

(19) DANMARK



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 144659 B

- (21) Ansøgning nr. 4064/75 (51) Int.Cl.³ C 12 Q 1/32
(22) Indleveringsdag 11. sep. 1975
(24) Løbedag 11. sep. 1975
(41) Alm. tilgængelig 13. mar. 1976
(44) Fremlagt 3. maj 1982
(86) International ansøgning nr. -
(86) International indleveringsdag -
(85) Videreførelsesdag -
(62) Stamansøgning nr. -
(30) Prioritet 12. sep. 1974, 2443741, DE

(71) Ansøger KOMMANDITGESELLSCHAFT SCHWARZHaupt, 5 Koeln 1, DE.

(72) Opfinder Walther Lamprecht, DE.

(74) Fuldmægtig Ingeniørfirmaet Hofman-Bang & Boutard.

(54) Fremgangsmåde og reagens til
bestemmelse af isoenzymerne
4 eller 5 af lactatdehydro-
genase og et diagnostisk mid-
del indeholdende reagenset.

Opfindelsen angår en fremgangsmåde og et reagens til bestemmelse af isoenzymerne 4 eller 5 af lactatdehydrogenase (LDH) alene eller i blanding med hinanden eller med andre LDH-isoenzymer, ved omsætning af lactat og nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD⁺) til pyruvat. Opfindelsen angår endvidere et diagnostisk middel indeholdende reagenset.

Det er kendt, at lactatdehydrogenase, sædvanligvis betegnet LDH, optræder i fem isoformer. Ved aktivitetsbestemmelse af enkelte isoenzymer er forskellige substrat- og pH-optima vigtige kendetegn, som hidtil ikke var fuldstændig kendt for de enkelte isoenzymer.

DK 144659 B

Til bestemmelse af alle isoenzymer har man hidtil enten adskilt isoenzymerne elektroforetisk (se f.eks. "Die Isoenzyme der Lactatdehydrogenase", Reihe Biochemie und Klinik af S.L. Kowalewski, udgivet af G. Thieme Verlag, Stuttgart 1972, side 29) eller holdt den samlede LDH i opløsning, bundet LDH-2 til -5 og bestemt det hyppigst forekommende LDH-1. En oversigt over den hidtidige standardarbejdsmetode findes f.eks. i bogen "Enzymatische Analyse", Band I, Verlag Chemie, Weinheim 1970, side 557. Ifølge denne foreskrives for omsætningen af lactat til pyruvat et pH-optimum mellem 8,3 og 8,9. Faktisk anvendes ved alle kendte bestemmelsesmetoder et basisk eller højst omkring neutralt pH-område for at omfatte isoenzymerne så fuldstændigt som muligt.

Af Lamprecht et al. (Cardiology 56: 371 - 375 (1971/72)) og i Fortschritte der klinischen Chemie, Enzyme und Hormone, Verlag der Wiener medizinischen Akademie 1972, side 277 - 283, blev det fastslået, at enkelte isoenzymer ved pH-ændring kan overgå i hinanden, altså at der finder en konformationsændring sted.

Opfindelsens formål er at afskaffe de ved de kendte fremgangsmåder optrædende komplicerede adskilleelsesprocedurer og de stadigt konstaterede unøjagtigheder ved den samlede bestemmelse og at tilvejebringe en fremgangsmåde til optimal bestemmelse af LDH-isoenzymerne 4 og/eller 5, eventuelt i blanding med andre LDH-isoenzymer. Endvidere er det opfindelsens formål at angive et reagens til anvendelse ved fremgangsmåden og et diagnostisk middel til konstatering af patologiske ændringer i det nedre kvindelige genitalområde.

Det har vist sig, at en sænkning af pH-værdien under neutralpunktet ved den i sig selv kendte omsætning af lactat og NAD til pyruvat fører til en optimal konstatering af den samlede mængde af LDH-isoenzymerne 4 og 5. Derved er det fremfor alt interessant, at LDH 4 og 5 kun konstateres fuldstændigt ved måling i surt pH-område. Derigennem optimeres den samlede mængde af alle konstaterede isoenzymer af LDH ved måling i surt område, og det er muligt at bestemme LDH 4 eller 5 fuldstændigt alene eller i blanding med hinanden, men også med andre LDH-isoenzymer.

Dette opnås ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, som er ejendommelig ved, at omsætningen gennemføres ved en pH-værdi på 6 - 6,5. For omsætningen er en ringe mængde væske tilstrækkelig, men den gennemføres hensigtsmæssigt i flydende medium.

Det har nemlig endvidere vist sig, at optimumet for den fælles bestemmelse af flere isoenzymer også er pufferafhængigt. For de fleste puffere ligger dette optimum ved omkring pH 6-6,5, ved triethanolamin-NaOH-puffer ved en pH-værdi på 6,3-6,4. Hvis man vil arbejde i phosphatpuffer, kan man ganske vist endnu måle, men derved bestemmes kun en delmængde, f.eks. isoenzym 5 ved pH 7,9. En sur pH-værdi egner sig imidlertid væsentligt bedre til fælles bestemmelse af flere isoenzymer. En pH-værdi på 6,3-6,4 egner sig især til fælles bestemmelse af LDH 4 og 5, som f.eks. kan optræde i vaginalvæsken.

Fortrinsvis tilvejebringes i reaktionsmediet en stor pufferkapacitet. Dette har den fordel, at der også ved undersøgelse af legemsvæsker med en pH-værdi, der afviger stærkt fra pH 6, hverken sker nogen under- eller overskridelse af den optimale pH-værdi ved omsætningen.

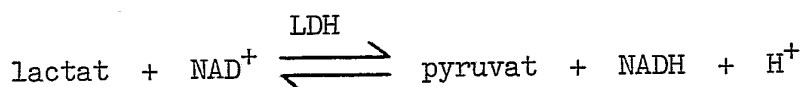
Omsætningen foregår på i sig selv kendt måde ved en temperatur på ca. 37°C. Derved indstilles coenzym-mængderne således, at de optimalt rækker til for alle foreliggende isoenzymer, hvad der under hensyntagen til de følgende angivelser kan bestemmes med få rutineforsøg.

Bestemmelsen af LDH er af stor vigtighed, især ved undersøgelsen af legemsvæsker. Medens disse isoenzymer hos sunde mennesker overvejende fastholdes i vævene, finder man dem ved unormal vævsvækst eller ved leukæmi eller andre sygdomme i betydelig koncentration i serummet eller andre legemsvæsker. Især kan man fastslå, at de findes i vaginalvæsken ved patologiske ændringer i det nedre kvindelige genitalområde.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan anvendes på alle legemsvæsker. Indstillingen af pH-værdien af den prøve, som skal undersøges, afhænger af prøvens egen pH-værdi. I hvert fald skal for omsætning-

gen selv foreligge en pH-værdi på 6,3-6,4, især omkring 6,3. I overensstemmelse hermed skal sammensætningen af reagenset til bestemmelsens gennemførelse indstilles.

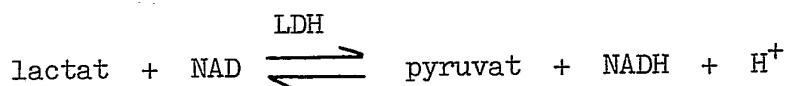
Medens der ved standardmetoden (se Enzymatische Analyse, Band I, loc. cit.) foreskrives et pH-optimum mellem 8,3 og 8,9, afviges ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen bevidst fra dette pH-område. Grunden til fastlæggelsen af det ovennævnte basiske pH-område skal søges deri, at der ved reaktionen



opstår en proton i det støkiometriske forhold til lactat-omsætningen. For at drive denne ligevægt for LDH til højre, arbejder man i det alkaliske område.

Ifølge opfindelsen skal derimod, f.eks. ved bestemmelse i serum eller plasma, den prøve, som skal undersøges, puffres med triethanolamin-NaOH til en pH-værdi på omkring 6,3-6,4 og også den til undersøgelsen anvendte testkombination (prøvereagens) indstilles på denne værdi. Til overslagsbestemmelser indstilles en pH-værdi på 6,0 - 6,5 og puffres således, at der ved selve bestemmelsen foreligger en pH-værdi på 6,3 - 6,4. Ved serumalbumin tilsættes på i sig selv kendt måde glutathion.

Isoenzymene af lactatdehydrogenase bestemmes optimalt ved pH 6,3-6,4, når der er sørget for, at reaktionsligevægten



ved følgereaktioner forskydes til højre. Til dette formål tilsættes phenacimethosulfat, ved hjælp af hvilket coenzymet NADH stadig oxideres igen. Målingen ved pH mellem 6,0 og 6,5 frembyder for første gang muligheden af, at bestemme LDH 5 fuldstændigt. Dette er fremfor alt interessant fordi forekomsten af LDH 5 er et indicium for forekomsten af carcinomer.

Ved visse legemsvæsker er de ovenfor beskrevne forhold imidlertid anderledes, fordi de udviser en egen-pH-værdi, der udpræget afviger fra pH 6,3 - 6,4. En sådan legemsvæske er især vaginalvæsken, hvis pH-værdi ligger ved omkring 4. Her må den optimale pH-værdi ved omsætningen indstilles ved hjælp af den anvendte testkombination, hvilket betyder, at testkombinationen har en højere pH-værdi, som så af vaginalvæskens pH-værdi trækkes ned på omkring pH 6 - 6,5.

I overensstemmelse hermed angår opfindelsen endvidere et reagens til anvendelse ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, hvilket reagens indeholder lactat, nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD^+), et tetrazoliums salt til synliggørelse af den enzymatiske NAD-reduktion og en puffer og er ejendommeligt ved, at reagentet er pufret således, at der sammen med prøven opnås en pH-værdi på 6 - 6,5. Ved anvendelse af et tørpræparat må således denne pH-værdi foreligge efter opløsning af dette.

For det specielle tilfælde, hvor der skal undersøges en vaginalvæske, som selv ikke er ændret i dens oprindelige pH-værdi, egner sig især anvendelsen af bestemmelsen med triethanolamin-NaOH-puffer, hvorved reagentet indstilles til pH 7,0, mens ved undersøgelsesprøver indstillet til pH 6,3 - 6,4 også reagentet indstilles til denne værdi.

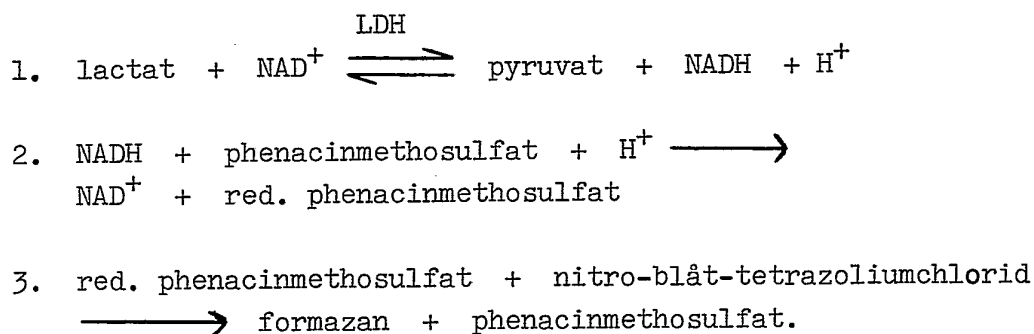
I overensstemmelse hermed angår opfindelsen endvidere et diagnostisk middel til konstatering af patologiske ændringer i det nedre kvindelige genitalområde, hvilket middel er ejendommeligt ved, at det består af en tampon, som bærer et reagens ifølge opfindelsen. Reaktionen med de i vagina forekommende LDH-isoenzymmer ved pH-omkring 6,0 - 6,5, især 6,3 - 6,4, fremkaldes ved indstikning af tamponen i vagina.

Reagentet består af en opløsning med følgende sammensætning:

	<u>fortrinsvis reagenssam- mensætning</u>	<u>nedre og øvre grænseområde</u>
Triethanolamin-NaOH-puffer, pH 7,0	5,0 mM	1,0 - 150 mM
Na-lactat (Natriumsalt af D,L-mælkesyre)	67,5 mM	20 - 350 mM
Phenacimethosulfat (PMS)	0,1 mM	0,01- 1,0 mM
Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD ⁺)	1,5 mM	0,1 - 10 mM
Nitro-blåt-tetrazoliumchlorid (NBT)	0,3 mM	0,01- 1,5 mM

Dette reagens påføres, medens det beskyttes mod lyset, en egnet bærer, især en tampon, og denne opbevares beskyttet mod lyset, indtil den skal anvendes.

Forekomsten af LDH i vaginalvæsken vises derved, at tamponen efter omkring 5-10 minutter antager en blå farve. Der finder følgende reaktionsforløb sted:



Da den anden og også den tredje til lactatomsætningen koblede reaktion fjerner det dannede reducerede coenzym lige så meget som den første reaktion, d.v.s. at lactatomsætningens ligevægt derved forskydes endnu stærkere til højre, vil ved reagensblandings pufning til pH 7,0 den faktiske omsætning efter indlægning af tamponen forløbe ved en pH-værdi omkring 6, især 6,3-6,4. Derved bestemmes isoenzymerne LDH-4 og LDH-5, som kan forekomme ved

unormale ændringer i vaginalvæsken, optimalt.

Ved de reagenser, som skal anvendes i vagina, skal der vælges en puffer, som er stabil og vævsvenlig. Hertil egner sig især triethanolamin-NaOH-puffer.

Reagenset kan påføres bæreren, især en tampon, på en hvilken som helst måde. Det er kendt, at håndteringen af sådanne reagenser skal foregå beskyttet mod lyset, og at den med reagenset forsynede bærer i vid udstrækning skal opbevares under udelukkelse af lys indtil dens anvendelse. To fordelagtige metoder til indbringning af reagenset i en tampon er en injektion af ca. 2 ml af det foretrukne reagens eller imprægnering af en tamponende i en længde på omkring $3/4$ cm med ligeledes omkring 2 ml reagens og efterfølgende tørring, især frysetørring af tamponen. Men reagenset kan også f.eks. blot påføres en udtrækssnor, som senere efter behov let kan fjernes fra tamponen. Meget gunstig er også påføringen af reagenset på et bomuldsbånd eller en bomuldssnor, som indsættes i tamponen.

Da det ved anvendelse til hurtig bestemmelse af en patologisk ændring i den nedre kvindelige genitalvej ved indføring i vagina naturligvis ikke vides, hvor megen vaginalvæske der findes, og mængden svinger fra tilfælde til tilfælde ligesom den mulige pH-værdi af vaginalvæsken, må der skabes en stor pufferkapacitet i reagenset, for at der ved den egentlige bestemmelse på reaktionsstedet opretholdes en pH-værdi på 6-6,5, især 6,3-6,4. Da pufferkapaciteten af den i udtrækssnoren foreliggende reagensmængde herved i praksis ofte ikke slår til, er det hensigtsmæssigt i dette tilfælde at anbringe en større mængde pufferstof i tamponen, således at der tilvejebringes en tilstrækkelig puffering, i hvert fald på den ved tamponen nærmestliggende del af udtrækssnoren.

Sådanne med reagenset forsynede bærere behøver ikke at anvendes af lægen, men enhver kvinde kan selv anvende dem. En blåfarvning efter 15-30 minutters ophold af tamponen i vagina angiver faren for en patologisk ændring og er en advarsel om at opsøge lægen.

Men hvis den benyttede tampon eller udtrækssnor eller lignende f.eks. skal arkiveres, hvad der især kan være tilfældet ved an-

vendelse hos lægen, eller hvis patienten vil sende tamponen til lægen, skal der foregå en efterbehandling af den benyttede tampon for at fjerne den ubehagelige lugt, desinficere tamponen og stabilisere farvningen til opbevaring over længere tidsrum. Det har endvidere vist sig, at denne efterbehandling kan ske ved neddykning af den til undersøgelsen anvendte tampon i en 20% "Paraloid"-opløsning ("Paraloid" opløst i toluen).

Medens de hidtidige metoder til LDH-bestemmelse er udtalte laboratoriemetoder, som desuden har de tidligere beskrevne ulemper, medfører opfindelsen muligheden af en hurtig, tilstrækkelig kvantitativ bestemmelse til visse anvendelsesformål, især for vaginalvæske, af den utrænede bruger. Dette er især vigtigt ved svulstpatienter. Hos et stort antal svulstpatienter blev der ifølge litteraturen indtil i dag undersøgt 26 enzymer. LDH har den højeste diagnostiske følsomhed; i serum (ikke ekskretter) fandtes en forhøjelse på mellem 40 og 90%. Ved påvist tumor har bestemmelsen af LDH i serummet vist sig egnet til forløbs- og terapi-kontrol. En LDH-forhøjelse er ganske vist på ingen måde tumorspecifik. Men den udgør altid en henvisning til en alvorlig sygdom og er i sammenhæng med andre kendetegn egnet til at støtte formodningsdiagnosen af en tumor.

Det foreliggende foretrukne reagens påført tamponer blev anvendt ved rækkeundersøgelser på ca. 100 sunde kvinder og på patienter med Carcinoma colli uteri, Carcinoma corporis og Carcinoma in situ. Til opnåelse af de bedste resultater indlægges tamponen i 15-30 minutter. Efter udtagning kunne følgende farvninger umiddelbart fastslås:

ingen farvning	negativ
rosa farvning	endnu negativ
lyseblå med violet tone	+
blå	++
mørkeblå	+++

Hvis der optrådte en blå (++) eller en mørkeblå (+++) farvning, så forelå der i alle tilfælde et carcinom, som altid stemte overens med de patologiske konstateringer. Ved lyseblå farvning kunne

næsten uden undtagelse fastslås diagnosen "omdannelseszone". En rosa farvning er hidtil kun fundet hos sunde kvinder (også hos svangre indtil den femtende dag).

Bestemmelsen in vitro, altså f.eks. undersøgelsen af serum eller plasma, gennemføres på i sig selv kendt måde. Den eneste nødvendige ændring er indstillingen af en pH-værdi på 6 - 6,5, i modsætning til den hidtil benyttede, stærkt basiske pH-værdi, således at der her ikke kræves nogen nærmere beskrivelse. Til absolut bestemmelse kan der foretages en justering af farveomslaget ved hjælp af en standard-LDH-prøve. Justerprøven kan farvekonserveres i nogen tid, som det er beskrevet for konserveringen af tamponen.

De følgende eksempler viser endnu to muligheder for at påføre reagenset på en tampon.

a) Neddykningsmetode.

Sædvanlige hygiejnetamponer omvikles en eller to gange stramt omkring midten med et 1 cm bredt klæbebånd. Tamponens hylster åbnes ved den modsatte ende af den, hvor udstrækssnoren befinder sig. Dermed ligger tamponens cylinderflade fri. Fra kommercielle reagensglas med et indhold på 18 ml bortsprænges bundkuppen. I det således dannede glasrør indføres tamponen på en sådan måde, at den ved en side åbnede tampon med sin endeflade flugter med rørenden. Udtrækssnoren fastgøres ved rørets anden ende med hæfteplaster, klæbebånd eller lignende. Rørets ende med det åbnede tamponhylster neddykkes i en opløsning af reagenset ifølge opfindelsen. Pr. tampon opsuges 2,0 ml. Påføringen af opløsningen og samtlige her skildrede manipulationer, som foregår i forbindelse med reagensopløsningen, skal gennemføres i mørkekammer med monochromatisk lys (fotolampe i det røde område, "røddlys").

På denne måde præparerede tamponer samt glasrør frysetørres i mørke. De tørrede tamponer fjernes fra rørene, f.eks. ved hjælp af udtrækssnoren og emballeres i mørke eller i mørkekammeret ved fotolys med lystæt papir eller folier eller farvet papir og opbevares beskyttet mod lyset.

b) Injektionsmetode

De følgende arbejder gennemføres i mørkekammer. Ved hjælp af en 2 ml sprøjte injiceres 2,0 ml af en opløsning af reagenset ifølge opfindelsen i tamponen. Ved den modsatte ende af tamponen af den, hvor udtrækssnoeren befinder sig, stikker man injektionsnålen igennem hylsteret ind i tamponen og fører, mens man sprøjter langsomt, nålen igennem i længderetningen til den anden ende af tamponen. Således har man opnået, at tamponen er regelmæssigt gennemfugtet. Derpå frysetørres tamponerne og emballeres og opbevares som under a).

Reagensblandingen kan påføres enhver porøs bærer. Til bestemmelse af vaginalvæske eller i vagina har transparente folier vist sig særlig hensigtsmæssige, f.eks. celluloseacetatfolie, som benyttes til elektrophoreseformål, eller produktet "Parafilm M". På det sted, hvor folien kommer i forbindelse med LDH ved pålægning, finder der en farvning sted i retning blå. Sådanne folier har den fordel, at de er mekanisk stærkere end f.eks. filterpapir og til stabilisering eller arkivering yderligere kan gøres fuldstændigt transparente. Derved forbliver farveintensiteten fuldstændig uforandret.

Som transparensbade for celluloseacetatfolier kan anvendes:

- a) methanol/iseddike i forholdet 85:15,
- b) isobutanol/dioxan i forholdet 1:1 til 3:7,
- c) methylethylketon/dioxan i forholdet 3:2,
- d) eddikeester/dioxan i forholdet 3:2,
- e) methanol/iseddike/glycerol i forholdet 87:12:1.

Til "Parafilm"-folien er en kort neddykning i 7,5% eddikesyreopløsning velegnet.

Der kan også foretages oliebehandling. Herved egner sig "Whitemore-Oil 120" eller "Ondino-Oil 17".

Disse folier med en flade på 1,5-2,5 cm² kan hensigtsmæssigt anvendes af speciallægen ved et kolposkopisk indgreb på en formodet slimhindeforandring i vagina. På det sted, hvor der befinder sig cellehobe, som er tumorøse, finder der punktformigt en farvning sted analogt med tamponen.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåde til bestemmelse af isoenzymerne 4 eller 5 af lactatdehydrogenase (LDH) alene eller i blanding med hinanden eller med andre LDH-isoenzymer, ved omsætning af lactat og nicotinamid-adenin-dinucleotid til pyruvat, k e n d e t e g n e t ved, at omsætningen gennemføres ved en pH-værdi på 6 - 6,5.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at omsætningen gennemføres i et triethanolamin-NaOH-puffersystem med pH 6 - 6,5, især 6,3 - 6,4.
3. Fremgangsmåde ifølge ethvert af de foranstående krav, k e n d e t e g n e t ved, at såvel den legemsvæske, som skal undersøges, som det til undersøgelsen anvendte reagens indstilles til en pH-værdi på 6,3 - 6,4.
4. Fremgangsmåde ifølge ethvert af de foranstående krav, k e n d e t e g n e t ved, at det til undersøgelsen anvendte reagens indstilles til en sådan pH-værdi, at der ved en fra pH 6 - 6,5 afvigende pH-værdi af den legemsvæske, der skal undersøges, foreligger en pH-værdi på 6 - 6,5, især 6,3 - 6,4 ved omsætningen af lactat og nicotinamid-adenin-dinucleotid til pyruvat.
5. Reagens til anvendelse ved fremgangsmåden ifølge ethvert af kravene 1-4 og indeholdende lactat, nicotinamid-adenin-dinucleotid, et tetrazoliums salt til synliggørelse af den enzymatiske NAD-reduktion og en puffer, k e n d e t e g n e t ved, at reagenset er pufret således, at der sammen med prøven opnås en pH-værdi på 6 - 6,5.
6. Reagens ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved, at det er pufret til en sådan pH-værdi, at der sammen med prøven opnås en pH-værdi på 6,3 - 6,4.
7. Reagens ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved, at det til undersøgelse af vaginalvæske er pufret til pH 7,0.
8. Reagens ifølge krav 6 eller 7, k e n d e t e g n e t ved,

at det som puffer indeholder triethanolamin-NaOH.

9. Reagens ifølge krav 8, k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder

1,0 - 150 mM triethanolaminpuffer, pH 7,0,
20 - 350 mM Na-lactat (natriumsalt af DL-mælkesyre),
0,01 - 1,0 mM phenacimethosulfat (PMS),
0,1 - 10 mM nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD⁺) og
0,01 - 1,5 mM nitro-blåt-tetrazoliumchlorid (NBT).

10. Reagens ifølge krav 9, k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder

5,0 mM triethanolaminpuffer, pH 7,0,
67,5 mM Na-lactat,
0,1 mM phenacimethosulfat (PMS),
1,5 mM nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD⁺) og
0,3 mM nitro-blåt-tetrazoliumchlorid (NBT).

11. Diagnostisk middel til konstatering af patologiske ændringer i det nedre kvindelige genitalområde, k e n d e t e g n e t ved, at det består af en tampon, som bærer et reagens ifølge et af kravene 5-10.

Fremdragne publikationer:
