

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
13. Jg. 1975, S. 85–88

Quantitative immunologische Bestimmung der Isoenzyme der Kreatinkinase im Serum

Von *Evangelia Jockers-Wretou, K. Grabert* und *G. Pfeleiderer*

Ruhr-Universität Bochum, Abteilung Chemie, Lehrstuhl Biochemie

(Eingegangen am 1. Oktober 1974/10. Januar 1975)

In Gemischen der drei Isoenzyme der Kreatinkinase läßt sich der Aktivitätsanteil der Isoenzyme MM und BB nach ihrer selektiven Präzipitation mit isoenzymspezifischen Antikörpern aus der Restaktivität bestimmen. Die Aktivität des Hybrids MB errechnet sich aus der Differenz der Summe der beiden reinen Isoenzyme und der Gesamtaktivität. Die Methode erlaubt daher eine empfindliche und einfache Bestimmung des für Herzinfarktseren charakteristischen Hybrids auch in Seren mit niedriger Kreatinkinase-Aktivität.

Quantitative immunological determination of creatine kinase isoenzymes in serum

The concentration of each of the creatine kinase isoenzymes MM and BB is determined in mixtures of the three isoenzymes by measuring the residual activity after selective precipitation with isoenzyme specific antibodies. The difference between the total activity of the sample and the summated activities of the MM and BB isoenzymes yields the activity of the hybrid species MB. This method thus provides a simple and sensitive procedure for the quantitation of the heartinfarct specific hybrid, even in sera with low creatine kinase activity.

Die Kreatinkinase (EC 2.7.3.2) ist allgemein als das Leitenzym für die Diagnostik und Quantifizierung des akuten Herzinfarktes anerkannt (1). Jedoch kann der diagnostische Wert der Kreatinkinase-Erhöhung im Serum bei der Beurteilung eines Herzinfarktes durch unspezifische Erhöhung, z. B. nach intramuskulären Injektionen, chirurgischen Eingriffen und durch primäre Myopathien verfälscht werden. Eine Differenzierung zwischen einer Erhöhung muskulären oder myokardialen Ursprungs wird nur durch die Bestimmung der Isoenzyme der Kreatinkinase im Serum ermöglicht. Die drei Isoenzyme der Kreatinkinase (CK) bestehen aus Kombinationen von jeweils zwei Monomeren, die als M- und B-Untereinheiten bezeichnet werden. Extrakte aus humanem Herzmuskel enthalten das Isoenzym CK-MM und das Hybrid CK-MB, während Skelettmuskelextrakte nahezu nur den MM-Typ aufweisen. Das Isoenzym CK-BB ist für das ZNS und die glatte Muskulatur charakteristisch. Folglich ist das Auftreten des Hybrids CK-MB im Serum ein spezifischer Indikator für Schädigung der Herzmuskelzellen (2–8). Da der Anteil dieses Isoenzymes an der Gesamtaktivität der Serum-Kreatinkinase jedoch ziemlich gering ist, bedarf es zu seiner Bestimmung einer spezifischen und empfindlichen Methode.

In der vorliegenden Mitteilung wird eine Methode zur quantitativen Ermittlung der Aktivität der einzelnen Kreatinkinase-Isoenzyme im Serum beschrieben, die auf den verschiedenen immunologischen Eigenschaften der Isoenzyme CK-MM und CK-BB beruht. Das Prinzip des

Verfahrens besteht in der Messung der Kreatinkinase-Aktivität des Serums vor und nach Inkubation mit isoenzymspezifischen Antikörpern. Auf diese Weise wird die immunologische Spezifität mit der Empfindlichkeit der enzymatischen Analyse kombiniert.

Zur Gewinnung der Antiseren, Anti-CK-MM und Anti-CK-BB, wurden Kaninchen mit reinen Isoenzymen CK-MM und CK-BB immunisiert, die, wie an anderer Stelle berichtet¹⁾, aus humanem Skelettmuskel bzw. Gehirn isoliert wurden. Durch eine Hitzebehandlung (5 min bei 60 °C) ließ sich der Kreatinkinase-Eigengehalt der Antiseren ausschalten.

Die Isoenzyme CK-MM und CK-BB lassen sich durch das entsprechende homologe Antiserum vollständig präzipitieren. Mit dem heterologen Antiserum findet keine Reaktion statt. Das Hybrid CK-MB, isoliert aus humanem Herzmuskel, wird gleichermaßen zu 90% von beiden Antiseren sedimentiert (Abb. 1). Daher läßt sich in einem Gemisch der drei Isoenzyme der Anteil an CK-BB als Restaktivität im Überstand nach Inkubation mit Anti-CK-MM bestimmen und der Gehalt an CK-MM entsprechend nach Inkubation mit Anti-CK-BB. Durch Subtraktion der Aktivitäten beider Isoenzyme von der Gesamtaktivität vor Zugabe der Antiseren wird der Anteil von CK-MB erhalten.

¹⁾ *E. Jockers-Wretou & G. Pfeleiderer, Clin. Chim. Acta, im Druck.*

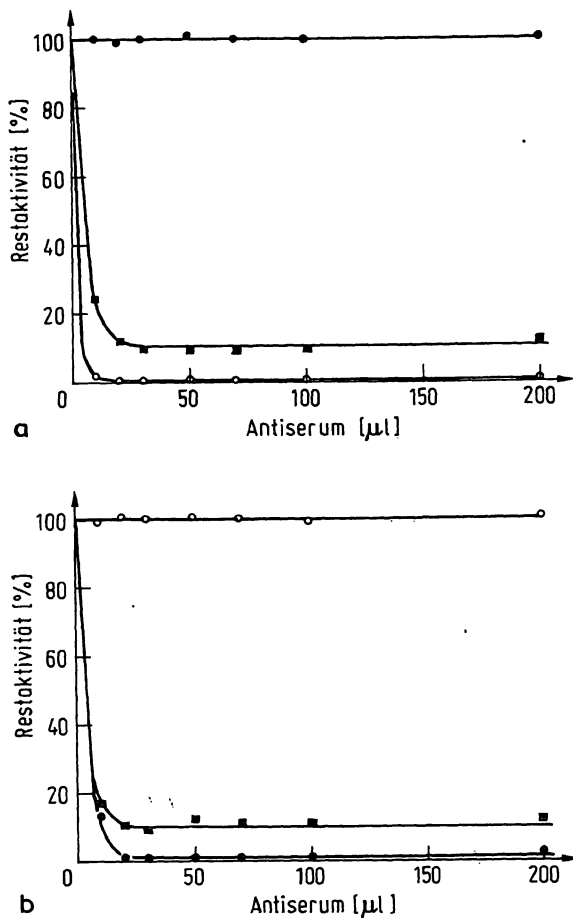


Abb. 1. Reaktion der Isoenzyme der Kreatinkinase CK-MM ○—○, CK-BB ●—● und CK-MB ■—■
 a) mit Antiserum gegen das Isoenzym MM,
 b) mit Antiserum gegen das Isoenzym BB.
 300 mU CK-MM, 100 mU CK-MB und 100 mU CK-BB wurden mit steigenden Antiserummengen inkubiert. Die Restaktivität wurde im Überstand nach Zentrifugation gemessen.

Material und Methoden

Immuntitration

Die Kreatinkinase-Isoenzymbestimmung in pathologischen Seren, die uns von der Abteilung für Innere Medizin der Krankenhäuser „Bergmannsheil“ und „Augusta“ in Bochum zur Verfügung gestellt wurden, erfolgte jeweils wenige Stunden nach der Blutentnahme, um etwaige Änderungen im Isoenzymmuster durch Aufbewahrung oder Einfrieren auszuschließen.

Zur Reaktivierung und zum Schutz der Kreatinkinase wurden die Seren mit 2-Mercaptoäthanol versetzt (Endkonzentration 0,02 mol/l) und nach 30–60 min mit dem „Monotest CPK aktiviert“ von Boehringer Mannheim in Mikroküvetten (Testvolumen 0,5 ml) getestet. Die Messungen erfolgten im Eppendorf-Photometer in einer Thermoküvette (25 °C) bei 366 nm. Die Spreizung des Schreibers betrug 0–0,25 und der Papiervorschub 1 cm/min. Aliquote Mengen des zu untersuchenden Serums wurden mit jedem der folgenden 5 Ansätze in Eppendorf-Gefäßen 30 min bei Raumtemperatur und 30 min bei 4 °C inkubiert:

1. 50 µl 0,05 mol/l Tris-HCl Puffer pH 7,2 + 0,001 mol/l EDTA,
2. 50 µl Kaninchen-Normalserum (Serum nicht immunisierter Tiere),
3. 50 µl Anti-CK-MM,
4. 50 µl Anti-CK-BB,
5. 50 µl Anti-CK-MM + Anti-CK-BB.

Anschließend wurde zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 3200, 4 min) und die Kreatinkinase-Aktivität im Überstand gemessen. Das Volumen des Serums, das bei der Inkubation eingesetzt wurde und das in den Testansatz pipettierte Volumen des Überstandes richteten sich nach der Kreatinkinase-Aktivität der Probe und können der folgenden Aufstellung entnommen werden:

Kreatinkinase-Aktivität des Serums (U/l)	Volumen des Serums im Inkubationsansatz (µl)	Volumen des Überstandes im Testansatz (µl)
100	100	80–100
100–200	50	80–40
200–400	50	40–20
400–800	50	20–10

Seren mit einer höheren Kreatinkinase-Aktivität wurden mit Tris-HCl Puffer (0,05 mol/l, pH 7,2, 0,001 mol/l EDTA und 0,02 mol/l Mercaptoäthanol) auf 400–800 U/l verdünnt.

Die Aktivität im Überstand von Ansatz 2 gilt als Bezugswert für die übrigen Ansätze. Durch Vergleich mit Ansatz 1 wird sichergestellt, daß keine unspezifische Hemmung durch Kaninchen Normalserum eintritt. Die Aktivität im Überstand von Ansatz 3 stellt den Gehalt des Serums an CK-BB dar; der Gehalt an CK-MM ergibt sich aus der Restaktivität im Überstand von Ansatz 4. Die Differenz zwischen der Gesamtaktivität des Serums (Ansatz 2) und der Summe der gemessenen Werte entspricht dem Anteil des Hybrids CK-MB. Als zusätzliche Kontrolle dient der Ansatz 5, der im Überstand keine Aktivität enthalten sollte.

Ergebnisse und Diskussion

Mit Hilfe der Immuntitration wurde die Kreatinkinase-Isoenzymverteilung in Seren von drei gesunden Probanden, in 31 Seren von Patienten mit diagnostiziertem Herzinfarkt und Seren von 5 Patienten mit stark erhöhter, jedoch nicht infarktbedingter Kreatinkinase-Aktivität quantitativ bestimmt.

In den Normalseren, ebenso wie den pathologischen Seren mit stark erhöhter Kreatinkinase-Aktivität, ließ sich ausschließlich der Muskel-Typ, CK-MM, nachweisen (Tab. 1), während alle Herzinfarktseren neben diesem Isoenzym noch das Hybrid CK-MB enthielten. Eine geringe Aktivität von 3% des Gehirmtyps CK-BB wurde in einem Herzinfarktserum mit 269 U/l Gesamtaktivität nachgewiesen. Wie der Tabelle 2 entnommen werden kann, lag der mittlere Aktivitätsanteil des Hybrids sowohl in Seren mit niedriger wie auch in Seren mit stark erhöhter Kreatinkinase-Aktivität bei 15%. Eine Relation zwischen der Gesamtaktivität des Serums und der Aktivität des Hybrids am 1. oder 2. Kliniktag wurde nicht festgestellt. 35% war der höchste Wert für CK-MB, der in einem Serum mit 82 U/l Gesamtaktivität gemessen worden ist. Mittlerer und höchster Aktivitätsanteil des Hybrids, ermittelt mit Hilfe der Immuntitration, stimmen gut überein mit den in der Literatur angegebenen Werten, die auf andere Weise bestimmt wurden (5, 7).

Da die Isoenzymverteilung der Kreatinkinase im adulten humanen Herzmuskel immunologisch zu 84% CK-MM, 15% CK-MB und 1% CK-BB bestimmt wurde¹⁾ (Mittelwerte aus 6 verschiedenen Proben), spiegeln die nach dem Herzinfarkt ins Serum ausgeschütteten relativen Aktivitäten der Isoenzyme diese Verteilung wider

Tab. 1. Quantitative Bestimmung der Aktivität der Kreatinkinase-Isoenzyme im Serum.

Nr.	Tag*	Gesamt-CK-Aktivität U/l	MM	MM	MB	MB	BB	BB
			U/l	%	U/l	%	U/l	%
Normalseren		11	11	100	—	—	—	—
		17	17	100	—	—	—	—
		30	30	100	—	—	—	—
Pathologische Seren								
Intoxikation		214	214	100	—	—	—	—
Verbrennung		8580	8580	100	—	—	—	—
Verbrennung		948	948	100	—	—	—	—
Herzstillstand		3160	3160	100	—	—	—	—
Muskeltrauma		595	595	100	—	—	—	—
Herzinfarkt								
1	1	139	118,5	85	20,5	15	—	—
2	1	40	35,2	88	4,8	12	—	—
3	1	82	53,3	65	28,7	35	—	—
	2	416	349	84	67	16	—	—
	3	382	328	86	53,5	14	—	—
4	1	314	251,2	80	62,8	20	—	—
	5	47	42,3	90	4,7	10	—	—
5	1	227	165,5	73	61,5	27	—	—
6	1	169	135,2	80	33,8	20	—	—
7	1	112	96,3	86	15,7	14	—	—
8	1	118	102,7	87	15,3	13	—	—
9	1	136	122,4	90	13,6	10	—	—
10	1	227	197,5	87	29,5	13	—	—
11	1	72	60,5	84	11,5	16	—	—
12	1	57	46,7	82	10,3	18	—	—
13	1	1060	837,4	79	222,6	21	—	—
14	4	66	62,0	94	4	6	—	—
15	2	384	314,9	82	69,1	12	—	—
	4	102	74,5	73	27,5	27	—	—
	5	36	29,9	83	6,1	17	—	—
16	1	32	28,2	88	3,8	12	—	—
17	1	223	171,3	77	51,7	23	—	—
	2	341	320,5	94	20,5	6	—	—
18	1	269	231,3	86	29,6	11	8	3
19	2	80	76,8	96	3,2	4	—	—
20	1	355	337,2	95	17,7	5	—	—
21	1	239	224,6	94	14,4	6	—	—
22	1	845	708,8	83	145,2	17	—	—
	3	340	319,6	94	20,4	6	—	—
23	1	92	80	87	12	13	—	—
24	1	405	356	88	49	12	—	—

* Angegeben wird der Tag nach der Einlieferung des Patienten, an dem Blut entnommen wurde.

Tab. 2. Quantitative Bestimmung der Aktivität der Kreatinkinase-Isoenzyme in Herzinfarktseren.

Gesamt-CK-Aktivität Bereich (U/l)	N	Mittelwert (U/l)	CK-MM (U/l)	CK-MM (%)	CK-MB (U/l)	CK-MB (%)
35–100	10	60,4	51,4	85,2	8,9	14,8
100–200	6	129	108,2	83,7	21,0	16,3
> 200	15	402,4	340,9	84,7	60,9	15,2

(Tab. 1 und 2). Dies gilt jedoch nur für die ersten Tage nach dem Infarkt, da die Aktivität des Hybrids im Serum rascher abnimmt als die Aktivität des Muskeltyps (6).

Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde durch 10-fache Analyse eines Herzinfarktserums bestimmt (Tab. 3). Da der für CK-MB berechnete Zahlenwert mit dem für CK-MM gemessenen korreliert ist (CK-BB ist,

wie Tabelle 1 zeigt, in Herzinfarktseren normalerweise nicht enthalten), bildet die Genauigkeit der Bestimmung des letzteren (3,5%) die untere Grenze für die quantitative Ermittlung des Hybridgehaltes. Der hohe Variationskoeffizient für das Hybrid, der durch den geringen Anteil an der Gesamtkaktivität und die indirekte Bestimmungsmethode bedingt ist, wird durch die Empfindlichkeit seines Nachweises mehr als ausgeglichen.

Tab. 3. Kreatinkinase-Isoenzymbestimmung in einem Herzinfarktserum (n = 10).
Alle Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

	Gesamt-CK Aktivität	CK-MM	CK-MB
Mittelwert (U/l)	404,9	356,6	48,5
Standardabweichung (U/l)	3,8	12,5	13,4
Variationskoeffizient (%)	1	3,5	27,5

Bisher wurden zur Bestimmung der Kreatinkinase-Isoenzyme im Serum, insbesondere des Herzinfarktspezifischen Hybrids CK-MB, meistens chromatographische (2) und elektrophoretische (3–8) Verfahren herangezogen. Während die Elektrophorese auf Agarose oder Polyacrylamidgel mit anschließender Tetrazoliumanfärbung der Isoenzyme (3, 4) und die von Mercer (2) entwickelte chromatographische Methode eine quantitative Bestimmung nur in Seren mit hoher Kreatinkinase-Aktivität erlauben, ist die empfindlichere Fluoreszenzmessung

(5, 6) mit einer beträchtlichen Ungenauigkeit behaftet (8). Bei der Elution der Isoenzyme nach elektrophoretischer Auftrennung (8) muß mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß die Ausbeuteverluste in den einzelnen Aktivitätsbanden unterschiedlich sind, was uns als Nachteil der sonst empfindlichen Methode erscheint.

Aus dieser ersten Anwendung an Seren erweist sich die Immuntitration als eine Methode, die auch bei niedrigen Kreatinkinase-Aktivitäten einen empfindlichen Nachweis des Herzinfarktspezifischen Hybrids CK-MB erlaubt. Neben der Spezifität und der Empfindlichkeit dürfte die einfache und schnelle Durchführung dieser Methode von weiterem Vorteil sein, so daß sie auch als Routinetest geeignet modifiziert Eingang in die klinische Diagnostik finden könnte.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. E. Böhle, Chefarzt der Abteilung für Innere Medizin des Krankenhauses „Augusta“, und Herrn Dr. H. Baumann, Leiter des klinisch-chemischen Labors der Abteilung für Innere Medizin des Krankenhauses „Bergmannsheil“, danken wir für die Überlassung der pathologischen Seren.

Literatur

1. Coodley, E. L. (1973), J. Amer. Med. Ass. 225, 597–600.
2. Mercer, D. M. (1974), Clin. Chem. 20, 36–40.
3. Konttinen, A. & Somer, H. (1972), Amer. J. Cardiol. 29, 817–820.
4. Anido, V., Conn, R. B., Mengoli, H. F. & Anido, G. (1974), Amer. J. Clin. Pathol. 61, 599–605.
5. Konttinen, A. & Somer, H. (1973), Brit. Med. J. 1, 386–389.
6. Roe, C. R., Limbird, L. E., Wagner, G. S. & Nerenberg, S. T. (1972), J. Lab. Clin. Med. 80, 577–590.
7. Wagner, G. S., Roe, C. R., Limbird, L. E., Rosati, R. A. & Wallace, A. G. (1973), Circulation 47, 263–269.
8. Roberts, R., Henry, P. D., Witteveen, S. A. G. J. & Sobel, B. E. (1974), Amer. J. Cardiol. 33, 650–654.

Prof. Dr. G. Pfeleiderer
Abteilung Chemie
Lehrstuhl Biochemie
4630 Bochum
Universitätsstraße 150