



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

207669

(11) (B2)

(51) Int. Cl.³
G 01 N 33/54

- (22) Přihlášeno 02 11 76
(21) (PV 5980-78)
(32) (31)(33) Právo přednosti od 03 11 75
(P 25 48 963.8)
Německá spolková republika
(40) Zveřejněno 15 09 80
(45) Vydáno 15 06 84

- (72) Autor vynálezu WÜRZBURG UWE dr., HENNRICH NORBERT dr., ORTH HANS-DIETER dr.
a LANG HERMANN dr., DARMSTADT (NSR)
(73) Majitel patentu MERCK PATENT GESELLSCHAFT mit BESCHRÄNKTER HAFTUNG, DARMSTADT (NSR)

(54) Prostředek ke stanovení účinnosti hybridního isoenzymu
kreatinkinázy-MB

1

Vynález se týká prostředku ke stanovení účinnosti hybridního isoenzymu kreatinkinázy-MB.

Stanovení účinnosti kreatinkinázy (ATP: kreatin-fosfotransferáza, E. C. 2.7.3.2, zkratka CK) v séru je citlivou laboratorní metodou při diagnostice onemocnění kostních svalů a srdečního svalu, zejména u infarktu myokardu. Rozlišení při poranění kosterních svalů a srdečního svalu, zvláště při diferenciální diagnóze infarktu myokardu je však obtížné. Stanovení celkové účinnosti CK není možno s jistotou toto odlišení provést. Řada pokusů proto vedla k tomu, zvýšit jistotu diferenciální diagnostiky při stanovení účinnosti CK, a to tak, že se stanoví účinnost dalších enzymů v séru a zjištěné výsledky se uvádějí do korelace, například vytvořením kvocientu CK/glutamát-oxalacetát-transamináza. Kvocienty tohoto typu však nedovolují rozlišení mezi srdečním a plicním infarktem nebo rozlišení mezi srdečním infarktem a důsledky šoku z jiných příčin.

CK se vyskytuje v organismu ve formě tří isoenzymů, a to CK-MM, například ve svalů, CK-BB, například v mozkové tkáni a jako hybrid CK-MB, který sestává z podjednotky M a podjednotky B, například v srdečním svalů. Účinnost CK, tak jak se stanoví v krevním séru, je vztažena obvykle na isoenzym CK-MM, protože CK-BB neprochází hematoencefalickou bariérou a CK-MB je omezen na určité orgány, například na srdeční sval. Při poškození srdečního svalu, například při srdečním infarktu se však CK-MB uvolňuje do krevního séra, kde je možno provést příslušné stanovení.

Kvantitativní stanovení tohoto isoenzymu vedle CK-MM v krevním séru je nejcitlivější a pro diferenciální diagnostiky nejprokazatelnější laboratorní metodou pro stanovení srdečního infarktu. Kromě srdečního svalu obsahují CK-MB ještě některé další orgány, například

slinivka břišní, bránice, aorta, plíce a děloha, avšak účinnost těchto orgánů je přibližně 100x nižší než v srdečním svaly, takže účinnost CK-MB, popřípadě uvolněná v uvedených orgánech leží pod hranicí stanovení.

Až dosud se stanovení účinnosti CK-MB provádělo v podstatě třemi způsoby:

1. Elektroforézou na různých nosičích. Takto získané výsledky si často odporují a často dochází k výskytu většího počtu pruhů, protože se současně stanoví i isoenzymy (Artefakty).

2. Chromatografií na sloupcích různých materiálů. Tato metoda je zdoluhavá, trvá několik hodin a nehodí se pro běžné stanovení. Výsledky zpráv jednotlivých pracovníků si částečně odporují.

3. Imunologické stanovení pomocí precipitujících protilátek. Tento způsob byl popsán v DE přihláškách P 21 28 670 a P 22 58 822 a dává dobré výsledky, například při kvantitativním stanovení isoenzymů aldolázy a alkalické fosfatázy. Ke stanovení poměrně nízké účinnosti CK a zejména CK-MB se citlivost této metody nehodí.

Všechny tyto způsoby vyžadují ke svému provedení dlouhou dobu a již z tohoto důvodu se nehodí k rychlé diagnóze srdečního infarktu.

Vynález si klade za úkol navrhnout prostředek ke stanovení účinnosti CK-MB ve vzorku tělesných tekutin.

Předmětem vynálezu je tedy prostředek ke stanovení účinnosti isoenzymu kreatinkinázy MB za přítomnosti kreatinkinázy MM ve vzorku tělesné tekutiny, vyznačující se tím, že obsahuje 0,01 až 1,0 mg protilátek pro inhibici až 2 500 jednotek na litr podjednotky MM a MB ve vzorku tělesné tekutiny.

S výhodou se postupuje tak, že se vzorek tělesné tekutiny a protilátky inkubuje za přítomnosti substrátu pro kreatinkinázu, s výhodou kreatinu, kreatinfosfátu, adenosinfosfátu, adenosintrifosfátu a hořečnatých iontů. Příslušné protilátky se získají očkováním zvířat, s výhodou koz, kreatinkinázu MM, která byla předem inaktivována přidáním N-acetylcysteinu, merkaptoetanolu, glutathionu, dithioerythritu, dithiothreitu a/nebo S-(2-amino-etyl)isothiouroniumbromidhydrobromidu jako látek stabilizujících a aktivujících thioskupinu.

Tělesnou tekutinou se při provádění způsobu s použitím prostředku podle vynálezu rozumí především lidské krevní sérum. Je však možno provádět stanovení i v jiných tělesných tekutinách, jako je plná krev, plazma, moč, sputum apod., stanovení je rovněž možno provádět v obdobném vyšetřovacím materiálu ze zvířat. CK-BB ruší provádění způsobu podle vynálezu a z tohoto důvodu nesmí být přítomen v krevních tekutinách, v nichž má být stanovení provedeno.

Protilátky pro prostředek podle vynálezu je možno získat očkováním zvířat CK-MM-antigeny. Jako antigen se užije především lidský CK-MM. Je možno užít také CK-MM ze zvířat, a to v případě, že takto získaná antiséra jsou schopna úplně blokovat enzymatickou účinnost podjednotky M v lidském CK-MM a CK-MB za případné přítomnosti CK-substrátů, aniž by přitom došlo k inaktivaci enzymatické účinnosti podjednotky B v přítomném CK-MB. Dárce antigenů CK-MM jsou především různé druhy opic, především rhesus a šimpanz, dále domácí zvířata jako vepř, kůň, skot, králík a morče a další zvířata jako krysy, myši a ptáci, například husy, kachny a slepice.

Antigen CK-MM, užitý k výrobě protilátek podle vynálezu má být prostý CK-MB a CK-BB. Citlivým kritériem tohoto požadavku na čistotu je imunologická analýza, která se s výhodou

provádí difúzi nebo elektroforézou. Mimoto je možno využít i analytické elektroforézy a elektrofokusace při použití polyakrylamidového gelu. Při použití těchto metod je možno provést dobré stanovení na čistotu oproti CK-MB a CK-BB. Mimoto je možno stanovit absolutní čistotu proti jiným bílkovinám, kterou je možno provést například dvěma posledními způsoby, což je však méně důležité. Mikroheterogenita CK-isoenzymatických typů, která spočívá v malých rozdílech složení aminokyselin u jednotlivých isoenzymů, nehraje při stanovení čistoty zpravidla žádnou úlohu.

K imunizaci se užívá takových zvířat, která po očkování aktivovaným CK-MM tvoří protilátky, které jsou schopné úplně blokovat enzymatickou účinnost podjednotky M v kreatinkinázách MM a MB, aniž by přitom došlo k blokování enzymatické účinnosti podjednotky B v přítomném CK-MB. Zvláště vhodné jsou kozy. Je však možno užít i jiných zvířat, zejména obratlovců, při jejichž použití je možno rovněž získat žádané protilátky. Jde například o různé druhy opic, koně, skot a podobná zvířata, ovce, psa, vepře, králíka, ptáky, například slepice, krocany, husy a kachny, dále krysy, myši a morčata. Pro indukci protilátek jsou zvláště vhodné kozy, které za přítomnosti CK-substrátu vytváří protilátky, které účinně brzdí podjednotku M v CK-MM i v CK-MB.

Imunizace pokusných zvířat se provádí aktivovaným lidským nebo zvířecím CK-MM. Aktivace CK-MM se provádí známými reakčními složkami, které stabilizují a aktivují skupiny SH- a/nebo dvojvaznými kovovými ionty, s výhodou kombinací svrchu uvedených činidel a kovových iontů. Reakčními činidly, schopnými stabilizovat a aktivovat SH-skupiny, jsou například N-acetylcystein, merkaptotanol a dithioerythrit, dále glutathion, cystein, dithiothreitol, S-(2-aminoethyl)isothiuroniumbromid-hydrobromid (AET) a/nebo kyselina thioglykolová. V případě dvojvazných kovových iontů padají v úvahu odpovídající ve vodě rozpustné soli, například chloridy nebo acetáty, s výhodou hořčíku, mimoto manganu, vápníku a/nebo kobaltu. Uvedená aktivace je zásadně známá z jiných oborů.

Další imunizace a zpracování získaného materiálu na antiséra a protilátky se provádí známým způsobem. Také další zpracování a uchovávání antisér a protilátek se provádí způsoby, které jsou z imunologie známy.

Protilátky, jichž se užívá v prostředku podle vynálezu, spadají do skupiny IgG-immunoglobulinů (bivalentní protilátky). Jejich molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 130 až 210 000, s výhodou 160 000. Jejich předběžná sedimentační konstanta je v rozmezí 6 S až 8 S, s výhodou 7 S. Obsah uhlhydrátů je přibližně 3 hmotnostní %. Kromě Jg6-protilátek lze užít také monovalentních Jg6-fragmentů (= Fab) a JgM-protilátek.

Protilátky podle vynálezu mají úplně blokovat enzymatickou účinnost podjednotky M v kreatinkináze. Pod pojmem "úplně blokovat" se rozumí průměrný zůstatek nejvýše 5 jednotek/litr, avšak s výhodou méně než 3 jednotky/litr enzymatické účinnosti podjednotky M v CK-MM a CK-MB po uvedení vzorku do styku s protilátkou.

Mimoto nemají protilátky ovlivňovat enzymatickou účinnost podjednotky B v CK-MB. To znamená, že nemají blokovat více než 10 jednotek/litr, s výhodou však méně než 5 jednotek na litr enzymatické účinnosti podjednotky B v CK-MB ve zpracovávaném vzorku.

Výhodné provedení způsobu s použitím prostředku podle vynálezu spočívá v tom, že se ke vzorku tělesné tekutiny a protilátky za přítomnosti CK-substrátu při inkubaci přidávají protilátky podle vynálezu, které mají mimoto mít tu vlastnost, že se jich blokující účinnost na enzymatickou účinnost podjednotky M v CK-MM a CK-MB má plně rozvíjet i za přítomnosti CK-substrátu, aniž by přitom došlo k ovlivnění enzymatické účinnosti podjednotky B v přítomném CK-MB. Tuto vlastnost je možno zajistit zejména u protilátek, které byly získány z koz imunizací plně aktivním CK-MM, a to navíc k ostatním svrchu uvedeným vlastnostem. Tato vlastnost však není bezprostředně nutná k normálnímu provádění způsobu, při němž se nejprve provádí inkubace protilátky, pak se přidá CK-substrát a provádí se fotometrické měření.

Jako CK-substrátu je možno užít všech běžných substrátů, popřípadě efektorů. Jde především o kreatin, kreatinfosfát, adenosindifosfát, adenosintrifosfát a hořečnaté ionty.

Stanovení účinnosti, resp. zbytkové účinnosti CK a jeho isoenzymů je možno provádět zásadně všemi rychlými a přesnými způsoby. Vhodné jsou například ty známé způsoby, které dovolují měřit účinnost CK po přidání CK-substrátů pomocí fotometrického stanovení, které navazuje na pomocnou reakci. Jde například o kolorimetrické metody, popsané například v "Methoden der enzymatischen Analyse", vyd. H. V. Bergmeyer, 3. vydání (1974), sv. 1, str. 145 ff. Výhodné jsou kinetické metody, u nichž se stanoví enzymatická účinnost měřením v ultrafialovém světle při 334, 340 nebo 366 nm. Výhodná je například standardní metoda, při níž se stanoví CK při použití kreatinfosfátu a adenosindifosfátu. (Z. Klin. Chem. Klin. Biochem, sv. 8, str. 658 ff /1970/ a sv. 10, str. 182 /1972/). Testovací balíčky ke stanovení účinnosti CK tímto způsobem se běžně dodávají.

Podle dalšího známého způsobu stanovení lze CK stanovit fluorometricky. Pomocí CK je možno uvolnit z kreatin-fosfátu kreatin, který se pak měří fluorometricky po reakci s anhydridem v silně alkalických roztocích způsobem podle publikace R. B. Conn (Clin. Chem., sv. 6, str. 537 f /1960/ a Sax a další, Clin. Chem., sv. 11, str. 951 f /1965/).

Dále bude uvedeno typické provedení způsobu s použitím prostředku podle vynálezu:

Vzorek tělesné tekutiny, v němž má být stanovení provedeno, s výhodou vzorek lidského séra, se smísí s takovým množstvím CK-MM protilátek podle vynálezu, které je dostatečné k tomu, aby úplně blokovalo až 2 500 jednotek/litr podjednotky M v CK-MM a CK-MB, s výhodou 1 000 jednotek/litr. V tělesných tekutinách s vyšší celkovou účinností CK je účelné před vlastním stanovením provést předběžné ředění na účinnost přibližně 1 000 jednotek/litr. Toto předběžné ředění je pak nutno vzít v úvahu při výpočtech. Po smísení se vzorek inkubuje 1 až 30, s výhodou 5 minut při teplotě +10 až 40 °C, s výhodou při teplotě místnosti, zejména při teplotě 25 až 30 °C. Pak se stanoví zbývající enzymatická účinnost reakční směsi známým způsobem, s výhodou svrchu popsanou metodou při použití ultrafialového světla. Směs séra a protilátek se přidá ke známé směsi enzymu, koenzymu a substrátu, která obsahuje všechny enzymy, koenzymy a substráty, nutné k provedení uvedené metody, načež se přidá dostatečné množství roztoku pufru o pH 7. Vhodné přípravky obsahují například jako směs enzymu a koenzymu hexokinázu, glukózo-6-fosfátdehydrogenázu, adenosindifosfát a nikotinamidadenindinukleotidfosfát a jako substráty kreatinfosfát a glukózu.

Je také možné přidat směs séra a protilátek ke směsi koenzymu a enzymu nebo obráceně a pak teprve přidat směs pufru a substrátu. Vhodným pufrem je například neutrální pufr, který obsahuje s výhodou triethanolamin nebo imidazolacetát, popřípadě kyselinu morfolinpropansulfonovou nebo morfolinetansulfonovou. Po smísení se vzniklá směs inkubuje 1 až 10, s výhodou 5 minut při teplotě 15 až 40 °C, s výhodou 25 až 30 °C, načež se stanoví při teplotě místnosti změna extinkce. Z této změny se pak vypočítá účinnost podjednotky B v CK-MB.

Tento způsob je možno obměnit tak, že se vzorek analyzované tělesné tekutiny inkubuje s protilátkami podle vynálezu a CK-substráty za přítomnosti pufru a látek, nutných ke stanovení bez předběžné inkubace vzorku z protilátek. Při tomto provedení je nutné, aby protilátky, přítomné v prostředku podle vynálezu měly ještě tu vlastnost, že jsou schopné brzdit úplně enzymatickou účinnost podjednotky M v CK-MM a CK-MB i za přítomnosti CK-substrátu. Tuto vlastnost mají například protilátky podle vynálezu, získané při použití plně účinného CK-MM z koz. Tyto protilátky umožňují provádět způsob jednoduchým a rychlým způsobem.

Je například možno protilátky podle vynálezu předem uvedené do lyofilizované formy spolu se směsí koenzymu, enzymu a substrátu, nutnou k provádění dalšího stanovení, smístit s určitým množstvím roztoku pufru na roztok, který se přidá ke stanovovanému vzorku tělesné tekutiny, například séra, načež se stanoví účinnost podílu B v CK-MM. Při obměně tohoto

postupu je možno přidat protilátky také se směsí, která sestává z koenzymu a enzymu ve formě lyofilizátu, v tomto případě se zvlášť přidává do roztoku pufr a substrát.

Podle dalšího výhodného provedení je možno provádět současné stanovení celkové účinnosti CK a účinnosti CK-MB pomocí svrchu uvedeného výhodného provedení způsobu podle vynálezu v jediném vzorku. Je možno postupovat například tak, že se nejprve stanoví celková účinnost CK fotometricky známým způsobem, načež se přidá do téhož vzorku ve vodě rozpuštěný lyofilizovaný materiál, sestávající z CK-MM protilátky. Směs se inkubuje 1 až 10, s výhodou 5 minut a pak se stanoví zbytková účinnost vzorku fotometricky. Také při tomto provedení platí požadavek, aby protilátky úplně blokovaly enzymatickou účinnost podjednotky M v CK-MM a CK-MB i za přítomnosti CK-substrátu.

Je možno nastavit kapacitu protilátek v antiséru při výhodném provedení tak, aby antisérum úplně blokovalo 2 500 jednotek/litr, s výhodou 1 000 jednotek/litr podjednotky M v CK-MM a CK-MB. V případě, že celková účinnost CK ve stanovovaném vzorku je při této kapacitě protilátek příliš vysoká, je nutno také v tomto případě provádět předběžné ředění, například na účinnost podjednotky M v CK-MM a CK-MB přibližně 1 000 jednotek/litr.

Způsob s použitím prostředku podle vynálezu má oproti dříve známému stavu techniky podstatné výhody, jde zejména o vysokou přesnost výsledků a o rychlost a jednoduchost provedení.

Přesnost způsobu s použitím prostředku podle vynálezu je založena na tom, že protilátky jsou specifické proti podjednotce M v CK-MM a CK-MB a proto dovolují stanovit účinnost CK-MB v tělesných tekutinách, například lidském séru přímým způsobem.

V DE přihláškách P 21 28 670 a P 22 58 822 se naproti tomu popisuje imunologická metoda pro kvantitativní stanovení isoenzymu, která má řadu nevýhod. Podle tohoto způsobu se sráží isoenzymy CK pro isoenzym specifickými precipitujícími protilátkami a pak se stanoví zbytková účinnost, která zůstává v supernatantu nad sraženinou. Bez ohledu na příliš velkou dobu provádění tohoto způsobu, zejména pro nutnost výroby většího množství specifických antisér je ještě v každém případě nutno užít alespoň dvou různých zkušebních vzorků, a to zejména stanovení celkové účinnosti CK a stanovení zbytkové účinnosti CK po vysrážení. To znamená, že účinnost CK je možno stanovit pouze na základě rozdílů měření. Proto také je výsledek této metody zpravidla zatížen běžnými chybami z obou měření. Při provádění způsobu podle vynálezu však se provádí jedno měření, čímž se podstatně snižuje příslušná chyba.

Při srážení je další nevýhodou, že imunologické srážení vyžaduje jako sekundární reakce dlouhou dobu, obvykle 60 minut i několik hodin, takže se pro rychlé stanovení nehodí.

V Clin. Chim. Acta, sv. 58, str. 223 až 232 (1975) jsou popsány protilátky proti CK-isoenzymům. Tyto protilátky způsobují kromě 100% blokování účinnosti CK-MM také 80% blokádu CK-MB. To znamená, že kromě M podjednotky z CK-MB je blokována také převážná část B podjednotky, přičemž účinnost podjednotek M a B v CK-MB k celkové účinnosti tohoto isoenzymu je obvykle v poměru 50:100. Protože při použití těchto protilátek je zbytková účinnost přibližně 20 %, i při reprodukovatelnosti se získané hodnoty pro přesné měření CK-MB pro svou nízkost nehodí, protože celková účinnost CK v séru je i tak velmi nízká. Z uvedených důvodů se popsané protilátky nehodí pro stanovení CK-isoenzymů blokádou. Při provádění způsobu s použitím prostředku podle vynálezu zůstává ještě 50 % celkové účinnosti CK-MB, to znamená téměř veškerá účinnost podjednotky B, což je pro měření dostatečné. Z tohoto hlediska znamená způsob podle vynálezu podstatný pokrok.

Rychlá proveditelnost je podstatnou výhodou. Platí to zejména pro výhodné provedení, při němž se blokáda podjednotky M v CK-MM a CK-MB a stanovení zbytkové účinnosti provádí současně. Při tomto provedení je možno v nejkratší době, například 5 až 30 minut s výhodou

5 až 15 minut dojít k přesnému výsledku, na němž je možno stanovit diagnózu. Významnou výhodou způsobu s použitím prostředku podle vynálezu je také jednoduché provedení. Způsob podle vynálezu je možno ve velkých ústavech nebo klinikách provádět i při použití běžných mechanizovaných zařízení pro stanovení enzymatické účinnosti, je však možno jej provádět i v malých ústavech a lékařských laboratořích pomocí fotometru.

Pro jednotlivá stanovení jsou vhodné testovací balíčky, které obsahují všechny reakční složky, nutné pro provádění způsobu s použitím prostředku podle vynálezu, a to vhodnou směs koenzymu, enzymu a substrátu, protilátky CK-MM podle vynálezu a roztok pufru. Testovací balíček tohoto nebo podobného složení umožní stanovit v krátké době účinnost CK-MB.

Podle známého stavu techniky nebylo možno očekávat, že lze vyřešit stanovení CK-MB tak jednoduchým a rychlým způsobem, jako je tomu v případě způsobu s použitím prostředku podle vynálezu. Nebylo možno předvídat, že lze získat specifická antiséra, která budou úplně blokovat enzymatickou účinnost podjednotky M v CK-MM a CK-MB, nebudou však ovlivňovat enzymatickou účinnost podjednotky B v CK-MB. Teprve použití protilátek s těmito dosud neznámými vlastnostmi umožnilo provedení tohoto způsobu.

Je také překvapující, že protilátky podle vynálezu si podržují svůj plný blokující účinek i za přítomnosti substrátů. Tento jev zdaleka není samozřejmý. V literatuře jsou popsány protilátky, které za přítomnosti CK-substrátů již neinaktivují CK-MM na 100 % (Ann. N. Y. Acad. Sci., sv. 103, str. 858 až 889 /1963/). Protilátky s těmito vlastnostmi by byly pro výhodné provedení způsobu, při němž se provádí blokování protilátkami za přítomnosti CK-substrátů, současně zcela nepoužitelné. Neblokovaný podíl účinnosti podjednotky M by mylně zvyšoval hodnoty měření pro CK-MB, popřípadě by omylem došlo k naměření účinnosti CK-MB v případě, že tento isoenzym by ve skutečnosti vůbec nebyl přítomen, čímž by došlo k omylu v diagnóze.

Překvapující vlastnost protilátek podle vynálezu, tj. úplné blokování enzymatické účinnosti podjednotky M v CK-MM a CK-MB bez ovlivnění enzymatické účinnosti substrátů, umožňuje dosud při imunologickém stanovení nedosažitelnou rychlost a přesnost stanovení účinnosti CK-MB. Tyto protilátky umožňují v praxi rychlé stanovení této účinnosti.

Je nyní možné stanovit laboratorní zkouškou zvýšení účinnosti CK u nemocných tak, že lze odlišit, zda běží o onemocnění nebo poranění kosterního svalu nebo svalu srdečního. Uvedeným způsobem je možno získat důležité údaje pro diferenciální diagnózu srdečního infarktu, například od plicního infarktu a/nebo od následků šoku a o jiných onemocněních, například poškození srdce.

Specifickým a přesným stanovením účinnosti CK-MB je možno zjistit srdeční poškození při jiných extrakardiálních onemocněních, například otravách a neštěstích, při terapeutických zákrocích, například oživovacích pokusech nebo při diagnostických zkouškách, například srdeční katetrizaci nebo koronární angiografii.

V následujících příkladech znamenají zkratky "M" a "mM" koncentrace v molech a milimolech.

P ř í k l a d 1

Blokování CK-MM, CK-MB a CK-BB protilátkou proti lidskému CK-MM

K lidskému séru, jehož vlastní účinnost CK byla potlačena, se přidá čistý CK-MM, CK-MB nebo CK-BB a měří se aktivita jednotlivých vzorků. Pak se 0,1 ml vzorků smísí s 0,1 ml roztoku s obsahem protilátky proti CK-MM, připravené podle příkladu Ba a po důkladném promísění se směs inkubuje 35 minut při teplotě 25 °C. Pak se stanoví známým způsobem zbytková účinnost. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

V tabulce je udána zbytková účinnost CK-isoenzymu po inkubaci s protilátkami proti lidskému CK-MM, a to jako střední hodnota ± 1 s vždy v 5 stanovení, přičemž s znamená standardní odchylku.

T a b u l k a

Isoenzym	Účinnost přidaného isoenzymu (jednotky/litr)	Zbytková účinnost po inkubaci s protilátkou proti CK-MM (jednotky/litr)
CK-MM	98 $\pm$ 1,9	0,3 $\pm$ 2,1
	1 043 $\pm$ 22	0,5 $\pm$ 2,5
CK-MB	103 $\pm$ 2,0	53 $\pm$ 1,7
	410 $\pm$ 7,8	206 $\pm$ 6,2
CK-BB	197 $\pm$ 3,8	199 $\pm$ 4,1

V mezích přesnosti měření je inhibována účinnost CK-MM na 100 %, CK-BB na 0 % a CK-MB na 50 % (odpovídají podílu 50 % podjednotky M). Výsledky jsou konstantní v širokém rozmezí účinnosti přidávaného isoenzymu.

P ř í k l a d 2

Test I ke kvantitativnímu stanovení účinnosti CK-MB v tělesných tekutinách

a) Složení zkušebního balíčku

Balíček stačí na 10 stanovení účinnosti. Obsahuje 1 láhev pufru na 10 stanovení, 10 nádobek se směsí koenzymu, enzymu a substrátu a 1 nádobku s obsahem antiséra proti CK-MM, získaného podle příkladu Ba.

Nádoba se směsí koenzymu, enzymu a substrátu obsahuje tyto složky:

disodnou sůl kreatinfosfátu ve formě hexahydrátu	27,24 mg
redukovaný glutathion	6,4 mg
(nebo místo předchozí složky N-acetyl-cystein)	3,4 mg
disodná sůl adenosindifosfátu ve formě hexahydrátu	1,25 mg
nikotinamidadenindinukleotidfosfát ve formě disodné soli	1,7 mg
adenosinmonofosfát ve formě disodné soli	8,47 mg
hexokináza	5 jednotek
glukózo-6-fosfátdehydrogenáza	3 jednotky
glukóza	8,32 mg
octan hořečnatý	4,52 mg

Nádobka s obsahem roztoku pufru obsahuje:

trietanolaminacetát ve vodě

105 mmolů

Lyofilizované protilátky se rozpustí ve 2 ml destilované vody. Vzniklý roztok protilátky se nastaví tak, aby byl schopen úplně blokovat až 1 000 jednotek/litr kreatinkinázy MM. U sér s velmi vysokým obsahem kreatinkinázy je proto nutno tato séra ředit na účinnost přibližně 1 000 jednotek/litr. Roztok protilátky je možno skladovat při teplotě +4 °C alespoň 7 dní.

b) Vlastní stanovení účinnosti CK-MB

b1) Provedení

Do reakční nádoby se napipetuje

0,1 ml séra
+ 0,1 ml roztoku protilátky.

Po dobrém promísení se směs inkubuje 5 minut při teplotě 25 °C. Pak se 0,1 ml této reakční směsi nanese spolu s 2,0 ml roztoku pufru do nádoby, která obsahuje směs koenzymu, enzymu a substrátu.

Po promísení se výsledná směs inkubuje 5 minut při teplotě 25 °C, načež se vlije do kyvety, a stanoví se extinkce při 25 °C a pak změna extinkce za minutu při vlnové délce 334, 340 nebo 366 nm při tloušťce vrstvy 1 cm.

b2) Výpočet

Zjištěná účinnost CK vzorku se násobí

a) zředovacím faktorem 2 a

b) faktorem pro CK-M-hybrid 2

z toho důvodu, že při provádění zkoušky se měří pouze podjednotka B z CK-MB.

Z rozdílu extinkce za minutu $\Delta E/\text{minuta}$ se vypočítá střední hodnota a dosadí se do vzorce pro výpočet:

měření při 334 nm: účinnost CK-MB = $\Delta E/\text{minuta} \times 4 \times 3\,500$ jednotek/litr,

měření při 340 nm: objemová účinnost CK-MB = $\Delta E/\text{minuta} \times 4 \times 3\,376$ jednotek/litr,

měření při 366 nm: objemová účinnost CK-MB = $\Delta E/\text{minuta} \times 4 \times 6\,364$ jednotek/litr.

P ř í k l a d 3

Test II ke kvantitativnímu stanovení účinnosti CK-MB v tělesných tekutinách

a) Složení zkušebního balíčku

Balíček stačí pro 30 stanovení účinnosti. Obsahuje 1 nádobku s obsahem pufru pro 30 stanovení a 30 nádobek lyofilizované směsi, sestávající z koenzymu, enzymu, substrátu a protilátky proti CK-MM, vyrobené způsobem podle příkladu Ba.

Množství trietanolaminacetátu obsažené v nádobce s roztokem pufru odpovídá množství udanému v příkladu 2a. Jednotlivě nádoby s obsahem koenzymu, enzymu, substrátu a protilátky proti CK-MM, získané způsobem podle příkladu Ba odpovídají 3 složkám, svrchu zmíněným v příkladu 2a a mimo to obsahují protilátku proti CK-MM, která úplně blokuje až 1 000 jednotek/litr CK-MM.

b) Stanovení účinnosti CK-MB

b1) Provedení

K obsahu nádoby se směsí koenzymu, enzymu, substrátu a protilátky proti CK-MM se pipetou přidá 2,0 ml roztoku pufru a 0,1 ml séra. Směs se promíchá a inkubuje 5 minut při teplotě 25 °C, načež se vlije do kyvety a 5 minut se měří extinkce při 25 °C při vlnové délce 334, 340 nebo 366 nm při tloušťce vrstvy 1 cm.

b2) Výpočet

Z rozdílu extinkce za minutu $\Delta E/\text{minuta}$ se vypočítá střední hodnota a tato hodnota se dosadí do odpovídajícího vzorce:

měření při 334 nm: objemová účinnost CK-MB = $\Delta E/\text{minuta} \times 7\,000$ jednotek/litr,

měření při 340 nm: objemová účinnost CK-MB = $\Delta E/\text{minuta} \times 6\,752$ jednotek/litr,

měření při 366 nm: objemová účinnost CK-MB = $\Delta E/\text{minuta} \times 12\,768$ jednotek/litr.

P ř í k l a d 4

Současné stanovení celkové účinnosti CK a účinnosti CK-MB

a) Složení zkušebního balíčku

Složení zkušebního balíčku odpovídá složení balíčku z příkladu 2a.

b) Stanovení celkové účinnosti CK a účinnosti CK-MB

b1) Provedení

Do nádoby se směsí koenzymu, enzymu a substrátu se přidá 2,0 ml roztoku pufru a 0,1 ml séra nebo zředěného séra. Směs se promísí a inkubuje se 5 minut při teplotě 25 °C, načež se vlije do kyvety a 2 minuty se měří změna extinkce (ΔE_1) při 25 °C. Pak se přidá 0,1 ml roztoku protilátky, směs se okamžitě promíchá a po 3 minutách se znovu měří změna extinkce (ΔE_2) při teplotě 25 °C při vlnové délce 334, 340 nebo 366 nm a tloušťce vrstvy 1 cm.

b2) Výpočet

Celková účinnost CK se vypočítá následujícím způsobem:

měření při 334 nm: objemová účinnost CK = $\Delta E_1/\text{minuta} \times 35\,000$ jednotek/litr,

měření při 340 nm: objemová účinnost CK = $\Delta E_1/\text{minuta} \times 3\,376$ jednotek/litr,

měření při 366 nm: objemová účinnost CK = $\Delta E_1/\text{minuta} \times 6\,364$ jednotek/litr.

Účinnost CK-MB se vypočítá následujícím způsobem:

měření při 334 nm: objemová účinnost CK-MB = $\Delta E2/\text{minuta} \times 7\,350$ jednotek/litr,

měření při 340 nm: objemová účinnost CK-MB = $\Delta E2/\text{minuta} \times 7\,090$ jednotek/litr,

měření při 366 nm: objemová účinnost CK-MB = $\Delta E2/\text{minuta} \times 13\,364$ jednotek/litr.

P ř í k l a d 5

Stanovení účinnosti CK-MB u nemocných se srdečním infarktem a bez infarktu při použití zkušebního balíčku podle příkladu 3

a) Účinnost CK u různých skupin nemocných

	Počet případů	Střední hodnota	
		účinnost CK (jednotky/litr)	účinnost CK-MB (jednotky/litr)
nemocný se zvýšenou účinností CK bez srdeč- ního infarktu	48	480	<1,7
nemocný se srdečním infarktem	5	510	44

Z tabulky je zřejmé, že způsobem podle vynálezu je možno rychle a jednoznačně od sebe odlišit případy se srdečním infarktem.

b) Průběh účinnosti CK-MB u nemocných se srdečním infarktem

Hodiny po vzniku infarktu	CK-MB (jednotky/litr)
3,5	<5
4,5	<5
5,5	6
7,5	22
8,5	23
9,5	29
10,5	50
11,5	46
13,5	56
15,5	55
17,5	64
21,5	62
25,5	50
29,5	42
33,5	25
43,5	18
53,5	<5
61,5	<5

Údaje ukazují vzestup a opětý pokles účinnosti CK-MB u nemocných se srdečním infarktem tak, jak je možno jej stanovit způsobem podle vynálezu.

Výroba výchozích látek

P ř í k l a d A

Výroba CK-MM

a) 1,2 kg na velmi nízkou teplotu zmrazeného lidského kosterního svalu se nechá roz-tát při teplotě místnosti a homogenizuje. Tkáň se uvede v suspenzi ve 2,5 litrech chlad-ného 0,05 M trispufu s kyselinou chlorovodíkovou o pH 8,0 (pufr s tris-(hydroxymetyl)-aminometanem a kyselinou chlorovodíkovou), který obsahuje ještě 0,01 M KCl a 1 mmol kyse-liny etylendiamintetraoctové s 1 mmolem dithioerythritu, načež se výsledná směs ještě homogenizuje v mixéru. Homogenát se míchá 45 minut za chlazení ledem a pak se odstřeďuje 60 minut při 12 000 g. 2,680 litrů čirého supernatantu se podrobí frakcionaci síranem amonným při pH 8,0 v rozmezí 40 až 75 % nasycení. Sraženina při 0,75 g se smísí s 0,04 M tris-pufrem s kyselinou chlorovodíkovou o pH 8,0 a dialyzuje se proti témuž pufru. K ad-sorpci mioglobinu a kyselým balastních bílkovin se užije 500 g vlhkého zásaditého ionto-měniče na podkladu zesíťného dextranu v tomtéž pufru. Po 30 minutách se iontoměnič oddělí a dvakrát se promyje 400 ml téhož pufru pokaždé s příměsí 0,02 M chloridu sodného. Filtrát a promývací kapalina se slíjí a nasytí se síranem amonným na 0,75 g.

Sraženina se oddělí odstředěním, rozpustí se ve 100 ml 0,04 M trispufu s kyselinou chlorovodíkovou o pH 8,0 a dialyzuje se proti témuž pufru tak dlouho, až není možno zjis-tit žádný síran amonný. Čirý dialyzát se nanese na sloupec zásaditého iontoměniče na pod-kladu zesíťného dextranu o rozměrech 6 x 60 cm v tomtéž pufru. Sloupec se vymývá tímtež pufrem tak dlouho, až je eluát prostý bílkovin. Pak se vymývá ze sloupce enzym 0,04 M trispufem s kyselinou chlorovodíkovou o pH 8 a obsahem 0,02 M NaCl, 1 mM kyseliny etylen-diamintetraoctové a 1 mM dithioerythritu. Frakce s obsahem enzymu alespoň 20 jednotek/ml se vlijí, sytí se síranem amonným na 80 % a vysrážený enzym se oddělí odstředěním. Nakonec se enzym čistí chromatografií na svrchu uvedeném systému, jen použitý sloupec má menší objem. Čištěné aktivní frakce se slíjí a enzym se sráží síranem amonným o 0,8 g, načež se rozpustí v 50 ml 0,04 M trispufu s kyselinou chlorovodíkovou o pH 8,0 s obsahem 0,02 M NaCl, 1 mM kyseliny etylendiamintetraoctové a 1 mM dithioerythritu, zfiltruje se za ste-rilních podmínek a znovu se sytí síranem amonným na 80 %. Tímto způsobem se získá při 4 °C stálá enzymatická suspenze CK-MM se specifickou účinností 26 až 30 jednotek/mg, měřeno při použití kreatinu jako substrátu při teplotě 25 °C.

Objem: 86 ml,
účinnost: 316 jednotek/ml,
obsah bílkovin: 11,8 mg/ml.

Výtěžek 30 %, vztaženo na extrakt orgánu.

b) Analogicky jako v příkladu Aa) se izoluje CK-MM ze svalové tkáně opice Rhesus, vepře a skotu.

P ř í k l a d B

Výroba protilátky pro CK-MM

a) CK-MM z lidského svalu se dialyzuje proti fyziologickému roztoku chloridu sodného o pH 7,0 s přísadou 0,07 M trietanolaminu jako pufru, 10 mM merkaptoetanolu a 10 mM chloridu hořečnatého. Enzymatický roztok se uvolní v ultraodstředivce a obsah bílkovin se upraví dialyzačním pufrům na 2 mg/ml. 1 ml tohoto roztoku se emulguje s 1 ml kompletního Freundova pomocného činidla, které sestává ze suspenze vody a minerálního oleje, která obsahuje ještě 2 mg usmrcených M-tuberkulózních bakterií. Tato emulze se vstříkuje nitrosvalově kozám. Po 3 stejných injekcích v odstupu 3 týdnů a 3 dalších injekcí boosterinu vždy v odstupu 16 týdnů se odebírá 21 dnů po poslední injekci krev. Sérum se získá známým způsobem, směsí 3 % ovčího sérového albuminu a 0,1 % azidu sodíku v 0,1 M borátovém pufru se nastaví na pH 8,4 a zfiltruje se za sterilních podmínek. Získaný roztok, který obsahuje protilátku proti CK-MM z lidského svalu, se plní po 0,5 ml do hnědých skleněných nádobek a lyofilizuje. Protilátky mají molekulovou hmotnost 160 000 až 180 000.

b) CK-MM, získaný podle příkladu Aa) z lidského svalu, se dialyzuje proti fyziologickému roztoku chloridu sodného o pH 6,8 s obsahem 7,5 mM N-acetylcysteinu a 25 mM octanu hořečnatého s přísadou 0,1 M imidazolu jako pufru. Pak se enzymatický roztok uvolní v ultraodstředivce a obsah bílkoviny se dialyzačním pufrům nastaví na hodnotu 0,2 mg/ml. 1 ml tohoto roztoku se emulguje s 1 ml kompletního Freundova pomocného činidla. Vzniklá emulze se vstříkuje nitrokožně skopcům. Po 3 až 6 týdnech se vstříkuje ještě druhá a třetí nitrosvalová injekce a pak se vstříkují ještě 3 injekce boosterinu vždy v odstupu 14 týdnů. 19 dní po poslední injekci se odebírá krev. Zpracování se provádí obdobným způsobem jako v příkladu Ba), čímž se získá protilátka proti CK-MM lidského svalu v lyofilizované formě. Molekulová hmotnost protilátky je 160 000 až 180 000.

c) CK-MM ze svalu opice Rhesus se dialyzuje proti fyziologickému roztoku NaCl o pH 6,8 s přísadou 0,15 M imidazolu jako pufru, 25 mM dithioerythritu a 15 mM chloridu manganatého. Po odstranění agregátu v ultraodstředivce se upraví obsah bílkovin svrchu uvedeným dialyzačním pufrům na hodnotu 5 mg/ml. 1 ml získaného roztoku se emulguje s 1 ml kompletního Freundova pomocného prostředku. Počet injekcí, odběr krve a zpracování získaného materiálu se provádí obdobným způsobem jako v příkladu Ba). Tímto způsobem se získá protilátka proti CK-MM ze svalu opice Rhesus v lyofilizované formě. Sedimentační konstanta této protilátky je 7 S.

d) CK-MM ze svalu vepře se aktivuje obdobným způsobem jako v příkladu Bb) a emulze takto získaného antigenu se vstříkuje králíkům s kompletním Freundovým pomocným činidlem. Po 4 týdnech následuje další podkožní injekce antigenu. Injekce se opakuje po dalších 3 týdnech, 19 dní po poslední injekci se odebírá frakce. Zpracování se provádí obdobným způsobem jako v příkladu Ba). Získá se protilátka proti CK-MM ze svalu vepře v lyofilizované formě. Molekulová hmotnost takto získané protilátky je 160 000 až 180 000.

Zcela analogickým způsobem je možno získat ze svalu skotu protilátku proti CK-MM ze svalu skotu s molekulovou hmotností 160 000 až 180 000.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Prostředek ke stanovení účinnosti hybridního isoenzymu kreatinkinázy MB za přítomnosti kreatinkinázy MM ve vzorku tělesné tekutiny, vyznačující se tím, že obsahuje 0,01 až 1,0 mg protilátek pro úplnou inhibici až 2 500 jednotek na litr podjednotky MM a MB ve vzorku tělesné tekutiny.

2. Prostředek podle bodu 1, vyznačující se tím, že protilátkami jsou protilátky typu JgC.

3. Prostředek podle bodu 1, vyznačující se tím, že obsahuje protilátky, získané z koz.