



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBRŮBY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

259704
(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
G 01 N 33/577

(22) Přihlášeno 19 01 84
(21) {PV 452-84}

(40) Zveřejněno 15 03 88

(45) Vydáno 15 03 89

(75)

Autor vynálezu

JANDOVÁ ANNA MUDr. CSc., ČOUPEK JIŘÍ ing. CSc.,
SANITRÁK JAROSLAV ing., MOTYČKA KAREL RNDr. CSc.,
MACH OTAKAR RNDr. CSc., PEKÁREK JAN MUDr. CSc., PRAHA

(54) Způsob přípravy imunologicky funkčních frakcí ze séra inbredních kmenů myši

1

Vynález se týká způsobu přípravy imunologicky funkční frakce získané ze séra inbredních kmenů laboratorních myši, např. infikovaných virem zvyšujícím izoenzym laktátdehydrogenázu. Výsledkem je imunologicky účinná frakce.

Autoři vynálezu se zabývali stanovením izoenzymu LDH (1.1.1.27 L-lactate: NAD oxidoreduktázy) u experimentálních i lidských nádorů) ve vztahu k chemoterapii. Pokud se používalo v experimentálním studiu myši různých kmenů, autoři zjistili, že izoenzym LDH je ojediněle v myším séru významně zvýšen ještě před pokusem. Toto zvýšení způsobuje LDH virus, „perfektní“ parazit u myši. LDH virus (Rileyův virus, LDV) je zařazen mezi neklasifikované „pomalé“ RNA viry. Jeho replikace nevyžaduje DNA-dependentní syntézu ribonukleové kyseliny. Jeho reservoárem je populace divokých myši, jimž působí doživotní onemocnění. Autoři sledovali tento jev dále a po rozvinutí gelové chromatografie a některých imunologických metod se pokusili o detekci protilátkové odpovědi na toto agens i u lidských pacientů. K ověření zvolili takové choroby, u nichž byla již dříve popsána zvýšená aktivita izoenzymu LDH.

Autoři zjistili, že u pacientů s nejrůznějšími druhy zhoubných nádorů a prekance-

2

roz existuje významná imunologická odpověď lidského leukocyty v různých imunologických testech na frakce získané z myšího LDH viru. Též jsou na tyto frakce citlivé leukocyty pacientů s infarktem myokardu, pacientek, které spontánně potrácejí bez gynekologické příčiny a u nichž je vyloučeno onemocnění jinými virozy nebo antropozoonozami a konečně pacientů se schizofrenií.

Způsob přípravy imunologicky funkční frakce získané ze séra inbredních kmenů laboratorních myši, např. C3H, infikovaných virem zvyšujícím izoenzym laktátdehydrogenázu spočívá podle vynálezu v tom, že myší plazma získaná z krve upravené heparinem se podrobí nejméně dvojnásobné centrifugaci po dobu 20 až 30 min. při zatížení 3 až $3,5 \times 10^5$ g, odebraný supernatant se čerá 1 až 2 min. při 9 až 11×10^5 g, získaný supernatant se podrobí další centrifugaci po dobu 50 až 70 min. při zatížení 50 až 100×10^5 g, získaný sediment se suspenduje v pufru majícím pH 7 až 7,4 sestávajícím z tris (hydroxymethyl)-aminomethan-NaCl (Tris-NaCl) a dvojsodné soli ethylen-diamintetraoctové kyseliny v minimálním objemu maximálně 1 ml s rovnovážnou centrifugací v sacharozovém hustotním gradientu se rozdělí a oblast odpovídající 32

až 38 % hmot. sacharózy s maximem 35 % hmot. sacharózy se odebere a po nařazení výše uvedeným pufrům v objemovém poměru 1:0,5 až 1,5 se podrobí centrifugaci při zatížení 50 až 100×10^3 g, 50 až 70 min. přičemž manipulace s krevní plazmou až po získání posledního sedimentu se provádí při 2 až 6 °C, získaný sediment se rozpustí v 1,5 až 3,0 ml fyziologického roztoku a podrobí se vysokotlaké gelové chromatografii, frakce odpovídající molekulové hmotnosti $3 \cdot 10^5$ až $1,5 \cdot 10^4$ jsou imunologicky aktivní. Rovnovážná centrifugace se provádí po dobu 180 až 210 min při zatížení 150 až 180×10^3 g. Jako stacionární fáze pro vysokotlakou gelovou chromatografii se použije Separon Hema — glc^R, který je suspenzním kopolymerem 2-hydroxyethylmethakrylátu s ethylendimethakrylátem s vylučovacím limitem kolony vyjádřeným molekulovou hmotností 3×10^5 , velikost partikulí gelu je 32 až 40 μ m, k detekci se používá diferenciální refraktometr a UV spektrofotometr s variabilní vlnovou délkou. Jako mobilní fáze se používá fyziologický roztok a jímá se frakce při vlnové délce 340 nm.

Popsaným způsobem zhotovené frakce jsou použitelné v různých imunologických testech, testech pro buňkami médiíovanou imunitu, pro protisměrnou elektroforézu na agarózovém gelu, elektrofokusaci, pro značení radioizotopy, pro studium hormonálních receptorů, pro experimentální práce v cytogenetice a genetickém inženýrství s cílem stanovit včasnou diagnostiku a monitorování níže uvedených onemocnění. Získané frakce jsou velice časnými (až několik let před vypuknutím onemocnění) pozitivními markery lidskému tělu cizí ribonukleové kyseliny, která pravděpodobně kontaminuje lidské i zvířecí nádory, šedou kůru mozkovou schizofreniků a srdeční sval postižený infarktem myokardu, jakož i endometrium žen, které potrácejí z gynekologicky nezjistitelné příčiny a u nichž nebylo zjištěno jiné virové onemocnění.

Jestliže jsou frakce získané z LDH viru v libovolném z výše uvedených testů u pacienta pozitivní, lze konstatovat, že je v těle přítomen tzv. univerzální rizikový faktor a je nutno dále testovat stejnou metodou citlivost jednotlivých orgánů, zda nejsou napadeny. V tom případě se použijí antigeny připravené z těchto orgánů podle AO 254706. Pozitivní orgánová odpověď bývá přítomna 3,5 i více let před výskytem prekancerózy a 10 i více let před výskytem nádoru.

U infarktu myokardu lze analogicky použít k testování frakce získané z LDH viru a jsou-li pozitivní, pak frakce získané ze srdce postiženého infarktem myokardu.

U onemocnění schizofrenií lze použít k testování frakce získané z LDH viru a jsou-li pozitivní, pak frakce získané ze šedé kůry mozkové.

U žen potrácejících z gynekologicky ne-

zjistitelné příčiny, u nichž je vyloučeno jiné virové onemocnění, ev. antropozoonóza, lze použít k testování frakce získané z LDH viru a jsou-li pozitivní (nutno testovat i jejich partnery), pak u ženy frakce získané z lidského karcinomu endometria.

Statisticky významné pozitivní výsledky se získají také u tzv. kontaktů, to jest u osob, které žijí s výše uvedenými nemocnými ve společné domácnosti. Nejčastěji mají takové osoby pozitivní testy na frakce získané z LDH viru, ale také na orgánový antigen většinou stejný jako nemocný, i když se cítí zdravý.

Stanovení tzv. rizikového faktoru, to jest frakcí získaných z LDH viru, má význam proto, že se hodí jako levný časný marker lidskému tělu cizí ribonukleové kyseliny, k vytypování a monitorování skupiny obyvatelstva, z níž později pocházejí v časovém pořadí ženy potrácející z gynekologicky nezjistitelné příčiny, nemocní kardiovaskulárními chorobami, schizofrenií, nemocní zhoubnými nádory.

Význam stanovení spočívá v kombinaci vytypovaných antigenů a v jejich pravidelném sledování u rizikových skupin, protože se zdá, že adaptace lidského organismu na LDH virovou ribonukleovou kyselinu může být mírou zdraví jedince a naopak, že včasnými zásadami do obranyschopnosti by k některým onemocněním nemuselo dojít. V této souvislosti doporučujeme provést vyšetření na LDH virus u partnerů před početím dítěte. Jsou-li oba pozitivní, je plod ohrožen.

V následujícím je předmět vynálezu osvětlen na příkladu, který však nijak neomezuje jeho rozsah:

Příprava imunologicky funkčních frakcí získaných ze séra myši infikovaných LDH virem.

Myši týden inokulované sérem obsahujícím infekční LDH virus se vykrvácí podstřížením, krev po sražení a 30 min stání při teplotě místnosti se podrobí centrifugování při zatížení $2 \cdot 10^3$ g 20 min. Sérum se upraví heparinem a podrobí se dvakrát centrifugování při zatížení $3,5 \cdot 10^3$ g po dobu 25 min při teplotě +4 °C. Získaný supernatant se po dobu 2 min při teplotě +4 °C podrobí další centrifugaci při zatížení 10^4 g. Získaný supernatant se opět centrifuguje při zatížení $5 \cdot 10^4$ při +4 °C 60 min. Obdrží se sediment, který obsahuje virus. Suspenduje se v max. 1 cm³ pufru o pH 7 až 7,4. Pufr sestává z tris (hydroxymethyl)-aminometan-NaCl (Tris-NaCl) a dvojsodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny.

Suspenze se navrství na sacharózový hustotní gradient 15 až 50 % hmot. a centrifuguje se při zatížení 10^5 g 4 h nebo při $5 \cdot 10^4$ g přes noc při +4 °C.

Gradient se rozdělí a bere se frakce v oblasti 35 % sacharózy, obsahující virus.

Naředí se výše uvedeným pufrům 1:1 a znovu se centrifuguje při zatížení $5 \cdot 10^4$ g 1 h při $+4^\circ\text{C}$. Získaný sediment se rozpustí ve 2 cm^3 fyziologického roztoku a zataví se do ampulí. Uchovává se ve zmrazeném stavu.

Obsah ampule se po rozmrazení injukuje do kolony po 1 ml a dělí se pomocí vysokotlaké gelové chromatografie. Kolona je na-

plněna suspenzním kopolymerem 2-hydroxyethyl-methakrylátu a ethylendimethakrylátu s vylučovacím limitem $3 \cdot 10^5$. Detekce se provádí diferenciálním refraktometrem R 043 a UV průtokovým spektrofotometrem s variabilní vlnovou délkou. Jako mobilní fáze se používá fyziologický roztok a jímá se frakce při vlnové délce 340 nm s molekulovou hmotností 10^5 až $1,5 \cdot 10^4$.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob přípravy imunologicky funkčních frakcí ze séra inbredních kmenů myší, infikovaných virem zvyšujícím izoenzym laktátdehydrogenázu, vyznačující se tím, že myší plazma získaná z krve upravené heparinem se podrobí nejméně dvojnásobné centrifugaci po dobu 20 až 30 min při zatížení 3 až $3,5 \cdot 10^3$ g, odebraný supernatant se čeří 1 až 5 min při zatížení 9 až $11 \cdot 10^3$ g, získaný supernatant se podrobí další centrifugaci po dobu 50 až 70 min. při zatížení 50 až $100 \cdot 10^3$ g, získaný sediment se suspenduje v pufru o pH 7 až 7,4 sestávajícím z tris (hydroxymethyl)-aminomethan-NaCl (Tris-NaCl) a dvojsodné sole ethylendiamintetraoctové kyseliny v objemu maximálně 1 ml, rovnovážnou centrifugací v sacharózovém hustotním gradientu (po dobu 180 až 210 min při zatížení 150 až $180 \cdot 10^3$ g) se rozdělí a oblast odpovídající 32 až 38 % hmot. sacharózy s maximem 35 % sacharó-

zy se odebere a po naředění výše uvedeným pufrům v objemovém poměru 1:0,5 až 1,5 se podrobí centrifugaci při zatížení 50 až $100 \cdot 10^3$ g, 50 až 70 min., přičemž manipulace s krevní plazmou až po získání posledního sedimentu se provádí při 2 až 6°C , získaný sediment se rozpustí v 1,5 až 3,0 ml fyziologického roztoku a podrobí se vysokotlaké gelové chromatografii a zachycují se frakce odpovídající molekulové hmotnosti $3 \cdot 10^5$ až $1,5 \cdot 10^4$ jako imunologicky aktivní.

2. Způsob podle bodu 1 vyznačující se tím, že jako stacionární fáze pro vysokotlakou gelovou chromatografii se použije suspenzní kopolymer 2-hydroxyethyl methakrylátu s ethylendimethakrylátem s vylučovacím limitem $3 \cdot 10^5$ a velikostí částic gelu 32 až $40\text{ }\mu\text{m}$ a jako mobilní fáze se používá fyziologický roztok.