



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

208781
(11) (B2)

(51) Int. Cl.³
G 01 N 33/54

(22) Přihlášeno 21 05 79
(21) (PV 3505-79)
(32) (31) (33) Právo přednosti od 12 06 78
(P 28 25 650.0)
Německá spolková republika
(40) Zveřejněno 30 01 81
(45) Vydáno 15 04 84

(72)
Autor vynálezu

KLEINHAMMER GERD dr., TUTZING, DEUTSCH GERLINDE, PÖCKING,
LINKE HANS-RALF dr., RAISTING, STÄHLER FRITZ dr., TUTZING,
GRUBER WOLFGANG dr., TUTZING-UNTERZEISMERING (NSR)

(73)
Majitel patentu

BOEHRINGER MANNHEIM GMBH, MANNHEIM-WALDHOF (NSR)

(54) Způsob stanovení vazného indexu thyroxinu v krevním séru

1

Diagnostika funkčního stavu štítné žlázy má v rámci klinické chemie vzhledem k velkému rozšíření poruch této žlázy velký význam. Při základní diagnostice funkce štítné žlázy *in vitro* se stanoví celkové množství thyroxinu v séru, stanoví se rovněž koncentrace globulinu, vázajícího thyroxin. Toto stanovení se provádí pomocí příjmu trijodthyroxinu nebo tak zvaného vazného indexu thyroxinu.

Při testu na příjem trijodthyroxinu se stanoví zbytek vazné kapacity nosných bílkovin pro hormony štítné žlázy v krevním séru. Z těchto bílkovin jde o globulin, který váže thyroxin, na nějž se váže přibližně 60 procent celkového množství thyroxinu, částečně jde také o prealbumin, a albumin, které jsou rovněž schopny vázat thyroxin. Při stanovení zbytkové vazné kapacity jde především o stanovení vazby hormonu štítné žlázy na globulin, který váže thyroxin. V případě, že jde o zvýšenou činnost štítné žlázy je obsah thyroxinu zvýšen, při snížené činnosti štítné žlázy je méně vazných míst nosných bílkovin vázáno na thyroxin a trijodthyronin.

Známy způsob stanovení vazného indexu thyroxinu se provádí tak, že se smísí známé množství radioaktivního trijodthyroxinu se vzorkem krevního séra a iontoměniče. Ra-

2

dioaktivní trijodthyronin se dělí mezi vazná místa nosné bílkoviny a iontoměniče. V případě, že nosná bílkovina obsahuje větší množství neobsazených vazných míst, váže se větší množství radioaktivního trijodthyroninu na tato místa a zbytek na iontoměnič. Vyhodnocení se provádí měřením radioaktivity na iontoměniči nebo v roztoku. Poměr radioaktivity roztoku, který odpovídá množství radioaktivního trijodthyroninu, vázaného na nosné bílkoviny zkoumaného vzorku séra k radioaktivitě roztoku standardního vzorku, násobený faktorem, specifickým pro každý standard se nazývá vazný index thyroxinu.

Nevýhoda tohoto známého způsobu spočívá v nutnosti použití radioaktivních sloučenin. Z toho vyplývá na jedné straně nutnost drahého a komplikovaného měřicího zařízení, na druhé straně nutnost zcela zvláštního zacházení s radioaktivními reakčními činidly vzhledem k možnému poškození zdravotního stavu pracovníků laboratoře. Tyto nevýhody ztěžují stanovení.

Vynález si klade za úkol navrhnout způsob stanovení vazného indexu thyroxinu, prostý svrchu uvedených nevýhod, proveditelný v každé laboratoři pomocí běžných zařízení a umožňující tak snadné stanovení tohoto indexu ke zjištění funkčního stavu štítné žlázy.

Předmětem vynálezu je tedy způsob stanovení vazného indexu thyroxinu v krevním séru, vyznačující se tím, že se ke zkoumanému vzorku séra přidá 100 až 500 ng thyroxinu ml a 1 až 200 milijednotek stanovitelného enzymu ml, kovalentně vázaného na thyroxin, získaný roztok se uvede ve styk s protilátkami proti thyroxinu v pevné fázi, kapalná fáze se oddělí od pevné fáze a v jedné z těchto fází se měří účinnost použitého enzymu.

Vynález vychází z toho, že je možno užít místo radioaktivního značení trijodthyroninu značení enzymem, zvláště v tom případě, že se užije snadno stanovitelného enzymu. Pokusy však prokázaly, že není možno nahradit radioaktivně značený trijodthyronin (125 I—enzymaticky značeným trijodthyroninem nebo thyroxinem. Ukázalo se totiž, že tyto látky značené enzymem nejsou vázány na vazná místa bílkovin krevního séra. Příčinou toho je patrně poměrně velká molekula enzymu, takže vzniká sterická zábrana.

Nyní bylo neočekávaně zjištěno, že thyroxin značený enzymem se může dostat do konkurence s nezačteným thyroxinem v případě styku s protilátkami proti thyroxinu, nacházejícími se v pevné fázi. Na této skutečnosti je založen způsob podle vynálezu, při němž na jedné straně dochází ke konkurenci vazných míst sérových bílkovin a nerozpustné protilátky proti thyroxinu, kde při vazbě na thyroxin, přičemž v případě, že se naváže větší množství thyroxinu na protilátku, zbývá méně volných vazných míst v séru. Současně dochází ke konkurenci značeného a nezačteného thyroxinu o protilátku. To znamená, že se váže tím více značeného thyroxinu na pevnou fázi, čím vyšší je vazná schopnost séra pro thyroxin a tím i vazný index thyroxinu. Naměřená enzymatická účinnost v pevné fázi je tedy přímým měřítkem pro velikost vazného indexu. Je však možno stanovit účinnost enzymu i v kapalně fázi.

Ke značení je nutno užít při provádění způsobu podle vynálezu enzymu, který je možno snadno stanovit a který je možno vázat na thyroxin bez ztráty enzymatické účinnosti. Zvláště vhodné pro toto značení jsou enzymy, jejichž účinnost je možno snadno stanovit opticky, a to zvláště pomocí barevných zkoušek ve viditelném světle nebo změnami jejich NADH-koncentrace. Typickými příklady vhodných enzymů jsou peroxidáza, glukózooxidáza, α - a β -galaktosidáza, glikoamyláza, invertáza a alkalická fosfatáza.

Pro všechny shora uvedené enzymy jsou známy jednoduché a rychlé metody stanovení, které byly popsány například v publikaci H. U. Bergmeyer „Methoden der enzymatischen Analyse“, Verlag Chemie, 3. vydání 1974. Protilátky proti thyroxinu v pevné fázi není nutno vázat na nosič, je možno je učinit nerozpustnými například zesítněním

pomocí polyfunkčních reakčních složek, jako jsou dialdehydy, dioxidy apod. S výhodou je však možno protilátky vázat na pevný nosič. Pevným nosičem pro protilátky proti thyroxinu je jakýkoliv materiál, který je inertní vzhledem k reakčním složkám a na něž je možno protilátky vázat. Bylo zjištěno, že u celé řady materiálů se protilátky váží dostatečně pevně na povrch nosiče. Je také možno postupovat tak, že se protilátky váží běžným způsobem pro fixaci biologicky aktivních bílkovin na pevném nosiči, to znamená kovalentní vazby. Typickým příkladem je aktivace povrchu nosiče bromkyanem, koklymerací vlákoviny, povrchovým zesítněním protilátky na nosič působením polyfunkčního zesíťujícího činidla, například glutaraldehydu a podobně. Všechny tyto způsoby jsou v oboru známy.

S výhodou se při provádění způsobu podle vynálezu užije nádobek, jejichž vnitřní stěna je potažena protilátkou. Typickými materiály pro výrobu těchto nádobek jsou polystyren, kopolymery styrenu a akrylonitrilu, další plastické hmoty a sklo. U plastických hmot na podkladě styrenu stačí pro potažení stěn uložení roztoku protilátky na určitou dobu do nádobky.

Způsob podle vynálezu je samozřejmě možno provádět také při použití nosičů, které nemají tvar nádobky, tyto nosiče mohou být rozděleny i na jednotlivé částice, mohou například tvořit náplň sloupce.

Protilátky proti thyroxinu je možno získat běžným způsobem pro výrobu protilátek proti hormonům. Výhodné je použití konjugátů thyroxinu na vhodné nosné bílkoviny k vyvolání imunity. Zvláště vhodné z velkého množství běžně známých nosných bílkovin jsou albuminy skotu. Tyto sérové albuminy skotu nebo jiné nosné bílkoviny se váží na thyroxin chemicky, například působením glutardialdehydu ve slabě alkalickém prostředí s následnou redukcí borohydridem sodíku. Dalším vhodným způsobem je reakce s morfolicyklohexylkarbodiimidem. Vhodnými pokusnými zvířaty pro aplikaci takto získaných látek, vyvolávajících imunitu proti thyroxinu jsou například králíci nebo ovce, je však možno užít i jiných zvířat.

Thyroxin, značený peroxidázou a použití při provádění způsobu podle vynálezu se získává s výhodou reakcí ter.butyloxykarbonylthyroxinu-N-hydroxysukcinimidu s peroxidázou s následným chromatografickým čištěním získaného produktu. Obdobným způsobem je možno získat i většinu dalších značených produktů při použití postupů, známých v chemii bílkovin.

Jak již bylo uvedeno, přidává se ke vzorku séra určité množství thyroxinu. Bylo zjištěno, že toto množství má být 100 až 500 ng thyroxinu/ml séra. Je však možno užít i většího nebo menšího množství. Svrchu uvedené rozmezí však stačí pro všechny praktické vzorky séra, to znamená, jak pro séra s případně snížené činnosti štítné žlázy, tak pro

séra v případě zvýšené činnosti štítné žlázy. Množství přidaného thyroxinu, značeného enzymem závisí na druhu užitého enzymu, zvláště na jeho specifické účinnosti, kterou je možno snadno stanovit. V případě, že se užije peroxidázy, užije se s výhodou takové množství, aby ve výsledném vzorku byla účinnost 1 až 200 mU peroxidázy/ml.

Reakční směs séra, pufru, thyroxinu a enzymaticky značeného thyroxinu se uvede ve styk s protilátkami proti thyroxinu, které jsou nerozpustné a s výhodou vázány na nosič tak dlouho, aby bylo možno dosáhnout stálé vazby značeného thyroxinu na protilátku. Doba styku závisí na podmínkách, zejména na pH, teplotě a koncentraci. Obvykle stačí půl hodiny až 2 hodiny. Po skončení inkubace se roztok oddělí od nosiče, například vylitím roztoku z nádoby, nosič se promyje vodou a pak se stanoví účinnost enzymu, vázaného na nosič. Při výhodném provedení způsobu podle vynálezu při použití nosiče ve formě nádoby a peroxidázy jako enzymu se přidá například peroxid vodíku a 2,2'-azino-di[3-ethylbenzthiazolinsulfonát (6)] v roztoku v pufru a měří se extinkce při vlnové délce 405 nm.

K provádění způsobu podle vynálezu lze užít různých sestav. Sestava se například skládá z thyroxinu, enzymaticky značeného thyroxinu, protilátky proti thyroxinu ve formě nerozpustné pevné látky, z pufru a reakčního činidla ke stanovení enzymatické účinnosti. Vhodné pufrы mají oblast pH v rozmezí 7,5 až 9,3. Výhodné pH tvoří rozmezí 8,0 až 9,0. Typickými příklady použitelných pufrů jsou fosfátový pufr, tris-pufr, boraxový pufr a barbitolový pufr.

Nejvýhodnější je barbitolový pufr v koncentraci 0,05 až 0,5 M.

Sestava může obsahovat ještě stabilizační činidla, například sérový albumin skotu, uhlohydráty nebo glycerin.

S výhodou obsahuje sestava jako enzymaticky značený thyroxin vázaný na peroxidázu. Reakční činidlo pro stanovení enzymatické účinnosti může být v tomto výhodném případě tvořeno peroxidem vodíku nebo sloučeninou, která tento peroxid uvolňuje, například perboritanem tento peroxid uvolňuje, například perboritanem sodným nebo perhydritem a 2,2'-azino-di[(3-ethylbenzthiazolinsulfonát/6)], jakož i vhodným pufrem. Typickým příkladem vhodného pufru je fosforečnanový a citronanový pufr o pH 4,5 až 6,0. Dalším vhodným pufrem pro toto provedení je fosfátový pufr o pH 7,0, guayakol a peroxid vodíku.

Ve výhodném provedení obsahuje sestava následující složky:

thyroxin	100 až 400 ng/ml
thyroxinperoxidáza	5 až 100 mU/ml
barbitolový pufr	0,1 až 0,2 M, pH 8,6
sérový albumin skotu	0,2 %
protilátky proti thyroxinu (bez nosiče)	1 až 0,05 µg/ml
H ₂ O ₂	0,5 až 5 mM/l
2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazolinsulfonát-(6)]	5 až 50 mM/l
pufr s fosfátem a citronanem o pH 5,0	0,1 až 0,2 M

Při výrobě enzymaticky značeného thyroxinu se s výhodou vychází z terc.butyloxykarbonylthyroxin-N-hydroxysukcinimidu a reakce se provádí ve směsi pufru a dimethylformamidu v poměru 1:1. Jako pufr se užije kterýkoli ze svrchu uvedených pufrů. K čištění konjugátu je vhodná fenylbutylaminsepharóza.

Způsobem podle vynálezu je tedy možno snadno provést stanovení vazného indexu thyroxinu v séru, přičemž přesnost tohoto stanovení odpovídá přesnosti při použití radioaktivních látek, způsob podle vynálezu je však prostý nevýhod shora uvedeného způsobu.

Způsob podle vynálezu lze využít v diagnostických i průmyslových podmínkách, zejména při výrobě farmaceutických přípravků.

Vynález bude osvětlen následujícími příklady.

Příklad 1

A. Výroba protilátek proti thyroxinu

Thyroxin se váže ve vodném roztoku o pH 10 přidáním 1,9 hmotnostních % glutardialdehydu na sérový albumin skotu. Pak se redukuje sloučenina Schiffovy báze borohydridem sodným a látky, vyvolávající imunitu proti thyroxinu se čistí chromatograficky. Získaný produkt se podrobí dialýze a pak se podává pokusným zvířatům.

B. Výroba thyroxinperoxidázy

Peroxidáza se uvede v reakci s 10násobným molárním přebytkem terc.butyloxykarbonylthyroxin-N-hydroxysukcinimidu ve směsi dimethylformamidu a fosfátového pufru o pH 8,5 v poměru 1:1. Pak se dimethylformamid odstraní dialýzou a vodný roztok se smísí s fenylbutylaminsepharózou. Sloupec se promyje směsí trispufru s chloridem sodným a pak směsí ethylenglykolu a vody v poměru 1:1 s obsahem 1 M chloridu sodného. Eluát se míchá 2 hodiny s 0,5 M hydroxylaminu, načež se dialyzuje proti fosfá-

rovému pufru. Získaný roztok se smísí se sérovým albuminem skotu a pak se lyofilizuje.

C. Výroba protilátek proti thyroxinu, vázaných na nosič

Z imunizovaných zvířat se známým způsobem získá antisérum proti thyroxinu a vysráží se síranem amonným. Srážení se provádí v 0,04 M fosfátovém pufru 1:6000, v němž se také rozpustí sraženina. 1,5 ml takto získaného roztoku se nechá stát přes noc v reakčních nádobkách ze směsného polymeru styrenu a akrylonitrilu (Luram), pak se obsah odsaje, nádobky se vymyjí fyziologickým roztokem chloridu sodného s obsahem 1 % sérového albuminu skotu, načež se promyjí a vysuší.

D. Stanovení

Shora získané reakční nádobky s vrstvou protilátek proti thyroxinu se naplní 10 μ l séra a 1 ml reakčního činidla, které obsahuje 280 ng thyroxinu/ml a 10 mU/ml thyroxin-peroxidázy v 0,12 M barbitalovém pufru o pH 8,6 s přísadou 0,2 % sérového albuminu skotu. Směs se nechá stát 2 hodiny při teplotě místnosti. Pak se obsah nádobek odsaje, nádobky se naplní reakčním činidlem pro stanovení peroxidázy, které sestává z 1,47 mM/l H_2O_2 a 14 mM/l ABTS v 0,2 M pufru s fosforečnanem a citronanem o pH 5,0. Změna barvy se měří při 405 nm.

K výhodnocení se užije cejchovací křivky, získané pomocí dvou standardů s různou

vaznou schopností thyroxinu, které se zpracovávají stejným způsobem jako vzorky. Nášejí se převrácené hodnoty extinkcí, naměřených pro tyto standardy, přičemž je možno stanovit vázané množství thyroxinu nebo přímo hodnoty vazného indexu thyroxinu.

E. Použití metody pro lidské sérum

83 vzorků lidského séra se zkoumá způsobem podle vynálezu a současně se provádí zkouška při použití trijodthyroninu, značeného radioaktivním jodem. Zkoumaná séra se klasifikují podle získané hodnoty vazného indexu thyroxinu jako normální a jako séra se sníženou nebo zvýšenou vaznou kapacitou thyroxinu. Je zřejmé, že mezi oběma metodami je naprostý souhlas jak je zřejmé z tabulky 1.

Tabulka 1

A/B	1	2	3
1	28	1	
2	1	28	
3		3	22

1) snížená

2) normální

3) zvýšená

} vazná schopnost thyroxinu

A — způsob podle vynálezu

B — způsob s použitím radioaktivního značení

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob stanovení vazného indexu thyroxinu v krevním séru, vyznačující se tím, že se ke zkoumanému vzorku séra přidá 100 až 500 ng thyroxinu/ml a 1 až 200 milijednotek stanovitelného enzymu/ml, kovalentně vázaného na thyroxin, získaný roztok se uvede ve styk s protilátkami proti thyroxinu v pevné fázi, kapalná fáze se oddělí od pevné fáze a v jedné z těchto fází se měří účinnost použitého enzymu.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako stanovitelného enzymu užije peroxidázy.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se protilátky proti thyroxinu užijí ve formě, vázané na nosič.

4. Způsob podle bodu 3, vyznačující se tím, že se jako pevného nosiče užije nádobky, jejíž vnitřní stěna je povlečena protilátkou.

5. Způsob podle bodů 1 až 4, vyznačující se tím, že se užije 100 až 500 ng thyroxinu/ml séra.

6. Způsob podle bodů 1 až 5, vyznačující se tím, že se užije 1 až 10 mU/ml peroxidázy vázané na thyroxin.