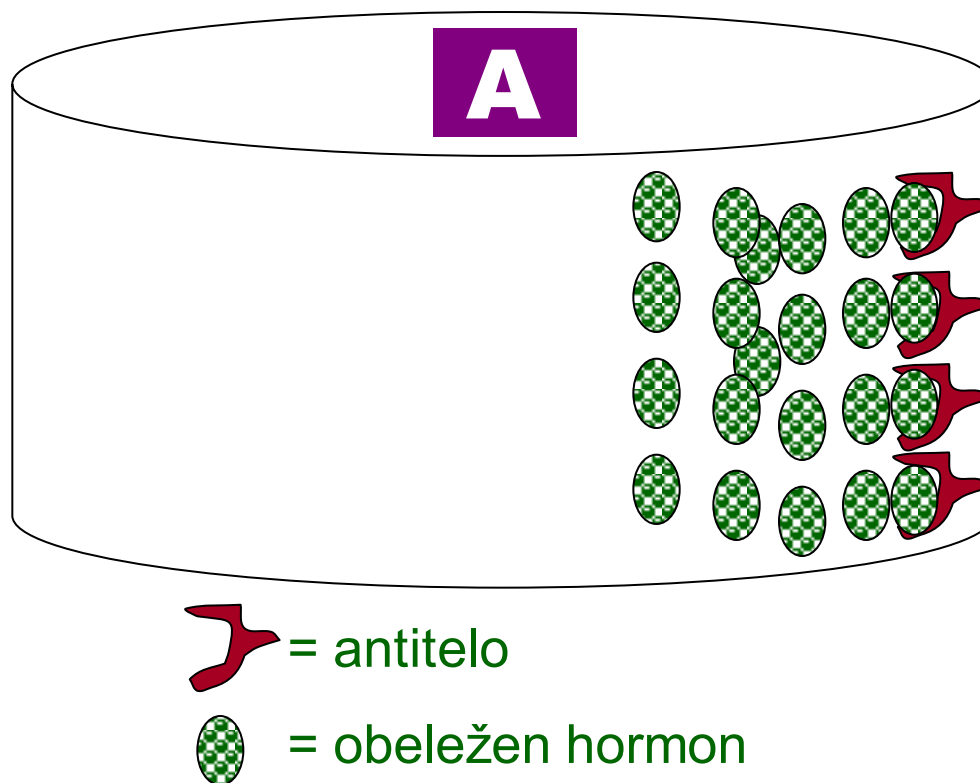
Obeležavanje ^{125}J , ^{131}J za proteinske hormone i tireoidne hormone i ^3H za neproteinske antigene)

specifično ANTITELO

neobeleženi ANTIGEN (može biti **HAPTEN**) - hormon čija se conc. određuje

Merenje hormona RIA metodom:

Dodavanje obeleženog hormona **bez prisustva neobeleženog hormona**
UZORKA

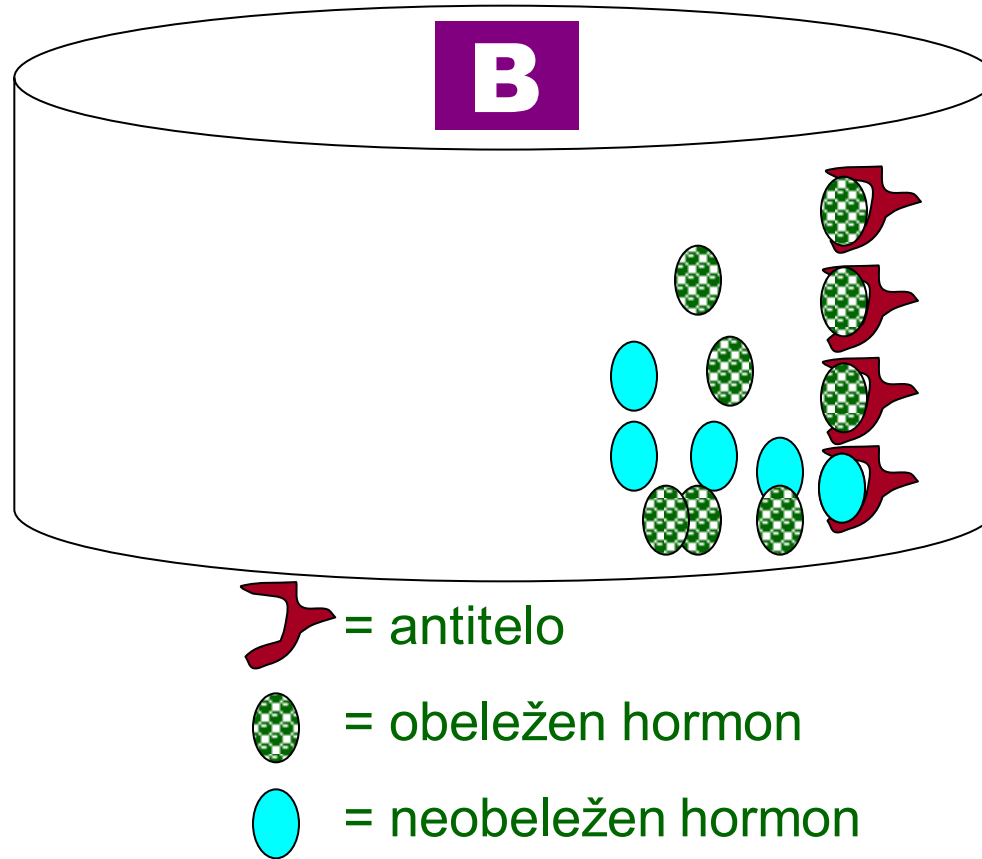


Antitela su zasićena viškom obeleženog hormona;

Meri se radioaktivnost obeleženog antitela u talogu - MAKSIMALNA

Merenje hormona RIA metodom

Dodavanje obeleženog hormona + **neobeležén hormon u malim količinama**

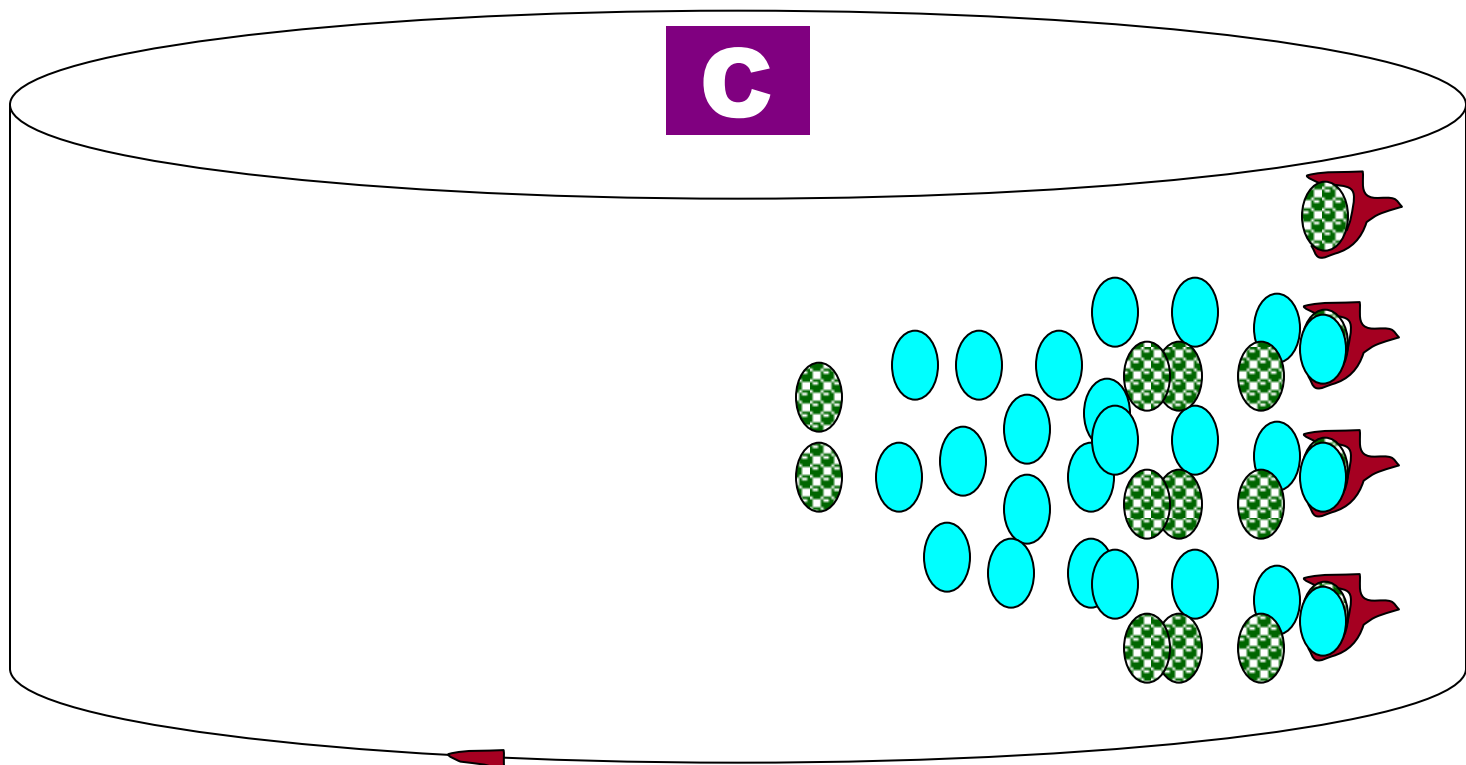



**Male količine neobeležénog hormona istiskuje malo obeleženog hormona
= ↓ koncentracija obeleženih antitela**

Meri se radioaktivnost obeleženog antitela u talogu - VISOKA

Merenje hormona RIA metodom

Dodavanje obeleženog hormona + **neobeleženi hormon u velikim količinama**



 = antitelo

 = obeležen hormon

 = neobeleženi hormon

Velike količine neobeleženog hormona istiskuju puno obeleženog hormona =

↓↓↓ koncentracija obeleženih antitela

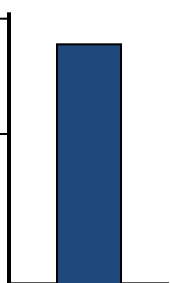
Meri se radioaktivnost obeleženog antitela u talogu - NISKA

Merenje koncentracije hormona: **Kriva istiskivanja**

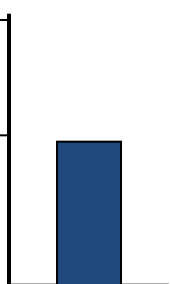
MERIMO




% labelled antigen bound (radioactive counts)



% labelled antigen bound (radioactive counts)

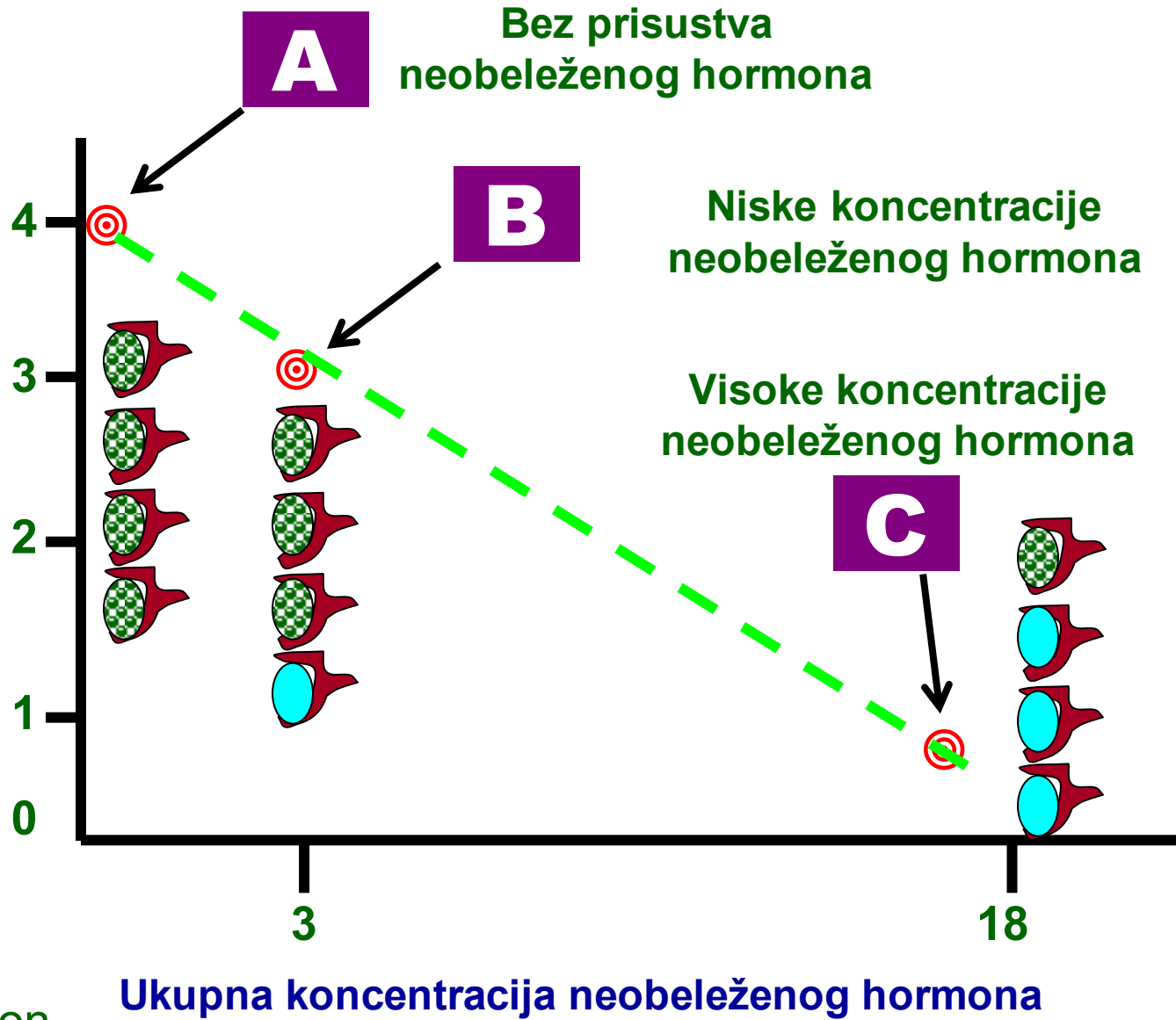


Obeležen hormon vezan za antitelo

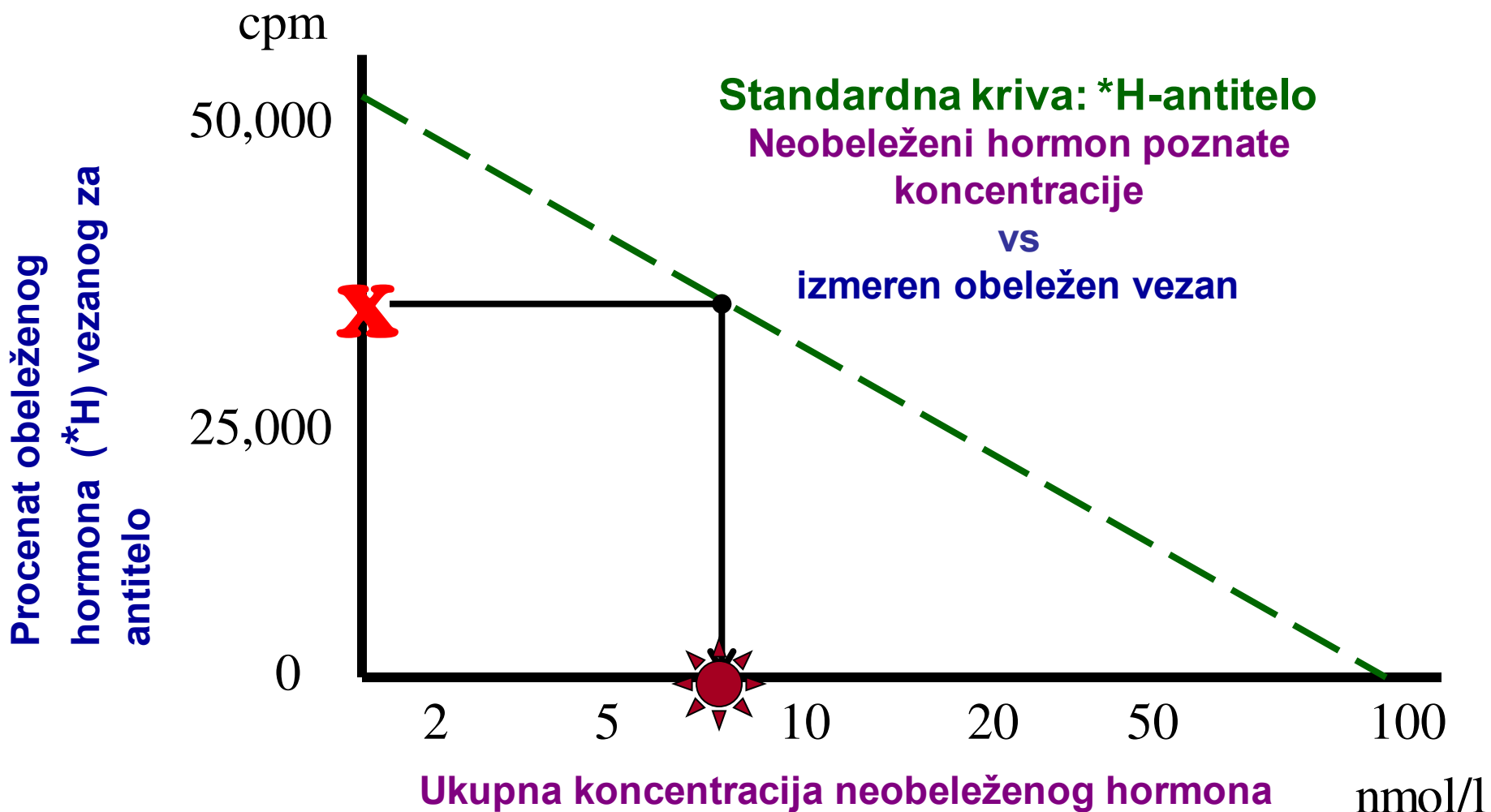
 = antitelo

 = obeležen hormon

 = neobeležen hormon



Merenje hormona RIA metodom: **Standardna kriva**



X = izmerena radioaktivnost u u ispitivanom uzorku

 = nepoznata koncentracija hormona u uzorku

Scintilacioni brojač

Meri radioaktivnost (γ i β)



Određivanje koncentracije hormona

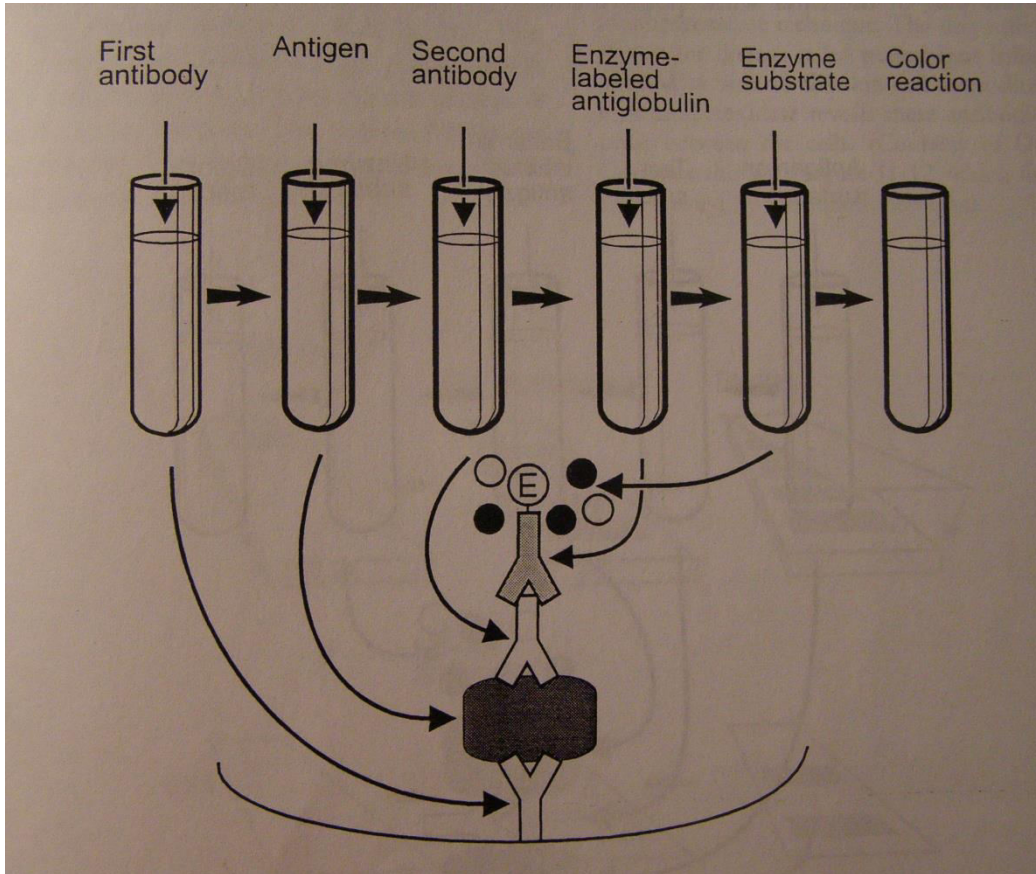
RIA

Prednost: visoka osetljivost (malo lažno negativnih),
veliki broj uzoraka se može istovremeno testirati (12 uzoraka)
očitava fizički proces neosetljiv na temperaturu, pH...

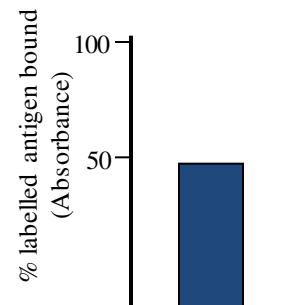
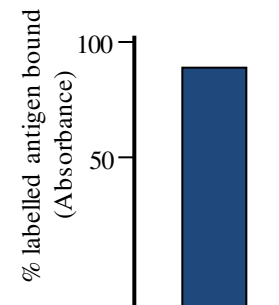
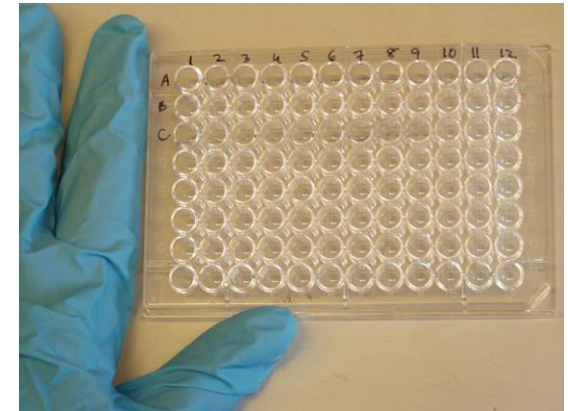
Nedostatak: radioaktivnost (hormon obeležen) - problem radioaktivnog otpada, meri hormone bez obzira da li imaju biološku aktivnost
...ZATO BI BILO DOBRO U RIA metodi ZAMENITI ANTITETLO SA RECEPTOROM koje bi imalo ulogu vezujućeg proteina..

Određivanje koncentracije hormona

Sendvič ELISA - određivanje koncentracije Ag



Elisa ploča
12 x 8 = 96



Biološki materijali u kojima se određuju hormoni

Krv - stresogeno naročito kod učestalog uzimanja (kateteri),
2 do 5 minuta od hvatanja nije stres

Mleko - dobar uzorak, samo kada je u laktaciji

Pljuvačka - sunđer i gaza u usta, nestresogeno kod teladi

Urin - kolektori

Feces - nestresogeno

Tkiva - analiza namirnica na prisustvo hormona

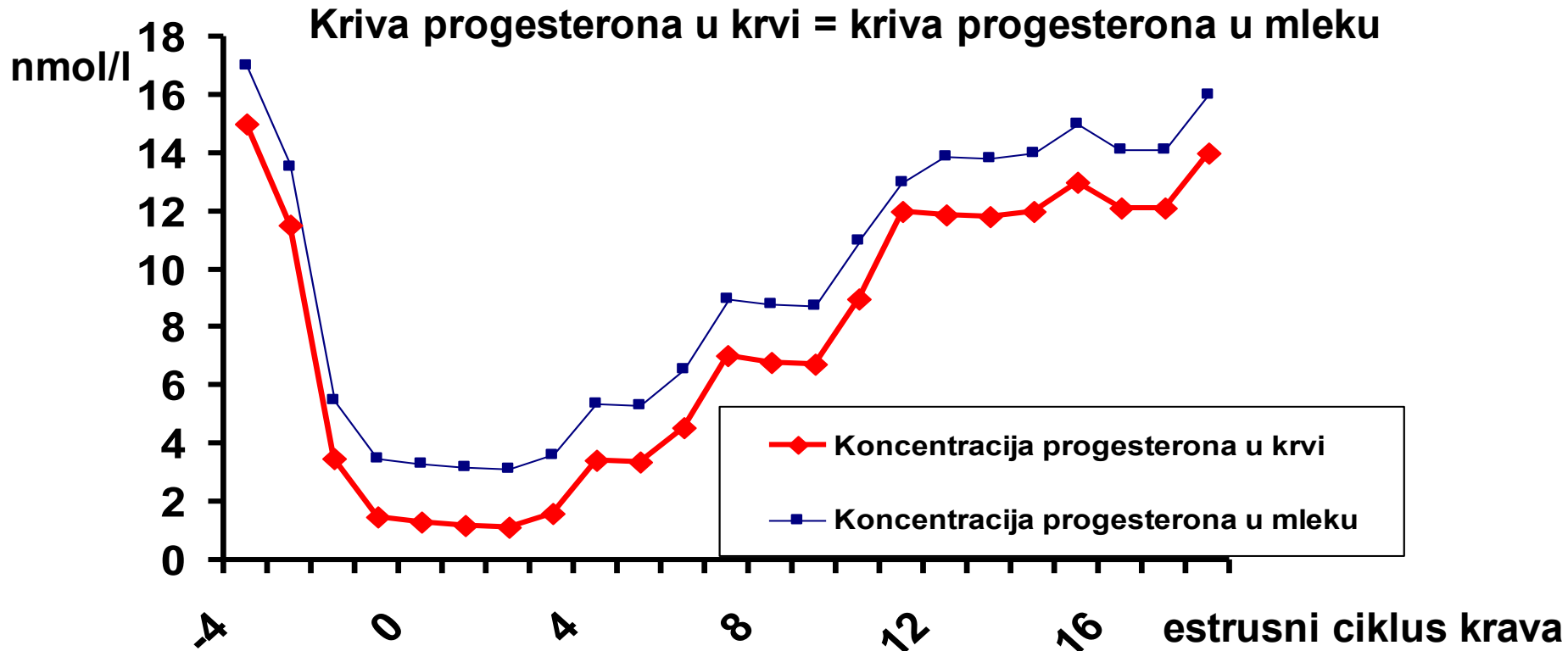
Biološki materijali u kojima se određuju hormoni

Krv, urin, feces, mleko, pljuvačka...

Progesteron u mleku

(slobodan ali i naknadno vezan oblik za spec ili nespec, receptori u samoj žlezdi)

Poremećaj **estrusnog ciklusa** kod krava...ali i svinja i ovaca..
Deteksija estrusa



Biološki materijali u kojima se određuju hormoni
Krv, urin, *feces*, *mleko*, *pljuvačka*....

Progesteron u mleku

Rano otkrivanje steonosti

Vrsta životinje	Stanje graviditeta	Dan graviditeta	Koncentracija progesterona u mleku (ng/ml)
KRAVA	Gravidna	21 do 24 dan	> 11
	Negravidna		< 2
KOZA	gravidna	22 do 26 dana	> 10
	Negravidna		< 2

Biološki materijali u kojima se određuju hormoni

Krv, urin, feces, mleko, pljuvačka....

Progesteron u mleku

Vežan za masti mleka...određivanje u punom ili obezmašćenom mleku....

..Postupak: uzorci mleka se zagreju na 45°C 20 min, homogenizacija na vortexu 30 sec. Odliti 20 µl. Razblažiti sa 780 µl fosfatnog pufera koji sadrži 0,1 % goveđeg serum albumina. Time su razblaženi 40 x čime je neutralisan nepovoljni uticaj mlečne masti na čitanje rezultata. Time se izbegava procedura obiranja mleka....

Insulin u mleku

Vežan za kazein i kada se istaloži kazein on ode na dno ...određivanje u punom mleku....

Biološki materijali u kojima se određuju hormoni

Krv, urin, feces, mleko, pljuvačka....

Kortizol u pljuvački preživara

Nestresogeno kod teladi

Delimično stresogeno kod odraslih

SLOBODAN - biološki aktivan se određuje

Biološki materijali u kojima se određuju hormoni

Krv, urin, feces, mleko, pljuvačka, DLAKA

Kortizol u DLACI

Akumulacija kortizola

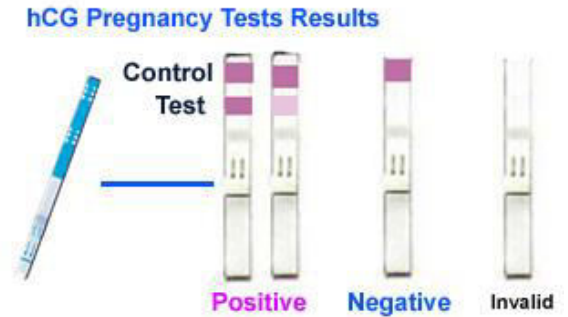
Boja, segment dlake

VALIDACIJA METODE



Biološki materijali u kojima se određuju hormoni

hCG u urinu - GRAMEM test

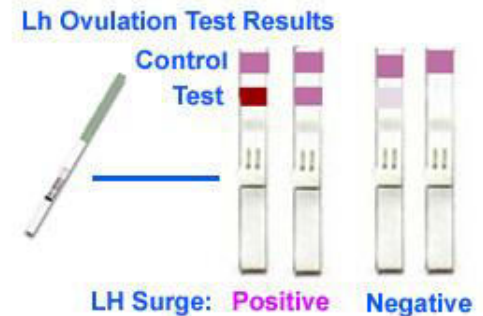


Urin je uzorak

Princip testa je da je na traci monoklonsko antitelo za koje je vezana boja - koloidno zlato. Ako je u urinu hCG iznad 20 mIU/ml on se vezuje za to antitelo formirajući At-Ag kompleks. Onda se dodaje anti hCG antitelo koje se vezuje i daje intenzivnu purpurnu boju - princip ELISA testa.

Testiranje je 14 do 24 dana od očekivane oplodnje - utvrđivanje graviditeta

LH u urinu - OVULIN test



Urin je uzorak

Monoklonsko antitelo i koloidno zlato kao marker

Uzastopno testiranje 5 dana za utvrđivanje preovulatornog pika u lučenju LH

RIA I ELISA proteinskih hormona dom.životinja - specifičnosti

HOMOLOGI TESTOVI

testovi za proteinske hormone su specifični za životinjsku vrstu od koje potiče hormon za dobijanje antitela i za obeležavanje ili ograničen broj srodnih vrsta

HETEROLOGI TESTOVI

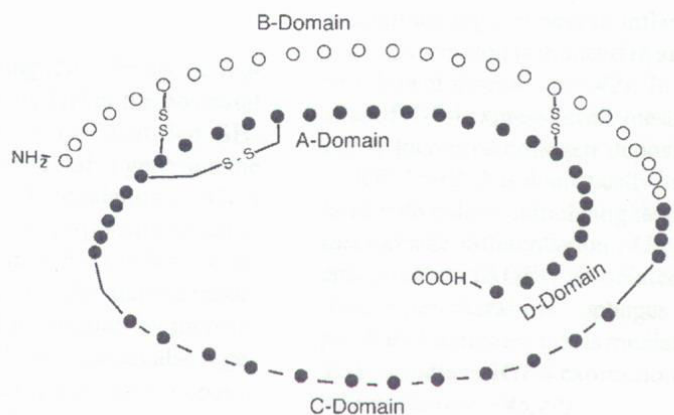
testovi za proteinske hormone u kome se koristi antiserum na hormon jedne vrste, a kao obeleženi antigen hormon druge životinjske vrste. Hormon iz uzorka može da pripada jednoj od te dve vrste ili nekoj trećoj vrsti.

Retki su gotovi komercijalni testovi za životinje. Koriste se komercijalni humani (ili homologni testovi neke druge vrste ili uspostavljaju heterologi testovi). Često se nabavljaju komponente sistema i pravi sopstveni test. Nabavljaju se (hormoni za jodiranje, antiserumi za hormon, hormoni za standard) za TSH, LH, FSH svinja, TSH, LH, FSH, GH krava, LH i FSH konja, GH, PRL kod psa, GH, PRL ovce.

RIA I ELISA proteinskih hormona dom.životinja - specifičnosti

HOMOLOGI HUMANI TESTOVI

IGF-I - koristi humani test



Sekvenca domena A, koju čine Phe49, Arg50 i Ser51 i domena B, izgrađena od Glu6, Gln15 i Phe16, esencijalne su za vezivanje sa IGFBP. Aminokiselinski ostaci odgovorni za vezivanje za IGF-I receptor su Tyr24 B domena i Tyr31 C domena, a za vezivanje za IGF-II receptor značajni su Phe49, Arg50 i Ser51 A domena

Insulin - koristi humani test

IGF-II - TREBALO BI DA koristi humani test (proizvođač ne garantuje...) ...jer...

INTERNET - info

RIA I ELISA steroidnih hormona dom.životinja - specifičnosti

Struktura steroidnih hormona je istovetne u različitim životinjskih vrsta - humani komercijalni RIA kitovi se koriste u veterini. Problem koncentracije odnosno standarda zbog velikih razlika u koncentraciji između vrsta i različitih faza života - različita razblaženja.

Uzrast i kategorija goveda	Koncentracija kortizola (nmol/l)
Neposredno posle rođenja	92,80
2. sat po rođenja	82,54
4. sat po rođenju	67,48
32. sat po rođenju	45,83
3. dan života	26,38
7. dan života	20,59
15. dan života	16,68
30. dan života	8,1
60. dan života	14,78
Krave	5,7
Junad	3,1

HOMOLOGI TESTOVI se koriste
ekstrakcija se vrši dietiletom.

Određivanje funkcije endokrine žlezde

Koncentracija hormona nije siguran pokazatelj funkcije endokrine žlezde jer: zavisi ne samo od količine hormona koji se proizvede na mestu sinteze, već i od količine koja se iskoristi u ciljnom tkivu, eliminiše iz cirkulacije i metaboliše u tkivima.

TESTOVI STIMULACIJE

TESTOVI SUPRESIJE

ODREĐIVANJE VEZUJUĆIH PROTEINA

...C peptid INSULINA...

RITMIČNOST U LUČENJU