



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 199433

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 26.04.78
(21) (PV 2691 - 78)

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.²

C 12 N 9/44

(40) Zveřejněno 31.10.79
(45) Vydáno 31.01.83

(75)
Autor vynálezu

Š t ě p á n Jan MUDr. CSc. a
Š k r h a Jan, Praha

(54)

ZPŮSOB ODDĚLOVÁNÍ ISOENZYMŮ ALFA-AMYLÁZY

Vynález se týká způsobu oddělování isoenzymů alfa-amylázy, vhodného ke stanovení aktivity isoenzymů alfaamylázy v krvi a v moči u lidí.

Alfa-amyláza je diagnosticky velmi významným enzymem. V klinické praxi má své stálé místo již po dobu více než půl století. Pro stanovení celkové aktivity enzymu v krvi a v moči byla vypracována řada metod, jako například amyloklastická, sacharogenní, nebo nefelometrická, nebo dnes nejužívanější metoda s barevným substrátem. Celkovou aktivitu amylázy v krvi i v moči tvoří aktivity dvou isoenzymů, označovaných jako S-isoamyláza (zpravidla přítomná ve slinách, méně přesněji označovaná jako slinný isoenzym amylázy) a P-isoamyláza (pankreatický isoenzym, přítomný ve slinivce břišní).

Dosavadní známé postupy oddělení obou isoenzymů byly buď jen kvalitativní, tedy bez možnosti kvalitativního hodnocení aktivity isoenzymů, nebo to byly postupy časově a přístrojově náročné. Za kvantitativně hodnotitelné nelze považovat hodnocení isoenzymů po jejich rozdělení elektroforézou, nebo elektrofokusací v gelu, pokud se hodnotí zóny aktivity enzymu vizualizované jodochromovou reakcí, nebo reakcí s barevným substrátem přímo v dělicím nosiči, např. agaru nebo polyakrylamidovém gelu. Příkladem jsou dříve publikované metody (Berk, J.E., Hyashi, S., Searcy, R.L., Amer, J. Digest. Dis. 11, 695, 1966, nebo Long, W.B., Grider, J.R., Gastroenterology 71, 589, 1976). Stejně málo přesná je i eluce isoenzymů amylázy z gelu po jejich elektroforetickém oddělení, a následné stanovení aktivity v eluátech. Preparativní elek-

troforézy se ke stanovení aktivity isoenzymů amylázy rovněž nepoužívá. Důvodem je časová a přístrojová náročnost postupu.

Kvantitativní stanovení aktivit isoenzymů amylázy umožňují zatím dva způsoby. První publikovali Fridlander, L., Berk, J.E., Ueda, M., Clin. Chem. 18, 1493, 1972. Užívá se nejprve pasáže směsi isoenzymů, t.j. krevního séra nebo moči, kolonou s organickým gelem. Získaný eluát s enzymovou aktivitou se pak nanáší na kolonu dextranového gelu s navázanými diethylaminoethylovými skupinami. Eluce se provádí pufrem s přísadkou chloridu sodného, při čemž se S-isoenzym amylázy vzhledem ke svému elektronegativnějšímu náboji opožďuje za isoenzymem P. Eluční profily obou isoenzymů se překrývají, oddělují se tedy nedostatečně. Další nevýhodou je časová náročnost, protože se sbírá více než 50 frakcí z každé kolony a aktivita amylázy se stanovuje v každé frakci. S tím souvisí i náročnost na přístrojové vybavení a na citlivost metody, kterou se stanoví amylázová aktivita. Z uvedených důvodů se metoda neosvědčila jako rutinní.

Druhá kvantitativně hodnotitelná metoda byla publikována v roce 1977 (O'Donnell, M.D., FitzGerald, O., McGeeney, K.F., Clin. Chem. 23, 560, 1977). Využívá různého stupně inhibice pankreatického a slinného isoenzymu amylázy v séru inhibitorem bílkovinné povahy, izolovaným ze pšenice. Širšímu využití metody zatím brání jednak obtížná dostupnost inhibitoru, jednak použitelnost metody jen pro odlišení isoenzymů v séru, nikoli v moči. Vedle toho zatím nejsou uveřejněné výsledky u zdravých osob v plném souhlase s dosud známými literárními údaji.

Uvedené nedostatky odstraňuje způsob oddělování isoenzymů alfa-amylázy podle vynálezu. Jeho podstata spočívá v tom, že se směs isoenzymů nanese na diethylaminoethylcelulózu, z níž se pankreatický isoenzym jednorázově eluuje do jediného objemu pufru, kterým je diethylaminoethylcelulóza ekvilibrována, načež se stanoví aktivita pankreatického isoenzymu amylázy, s výhodou fotometricky, přičemž aktivita slinného isoenzymu, který zůstal vázán na diethylaminoethylcelulóze, tvoří zbývající podíl z celkové aktivity.

Účinky způsobu podle vynálezu spočívají v jednoduchosti provedení, které je vhodné pro kterýkoli typ klinicko-biochemické laboratoře s běžným typem vybavení. Získá se kvantitativní forma výsledku, umožňující i dynamické hodnocení rozvoje změn aktivit isoenzymů během onemocnění pacienta. Další výhodou je časová úspornost, umožňující získat výsledky do 40 minut od odběru materiálu, s možností provádění několika analýz současně. Náklady na analýzu jsou pouze dvojnásobné v porovnání se stanovením pouze celkové aktivity enzymu, přičemž jsou použitelné běžné metody s barevným substrátem.

Způsob podle vynálezu se uplatní hlavně v diagnostice onemocnění slinivky břišní a slinných žláz. U průušnic může docházet k onemocnění nejen slinných žláz, ale i například slinivky břišní. Postižení slinných žláz se podle klinického obrazu hodnotí dobře, zvýšení celkové aktivity alfa-amylázy je zde obvyklé a připisuje se zpravidla aktivitě S-isoenzymu. Zvýšení celkové

aktivity enzymu však může být podmíněno i zvýšenou aktivitou P-isoenzymu, pokud došlo k zánětu slinivky břišní. Tato komplikace se klinicky projeví až při těžším průběhu. Její včasné rozpoznání na základě vyšší aktivity P-isoenzymu může předejít komplikacím a umožní včasné zahájení cílené léčby. Stanovení aktivity isoenzymů amylázy se uplatňuje i při samotném onemocnění slinivky břišní. Při akutním zánětu má význam pro posuzování průběhu onemocnění, protože zvýšení aktivity P-isoenzymu přetrvává déle než zvýšení celkové aktivity amylázy. Diagnostický význam má dále nález zvýšené aktivity P-isoenzymu při chronickém zánětu slinivky břišní, kdy celková aktivita může být v mezích normy. Naopak snížená aktivita P-isoenzymu může být i projevem poruchy zevně sekreční funkce žlázy. Chybění aktivity P-isoenzymu koncem prvního roku věku dítěte je cenné pro diagnostiku cystické fibrosy slinivky břišní. Stanovení aktivity isoenzymů amylázy může napomoci i při vyšetření nemocných s rakovinou slinivky břišní. Způsob podle vynálezu se uplatní také při stanovení rychlosti, jakou je krev od jednotlivých isoenzymů očišťována, což je diagnosticky opět velmi cenný ukazatel.

Způsob podle vynálezu je v dalším blíže popsán na příkladu provedení.

Příklad

Byla použita kolona diethylaminoethylcelulosa a tris-(hydroxymethyl)-aminomethanový pufr. Kolona se ekvilibruje pufrům. Na sloupec se nanese 0,1 ml směsi isoenzymu (krevní sérum, moč). Sloupec se promyje pufrům do konečného objemu eluátu 4,2 ml. V eluátu se stanoví aktivita amylázy, tedy P-isoenzymu amylázy tak, že se k eluátu přidá tableta substrátu, protřepe, inkubuje 15 min. při 37 °C, reakce se ukončí, v supernatantu se fotometricky stanoví množství uvolněného barviva a z kalibrační křivky se odečte odpovídající aktivita enzymu. Stejně se provede stanovení celkové aktivity amylázy v původní směsi isoenzymů v séru nebo v moči po naředění 0,1 ml vzorku směsi isoenzymů pufrům do objemu 4,2 ml. Z rozdílu celkové aktivity a aktivity pankreatického isoenzymu se propočte aktivita slinného isoenzymu, který se za uvedených podmínek zcela vázal na koloně. Pokud je žádoucí vyjádření aktivity amyláz za konvenčních podmínek, kdy se enzym ředí vodou a nikoli zmíněným pufrům, použije se zjištěné relativní zastoupení obou isoenzymů na celkové aktivitě k propočtení aktivit z hodnoty celkové aktivity, stanovené za standardních podmínek.

Podle příkladu bylo na kolonu nanášeno 0,1 ml krevního séra nemocného s průdušnicemi. V eluátu byla stanovena aktivita P-isoenzymu 160 U/l, celková aktivita při ředění séra pufrům byla 880 U/l. Aktivita slinného isoenzymu tedy činila $880 - 160 = 720$ U/l. Celková aktivita amylázy v séru stanovená konvenčním způsobem činila 760 U/l. Poměrné zastoupení pankreatického isoenzymu bylo 18,2 % z celkové aktivity, aktivita pankreatického isoenzymu vypočítaná ze standardně stanovené amylázové aktivity činila 138 U/l, aktivita slinného isoenzymu 622 U/l.

Předmět vynálezu

Způsob oddělování isoenzymů alfa-amylázy vyznačený tím, že se směs isoenzymů nanese na diethylaminoethylcelulózu, z níž se P-isoenzym jednorázově eluuje do jediného objemu pufru, kterým je diethylaminoethylcelulóza ekvilibrována, načež se stanoví aktivita P-isoenzymu v eluátu, s výhodou fotometricky, přičemž aktivita S-isoenzymu, který zůstal vázán na diethylaminoethylcelulóze, tvoří zbývající podíl z celkové aktivity.