

Myoglobin-Radioimmunoassay: Erfahrungen bei der Diagnostik von Skelettmuskelerkrankungen*

Wolfgang R. Kießling und Karl W. Pflughaupt

Neurologische Universitätsklinik, D-8700 Würzburg, Bundesrepublik Deutschland

Myoglobin Radioimmunoassay: Experience of the Diagnosis of Skeletal Muscle Disorders

Summary. Serum myoglobin was measured by a sensitive radioimmunoassay in healthy controls and in patients with skeletal muscle disorders such as polymyositis and Duchenne type muscular dystrophy. The serum myoglobin levels were closely related to the serum creatine kinase (CK) activity, thus indicating that myoglobin is a useful adjunct in the assessment of muscle cell damage.

Key words: Myoglobin radioimmunoassay – Creatine kinase (CK) – Polymyositis – Duchenne type muscular dystrophy

Zusammenfassung: Die Serum-Myoglobinkonzentration wurde mit einem empfindlichen Radioimmunoassay bei gesunden Kontrollpersonen und Patienten mit Polymyositis und progressiver Muskeldystrophie vom Typ Duchenne bestimmt. Die gemessenen Konzentrationen korrelieren eng mit der Serum-Kreatin-Kinase, so daß die Myoglobinkonzentration im Serum als nützlicher Parameter bei der Beurteilung von Muskelzellenschäden herangezogen werden kann.

Schlüsselwörter: Myoglobin-Radioimmunoassay – Kreatin-Kinase (CK) – Polymyositis – Progressive Muskeldystrophie vom Typ Duchenne

Einleitung

Myoglobin (MB) ist ein sauerstoffbindendes, niedermolekulares Protein (MG etwa 18000), das in der Herz- und Skelettmuskulatur synthetisiert wird. Im frisch gewonnenen Blutserum läßt sich MB überwiegend als Oxymyoglobin nachweisen,

* Herrn Prof. Dr. H. G. Mertens zum 60. Geburtstag gewidmet

Sonderdruckanforderungen an: Dr. W. R. Kießling, Neurologische Universitätsklinik, Josef-Schneider-Straße 11, D-8700 Würzburg, Bundesrepublik Deutschland

während über längere Zeit gelagerte Serumproben hauptsächlich Methmyoglobin enthalten (Roxin et al. 1979). Das immunreaktive Verhalten dieser beiden verschiedenen Myoglobine scheint beim radioimmunologischen Nachweis im wesentlichen jedoch identisch zu sein. Entscheidende klinische Bedeutung hat die MB-Bestimmung im Serum während der letzten Jahre bei der Frühdiagnostik des Myokardinfarkts erlangt. Mehrere Untersucher konnten zeigen, daß MB beim Infarkt nicht nur früher, sondern auch rascher ansteigt als die Kreatin-Kinase (CK) (Rosano et al. 1977; Stone et al. 1977; Miyoshi et al. 1978). Da bislang über die Wertigkeit der radioimmunologischen MB-Bestimmung bei Skelettmuskelerkrankungen nur wenig Daten vorliegen (Hische und van der Helm 1979; Kießling und Beckmann 1981), haben wir seit Oktober 1979 mit einem kommerziellen Testbesteck entsprechende Erfahrungen gesammelt. In der vorliegenden Arbeit soll daher zu folgenden Punkten Stellung genommen werden: a) technische Durchführung des MB-Radioimmunoassays (MB-RIA), b) Untersuchungen zur Qualitätskontrolle, c) Etablierung eines laboreigenen Normbereichs, d) Überprüfung der Korrelation zur CK-Aktivität im Serum bei gesunden Personen und Patienten

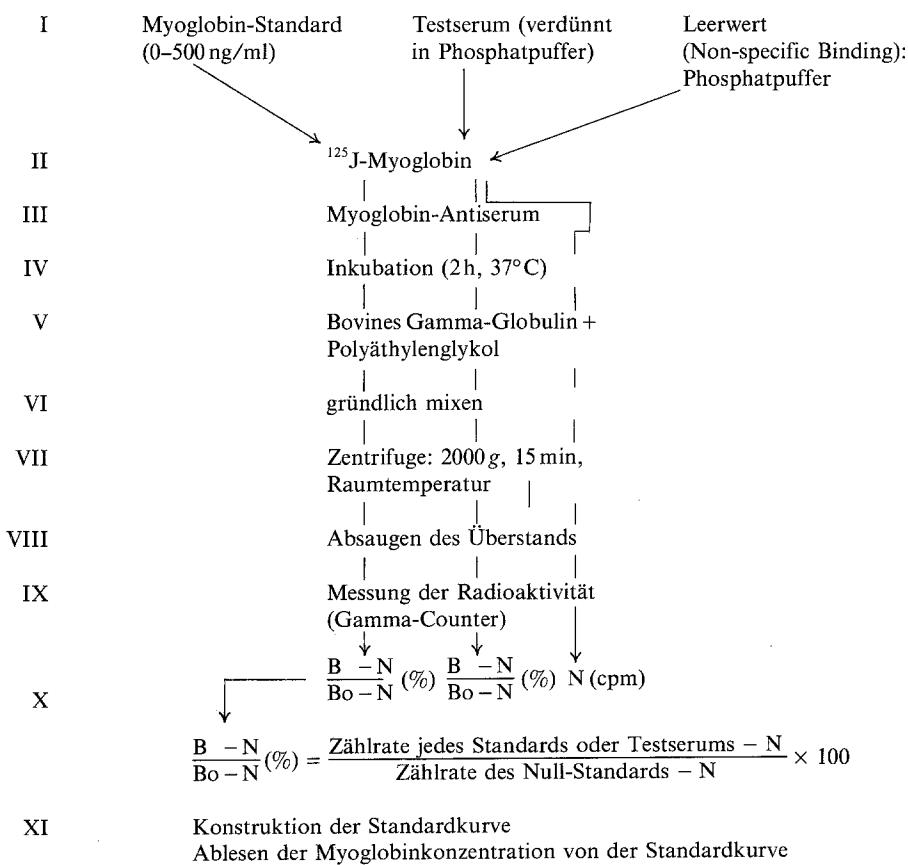


Abb. 1. Myoglobin-Radioimmunoassay: Anleitung zur Durchführung der verschiedenen Arbeitsschritte (I–XI)

mit Skelettmuskelaffektionen, e) Besonderheiten bei der Interpretation pathologischer Befunde.

Material und Methoden

Personen ohne Skelettmuskelaffektion. Insgesamt 109 gesunde Personen (62 Männer und 47 Frauen, Alter 19 bis 79 Jahre).

Patienten mit Skelettmuskelaffektion. Fünf Patienten mit Polymyositis. Die Diagnose war gesichert durch klinische Untersuchung, EMG und Muskelbiopsie (Prof. Ricker und Dr. Boxler, Neurol. Univ.-Klinik, Würzburg) sowie durch erhöhte CK-Aktivitäten. Zwanzig Patienten mit progressiver Muskeldystrophie vom Typ Duchenne. Die Seren dieser Patienten waren freundlicherweise von Herrn Prof. Beckmann, Abtlg. Pädiat. Muskelerkrankungen, Univ.-Kinderklinik, Freiburg i. Breisgau, zur Verfügung gestellt worden.

Myoglobin-Radioimmunoassay (MB-RIA). Riamat Myoglobin (Fa. Byk-Mallinckrodt, Dietzenbach, Bundesrepublik Deutschland), ein kommerzieller Kit, der auf einer Doppelantikörpermethode basiert, wobei vom Hersteller folgende Reagenzien geliefert werden: in lyophilisierter Form MB aus menschlichem Skelettmuskel (1.0 µg Human-MB-Standard, ^{125}I -Human-MB mit einer Gesamtaktivität von 1 µCi pro Kit), MB-Antiserum, Phosphatpuffer und in wässriger Lösung Polyäthylenglykol. Der Versuchsansatz erfolgt am zweckmäßigsten in 5 ml-Plastikspitzröhren (Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Bundesrepublik Deutschland).

Kreatin-Kinase-Bestimmung. Die Bestimmung der Serum-CK-Aktivität erfolgte in einem halbmechanisierten Photometersystem (Eppendorf Gerätebau Netheler und Hinz GmbH, Hamburg,

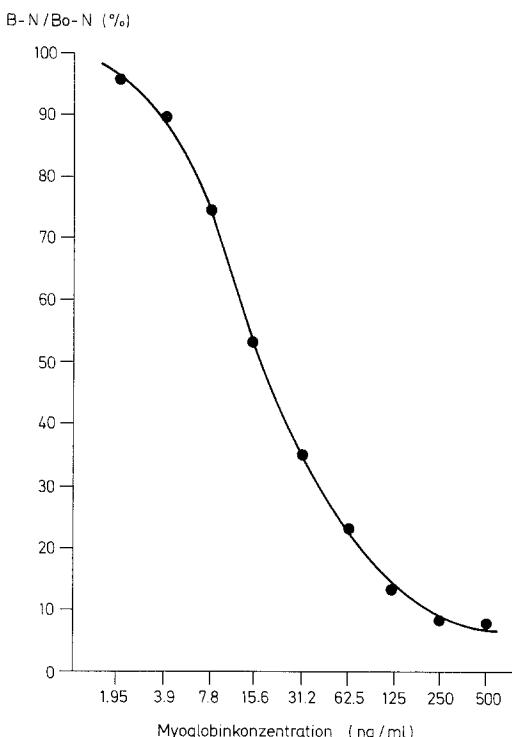


Abb. 2. Myoglobin-Radioimmunoassay: Standardkurve. Die auf der Kurve eingetragenen Punkte resultieren aus der mittleren Zählrate (cpm) von jeweils 3 Einzelbestimmungen

Bundesrepublik Deutschland) unter Verwendung von Monotest CK NAC (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Bundesrepublik Deutschland). Normbereich: 10–80 U/l (Männer), 10–70 U/l (Frauen).

Statistik. Erfasste Variablen: MB, CK, Alter und Geschlecht. Folgende Tests wurden durchgeführt: Berechnung von Mittelwert \pm Standardabweichung (SD), Prüfung auf Normverteilung, *t*-Test nach Student, Variationskoeffizient, Korrelationstests (r = Korrelationskoeffizient), Signifikanzgrenze $P < 0,05$.

Ergebnisse

In Abb. 1 sind die verschiedenen Arbeitsschritte sowie die von den Autoren gewählten Versuchsbedingungen bei der Durchführung des MB-RIA zusammengestellt. Eine repräsentative Bindungskurve (Standardkurve) ist in Abb. 2 aufgezeigt. Bei Messung hoher und niedriger Konzentrationen ($n = 20$) betrug der Variationskoeffizient für Intraassaybedingungen 3,8% und für Interassaybedingungen 5,0%. Untersuchungen zur unteren Nachweisgrenze, (Bo-3 SD)-N/Bo-N, ($n = 23$), vgl. Abb. 1, ließen eine Konzentration von 2,8 ng/ml erkennen. Die MB-Serumkonzentrationen des Normalkollektivs bewegten sich zwischen 4–60 ng/ml und wiesen neben einer Normalverteilung sowohl eine Geschlechts- als auch Altersabhängigkeit auf (Tabelle 1). Statistisch signifikant war jedoch lediglich der Geschlechtsunterschied für die jeweiligen Gesamtkollektive. Extreme Myoglobinämie bis zu 5000 ng/ml war im Falle von Polymyositiden und der progressiven Muskeldystrophie vom Typ Duchenne nachweisbar. In Abb. 3 ist die signifikante Korrelation zwischen MB und CK dargestellt ($r = 0,92$, bei nichtlogarithmischer Datenerfassung $r = 0,68$). Die zum Teil sehr hohen MB-Konzentrationen bei den genannten Skelettmuselerkrankungen erfordern höhere Verdünnungen der eingesetzten Serumproben. Diese Notwendigkeit ist eine Fehlerquelle, zumal mit zunehmender Verdünnung die genessenen Konzentrationen wieder abnehmen (Tabelle 2). Ein derartiges Verdünnungsphänomen ist bei radioimmunologischen Methoden bekannt und wird als Ausdruck eines gestörten Antigen-Antikörper-Gleichgewichts bei unterschiedlichem Antigenangebot gewertet. Aufgrund dieser Erfahrung sind die Autoren der Meinung, daß bei der Durchführung des MB-RIA

Alter (Jahre)	Serum-Myoglobin (ng/ml)	
	Mittelwert \pm SD	
	Männer	Frauen
≤ 30	$28,9 \pm 13,0$ ($n = 21$)	$17,1 \pm 8,5$ ($n = 16$)
≤ 60	$31,3 \pm 12,9$ ($n = 20$)	$23,9 \pm 19,3$ ($n = 19$)
< 90	$33,5 \pm 13,5$ ($n = 21$)	$28,9 \pm 16,7$ ($n = 12$)
$\leq 30 - < 90$	$31,2 \pm 12,0$ ($n = 62$)	$22,8 \pm 12,1^{**}$ ($n = 47$)

Tabelle 1. Geschlechts- und Altersabhängigkeit der Myoglobinkonzentration bei 109 gesunden Kontrollpersonen

** $P < 0,01$

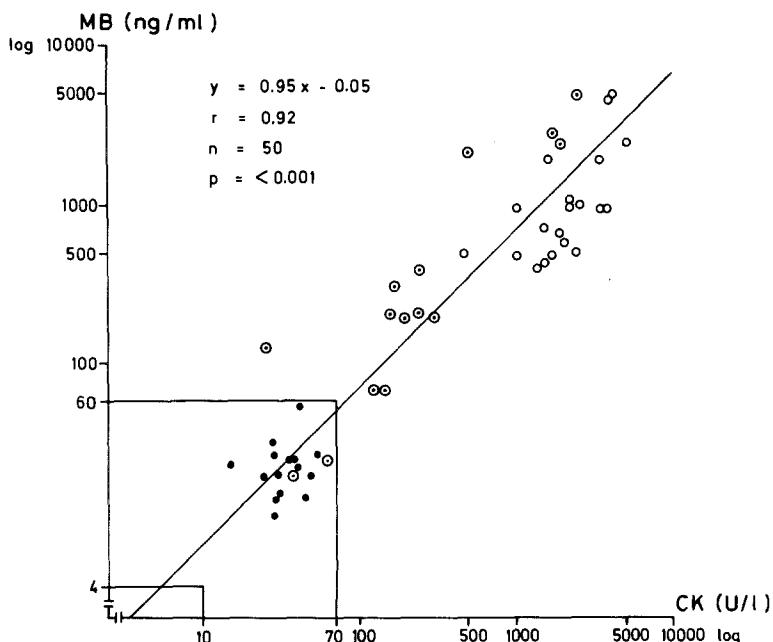


Abb. 3. Korrelation der Serumkonzentrationen von Myoglobin (Normbereich 4–60 ng/ml) und CK (Normbereich 10–70 U/l) bei einem Kollektiv von gesunden Kontrollpersonen ●, Patienten mit progressiver Muskeldystrophie vom Typ Duchenne ○ und Patienten im Verlaufe einer Myositis ◎

Tabelle 2. Einfluß der Serumverdünnung auf die gemessene Myoglobinkonzentration

Verdünnung	Normalserum	Serum bei Myositis
1:2	30 ng/ml	900 ng/ml
1:4	30 ng/ml	1120 ng/ml
1:8	28 ng/ml	1200 ng/ml
1:16	—	950 ng/ml
1:32	—	890 ng/ml
1:64	—	800 ng/ml
1:128	—	750 ng/ml

Seren in einer Verdünnung zwischen 1:4 und 1:8 eingesetzt werden sollten. Als Verdünnungsmedium wird Phosphatpuffer verwendet (vgl. Abb. 1).

Diskussion

Die bisherigen Untersuchungen bei einem käuflichen MB-RIA-Kit zeigen, daß der MB-Nachweis auch bei der Diagnostik von Skelettmuselerkrankungen als wertvoller Parameter angesehen werden kann. Es wurde gefunden, daß vor allem

bei entzündlichen Muskelerkrankungen und bei der progressiven Muskeldystrophie vom Typ Duchenne hohe MB-Konzentrationen gemessen werden, die in Einzelfällen vergleichsweise sogar höher lagen als die Serum-CK-Aktivitäten. Berücksichtigt man die Serumverdünnung als mögliche Fehlerquelle, so läßt sich feststellen, daß mit dem angebotenen Testbesteck eine empfindliche und zuverlässig reproduzierbare laborchemische Methode zur Verfügung steht, die zur Beurteilung eines Muskelzellschadens eingesetzt werden kann. Zum jetzigen Zeitpunkt bleibt noch abzuwarten, ob die MB-Bestimmung bei der Erfassung subklinischer Myopathien und bei der Frühdiagnostik erblicher Muskelerkrankungen eine weitere nützliche Indikation darstellt und der alleinigen CK-Bestimmung eventuell überlegen ist.

Danksagung. Herrn Dr. Kellermann, Fa. Byk-Mallinckrodt, danken wir für die freundliche Bereitstellung der Myoglobin-RIA-Kits. Frau Dr. Haubitz, Rechenzentrum der Universität Würzburg, sind wir für die statistische Beratung zu Dank verpflichtet.

Literatur

- Hische EAH, van der Helm JH (1979) The significance of serum myoglobin in neuromuscular diseases. *J Neurol Sci* 43:243-251
- Kießling WR, Beckmann R (1981) Serum levels of myoglobin and creatine kinase in Duchenne muscular dystrophy. *Klin Wochenschr* (im Druck)
- Roxin LE, Venge P, Friman G, Hällgren R (1979) Radioimmunoassays of human myoglobin in serum and urine. *Scand J Clin Lab Invest* 39:37-46
- Miyoshi K, Saito S, Kawai H, Kondo A, Iwas M, Hayashi T, Yagita M (1978) Radioimmunoassay for human myoglobin. *J Lab Clin Med* 92:341-352
- Rosano TG, Sanders LA, Johnson ES, Kenny MA, Clayson KJ, Strandjord PE (1977) Myoglobin concentrations and muscle enzyme activities in serum after myocardial infarction and cardiac arrhythmia. *Clin Chem* 23:868-870
- Stone MJ, Waterman MR, Harimoto D, Murray G, Wilson N, Platt MR, Blomquist G, Willerson JT (1977) Serum myoglobin level as a diagnostic test in patients with acute myocardial infarction. *Br Heart J* 39:375-380

Eingegangen am 30. Januar 1981