

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

105 935

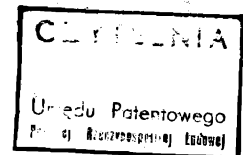
Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 17.07.76 (P. 191289)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 13.03.78

Opis patentowy opublikowano: 15.03.1980



Int. Cl.² G01N 33/16

Twórcy wynalazku: Apolinary Szewczuk, Maria Wellman-Bednawska

Uprawniony z patentu: Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
Polskiej Akademii Nauk,
Wrocław (Polska)

Sposób oznaczania aktywności gamma-glutamylotranspeptydazy w materiale biologicznym, zwłaszcza w surowicy krwi

Przedmiotem wynalazku jest sposób oznaczania aktywności gamma-glutamylotranspeptydazy (GGT) w materiale biologicznym, zwłaszcza w surowicy krwi.

Gamma-glutamylotranspeptydaza (zwana inaczej gamma-glutamylotransferazą, E.C.2.3.2.2.) jest enzymem występującym w wielu narządach i płynach ustrojowych ludzi i zwierząt a także w roślinach i niektórych bakteriach. Oznaczanie aktywności tego enzymu w surowicy krwi ludzi chorych jest obecnie wykonywane rutynowo w laboratoriach klinicznych a uzyskane wyniki są wykorzystywane w diagnostyce chorób wątroby, trzustki, serca a także w onkologii i ocenie skuteczności leczenia alkoholizmu. Ponadto istnieją doniesienia o użyteczności oznaczania aktywności gamma-glutamylotranspeptydazy w diagnostyce weterynaryjnej a nawet przy różnicowaniu pałeczek jelitowych.

Dotychczas znanych jest kilka metod oznaczania aktywności gamma-glutamylotranspeptydazy w surowicy, moczu, płynie mózgowo-rdzeniowym i w wyciągach tkanek. Do jednej z pierwszych należy metoda stosująca toksyczny nitryl γ -DL-glutamylalaniny jako substrat (Szewczuk, Orłowski, Clin. Chim. Acta, 5, 680, 1960), a miarą aktywności enzymu jest ilość uwolnionego nitrylu alaniny. Metoda ta nie nadaje się do rutynowych badań, ponieważ kolorymetryczne oznaczanie tej substancji jest dość kłopotliwe. Również nie znalazła szerszego zastosowania metoda wykorzystująca trudno rozpuszczalny γ -DL-glutamylanilid (Goldbarg i współpr. Archiv Biochem. Biophys., 91, 61, 1960).

W minionym dziesięcioleciu opracowano i zastosowano w laboratoriach klinicznych metodę stosującą γ -L-glutamyl- α -naftyloamid, jako substrat do oznaczania aktywności GGT. Ze związku tego pod wpływem GGT uwalnia się α -naftyloamina, którą oznacza się kolorymetrycznie po zdwuazowaniu i sprzęgnięciu z N-(1-naftylo)-etylenodwuaminą (Orłowski, Szewczuk, Acta Biochim. Polon., 8, 189, 1961). Później metoda ta została uproszczona dzięki zastosowaniu tetraazowanej o-dwuanyzydyny, sprzęgającej się bezpośrednio z naftyloaminą (Kilhanek, Dimov, Clin. Chim. Acta, 14, 619, 1967). Znane jest także fluorymetryczne oznaczanie α -naftyloaminy uwolnionej przez GGT (Rieth, Cuilbault, Clin. Chem., 21, 715, 1975).

W celu szybkiego oznaczenia aktywności gamma-glutamylotranspeptydazy w surowicy i moczu stosuje się również krążki bibuły nasyczone w odpowiedni sposób γ -glutamylonaftyloamidem lub γ -glutamylanilidem i buforem (polski opis patentowy nr 84464). Jednak metoda ta nie daje powtarzalnych wyników, ponieważ stosowane w niej substraty są słabo rozpuszczalne w wodzie.

Szersze zastosowanie znalazła metoda, w której jako substrat do oznaczania aktywności GGT stosuje się γ -L-glutamyl-p-nitroanilid (Orłowski i Meister, J. Biol. Chem., 240, 338, 1965), z którego GGT uwalnia żółto zabarwioną p-nitroanilinę. Wadą tej metody są trudności w uzyskaniu dokładnych i powtarzalnych wyników, z powodu słabej rozpuszczalności substratu w buforowanych roztworach wodnych. Jak wynika z literatury patentowej, zwiększenie rozpuszczalności γ -L-glutamyl-p-nitroanilidu uzyskano przez dodatek niektórych substancji chemicznych o charakterze detergentów (opisy patentowe RFN nr 2032270 i nr 2042829). Innym rozwiązaniem było zwiększenie czułości metody przez zastosowanie 8-hydroksychinoliny do kolorymetrycznego oznaczania p-nitroaniliny (opis patentowy St. Zjedn. Amer. nr 3892631). Ostatnio zastosowano N-(γ -L-glutamyl)-3-sulfo-4-nitroanilid jako dobrze rozpuszczalny w środowisku obojętnym substrat dla GGTP (opis patentowy RFN nr 2333798). Jednak wartość diagnostyczna i sposób zastosowania tego substratu, w porównaniu z γ -glutamylanilidem pozostają nie zmienione (Bernt i współpr. Clin. Chem., 21, 996, 1975). Dodatkowym poważnym utrudnieniem stosowania substratów p-nitroanilidowych jest to, że żółto zabarwione próbki surowic niektórych pacjentów (np. w przypadku żółtaczek lub podczas leczenia niektórymi lekami) interferują z barwą oznaczonej nitroaniliny lub jej sulfonowanej pochodnej, co znacznie obniża dokładność uzyskanych wyników.

Celem wynalazku było opracowanie takiego sposobu oznaczania aktywności GGT, który nie byłby obciążony wadami dotychczasowych metod. Wyeliminowano przy tym naftyloamidy jako substraty do oznaczania aktywności GGT, ponieważ istnieją doniesienia, że naftyloamina, stanowiąca półprodukt przy syntezie tych substratów wykazuje właściwości nowotworowe.

Stwierdzono, że jako substrat do oznaczania aktywności GGT nadają się kwasy γ -L-glutamylaminobenzoesowe, zwłaszcza kwas γ -L-glutamyl-p-aminobenzoesowy. Są to związki nowe i dotychczas nie opisane w literaturze. Zgodnie z przewidywaniem okazało się, że kwasy te, dzięki obecności grupy karboksylowej w pierścieniu aromatycznym wykazują dobrą rozpuszczalność w roztworach wodnych o pH > 6. Z drugiej strony stwierdzono doświadczalnie, że kwasy γ -L-glutamyl-aminobenzoesowe nie wykazują działania toksycznego lub nowotworowego. Podawanie myszom codziennie dootrzewnowo kwasu γ -L-glutamyl-p-aminobenzoesowego w ilości 2 g/kg w okresie wielu tygodni, nie powodowało jakichkolwiek ujemnych objawów.

Ponieważ sam kwas γ -L-glutamylaminobenzoesowy jest bardzo wolno rozkładany przez GGT z nerki wąłowej, a szczególnie z surowicy krwi, w celu przyspieszenia procesu enzymatycznego stosuje się dodatek glicyloglicyny jako znanego akceptora reszty γ -glutamylowej.

Sposobem według wynalazku do badanego materiału biologicznego wprowadza się więc kwas γ -L-glutamylaminobenzoesowy z dodatkiem glicyloglicyny, w postaci buforowanego roztworu wodnego o pH = 7,0–8,5, korzystnie o pH = 7,4. Jako bufor korzystnie stosuje się trójhdroksymetyloaminometan (Tris) z dodatkiem kwasu solnego.

W wyniku reakcji enzymatycznej uwalnia się kwas aminobenzoesowy, którego ilość stanowi miarę aktywności GGT. Zawartość kwasu aminobenzoesowego można oznaczyć kolorymetrycznie przez pomiar ekstynkcji, po uprzednim przeprowadzeniu go w związek barwny np. na drodze dwuazowania i następnego sprzęgania z naftolem lub jego pochodnymi.

Oczywiste jest przy tym, że gdy tworzący się barwnik ma zabarwienie żółte, to wyniki pomiarów mogą być nieprawidłowe w przypadkach kiedy badany materiał, np. surowica krwi pobrana od chorych z żółtaczką, są zabarwione. Z drugiej strony wiadomo, że prawidłowy pomiar może być dokonany jedynie w tym przypadku, kiedy powstający barwnik wykazuje odpowiednią trwałość oraz intensywne zabarwienie.

Stwierdzono, że najbardziej odpowiednim związkiem do sprzęgania zdwuazowanego kwasu p-aminobenzoesowego jest kwas H (kwas 1-amino-8-hydroksynaftaleno-3,6-dwusulfonowy). W takim przypadku reakcja sprzęgania przebiega bardzo szybko, a powstały barwnik posiada intensywną barwę czerwoną (jego ekstynkcja molarna wynosi 35000 przy 535 nm) i jest trwały przez wiele godzin. Dzięki powyższemu, żółto zabarwione próbki badanej surowicy, pobrane od pacjentów z silną żółtaczką nie mają wpływu na kolorymetryczne oznaczenie aktywności GGT.

Za pomocą reakcji z kwasem H można także oznaczyć kolorymetrycznie kwas antranilowy (o-aminobenzoesowy) i m-aminobenzoesowy. W obu przypadkach maksimum absorpcji powstającego barwnika azowego oraz jego ekstynkcja molarna są bardzo podobne do wartości uzyskiwanych na kwasie p-aminobenzoesowym.

Sposób według wynalazku, w którym jako substrat do oznaczania aktywności GGT stosuje się kwas γ -L-glutamylaminobenzoesowy i w którym w celu wywołania reakcji barwnej stosuje się kwas H, wykazuje poważne zalety w stosunku do metod dotychczasowych. Z uwagi na czułość metody kolorymetrycznego

oznaczania uwolnionego kwasu aminobenzoowego można zmniejszyć czas inkubacji enzymatycznej do 10–30 minut. Do zdwuazowania uwolnionego kwasu aminobenzoowego można zastosować mieszaninę kwasu octowego i azotynu sodu, która przemywa reakcję enzymatyczną bez wytrącania białka obecnego w badanej surowicy. Dodatkową zaletą stosowanej mieszaniny jest jej szybkie działanie (pełne zdwuazowanie osiąga się już po 3 minutach). Również kwas H, stosowany w sposobie według wynalazku, sprzęga się bardzo szybko w temperaturze pokojowej i w środowisku słabo zasadowym ze zdwuazowanym kwasem aminobenzoowym.

Wszystkie wyżej wymienione zalety, wynikające z zastosowania odpowiednich odczynników, umożliwiają szybkie wykonanie oznaczenia aktywności GGT, co jest ważne i konieczne przy stosowaniu rutynowych testów diagnostycznych. Ponadto sposób według wynalazku może być wykorzystany do automatycznych analizatorów. Standardowy błąd oznaczania aktywności GGT sposobem według wynalazku wynosi $\pm 3\%$.

Dodatkową zaletą sposobu według wynalazku jest to, że umożliwia on stosowanie krążków testowych do rutynowych oznaczeń aktywności GGT i przez to eliminuje konieczność częstego sporządzania roztworów potrzebnych odczynników, skraca czas i znacznie obniża koszty wykonania oznaczenia. Krążki testowe mogą być wykonane z nasiąkliwego tworzywa, korzystnie z grubej bibuły filtracyjnej, którą nasycy się wodnym roztworem kwasu γ -L-glutamylaminobenzoowego, substratu dla oznaczanego enzymu, glicyloglicyny jako aktywatora GGT i buforu nietłotnego, korzystnie Tris/HCl o pH = 7,0–8,5 korzystnie o pH 7,4. Krążki testowe przechowywane w stanie suchym i chłodnym miejscu są podatne do użytku w ciągu wielu miesięcy.

Wykorzystując krążki testowe opracowano skład zestawów diagnostycznych dla oznaczenia gamma-glutamylotranspeptydazy w surowicy krwi. Zestawy te można wykorzystać również do badania innych płynów ustrojowych (np. moczu, płynu mózgowo-rdzeniowego), a nawet wyciągów z narządów ludzkich i zwierzęcych lub nawet zawiesiny drobnoustrojów.

Sposób według wynalazku jest objaśniony za pomocą niżej przytoczonego przykładu.

P r z y k ł a d. W celu przygotowania krążków testowych do oznaczenia aktywności GGT sporządzono roztwór z 2,4 g (9,0 mmoli) kwasu γ -L-glutamyl-p aminobenzoowego i 5,9 g (45 mmoli) glicyloglicyny rozpuszczonych w 100 ml 2 M buforu tris-(hydroksymetylo)-aminometanu w HCl o pH = 7,4.

Roztworem tym nasycano paski z bibuły Whatman Nr 3, które po wysuszeniu w temperaturze pokojowej tnie się na krążki o średnicy 1 cm.

W celu oznaczenia aktywności GGT przygotowano następujący zestaw diagnostyczny:

1. krążki testowe

2. roztwór wzorca,

a) podstawowy: 34 mg kwasu p-aminobenzoowego rozpuszczono w 0,5 ml 0,5 M Na_2CO_3 i następnie dodano 9,5 ml 10% Na_2CO_3 .

b) roboczy: 0,2 ml roztworu podstawowego rozcieńczono wodą do 50 ml.

3. roztwór 15 mg kwasu H (soli sodowej) w 50 ml wody

4. roztwór 70 mg azotynu sodowego w 50 ml wody

5. roztwór 1,4 ml lodowatego kwasu octowego w 50 ml wody

6. roztwór 21,6 g węglanu sodowego ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) w wodzie i uzupełniony do 200 ml.

Tuż przed użyciem sporządzono: mieszaninę azotynu sodowego z kwasem octowym (zmieszano 1 objętość roztworu 4. z 1 objętością roztworu 5) i alkaliczny roztwór kwasu H (zmieszano 1 objętość roztworu 3 z 2 objętościami roztworu 6). Przed przystąpieniem do oznaczania aktywności GGT sporządzono wykres kalibracyjny. Do szeregu próbek odmierzone dokładnie po 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05 i 0,06 ml roztworu wzorca) co odpowiada 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05 i 0,06 mikromola PABA), po czym płyn w probówkach uzupełniono wodą do 0,5 ml. Do próbki przeznaczonej na „próbę zerową”, odmierzone 0,5 ml wody. Następnie do każdej próbki dodano 0,5 ml roztworu 0,01 M NaNO_2 w 0,25 M CH_3COOH , zmieszano i odstawiono w temp. pokojowej na 5–45 minut a następnie dodano 1,5 ml roztworu wywoływacza (kwas H), zmieszano i odstawiono przynajmniej na 3 minuty w temperaturze pokojowej. Ekstynkcję czerwono zabarwionej próbki odczytano przy 535 nm w kuwetach 1 cm wobec próbki zerowej. Z odczytanych wartości ekstynkcji i odpowiadających im mikromoli kwasu p-aminobenzoowego sporządzono na papierze milimetrycznym wykres kalibracyjny, stanowiący linię prostą przechodzącą przez środek układu.

Wykonanie oznaczenia aktywności GGT

Do oznaczeń użyto surowicę otrzymaną przez odwirowanie skrzepu ze świeżo pobranej krwi. (Surowicę można przechowywać w lodówce (4°C) przez tydzień). W czystej próbce umieszczono jeden krążek testowy, dodano 0,4 ml wody, zmieszano i ogrzewano przez 10 minut w łaźni wodnej o temperaturze 37°C . Następnie dodano 0,1 ml badanej surowicy i ogrzewanie kontynuowano przez 30 minut, po czym próbkę usunięto z łaźni i reakcję enzymatyczną przerwano przez dodanie 0,5 ml mieszaniny azotynu sodowego z kwasem octowym. Roztwór odstawiono w temperaturze pokojowej na 4 minuty a wreszcie dodano 1,5 ml alkalicznego

roztworu kwasu H. Prawie natychmiast powstał czerwony barwnik. Po 3 minutach odczytano ekstynkcję czerwono zabarwionej próbki przy 535 nm wobec próby kontrolnej. Tę ostatnio sporządzono w sposób analogiczny jak próbę właściwą z tą jednak różnicą, że próbkę surowicy dodano dopiero po wprowadzeniu roztworu Na NO_2 z CH_3COOH . (Przechowywanie prób w temperaturze pokojowej przez jedną dobę nie powodowało zmian wartości odczytywanej ekstynkcji). Na podstawie odczytanej wartości ekstynkcji posługując się wykresem krzywej kalibracyjnej, wyznaczono ilość kwasu p-aminobenzoowego uwolnionego przez GGT.

Aktywność GGT w surowicy wyraża się w międzynarodowych milijednostkach (m.j.) równych ilości nanomoli p-aminobenzoesu (10^{-3} mikromoli) uwolnionego w warunkach metody przez 1 ml surowicy w ciągu 1 minuty.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób oznaczania aktywności gamma-glutamylotranspeptydazy w materiale biologicznym, zwłaszcza w surowicy krwi przez kontaktowanie badanego materiału z substratem, z którego w wyniku reakcji enzymatycznej uwalnia się aromatyczna amina, której ilość określającą aktywność enzymu oznacza się kolorymetrycznie przez pomiar ekstynkcji po uprzednim przeprowadzeniu tej pochodnej aminowej w związek barwny, z n a m i e n n y t y m , że materiał biologiczny kontaktuje się z kwasem γ -L-glutamylaminobenzoowym jako substratem, stosowanym w postaci roztworu wodnego zawierającego dodatek glicyloglicyny, a uwolniony przez enzym kwas aminobenzoowy w celu przeprowadzenia go w związek barwny, dwuazuje się i następnie sprzęga z kwasem H.

2. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m , że materiał biologiczny kontaktuje się z kwasem γ -L-glutamylaminobenzoowym z dodatkiem glicyloglicyny w buforowanym roztworze wodnym o $\text{pH} = 7,0-8,5$, korzystnie o $\text{pH} = 7,4$.

3. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m , że materiał biologiczny kontaktuje się z krążkami testowymi z nasiąkliwego tworzywa, korzystnie bibuły, nasyconymi kwasem γ -L-glutamylaminobenzoowym z dodatkiem glicyloglicyny i nielotnym buforem o $\text{pH} = 7,0-8,5$, korzystnie o $\text{pH} = 7,4$.