



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

218345
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
G 01 N 33/54

(22) Přihlášeno 21 01 81
(21) (PV 409-81)

(40) Zveřejněno 25 06 82

(45) Vydáno 15 02 85

(75)

Autor vynálezu

RACEK JAROSLAV MUDr., SLABÝ PAVEL prom. biolog, PLZEŇ

(54) Způsob stanovení katalytické aktivity kreatinkinasy aktivované thiolovými deriváty ve viditelné oblasti spektra

1

2

Vynález se týká způsobu stanovení katalytické aktivity kreatinkinasy aktivované thiolovými deriváty ve viditelné oblasti spektra. Podstata vynálezu spočívá v tom, že přebytek thiolových aktivátorů, interferujících při reakci redukované formy nikotinamid-adenindinukleotidu s chromogenem, se odstraní přidáním N-etylmaleinimidu v množství 2 až 4 moly na 1 mol thiolového aktivátoru, načež se přidá chromogen a vzniklé zabarvení se měří ve viditelné oblasti spektra. Použití vynálezu odstraňuje nutnost fotometrie v ultrafialové oblasti spektra při stanovení aktivované kreatinkinasy, a umožňuje tak rozšíření této metody i do menších laboratoří klinické biochemie.

Předmětem vynálezu je způsob stanovení katalytické aktivity kreatinkinasy aktivovaně thiolovými deriváty ve viditelné oblasti spektra.

Kreatinkinasa je enzym důležitý pro činnost příčně pruhovaného svalstva. Katalyzuje přenos fosfátové skupiny mezi adenosin-trifosfátem a kreatinfosfátem. Z poškozených svalových buněk se enzym dostává do krve. Stanovení jeho katalytické aktivity v séru má velký význam při chorobách postihujících příčně pruhované svalstvo, například při progresivní svalové dystrofii a zejména při infarktu myokardu, kdy sledování aktivity kreatinkinasy v séru má nejen diagnostický význam, ale i prognostický význam.

Ke stanovení katalytické aktivity kreatinkinasy se užívá komplexu tří na sebe navazujících reakcí, z nichž první je katalyzována kreatinkinásou. V pomocné a indikační reakci, katalyzované enzymem hexokinásou a glukóza-6-fosfátdehydrogenásou, je pak přeměňován produkt první reakce za tvorby redukované formy nikotinamidadeninukleotidu.

Vznik této sloučeniny se dá sledovat fotometricky v ultrafialovém světle jako nárůst absorbance, který je úměrný katalytické aktivitě kreatinkinasy. Stanovení tedy vyžaduje fotometr s možností měřit v ultrafialové oblasti spektra; tento fotometr je drahý a v menších laboratořích klinické biochemie nedostupný.

U stanovení aktivity jiných enzymů, zejména dehydrogenas, jejichž činností vzniká též redukovaná forma nikotinamidadeninukleotidu, bylo popsáno převedení měření z ultrafialové do viditelné oblasti spektra. Metoda využívá účinku redukované formy nikotinamidadeninukleotidu na chromogeny, jejichž redukcí vzniká barevná sloučenina, či naopak jejich zbarvení ubývá. Jako chromogeny jsou nejčastěji užívány různé tetrazolové soli, méně často se využívá redukce 2,6-dichlorfenolindofenolu nebo redukce solí obsahujících trojmocné železo či dvojmocnou měď.

Tohoto postupu nelze užít při stanovení aktivity kreatinkinasy. Tento enzym je totiž velice rychle oxidován a ztrácí svoji aktivitu. Před jeho stanovením je nutné provést reaktivaci přidáním přebytku thiolových sloučenin, například glutathionu, N-acetylcysteinu či dithiothreitolu. Při měření aktivity kreatinkinasy v ultrafialovém světle thiolové sloučeniny neinterferují. Při pokusu o výše uvedené převedení do viditelné oblasti spektra se však projeví redukční účinek thiolových sloučenin na chromogen, který tak nespecificky zvyšuje výsledné zbarvení, jež pak není úměrné aktivitě kreatinkinasy.

Podstata způsobu stanovení katalytické aktivity kreatinkinasy aktivované thiolovými deriváty ve viditelné oblasti spektra podle vynálezu spočívá v tom, že přebytek thiolových aktivátorů, interferujících při reakci redukované formy nikotinamidadeninuku-

kleotidu s chromogenem se odstraní přidáním N-etylmaleinimidu v množství 2 až 4 moly na 1 mol thiolového aktivátoru, načež se přidá chromogen a vzniklé zbarvení se měří ve viditelné oblasti spektra.

Použití N-etylmaleinimidu blokuje nežádoucí vedlejší reakci thiolových aktivátorů s chromogenem tím, že s nimi tvoří neaktivní sloučeninu vzniklou adicí jejich sulfhydrylové skupiny na dvojnou vazbu heterocyklu N-etylmaleinimidu. Při vlastním stanovení se s výhodou postupuje tak, že po proběhnutí enzymových reakcí, které dávají vzniknout redukovanému nikotinamidadeninukleotidu, se přidá roztok N-etylmaleinimidu.

Během 30 sekund dojde k vazbě veškerých volných sulfhydrylových skupin, což se projeví inaktivací thiolových aktivátorů a nastavením enzymové reakce katalyzované kreatinkinásou. V dalším stupni pak může proběhnout barevná reakce, při níž je chromogen redukován pouze redukovanou formou nikotinamidadeninukleotidu a vzniklé zbarvení je úměrné katalytické aktivitě kreatinkinasy. N-etylmaleinimid při této barevné reakci neinterferuje. Měření lze převést do viditelné oblasti spektra a tak rozšířit možnost provádět stanovení aktivované kreatinkinasy i v menších laboratořích, které nejsou vybaveny spektrofotometrem pro měření v ultrafialovém světle.

Příklad 1

Při použití činidla pro stanovení aktivity kreatinkinasy podle Rosalkiho s obsahem 8 mmol/l glutathionu se inaktivuje přebytek glutathionu přidáním 0,4 mol/l N-etylmaleinimidu do konečné koncentrace 20 mmol/l. Po 1 minutě se přidá chromogen; jeho konečná koncentrace v testu je 0,8 mmol/l tetrazoliumchloridu a 0,32 mmol/l N-metylfenaziniummetylsulfátu. Vznikající zbarvení se měří při vlnové délce 500 nm.

Příklad 2

Při použití činidla pro stanovení aktivity kreatinkinasy podle Szasze s obsahem 20 mmol/l N-acetylcysteinu se inaktivuje přebytek aktivátoru přidáním 0,4 mol/l N-etylmaleinimidu do konečné koncentrace 40 mmol/l. Po 1 minutě se přidá chromogen do konečné koncentrace 1,0 mmol/l 3,3'-dianisol-4,4'-bis[2-(4-nitrofenyl)-5-fenyltetrazoliumchloridu] a 0,4 mmol/l N-metylfenaziniummetylsulfátu. Vzniklé zbarvení se měří při vlnové délce 530 nm.

Příklad 3

Po elektroforéze séra na acetátcelulóze a po inkubaci v činidle pro stanovení kreatinkinasy podle Szasze se fólie přenesou do 10 mmol/l roztoku N-etylmaleinimidu a po 1 minutě se přidá barvicí roztok s obsahem

1,0 mmol/l 3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromidu a 0,18 mmol/l N-metylfenaziniummetylsulfátu. Postup slou-

ží ke stanovení aktivity izoenzymů kreatinkinasy.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob stanovení katalytické aktivity kreatinkinasy aktivované thiolovými deriváty ve viditelné oblasti spektra, vyznačený tím, že přebytek thiolových aktivátorů, interferujících při reakci redukované formy nikotinamidadeninidinukleotidu s chromogenem se

odstraní přidáním N-etylmaleinimidu v množství 2 až 4 moly na 1 mol thiolového aktivátoru, načež se přidá chromogen a vzniklé zabarvení se měří ve viditelné oblasti spektra.