



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

236530

(11)

(B1)

(22) Přihlášeno 06 09 83
(21) (PV 6473-83)

(40) Zveřejněno 18 06 84

(45) Vydáno 15 11 86

(51) Int. Cl.³

G 01 N 23/06

(75)

Autor vynálezu

DOBIÁŠOVÁ MILADA RNDr. CSc., SCHÜTZOVÁ MARIE, PRAHA

(54) Způsob stanovení aktivity enzymu lecitincholesterolacyltransferázy

Řešení se týká způsobu stanovení aktivity enzymu lecitin cholesterol acyltransferázy.

Filtrační papír s výhodou tvaru disku o průměru 6 až 9 mm se napustí dávkou 2 až 8 μ l roztoku radioaktivního cholesterolu o koncentraci 0,1 až 2 μ mol/ml a radioaktivitě 0,36 až 3,6 MBq/ml. Vysušený filtrační papír se vloží do tmavě zbarvených zkumavek, do kterých se napi-
petuje 150 až 300 μ l zkoušené tělní tekutiny obsahující lipoproteiny například krevní plasmy, krevního sera, lymfy nebo folikulární tekutiny. Nechá se v chladu při teplotě 2 až 8 °C po dobu 12 až 24 hodin a poté se vyjme filtrační papír a odebere se 20 až 50 μ l takto označené tělní tekutiny k extrakci a chromatografické a radiometrické analýze podílu volného a esterifikovaného cholesterolu před a po inkubaci.

K roztoku radioaktivního cholesterolu, kterým se napustí filtrační papír, lze přidat antioxidant. Vynález lze využít pro diagnostiku poruch lipidního metabolismu.

Vynález se týká způsobu stanovení aktivity lecitincholesterolacyltransferázy.

Lecitincholesterolacyltransferáza, dále jen LCATX je enzym lipidního metabolismu, který zprostředkuje v krevní plasmě i jiných tělních tekutinách esterifikaci volného cholesterolu přenosem vyšší mastné kyseliny z lecitinu za vzniku cholesteryl esterů a lysolecitinů viz Glomset J. A., Biochim. Biophys. Acta 1962, 65, 128-135. Aktivita LCAT je měřítkem rychlosti přenosu cholesterolu mezi krevní plasmou a tkáněmi v organismu a podle nejnovějších výzkumů je dynamickým indikátorem poruch lipidního metabolismu zejména u pacientů ohrožených kardiovaskulárním onemocněním viz Dobiášová M., 1983, Advances in Lipid Research, Vol. 20, Academic Press, New York.

Až dosud jsou však metody stanovení aktivity LCAT nejednotné, mezi různými laboratorními špatně srovnatelné a pro svoji nákladnost a pracnost jen omezeně využitelné v klinické praxi.

Existují tři typy metod na stanovení aktivity LCAT. První z nich je založena na měření aktivity LCAT jednotlivého vzorku na jednotném substrátu, který se připravuje tepelnou inaktivací krevní plasmy nebo sera (které se spojují z více dárců) s následujícím značením radioaktivním volným cholesterolem, který se do enzymaticky inaktivního sera popřípadě plasmy přidává v emulsi s albuminem. Takto připravený tzv. společný substrát se smísí s enzymaticky aktivním vzorkem, inkubuje a po chromatografickém rozdělení a změření radioaktivity se stanoví podíl esterifikovaného cholesterolu, který je produktem reakce viz Glomset J. A. a Wright J. L., 1964, Biochim. Biophys. Acta, 89, 266-276. Nedostatkem této metody je nehomogenní rozdělení radioaktivního cholesterolu v tepelně inaktivovaném či částečně denaturovaném substrátu, rychle klesající stabilita takto připraveného substrátu a závislosti kvality substrátu na individuálních dárcích. Modifikací tohoto typu metody je příprava společného radioaktivního substrátu z apoproteinu AI, liposomů radioaktivního cholesterolu s lecitemem a albuminu viz Pownall H. J., Van Winkle W. B., Pao Q., Rohde M. a Gotto A. M. Jr. 1982, Biochim. Biophys. Acta 713, 494-503. Tento umělý substrát je neúměrně nákladný, dostupný jen laboratorním, které připravují apoprotein AI a kromě toho i při nízkých teplotách, -20 °C klesá jeho stabilita.

Další typ metod dle Stokke K. T. a Norum K. R., 1971, Scand. J. clin. Lab. Invest. 27, 21-27 je založen na stanovení aktivity LCAT v plasmě nebo seru, které slouží současně jako substrát. Při této metodě se dočasně inhibuje LCAT 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou kyselinou, pak se plasma označí radioaktivním cholesterolem aplikovaným v emulsi s albuminem. Po určité době inkubace za tepla se enzym reaktivuje přidáním merkaptoetanolu a po reaktivaci se serum opět inkubuje při 37 °C a potom běžným způsobem stanoví podíl nově vzniklého cholesteryl esteru. Nevýhodou této metody je, že vedle problematického zavádění radioaktivního cholesterolu v emulsi se přidává ještě chemický inhibitor a reaktivátor, které mohou být zdrojem chyb, tak i rozdílu v aktivitě LCAT mezi nativním a chemicky ovlivněným systémem.

Třetím typem metod je stanovení úbytku volného cholesterolu v plasmě po inkubaci nativní plasmy nebo sera buď plynovou chromatografií viz Marcel Y. a Vezinová C. 1973, Biochim. Biophys. Acta 306, 497-504 nebo nezrytmickým stanovením koncentrace volného cholesterolu viz Nagasaki T. a Akanuma Y., 1977, Clin. Chim. Acta 75, 371-375; Dieplinger H. a Kostner C., 1980, Clin. Chim. Acta 106, 319-324. Oba tyto způsoby stanovení úbytku volného cholesterolu, který v LCAT reakci činí pouze 1 až 4 %, v časovém úseku, kdy reakce probíhá lineárně, jsou jako všechna nepřímá měření, zatížena vysokou metodickou chybou.

Předmětem vynálezu je způsob stanovení aktivity enzymu lecitincholesterolacyltransferázy, jehož podstatou je, že filtrační papír s výhodou tvaru disku o průměru 6 až 9 mm se napustí dávkou 2 až 8 μ l, roztoku radioaktivního cholesterolu o koncentraci 0,1 až 2 μ mol/ml a radioaktivitě 0,36 až 3,6 MBq/ml, načež po vysušení se filtrační papír vloží do tmavě zbarvených zkumavek s rovným dnem o obsahu 2 až 5 ml a do těchto zkumavek se napipetuje 150 až 300 μ l tělní tekutiny obsahující lipoproteiny s výhodou krevní plasmy, krevního sera, lymfy, folikulární tekutiny a nechá se v chladu při teplotě 2 až 8 °C po dobu 12 až 24 hodin a poté se vyjme filtrační papír a odebere se 20 až 50 μ l takto označené tělní tekutiny k extrakci a chromatografické a radiometrické analýze podílu volného a esterifikovaného cholesterolu před a po inkubaci.

Způsobem dle vynálezu se dosáhne homogenního značení lipoproteinů substrátu např. krevní plasmy, sera a jiných tekutin, obsahujících lipoproteiny, radioaktivním cholesterolem značeným radionuklidy ^{14}C nebo ^3H za chladu. Značení se provádí interakcí jemně dispergovaného radioaktivního cholesterolu na filtračním papíru, případně stabilizovaného meso-2,3-bis (3,4-dihydroxy benzyl)-butanem, s tekutinami obsahujícími lipoproteiny po dobu 12 až 24 hod při teplotách nepřevyšujících 8 °C.

Výhodou uvedeného způsobu značení substrátu je, že je vyloučen negativní vliv chemických látek a denaturace teplem na reaktivitu substrátu. Ve srovnání s metodami měření úbytku volného cholesterolu je tímto způsobem zajištěna vysoká citlivost a reprodukovatelnost stanovení. Hodnota korelačního koeficientu pro paralelní měření 62 vzorků LCAT aktivitě je $r = 0,973$. Další výhodou je ekonomická úspora při nižší spotřebě radioaktivní sloučeniny, která je asi 5 až 10x nižší, časová úspora při stanoveních a možnost okamžitého použití pro stanovení LCAT aktivity jednotlivých vzorků i celých serií.

Metoda měření aktivity LCAT uvedeným způsobem je rychlá, vysoce citlivá, reprodukovatelná a vzhledem k standardnosti přípravy radioaktivního substrátu srovnatelná mezi laboratorii a pro svoji jednoduchost použitelná k zjišťování poruch metabolismu cholesterolu v běžné klinické praxi.

Zařízení k provedení způsobu podle vynálezu, sestává z nádoby s víkem a vyjímatelnou vložkou s otvory, ve kterých jsou uloženy tmavě zbarvené uzátkované zkumavky s rovným dnem. Do zkumavek je vložen disk filtračního papíru napuštěný radioaktivním cholesterolem.

Uvedené zařízení se dá s výhodou použít zejména pro seriové stanovení. Vyjímatelná vložka s otvory, ve kterých jsou uloženy naplněné tmavě zbarvené uzátkované zkumavky s rovným dnem, se může libovolně přemisťovat při všech popisovaných operacích stanovení enzymu včetně skladování vzorků v chladu.

Vynález je možno využít jednak v experimentálních studiích a dále na klinických pracovištích, která se zabývají diagnostikou poruch lipidního metabolismu.

P ř í k l a d 1

Na disky filtračního papíru pro analytické účely, o průměru 7 až 9 mm upevněné horizontálně, se nanese přesným dávkovačem 5 μ l roztoku ^{14}C -4-cholesterolu v benzenu o koncentraci 0,33 μ mol/ml a radioaktivitě 0,7 MBq/ml. Po vysušení v proudu dusíku se přenesou disky na dno tmavých 4 ml skleněných zkumavek s rovným dnem, které se uzavřou a skladují v chladničce při 4 °C. Vlastní stanovení aktivity LCAT se provádí tak, že se do těchto zkumavek za chlazení ledem napipetuje 200 μ l krevního sera, které je už od odběru přechováváno v chladu. Zkumavky se uzavřou a ponechají v chladničce 20 hodin při 4 °C. Po této době, kdy dojde k rovnoměrnému značení lipoproteinů sera radioaktivním cholesterolem, se vyjme pinzetou papírový disk, odebere se 30 μ l sera pro stanovení aktivity LCAT v čase 0 a uzavřená zkumavka se zbytkem tekutiny se přenesou do Dubnoffova inkubátoru k inkubaci při 37 °C po dobu 30 min, kdy probíhá reakce lineární.

Potom se odebere 30 μ l vzorek. Vzorky odebírané před a po inkubaci se okamžitě pipetují do 1 ml ethanolu a promíchají na laboratorní míchačce. Promíchání se opakuje ještě 2x po 30 min, sediment se centrifuguje při 2 až 3 000 otáčkách za min po dobu 5 minut a supernatant se přelije do čistých zkumavek a odpaří k suchu proudem vzduchu při teplotě kolem 50 °C. Odparek se rozpustí několika kapkami chloroform-metanolu v poměru 2:1 a kvantitativně, opakovaným vymytím rozpustidlem, přenesou na silikagelovou desku. Vyvíjí se v soustavě hexan-diethyletheroctan ethylnatý v poměru 50:50:1,5 obj.

R_F cholesterylesteru jako produktu LCAT reakce je v tomto uspořádání rovno 1, R_F volného cholesterolu = 0,31. Po vysušení desky se cholesterylestery a cholesterol detekují buď autoradiografií, při expozici 2 až 4 dny, s jodovými parami, nebo pouze jodovými parami, přičemž vystoupí hnědé zbarvení cholesterylesterů a velmi světlé zbarvení volného cholesterolu. Plochy odpovídající cholesterolu a cholesterylesterům se vystříhají a přenesou do lahvíček pro kapalně scintilační měření. Přidá se po 5 ml scintilátoru XPPO-2,5-difenyloxazol 4 g/l, POPOP-1,4-di-2-/5-fenyloxazolyl/-benzen 200 mg/l v toluenu a ponechá v temnu přes noc. Vzorky se měří na přístroji pro beta- kapalnou scintilaci. Po změření se vyjádří procento cholesterylesterů, které po přepočtu na dobu inkubace dává hodnotu frakční esterifikační rychlosti v % hod^{-1} a po vynásobení koncentrací volného cholesterolu v plasmě molární esterifikační rychlost vyjádřenou jako $\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{hod}^{-1}$.

P ř í k l a d 2

Postupuje se stejně jako v příkladu 1, ale s tím rozdílem, že papírové disky se před nanášením radioaktivního cholesterolu impregnují ponořením do ethanolického roztoku antioxidantu např. meso-2,3bis/3,4dihydroxybenzyl/-butanu o koncentraci 2 $\mu\text{mol/ml}$ a rozpustidlo se odpaří.

P ř í k l a d 3

Pro seriové stanovení se vyjme z nádoby vložka se sadou skleněných tmavě zbarvených zkumavek s rovným dnem, obsahující filtrační disky radioaktivního cholesterolu. Vložka se umístí do nádoby s ledovou vodou a dále se použije jako universální stojánek pro celou sadu při všech následujících operacích, jak uvedeno v předchozích příkladech.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob stanovení aktivity enzymu lecitincholesterolacyltransferázy, vyznačený tím, že filtrační papír například tvaru disku o průměru 6 až 9 mm se napustí dávkou 2 až 8 μl roztoku radioaktivního cholesterolu o koncentraci 0,1 až 2 $\mu\text{mol/ml}$ a radioaktivitě 0,36 až 3,6 MBq/ml, načež po vysušení se filtrační papír vloží do tmavě zbarvených zkumavek s rovným dnem o obsahu 2 až 5 ml a do těchto zkumavek se napipetuje 150 až 300 μl tělní tekutiny obsahující lipoproteiny například krevní plasmy, krevního sera, lymfy, folikulární tekutiny a nechá se v chladu při teplotě 2 až 8 °C po dobu 12 až 24 hodin a poté se vyjme filtrační papír a odebere se 20 až 50 μl takto označené tělní tekutiny k extrakci a chromatografické a radiometrické analýse podílu volného a esterifikovaného cholesterolu před a po inkubaci.

2. Způsob stanovení podle bodu 1, vyznačený tím, že k roztoku radioaktivního cholesterolu, kterým se napustí filtrační papír, se přidá antioxidant například meso-2,3 bis(3,4-dihydroxybenzyl)-butan o koncentraci 1 až 10 $\mu\text{mol/ml}$ nebo se uvedeným antioxidantem impregnuje filtrační papír před napuštěním radioaktivním cholesterolem.