



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

240 043

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 07 09 84
(21) PV 6744-84

(51) Int. Cl. 4

G 01 N 21/00

(40) Zveřejněno 13 06 85
(45) Vydáno 01 06 87

(75)
Autor vynálezu

RACEK JAROSLAV MUDr., PLZEŇ

(54)

Akceptor elektronů při stanovení koncentrace
laktátu pomocí cytochromu b_2

Použití tetrazoliové soli jako akceptoru elektronů při stanovení koncentrace laktátu pomocí cytochromu b_2 má za následek významné zvýšení citlivosti reakce, dosažení pozitivní změny absorpance a v neposlední řadě i možnost měřit výsledné zabarvení ve viditelné oblasti spektra. Využití řešení je vhodné zejména pro laboratoře klinické biochemie a jiná pracoviště, kde se provádí stanovení koncentrace laktátu při hodnocení tíže laktátové acidózy u nemocných v těžkém stavu při určení anaerobního práhu u pacientů po infarktu myokardu a u sportovců.

Vynález se týká použití tetrazoliové soli jako akceptoru elektronů při stanovení koncentrace laktátu pomocí cytochromu b_2 .

Kyselina mléčná, resp. laktát je důležitý metabolit, vznikající jako konečný produkt anaerobní glykolýzy. Stanovení koncentrace laktátu v plazmě má zásadní význam u nemocných v těžkém stavu, zejména v šoku, kdy pomáhá určit nejen diagnózu laktátové acidózy, ale uplatňuje se i jako ukazatel úspěšnosti léčby a prognózy onemocnění. U pacientů po infarktu myokardu se využívá stanovení koncentrace laktátu v krvi k určení velikosti zátěže, kterou pacient ještě dokáže zvládnout aerobní oxigenací, tj. lze určit vhodnou zátěž pro rehabilitační cvičení. U sportovců dovoluje stanovení koncentrace laktátu v krvi po fyzické zátěži posoudit stupeň trénovanosti.

Ke stanovení koncentrace laktátu v plazmě se obvykle užívá jedné ze dvou specifických enzymových metod. Prvá spočívá v oxidaci laktátu na pyruvát nikotinamidadenindinukleotidem za katalýzy živočišnou laktátdehydrogenasou. Vznik redukované formy nikotinamidadenindinukleotidu se projeví nárůstem absorbance v ultrafialové oblasti spektra. Protože reakční rovnováha je nepříznivá pro uvedený směr reakce, je třeba odčerpávat jeden z produktů, obvykle pyruvát. K tomu lze např. využít transaminální reakce s glutamátem za katalýzy alaninaminotransferasou. Tento princip je užit v práci Nolla (in: Bergmeyer, H. U., ed.: Methoden der enzymatischen Analyse, 2. vyd., díl 2, Akademie - Verlag, Berlin 1970, s. 1433 až 1437) a je na něm založeno i u nás užívané stanovení koncentrace laktátu pomocí soupravy Lactat vollenzymatisch firmy Boehringer Mannheim. Nutnost přítomnosti dvou enzymů, koenzymu a dalšího pomocného substrátu prodražuje stanovení. Další nevýhodou je nezbytnost užití fotometru s možností měřit v ultrafialové oblasti spektra; tento fotometr je

drahý a v menších laboratořích klinické biochemie nedostupný.

Druhá metoda využívá cytochrom b_2 , obvykle izolovaný z aerobních kvasinek, např. z pekařského droždí. Tento enzym působí také jako laktátdehydrogenasa a katalyzuje přeměnu laktátu na pyruvát. Enzym nepotřebuje žádný koenzym a jako umělý akceptor elektronů je využíván ferrikyanid draselný. Tuto metodu poprvé popsal Wieland (Biochem. Z. 329, 1958, č. 7, s. 568 až 576) a užili ji později i jiní autoři, např. Durliat a spol. (Clin. Chem. 22, 1976, č. 11, s. 1802 až 1805). Průběh reakce je sledován jako pokles absorbance v krátké oblasti viditelného světla, způsobený přeměnou žlutého ferrikyanidu na bezbarvý ferrokyanid. Nevýhodou stanovení je malá citlivost a obtížný způsob automatizace při záporné změně absorbance.

Podstata akceptoru elektronů při stanovení koncentrace laktátu pomocí cytochromu b_2 spočívá v použití tetrazoliové soli. Tato sloučenina, obvykle užívaná jako redoxní indikátor k průkazu redukované formy nikotinamidadenindinukleotidu nebo sulfhydrylových skupin, je v tomto případě redukována laktátem za katalytického působení cytochromu b_2 na barevný formazan; nárůst absorbance je měřen ve viditelné oblasti spektra.

Výhodou tohoto stanovení je jednoduchost a vysoká citlivost, téměř desetkrát vyšší než při užití ferrikyanidu. Protože dochází k nárůstu absorbance, lze výsledky snadno automaticky vyhodnocovat. Vzniklé zabarvení je měřeno ve viditelné oblasti spektra, čímž je stanovení zpřístupněno i těm laboratořím, které nejsou vybaveny spektrofotometrem pro měření v ultrafialovém světle. Izolace cytochromu b_2 je levná a pro jednoduchost postupu snadno realizovatelná.

Příklad 1

Při stanovení koncentrace laktátu pomocí cytochromu b_2 se jako akceptor elektronů užije 3,3'-dianisol-4,4'-bis[2-(4-nitrofenyl)-5-fenyltetrazoliumchlorid] v konečné koncentraci 0,4 mmol/l a jako přenašeč elektronů N-metylfenaziniummetylsulfát v konečné koncentraci 0,15 mmol/l. Vzniklé zabarvení se měří při vlnové délce 530 nm.

Příklad 2

240 043

Po elektroforéze v gradientovém polyakrylamidovém gelu následuje inkubace v roztoku obsahujícím laktát v koncentraci 50 mmol/l, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid v koncentraci 2,0 mmol/l a N-metylfenaziniummetylsulfát v koncentraci 0,2 mmol/l. Postup slouží k charakterizaci laktátdehydrogenasy po její izolaci z kvasinek.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

240 043

Použití tetrazoliové soli jako akceptoru elektronů při stanovení koncentrace laktátu pomocí cytochromu b_2 .