

~~P0000272~~
700 02003 Jan az adatközpont 2002/07/22.

01000

ELJÁRÁS ÉS REAGENS-KÉSZLET 5'-NUKLEOTIDÁZ AKTIVITÁS MEGHATÁROZÁSÁRA

Dr. BERTHA András, ~~0315 Gyenesdiás, Kossuth L. u. 13.~~

Dr. TULOK István, ~~2013 Pomáz, Dézsa György u. 23/b.~~

A bejelentés napja: 2000. május 24.

K i v o n a t

A találmány tárgya eljárás 5'-nukleotidáz aktivitás meghatározására, amelynek során a biológiai mintát önmagában ismert módon és körülmények között nukleotid pentóz-monofoszfáttal mint szubsztrátummal inkubálják, a felszabadult anorganikus foszfátot ammónium-molibdáttal és redukálószerrel kezelve színes komplexszé alakítják, a színintenzitást ismert módon mérik, és a mért értékből ismert számítással és/vagy kalibrációs görbe segítségével kiszámítják az 5'-nukleotidáz aktivitást vagy az időegység alatt felszabadult anorganikus foszfát mennyiségét, mint az 5'-nukleotidáz aktivitással arányos adatot. A találmány értelmében nukleotid pentóz-monofoszfátként 5'-AMP-t, 5'-CMP-t, 5'-UMP-t, 5'-GMP-t, 5'-IMP-t és 5'-TMP-t használnak, és a mérést mind a hat felsorolt szubsztrátumon elvégzik.

A találmány tárgyát képezi a fenti eljárás végrehajtására alkalmas reagens-készlet is. A találmány tárgya továbbá a fenti eljárás és reagens-készlet felhasználása rosszindulatú folyamatok diagnosztizálására és/vagy terápia nyomonkövetésére.


Jelölés az a g

Képviselő: Dr.Jalsovszky Györgyné ügyvéd

21326/00

Társképviselő: Dr.Tóth-Urbán László ügyvéd

704/4

ELJÁRÁS ÉS REAGENS-KÉSZLET 5'-NUKLEOTIDÁZ AKTIVITÁS MEGHATÁROZÁSÁRA

Dr.BERTHA András, 8315 Gyenesdiás, Kossuth L. u. 13.,

Dr.TULOK István, 2013 Pomáz, Dózsa György u. 23/b.

A feltalálók azonosak a bejelentőkkel.

A bejelentés napja: 2000. május 24.

A találmány tárgya eljárás 5'-nukleotidáz (5'-ribonukleotid-foszfohidroláz) aktivitás meghatározására testnedvekben, szövetpreparátumokban és/vagy sejtalkotó elemekben. A találmány továbbá a meghatározáshoz felhasználható reagens-készletre vonatkozik.

A rosszindulatú folyamatokhoz is kapcsolódó, azokkal együttjáró és azokat fenntartó anyagcserefolyamat-zavarok közül kiemelkednek a nukleotid metabolizmusban kialakult változások. Ez a magyarázata annak, hogy a daganatterápiás beavatkozások egyik fő célja a DNS/RNS szintézis és e folyamatokhoz szervesen

kapcsolódó nukleinsav-nukleotid metabolizmus befolyásolása.

A nukleinsav-nukleotid anyagcserefolyamatok vizsgálatának kiemelt jelentősége van a daganatos folyamatok felderítésében és a jó- és rosszindulatú folyamatok egymástól való megkülönböztetésében. A nukleinsav-anyagcserefolyamatok változásainak vizsgálata a daganatterápia nyomonkövetése szempontjából is mellőzhetetlen, mert a kemoterápiás kezelések döntő többségének terápiás hatása a nukleinsav-nukleotid anyagcsere mesterségesen előidézett zavaraiiban és a DNS-szintézis mesterséges károsításában nyilvánul meg. E mesterségesen előidézett változások meghatározó tényezői a daganatterápia eredményességének, de ugyanakkor az egészséges sejteket alapvetően érintő károsodásokért, sejt- és szervfunkció-zavarokért is felelősek.

A nukleinsav-nukleotid anyagcserefolyamatok változásainak vizsgálatára rutin körülmények között az egyik legalkalmasabb módszer a Reis [Reis, J.: Über die spezifische Phosphatase der Nervengewebe; Enzymologia 2, 110-115 (1937)] által felfedezett 5'-nukleotidáz (5'-ribonukleotid-foszfohidroláz) enzim aktivitásának meghatározása. Ez az enzim kizárólag a nukleotid pentóz-monofoszfátok (5'-AMP, 5'-CMP, 5'-UMP, 5'-GMP, 5'-IMP, 5'-TMP, dAMP, dCMP, dUMP stb.) hidrolízisét katalizálja nukleozidok és anorganikus foszfát keletkezése közben [Bodansky, O., Schwartz, M.K.: 5'-Nucleotidase; Adv. Clin. Chem. 11, 277-327 (1968)]; és az egyik legérzékenyebb plazmamembrán markernek tekinthető. Az 5'-nukleotidáz aktivitás meghatározását klinikai célokra és experimentális vizsgálatokban egyaránt alkalmazzák; a mérést az előbbi esetben rendszerint hemolízismentes szérumban és/vagy hemolizátumban, az utóbbi esetben testnedvekben, szövetpreparátumokban (például plazmamembránokban) és/vagy

sejtalkotó elemekben (például mikroszómákban, citoplazmákban, lizoszómákban) végzik [Solyom, A., Trans, E.G.: Enzyme Markers in Characterization of Isolated Plasma Membranes; Enzyme 13, 329-372 (1972)].

Minthogy az 5'-nukleotidáz a nukleotid pentóz-monofoszfátokat specifikusan hasító enzim, az 5'-nukleotidáz-aktivitás meghatározásának egyik igen széles körben használt módja az, hogy a biológiai mintát egy nukleotid pentóz-monofoszfát szubsztrátummal inkubálják, majd megfelelő színeképző reagens hozzáadása után kolorimetriásan (spektrofotometriásan) mérik az enzim hatására időegység alatt felszabadult anorganikus foszfát mennyiségét. Ha a vizsgálandó biológiai minta olyan komponenseket is tartalmaz, amelyek interferálnak az 5'-nukleotidáz enzimmel (vér vagy szérum esetén ilyen az alkalikus foszfatáz, lizoszóma membrán esetén az egyéb cukorfoszfátok), az inkubálást ezek gátlására alkalmas inhibítorok jelenlétében végzik. Színeképző reagensként ammónium-molibdátot használnak redukálószer (rendszerint ón(II)-klorid és adott esetben hidrazinsó vagy aszkorbinsav) jelenlétében, ami az anorganikus foszfáttal intenzív kék színű komplex képződése közben reagál. Minthogy az ammónium-molibdát a biológiai mintákban lévő fehérjéket kicsapja, a színreakció keltése előtt a fehérjéket eltávolítják, vagy megfelelő szolubilizálószer hozzáadásával gondoskodnak a fehérjék oldatban tartásáról. Az utóbbi a jelenlegi ismereteink szerint az egyik legkorszerűbb kolorimetriás módszer. Alkalmazásával a mérés mintaigénye századmilliliterre is csökkenthető, és a meghatározás pontossága jelentősen fokozható. Az 5'-nukleotidáz aktivitás fenti elven alapuló mérését részletesen ismertetik többek között a következő közlemények, és az azokban talál-

ható egyéb hivatkozások: J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 7, 18-25 (1969), 13, 453-459 (1975), 15, 715-718 (1977), 18, 781-788 (1980); Clin. Chem. 23, 2311-2323 (1977), 27, 464-465 (1981); Adv. Clin. Chem. 11, 277-332 (1968).

Az 5'-nukleotidáz aktivitás fenti elven alapuló, diagnosztikai vagy általános experimentális mérésére eddig alkalmazott rutin módszerek közös jellemzője, hogy mindig csak egyetlen szubsztrátumon mérték az enzimaktivitást. Szubsztrátumként leggyakrabban adenzin-5'-monofoszfátot (5'-AMP), ritkábban citidin-5'-monofoszfátot (5'-CMP) vagy inozit-5'-monofoszfátot, vagy hemolizátumban uridin-5-monofoszfátot (5'-UMP) használtak.

A rosszindulatú folyamatok kimutatására és a daganatterápia hatásosságának nyomonkövetésére irányuló vizsgálataink során azonos biológiai minta 5'-nukleotidáz aktivitását hat különböző szubsztrátummal - éspedig adenzin-5'-monofoszfáttal (5'-AMP), citidin-5'-monofoszfáttal (5'-CMP), uridin-5'-monofoszfáttal (5'-UMP), guanozin-5'-monofoszfáttal (5'-GMP), inozin-5'-monofoszfáttal (5'-IMP) és timidin-5'-monofoszfáttal (5'-TMP) - mértük párhuzamosan. A biológiai minták nemspecifikus foszfátáz aktivitását β -glicerofoszfát szubsztrátummal határoztuk meg, amit korrekcióba vettünk. Megállapítottuk, hogy egészséges egyéneknél az egyes nukleotid pentóz monofoszfát szubsztrátumokhoz tartozó 5'-nukleotidáz aktivitás értékek mennyiségileg ugyan eltérnek egymástól, de az egyes szubsztrátumokhoz tartozó aktivitás-értékek között szoros korreláció áll fenn. Ez azzal magyarázható, hogy fiziológiás körülmények között a szérumban mint közös metabolikus poolban a nukleinsav-nukleotid anyagcserefolyamatok dinamikus egyensúlyi állapota tükröződik. Felismertük, hogy egészséges és beteg egyének szé-

rumában a fenti hat szubsztrátummal mért 5'-nukleotidáz aktivitás értékek különbözőségei nem az egyes szubsztrátumok kémiai tulajdonságaira vezethetők vissza, hanem élettani folyamatok hatására alakulnak így. Meglepő módon azt tapasztaltuk azonban, hogy különböző kemoterápiás kezelés hatására ez a szoros korreláció megváltozik, és jelentős eltérések lépnek fel annak alapján, hogy a terápia a purin-metabolizmusban, a pirimidin-metabolizmusban vagy a timidin-metabolizmusban fejtette-e ki hatását. A felsorolt hat szubsztrátumon párhuzamosan végzett aktivitásmérések eredményei alapján tehát eldönthetővé válik, hogy az alkalmazott terápia hatásos-e, a befolyásolni kívánt helyen fejti-e ki hatását, és nem indukál-e nemkívánatos sejtkárosodásokat. Ez a felismerés képezi a találmány alapját.

Felismertük azt is, hogy a kemoterápiás kezelést követő rövid idő (24 óra) elteltével már igen jól érzékelhető az 5'-nukleotidáz aktivitás változása mind a hat különböző szubsztrátumnál, így a terápia fenntartásáról, módosításáról vagy megszüntetéséről hamarabb és egyértelműbben lehet megalapozott döntést hozni. Összehasonlításként megjegyezzük, hogy a tumor-markerek legtöbbjénél csak kb. 1 hetes kezelés után lehet döntést megalapozó mértékű változást észlelni.

Felismertük továbbá, hogy ha az 5'-nukleotidáz aktivitást a fenti hat szubsztrátummal párhuzamosan mérjük, és az eredményeket összesítjük, sokkal megalapozottabb diagnózis állítható fel a vizsgált személyek állapotáról, a máj- és csontfolyamatok előfordulásáról, mint ha a mérést csak egy szubsztrátummal hajtánánk végre. Ez a rosszindulatú folyamatok korai felismeréséhez nyújthat értékes segítséget.

Végül felismertük, hogy a biokémiai folyamatok következményes kapcsolatait alapján a fenti hat szubsztrátummal történő 5'-nukleotidáz aktivitás meghatározás helyettesítheti az experimentális és klinikai gyakorlatban ritkábban alkalmazott, módszerünkénél jóval bonyolultabb, és rutinszerűen nehezen vagy nem alkalmazható enzimaktivitás-meghatározásokat. Ezek a helyettesítési vagy pótlási lehetőségek például a következők: 5'-CMP nukleotidáz $\rightarrow$ citidin-kináz $\rightarrow$ citidin-dezamináz $\rightarrow$ citidin-trifoszfát-szintetáz; 5'-GMP nukleotidáz $\rightarrow$ guanozin-dezamináz; 5'-IMP nukleotidáz $\rightarrow$ IMP dehidrogenáz; 5'-TMP nukleotidáz $\rightarrow$ timidin-kináz $\leftrightarrow$ timidin-szintetáz.

Az egyik szempont szerint tehát a találmány tárgya eljárás 5'-nukleotidáz aktivitás meghatározására, amelynek során a biológiai mintát önmagában ismert módon és körülmények között nukleotid pentóz-monofoszfáttal mint szubsztrátummal inkubáljuk, a felszabadult anorganikus foszfátot ammónium-molibdáttal és redukálószerrel kezelve színes komplexszé alakítjuk, a színintenzitást ismert módon mérjük, és a mért értékből ismert számítás-sal és/vagy kalibrációs görbe segítségével kiszámítjuk az 5'-nukleotidáz aktivitást vagy az időegység alatt felszabadult anorganikus foszfát mennyiségét, mint az 5'-nukleotidáz aktivitással arányos adatot. A találmány értelmében nukleotid pentóz-monofoszfátként 5'-AMP-t, 5'-CMP-t, 5'-UMP-t, 5'-GMP-t, 5'-IMP-t és 5'-TMP-t használunk, és a mérést mind a hat felsorolt szubsztrátumon elvégezzük.

A mérésekhez szükséges reagensekről, a reakciókörülményekről és a számítás módjáról a szakirodalomban - köztük a fent már idézett közleményekben - részletes útmutatás található. Az

alábbiakban példaként ismertetjük egy igen előnyösnek talált, fehérjementesítés nélküli méréshez használható reagens-rendszer összetételét, és az azzal szérummintában végzendő mérés és számítás menetét, anélkül, hogy a találmány szerinti eljárás alkalmazhatóságát a most ismertetendő reagens-rendszerre és körülményekre korlátoznánk.

A felhasználandó reagensek a következők:

(1) *Puffer/aktivátor oldat:*

75-400 mmól/l TRIS, 5,0-10,0 mmól/l $MgCl_2$ vagy 2,0-5,0 mmól/l $MnCl_2$, 1,0-5,0 mmól/l KCl; az oldat pH-ja 3-6 N vizes sósavoldattal 9-9,5-re állítva.

(2) *Inhibítor:*

Inhibítor használatára csak akkor van szükség, ha a biológiai minta az 5'-nukleotidáz aktivitás meghatározásával interferáló anyagot tartalmaz. Vér és szérum esetén ilyen anyag az alkalikus foszfatáz, amelynek inhíbeálására 10-20 g/l L-ciszteint vagy L-glicint vagy ennek megfelelő L-cisztein- vagy L-glicinsót, vagy 50-250 mg/l Concavalin A-t használunk a fenti pufferoldatban oldva. Lizoszóma membránokon végzett mérésekhez a cukorfoszfátok inhíbeálására L(+)-tartarátot használunk a fenti pufferoldattal készített 5-50 mmol/l koncentrációjú oldatban.

(3) *Szubsztrátumok:*

Szubsztrátumokként 5'-AMP-t, 5'-CMP-t, 5'-UMP-t, 5'-GMP-t, 5'-IMP-t és 5'-TMP-t használunk ionmentes vízzel készített 1-10 mmól/l koncentrációjú oldatként. Szükséges még szubsztrátként β -glicerofoszfátot vagy dinátrium-fenil-foszfátot is használni ugyanilyen koncentrációjú oldatban. Az utóbbi két szubsztrátum a nemspecifikus foszfatáz aktivitás meghatározásának két ismert szubsztrátuma; az 5'-nukleotidáz aktivitás mértékének pontos

meghatározásához a vizsgálatok során a nemspecifikus foszfatáz aktivitás mértéke is meghatározandó.

(4) *Fehérjeoldó reagens:*

Tiszta (tömény) hangyasav vagy propionsav; analitikailag legtisztább (alt) minőségű.

(5) *Stabilizáló reagens:*

1:9 és 4:6 közötti térfogatarányú glicerín/víz elegy, vagy 0,5-5 tömeg %-os vizes szorbit oldat, vagy 0,25-2,5 tömeg %-os vizes mannit oldat, vagy 1:2 és 1:1 közötti térfogatarányú n-propanol/víz elegy.

Célszerű a stabilizáló reagensben kevés (0,001-0,01 tömeg %) nátrium-azidot is oldani az eltarthatóság növelésére.

(6) *Színreagens:*

Ammónium-molibdát ionmentes vízzel készített 5-10 g/l koncentrációjú oldata.

(7) *Redukciós oldat:*

SnCl_2 1,0 N vizes sósavoldattal készített, 1-5 g/l koncentrációjú oldata, vagy aszkorbinsav ionmentes vízzel készített, 1-5 g/l koncentrációjú oldata.

(8) *Foszfor standard oldat:*

1,61 mmol/l koncentrációjú anorganikus foszfát oldat, amiből hígítási sort készítünk.

A mérés menete a következő:

Munkareagenst készítünk az anorganikus foszfát meghatározásához úgy, hogy a fehérjeoldó reagenst

- (4:1)-(1:1) térfogatarányban a vizes glicerín-oldattal,
- (3:1)-(1:1) térfogatarányban a vizes szorbit-oldattal,
- (5:1)-(1:2) térfogatarányban a vizes mannit-oldattal, vagy
- (7:1)-(4:1) térfogatarányban a vizes n-propanol-oldattal

keverjük össze, és a kapott keverékhez a végső keverék osztótér-fogatára vonatkoztatva 15-25 térfogat % színreagenst adunk.

Az 1. táblázat első öt sorában felsorolt komponenseket az ott megadott arányokban összekeverjük egymással, és a kapott elegyet 60 percig 37°C-on inkubáljuk. Ezután az elegyhez hozzáadjuk az 1. táblázatban felsorolt további komponenseket, a kapott elegyet összekeverjük, 15 percig állni hagyjuk, és mérjük az oldat abszorbanciáját 620-720 nm között. Az 1. táblázatban 5'-ND+ALP-vel jelölt oszlop olyan mérésre vonatkozik, ahol az 5'-nukleotidáz aktivitást az alkalikus foszfatáz aktivitással együtt mérjük (azaz nem használunk inhibítort), míg az 5'-ND jelölés az alkalikus foszfatáz-inhibitor jelenlétében végzett mérésre vonatkozik. Mindkét mérés eredményében a nonspecifikus foszfatáz aktivitás is jelentkezik. A nonspecifikus foszfatáz aktivitás külön meghatározását inhibitor jelenlétében végezzük el β -glicerofoszfát szubsztrátummal; az így kapott értéket az előzőekből kivonva kapjuk az 5'-nukleotidáz + alkalikus foszfatáz, illetve az 5'-nukleotidáz aktivitást.

A számítás menete a következő:

(a) ΔE értékek (extinkciókülönbségek) számítása:

β -glicerofoszfát: $E_{\text{minta}} - E_{\text{vak}} = \Delta E_{\beta \text{ glicerofoszfát}}$

más szubsztrátok: $E_{\text{minta}} - E_{\text{minta vak}} =$

$= \Delta E_{5'-\text{AMP}, 5'-\text{CMP}, 5'-\text{UMP}, 5'-\text{GMP}, 5'-\text{IMP}, 5'-\text{TMP}}$

standard: $E_{\text{standard}} - E_{\text{reagens vak}} = \Delta E_{\text{standard}}$

(b) Enzimaktivitások számítása a fenti ΔE értékek alapján:

$$\text{Aktivitás, U/l minta} = \frac{\text{Minta } \Delta E}{\text{Standard } \Delta E} \times \text{Standard konc.} \times K$$

ahol Standard konc. a standard koncentrációja,

K a következő képletből számított konstans:

$$\frac{\text{inkubált össztérfogat, ml} \times 1000}{\text{inkubálási idő, perc} \times \text{mintatérfogat, ml} \times \text{küvetta vastagsága}}$$

(c) Az egyedi enzim-aktivitások, ill. az összaktivitások számítása a fenti aktivitási adatokból:

$$\text{Nemspecifikus foszfatáz aktivitás} = \beta\text{-glicerofoszfáttal mért aktivitás}$$

$$\text{Különböző nukleotid-pentóz-monofoszfátokkal mért 5'-nukleotidáz aktivitások} = 5'\text{-ND aktivitás} - \text{nemspecifikus foszfatáz aktivitás}$$

$$5'\text{-nukleotidáz} + \text{alkalikus foszfatáz aktivitás} = 5'\text{-ND+ALP} - \text{nemspecifikus foszfatáz aktivitás}$$

$$\text{Alkalikus foszfatáz aktivitás} = 5'\text{-ND+ALP} - 5'\text{-ND} - \text{nemspecifikus foszfatáz aktivitás}$$

Szérumtól eltérő biológiai mintán ugyanígy végezzük el a mérést, azzal a különbséggel, hogy inhibitorra esetenként nincs szükség, vagy más inhibítort használunk. A számítás menete is azonos a fentiekkel.

1. táblázat

Oldat	5'-ND+ALP	5'-ND	Minta vak	Standard	Reagens vak
Puffer/aktivátor	0,125 ml	0,125 ml	0,125 ml	-	-
Ionmentes víz	0,075 ml	0,050 ml	0,075 ml	-	-
Inhibitor	-	0,025 ml	-	-	-
Minta (szérum)	0,025 ml	0,025 ml	-	-	-
Szubsztrátum	0,025 ml	0,025 ml	-	-	-

Munkareagens	0,750 ml	0,750 ml	0,750 ml	0,750 ml	0,750 ml
Ionmentes víz	-	-	-	0,125 ml	0,250 ml
Minta (szérum)	-	-	0,025 ml	-	-
Szubsztrátum	-	-	0,025 ml	-	-
Standard	-	-	-	0,125 ml	-
Redukciós oldat	0,125 ml	0,125 ml	0,125 ml	0,125 ml	0,125 ml

- 11 -

2008

A fenti méréssorozattal minden egyes szubsztrátummal külön-külön kapott 5'-nukleotidáz aktivitás-értékekből a következő biológiai következtetések vonhatók le:

Állapot eldöntése: A hat mért aktivitási érték összegzésével kapott szám 54-65 U/l-ig betegségmentes állapotot jelent, ha az alkalikus foszfátáz aktivitás értéke ugyanakkor 10-25 U/l. Amennyiben az alkalikus foszfátáz aktivitás értéke 50 U/l fölött van, és az 5'-nukleotidáz aktivitás értékek összege 54-65 U/l, akkor malignus csontfolyamatok gyanúja vetődik fel. Ha az 5'-nukleotidáz aktivitások összege 70 U/l-nél nagyobb, ez biztosan beteg állapotot jelent. Ha ugyanakkor az alkalikus foszfátáz aktivitás 35 u/l-nél nagyobb, úgy biztosan májkárosodással kell számolni. Rosszindulatú májdaganatok esetén mind az 5'-nukleotidáz aktivitás értékek összegzésével kapott szám, mind az alkalikus foszfátáz aktivitás értéke a normál értékek négy-tízszere.

Terápia értékelése: Az 5'-AMP, 5'-GMP és 5'-IMP szubsztrátumokkal mért aktivitás változása azt jelzi, hogy a daganatterápia a purin-metabolizmusba avatkozott be; az 5'-CMP, 5'-UMP és 5'-TMP szubsztrátummal mért aktivitás változása a pirimidin-metabolizmusba való beavatkozást jelez. Változásmentes értékek a terápia értéktelenségét jelzik. Az aktivitáscsökkenés minden esetben azt jelzi, hogy a terápia kedvezően avatkozott a folyamatokba. Számos esetben előfordul, hogy az alkalmazott kemoterápiás kezelés során olyan nagymértékű az 5'-nukleotidáz aktivitások csökkenése, hogy mind az egyes szubsztrátumoknál külön-külön mért aktivitás, mind pedig azok összege 10 U/l-nél kisebb, sőt esetenként az 5'-nukleotidáz aktivitásokra negatív

számokat kapunk. Ez annak a következménye, hogy a terápia a nukleotid anyagcserét támadja, de nem befolyásolja a nonspecifikus foszfatáz értékeket; negatív aktivitási adathoz akkor jutunk, ha kisebb 5'-ND értékekből kell kivonni a nagyobb nonspecifikus foszfatáz aktivitás értékét. Az egészséges kontrollok-nál mért értékekhez képest alacsonyabb 5'-nukleotidáz aktivitás értékek már a gyors nukleotid metabolizmusú egészséges sejtek (elsősorban bélnyálkahártya, csontvelő, eritrociták) citotoxikus károsodását jelzik, különösen akkor, ha ez a változás mind a hat szubsztrátummal mért 5'-nukleotidáz aktivitásban bekövetkezik. Ilyenkor a terápia módosítására vagy befejezésére lehet szükség.

Egy további szempont szerint a találmány tárgya a fent ismertetett eljárás felhasználása rosszindulatú folyamat fennállásának diagnosztizálására és/vagy rosszindulatú folyamat kezelésére használt terápia eredményeinek nyomonkövetésére.

A találmány továbbá a találmány szerinti eljáráshoz felhasználható vegyszerkészletre vonatkozik, amit az jellemez, hogy az 5'-nukleotidáz aktivitás anorganikus foszfát képzésén, a képződött foszfát színes komplexszé alakításán és a színintenzitás fotometriás mérésén alapuló méréséhez felhasználható vegyszerkészlet szokásos komponensei mellett szubsztrátumként 5'-AMP-t, 5'-CMP-t, 5'-UMP-t, 5'-GMP-t, 5'-IMP-t és 5'-TMP-t tartalmaz.

A vegyszerkészlet szokásos komponensei az ismert módszerekhez felhasznált - például a korábbiakban idézett közleményekben ismertetett - komponensek lehetnek. Egy előnyös vegyszerkészlet a következő szokásos komponenseket tartalmazhatja:

- puffer,

- fehérjeoldó reagens,
- stabilizáló reagens,
- színreagens,
- redukálószer,
- foszfor standard;

továbbá adott esetben

- inhibitor és/vagy
- nukleotid-pentóz-monofoszfáttól eltérő szubsztrátum

(például β -glicerofoszfát).

A felsorolt szokásos komponensek előnyös képviselői a találmány szerinti eljárás példaszerű ismertetésénél megadottak. A vegyszerkészlet a szokásos komponenseket akár a fent megadott koncentrációjú oldatok, akár azoknál töményebb, utólag hígítandó oldatok, akár tiszta vegyszerek formájában tartalmazhatja.

A következőkben példaként szérummintákon a találmány szerinti eljárással végzett 5'-nukleotidáz-aktivitásmérések eredményeit ismertetjük, az azokból levonható következtetésekkel együtt. A méréseket minden esetben az 1. táblázatban megadott anyagmennyiségekkel végeztük, az ott megadott körülmények között. A felhasznált egyedi reagensek pontos összetétele a következő volt:

(1) *Puffer/aktivátor oldat*: 75,0 mmol/l TRIS.HCl, 5,0 mmol/l $MgCl_2$, 5,0 mmol/l KCl; pH: 9,3.

(2) *Inhibitor*: 0,29 g L-cisztein.HCl 20,0 ml puffer/aktivátor oldatban oldva.

(3) *Szubsztrátumok*: 5'-AMP, 5'-CMP, 5'-UMP, 5'-GMP, 5'-IMP, 5'-TMP és β -glicerofoszfát ionmentes vízzel készített, 8,0 mmol/l koncentrációjú oldatai.



(4) *Fehérjeoldó reagens*: Alt. minőségű tömény hangyasav.

(5) *Stabilizáló reagens*: 300 ml alt. glicerín + 700 ml ionmentes víz + 0,05 g NaN_3 .

(6) *Színreagens*: ammónium-molibdát ionmentes vízzel készített, 8,0 g/l koncentrációjú oldata.

(7) *Redukciós oldat*: 0,20 g SnCl_2 100 ml 1,0 N vizes sósav-oldatban oldva.

(8) *Foszfor standard oldat*: "Dyalab" típusú, 1,61 mmol/l koncentrációjú anorganikus foszfát oldat (további ezerszeres hígításra)

Munkareagens: 200 ml (4) komponens 200 ml (5) komponenssel és 100 ml (6) komponenssel elegyítve.

A méréseket a következő esetekben végeztük el:

- Egészséges egyéneken és klinikailag diagnosztizált, kezelés előtt álló daganatos betegeken. Az eredményeket a 2. táblázat tartalmazza.
- Emlődaganatos betegek műtét utáni ciklofoszfamid - metotrexát
- 5-fluor-uracil (CMF) terápiájának nyomonkövetésére. Az eredményeket a 4. és 5. táblázat tartalmazza.
- Osteosarcomás betegek metotrexát (fólsav-antagonista hatóanyag) terápiájának nyomonkövetésére. Az eredményeket a 7. táblázat tartalmazza.

A 2. és minden további táblázatban az egyszerűség érdekében csak a szubsztrátum jelét tüntetjük fel, ez azonban mindig az adott szubsztrátummal mért 5'-nukleotidáz aktivitást jelenti.

2. táblázat

Vizsgált csoportok	Enzimaktivitás, U/l $\pm$ standard deviáció							Alk.foszf.
	5'-AMP	5'-CMP	5'-UMP	5'-GMP	5'-IMP	5'-TMP	Σ 5'-ND	
Egészséges kontroll n=157	6,5 +1,2 _	10,1 +2,2 _	8,4 +1,6 _	4,1 +1,1 _	3,3 +0,9 _	8,5 +1,6 _	40,9 +1,43 _	13,2 +4,4 _
Emlő karcinóma n=341	23,45 +4,1 _	50,92 +9,8 _	34,8 +4,7 _	13,76 +4,3 _	10,6 +3,3 _	27,87 +5,8 _	161,4 +5,33 _	45,7 +7,8 _
Petefészek karcinóma n=189	47,56 +7,8 _	95,87 +9,1 _	67,1 +6,9 _	33,2 +4,4 _	13,7 +3,5 _	30,4 +6,1 _	287,8 +6,3 _	65,5 +11,2 _
Pajzsmirigy karcinóma n=76	34,66 +7,2 _	70,3 +9,7 _	45,4 +5,9 _	22,3 +4,4 _	17,8 +5,2 _	45,1 +9,5 _	235,56 +6,98 _	57,6 +12,3 _
non-Hodgkin lymphoma n=45	23,5 +5,6 _	46,8 +8,4 _	34,5 +5,1 _	11,6 +6,3 _	9,11 +2,2 _	18,6 +3,2 _	144,11 +5,13 _	23,4 +4,4 _
Hodgkin-kór n=36	34,6 +3,9 _	80,6 +12,7 _	57,5 +7,4 _	21,2 +5,2 _	10,7 +1,9 _	15,5 +3,2 _	220,1 +5,71 _	43,3 +6,2 _
Melanoma malignans n=1567	10,8 +2,3 _	23,7 +3,8 _	15,8 +2,9 _	5,7 +0,89 _	8,8 +1,5 _	23,2 +4,3 _	88,01 +2,61 _	41,3 +6,8 _
Tüdő daganat n=76	67,7 +13,4 _	123,4 +19,4 _	78,3 +13,5 _	34 +5,9 _	23 +3,9 _	34 +4,5 _	360,4 +10,15 _	62,2 +11,2 _
Lymphoma + csont manifest. n=23	9,2 +2,3 _	10,8 +1,7 _	8,2 +1,1 _	5,4 +0,9 _	3,3 +0,2 _	9,8 +1,8 _	45,8 +1,33 _	167,6 +23 _
Lymphoma + máj manifestáció n=76	89,7 +19 _	189,7 +23 _	102,6 +31 _	45,8 +12 _	34,9 +8,9 _	34,6 +4,6 _	497,3 +16,41 _	56,7 +11,2 _

A 2. táblázat adataiból megállapítható, hogy a vizsgált malignómákban a hat szubsztrátummal mért 5'-nukleotidáz aktivitás értékek a lymphoma + csont manifesztáció kivételével jelentős mértékben megemelkedtek az egészséges kontroll értékekhez viszonyítva. Az 5'-nukleotidáz aktivitás értékek összege ($\Sigma 5'$ -ND) tüdődagában és máj manifesztációval szövődött lymphomában mutatja a legkifejezettebb emelkedést. Az alkalikus foszfátáz aktivitás emelkedése az 5'-nukleotidáz aktivitás változásához viszonyítva csont manifesztációval szövődött lymphomában a legkifejezettebb.

A vizsgált malignómákban szenvedő, kezelés előtt álló betegek és az egészséges kontrollok esetén az egyes szubsztrátumokhoz tartozó 5'-nukleotidáz aktivitás értékek, valamint az 5'-AMP szubsztrátummal mért aktivitás érték és a nonspecifikus foszfátáz aktivitást jelző β -glicerofoszfáttal mért aktivitás között szoros korreláció tapasztalható, amit a 3. táblázat adatai igazolnak.

3. táblázat

Korrelációs párok	Korreláció
5'-AMP 5'-CMP	0,9943
5'-AMP 5'-UMP	0,9728
5'-AMP 5'-GMP	0,9234
5'-AMP 5'-IMP	0,9656
5'-AMP 5'-TMP	0,9878
5'-CMP 5'-UMP	0,9456
5'-CMP 5'-GMP	0,9678
5'-CMP 5'-IMP	0,9489
5'-CMP 5'-TMP	0,8978
5'-UMP 5'-GMP	0,8989
5'-UMP 5'-IMP	0,9323
5'-UMP 5'-TMP	0,9562
5'-GMP 5'-IMP	0,8978
5'-GMP 5'-TMP	0,9545
5'-AMP- β -glicerofoszfát	0,8978

Az emlőtumorral műtött, majd kemoterápiásan kezelt betegek terápiájának nyomonkövetésére alkalmazott mérések eredményeit a 4. és 5. táblázatban közöljük. A 4. táblázatban a sikeres, az 5. táblázatban a CMF-terápiára rezisztens esetek adatait foglaltuk össze. Az 5. táblázatban a terápiaváltás utáni adatokat is megadtuk. A terápiaváltás során a betegeket Cis-platin kezelésnek vetettük alá, majd az első kezelés után 1 nappal, illetve a kúra befejezése után 1 nappal mértük az 5'-nukleotidáz aktivitásokat. Minden más esetben a méréseket 24 órával a kemoterápia után végeztük. Összehasonlításként az egészséges kontrollokon mért értékeket is megadjuk.

4. táblázat

	5'-nukleotidáz aktivitás, U/l standard dev.						
	5'-AMP	5'-CMP	5'-UMP	5'-GMP	5'-IMP	5'-TMP	Σ5'-ND
Egészséges kontroll	6,5 ±1,2	10,1 ±2,2	8,4 ±1,6	4,1 ±1,1	3,3 ±0,9	8,5 ±1,6	40,9 ±1,43
Beteg, CMF előtt	29,4 ±3,7	34,7 ±7,8	11,8 ±3,4	7,9 ±1,8	7,6 ±1,1	19,8 ±3,7	112,2 ±3,5
1 széria CMF után	11,6 ±2,1	3,4 ±0,9	4,6 ±1,2	2,3 ±0,8	3,2 ±0,9	4,5 ±1,4	29,6 ±1,2
3 széria CMF után	3,4 ±1,1	2,3 ±0,9	2,1 ±0,9	-2,4 ±0,1	-2,8 ±0,8	1,1 ±0,03	1,28 ±0,63
6 széria CMF után	0,7 ±0,04	-1,7 ±0,3	2,2 ±0,7	-3,3 ±0,8	1,1 ±0,1	-3,4 ±0,7	-4,4 ±0,44

Az adatokból a következő következtetések vonhatók le:
Már az első széria CMF kezelés után jelentős mértékben csökkent az 5'-CMP, 5'-GMP, 5'-IMP és 5'-TMP szubsztrátumokkal mért 5'-nukleotidáz aktivitás. A harmadik széria CMF kezelés után az 5'-AMP, 5'-GMP és 5'-IMP szubsztrátumokkal mért 5'-nukleotidáz aktivitás csökkent különösen nagy mértékben. A hatodik széria

CMF kezelés után az 5'-AMP, 5'-CMP, 5'-GMP, 5'-IMP szubsztrátumokkal mért 5'-nukleotidáz aktivitásban észleltünk jelentős mértékű csökkenést. Gyógyszerkombináció esetén a különböző támadáspontok miatt nehéz behatárolni a támadáspontra gyakorolt hatást. Ezen esetekben a kezelés előtti állapothoz való viszonyítás az útmutató. A mérési adatok azt igazolják, hogy az alkalmazott gyógyszerkombináció két fázisban fejti ki a terápiás hatást, a purin és pirimidin anyagcsere-folyamatokra gyakorolt következmények révén.

5. táblázat

	5'-nukleotidáz aktivitás, U/l standard dev.						
	5'-AMP	5'-CMP	5'-UMP	5'-GMP	5'-IMP	5'-TMP	Σ5'-ND
Egészséges kontroll	6,5 +1,2	10,1 +2,2	8,4 +1,6	4,1 +1,1	3,3 +0,9	8,5 +1,6	40,9 +1,43
Beteg, CMF előtt	39,6 +8,6	72,4 +11,3	45,8 +10,9	23,7 +7,8	18,9 +3,5	24,7 +6,2	225,11 +8,05
1 széria CMF után	26,7 +5,3	68,9 +10,2	40,2 +9,9	19,8 +6,9	16,4 +4,6	21,1 +5,2	193,1 +7,01
Cis-platin után (*)	20,3 +3,4	43,2 +8,1	26,5 +5,7	4,2 +1,1	2,3 +0,9	8,9 +1,8	115,4 +3,5
Cis-platin után (**)	4,1 +1,3	3,6 +0,9	4,4 +1,5	-1,6 +0,8	1,1 +0,6	1,2 +0,3	12,8 +1,2

Hatástalan CMF kezelés után az egyes szubsztrátumokkal mért 5'-nukleotidáz aktivitások nem mutattak szignifikáns csökkenést, ezért a kezelés Cis-platin alkalmazásával folytatódott. A vizsgálatok eredményei alapján megállapítottuk, hogy a Cis-platin kezelés első fázisában (a kezelést követő 24. órában; a táblázatban *-gal jelölve) már szignifikánsan csökkentek az egyes szubsztrátumokhoz tartozó 5'-nukleotidáz aktivitás értékek, mely csökkenés elsősorban a purin metabolizmusban résztve-

vő szubsztrátumokon mutatkozott meg. A Cis-platin kezelés befejezését követő első napon mért értékek (a táblázatban ** -gal jelölve) igazolták, hogy a purin metabolizmus változását időrendben a pirimidin metabolizmus változása követi, azzal a megjegyzéssel, hogy a két anyagcsere-folyamat változása összeadódik. A CMF terápia hatástalanságát vizsgálataink már a diagnosztikai értékű (egyébként szintén hatástalanságot jelző) tumormarker (CA 15-3) mérés előtt 5 nappal jelezték, így a betegeket meg lehetett kímélni 5 napi felesleges CMF kezeléstől.

A terápia eredményességét és hatását az is jelzi, hogy a különböző szubsztrátumok felhasználásával mért 5'-nukleotidáz értékek közötti kezdeti szoros korreláció megváltozik. Az eredményes terápia után számított korreláció-értékeket a 6. táblázatban közöljük; összehasonlításként a terápia előtti értékeket is megadjuk.

6. táblázat

Korrelációs párok	Korreláció	
	Kemoterápia előtt	Kemoterápia után
5'-AMP 5'-CMP	0,9856	0,6767
5'-AMP 5'-UMP	0,8997	0,4561
5'-AMP 5'-GMP	0,7845	0,3267
5'-AMP 5'-IMP	0,8967	0,4519
5'-AMP 5'-TMP	0,7897	0,4687
5'-CMP 5'-UMP	0,9879	0,5639
5'-CMP 5'-GMP	0,7868	0,2345
5'-CMP 5'-IMP	0,8887	0,2689
5'-CMP 5'-TMP	0,6767	0,1123
5'-UMP 5'-GMP	0,8978	0,3493
5'-UMP 5'-IMP	0,8889	0,0567
5'-UMP 5'-TMP	0,8992	0,3635
5'-GMP 5'-IMP	0,9981	0,4684
5'-GMP 5'-TMP	0,9767	0,4781
5'-IMP-5'-TMP	0,8898	0,4356

A 6. táblázat adatai igazolják, hogy a különböző szubsztrátumoknál mért 5'-nukleotidáz aktivitások közötti kezdeti szoros korreláció megszűnt, ami azt is igazolja, hogy a különböző szubsztrátumokkal végzett mérések lehetőséget nyújtanak a terápia során végbemenő egyedi biológiai folyamatok külön-külön kiutatására és értékelésére.

Pótolhatatlanul hasznos információt nyújt az 5'-nukleotidáz aktivitás meghatározása a fent említett 6 szubsztrátummal olyan esetekben is, amikor a kemoterápiás kezelés közvetlenül nem befolyásolja a nukleotid anyagcserét. Erre jó példa az osteosarcomás betegek metotrexát-kezelése. A metotrexát folsav-antagonista hatású anyag, nincs közvetlen hatása a nukleotid metabolizmusra, ezért minden olyan változás a nukleotid anyagcserében, amely a metotrexát kezelés hatására alakul ki, a de novo nukleotid szintézist, azaz az egészséges sejtek károsodását jelzi. A kezelés hatására esetlegesen kialakuló károsodások tartósan súlyos következményekkel járnak; ilyen lehet például a celluláris és humorális immunitás gyengülése, mely indukálhatja egy második daganat kialakulását is.

A 12,0 g dózisú metotrexáttal kezelt osteosarcomás betegeken mért 5'-nukleotidáz aktivitás változásokat a 7. táblázatban foglaljuk össze.

7. táblázat

Idő	5'-nukleotidáz aktivitás, U/l					
	Pirimidin metabolizmus			Purin metabolizmus		
	5'-AMP	5'-CMP	5'-UMP	5'-GMP	5'-IMP	5'-TMP
0 perc	-8,39	5,33	5,05	3,34	3,77	1,56
15 perc	-3,12	2,21	0,14	0,57	-0,2	-6,75
30 perc	-11,87	-2,19	1,92	-2,19	2,98	-6,89
1 óra	-5,05	2,41	1,2	-2,1	1,34	-1,01
2 óra	-4,84	5,97	2,77	2,84	-3,49	-2,49
3 óra	-0,5	8,6	4,05	7,61	5,68	2,41
4 óra	-3,63	6,76	4,19	0,92	-0,28	-3,98
6 óra	-10,32	-1,63	-1,85	-5,48	-2,7	-3,7
12 óra	-1,71	-0,15	1,48	1,98	3,69	-4,49
21 óra	-2,56	6,04	5,83	-0,99	0,35	-4,84
44 óra	31,38	4,69	7,89	1,99	-12,95	-9,46
69 óra	7,96	18,42	14,93	13,16	13,01	8,6
90 óra	6,83	13,09	15,16	3,49	10,1	3,63
162 óra	-12,6	6,97	29,53	-6,33	-1,99	-1,35
186 óra	1,41	7,53	12,16	14,94	6,54	0,35
210 óra	5,76	4,48	7,39	3,91	-3,91	0,92
234 óra	8,61	3,48	10,88	8,68	5,47	6,11
258 óra	3,99	2,42	2,64	0,22	0,43	-5,82
330 óra	9,25	7,47	2,99	8,46	10,53	-2,7
358 óra	9,67	5,47	4,9	5,97	-2,28	2,56
402 óra	5,18	8,03	9,59	8,24	6,04	5,4

A pirimidin és purin metabolizmus változásainak vizsgálatára alkalmazott hat szubsztrátummal elvégzett 5'-nukleotidáz aktivitás meghatározásának eredményei azt igazolják, hogy a kezelés hatása első periódusban a pirimidin metabolizmust érinti. A különbség a két metabolikus út között különösen a kezelést követő 44. órában rendkívül kifejezett. A 7. táblázat adatai mutatják, hogy az egyes szubsztrátumok esetén (egy metabolikus úton belül is) jelentős eltérések tapasztalhatók. Ennek egyértelmű magyarázata az egyes szubsztrátumok biokémiai funkcióinak eltérése. A terápiát a találmány szerinti módon nyomonkövetve lehetőség nyílik arra, hogy a terápiát leállítsuk vagy megváltoztassuk, még mielőtt a felfedezett zavarok késői következményként súlyosabb változásokhoz vezetnének.

Noha a korábbiakban a találmány szerinti eljárás és reagens-készlet diagnosztikai célú felhasználását ismertettük, a találmány nem korlátozódik ezekre a felhasználásokra. Az eljárás és reagens-készlet kutatási célokra is kiválóan használható például egyes rosszindulatú folyamatok mechanizmusának felderítéséhez, ismert vagy új rákellenes szerek teszteléséhez és hatásmechanizmusuk vizsgálatához.

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás 5'-nukleotidáz aktivitás meghatározására biológiai mintában, amelynek során a biológiai mintát önmagában ismert módon és körülmények között nukleotid pentóz-monofoszfáttal mint szubsztrátummal inkubáljuk, a felszabadult anorganikus foszfátot ammónium-molibdáttal és redukálószerrel kezelve színes komplexszé alakítjuk, a színintenzitást ismert módon mérjük, és a mért értékből ismert számítással és/vagy kalibrációs görbe segítségével kiszámítjuk az 5'-nukleotidáz aktivitást vagy az időegység alatt felszabadult anorganikus foszfát mennyiségét, mint az 5'-nukleotidáz aktivitással arányos adatot, azzal jellemezve, hogy nukleotid pentóz-monofoszfátként 5'-AMP-t, 5'-CMP-t, 5'-UMP-t, 5'-GMP-t, 5'-IMP-t és 5'-TMP-t használunk, és a mérést mind a hat felsorolt szubsztrátumon elvégezzük.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a biológiai mintát pufferolt közegben, adott esetben inhibitor jelenlétében inkubáljuk a szubsztrátummal, majd az inkubált elegyhez az ammónium-molibdáton és a redukálószeren kívül fehérjeoldó reagenst és stabilizáló reagenst is adunk.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a nukleotid pentóz-monofoszfát szubsztrátumokat 1-10 mmól/l koncentrációjú vizes oldatok formájában használjuk.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy biológiai mintaként teljes vért, vérserumot vagy hemolizátumot használunk, és a szubsztrátummal való inkubálást alkalikus foszfatáz-inhibitor jelenlétében és távollétében egyaránt elvégezzük.

5. Reagens-készlet az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás elvégzéséhez, azzal jellemezve, hogy az 5'-nukleotidáz aktivitás anorganikus foszfát képzésén, a képződött foszfát színes komplexszé alakításán és a színintenzitás mérésén alapuló méréséhez használható reagens-készlet szokásos komponensei mellett szubsztrátumként 5'-AMP-t, 5'-CMP-t, 5'-UMP-t, 5'-GMP-t, 5'-IMP-t és 5'-TMP-t tartalmaz.

6. Az 5. igénypont szerinti reagens-készlet, azzal jellemezve, hogy szokásos komponensekként puffert, fehérjeoldó reagenst, stabilizáló reagenst, színreagenst, foszfor standardot, továbbá adott esetben inhibítort és/vagy nukleotid-pentóz-mono-foszfáttól eltérő szubsztrátumot tartalmaz.

7. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás vagy az 5. vagy 6. igénypont szerinti reagens-készlet felhasználása rosszindulatú folyamat fennállásának diagnosztizálására és/vagy rosszindulatú folyamat kezelésére használt terápia eredményeinek nyomonkövetésére.

A bejelentő helyett

a meghatalmazott:

2740 = 27 oldal



2002.06.07.

Dr. Jalscsovsky Györgyné

1093 Budapest, Kármán u. 24.
Tel.: 218-4148 Fax: 218-4508