

JOLANTA RACZYŃSKA-GAJEWSKA

BADANIA PORÓWNAWCZE DOTYCZĄCE NIEKTÓRYCH METOD STOSOWANYCH DO OZNACZANIA AKTYWNOŚCI DEZAMINAZY ADENOZYNOWEJ W SUROWICY KRWI

Z Zakładu Diagnostyki Laboratoryjnej Centrum Medycznego Kształcenia
Podyplomowego w Warszawie

Kierownik: prof. dr med. J. Krawczyński

Badania porównawcze dotyczyły dwóch metod kolorymetrycznych oznaczania aktywności dezaminazy adenozynowej: metody Koehlera i Benza oraz metody Martineka. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że metoda Martineka charakteryzuje się wielokrotnie większą trwałością stężeń związku barwnego, dwukrotnie większym zakresem czułości reakcji kolorymetrycznej i prawie 10-krotnie mniejszym współczynnikiem zmienności.

W latach 60-tych ukazały się pojedyncze wzmianki opisujące zmiany aktywności dezaminazy adenozynowej w surowicy ludzi chorych z różnymi stanami patologicznymi (8, 9, 17, 18). Podjęte przez nas w tym okresie badania udowodniły, że wyraźny wzrost aktywności tego enzymu towarzyszy takim procesom chorobowym, jak wirusowe zapalenie wątroby i marskość wątroby (10, 15, 16).

Zarówno nasze doświadczenia, jak również obserwacje innych autorów stanowiły podstawę włączenia dezaminazy adenozynowej do jednej z konstelacji testowych, stosowanych w diagnostyce chorób wątroby (11).

Zastosowanie nowego testu do celów diagnostycznych wymaga jednak opracowania lub dokonania wyboru spośród znanych metod — metody względnie czulej i prostej.

W dostępnym piśmiennictwie dotyczącym dezaminazy adenozynowej znane są dwie metody oznaczania aktywności tego enzymu.

Pierwsza z nich wykorzystuje właściwości optyczne adenozyminy i jej pochodnej — inozyny, których maksimum absorpcji leży w zakresie ultrafioletu przy długości fali 265 i 247 nm. Na podstawie różnicy ekstynkcji oraz współczynnika molarnego można wnioskować o ubytku adenozyminy lub przyroście inozyny w badanym roztworze. Oparta na tej zasadzie metoda Kalckara (7) jest bardzo prosta i czuła, nie przedstawia jednak dużych walorów z praktycznego punktu widzenia. Konieczność stosowania spektrofotometru z zakresem ultrafioletu uniemożliwia szersze zastosowanie tej metody w laboratoriach klinicznych.

Druga metoda oznaczania aktywności DA została wylansowana w roku 1957 przez Strauba i wsp. (19). Jako podstawę do określania aktywności tego enzymu przyjęto kolorymetryczny pomiar ilości powstającego amoniaku przy użyciu odczynnika Nesslerera.

Ogłoszona w 1962 roku przez *Koehlera* i *Benza* (8) metoda oznaczania aktywności dezaminazy adenozynowej stanowi nieznaczną, ale uproszczoną modyfikację procedury *Strauba* i wsp. (19), z zachowaniem jej warunków odnośnie kinetyki reakcji enzymatycznej.

Inny sposób oznaczania aktywności DA opublikował w rok później *Martinek* (12). W oparciu o reakcję *Berthelota* (1) oraz pracę *Chaneya* i *Martineka* (3) zaproponował identyfikację uwolnionego w czasie reakcji enzymatycznej amoniaku odczynnikami fenolo-podchlorynowym. Ponieważ wydawało się, że metoda *Martineka* reprezentuje duże walory z praktycznego punktu widzenia, postanowiono przeprowadzić badania porównawcze z powszechnie stosowaną metodą *Koehlera* i *Benza*. Celem tych badań była ocena metodologiczna i wybór jednej z tych metod do rutynowych oznaczeń w laboratorium klinicznym.

WYNIKI

W celu porównania metody *Koehlera* i *Benza* (8) z metodą *Martineka* (12) określono następujące parametry:

1. Maksimum absorpcji światła barwnego związku, powstającego w wyniku reakcji amoniaku z odczynnikiem Nesslerera

Oznaczenia wykonano na roztworze wzorcowym siarczanu amonu o stężeniu 30 µg/ml. Pomiar absorpcji przeprowadzono na spektrofotometrze Beckman B w zakresie 400—800 nm w 10 mm kuwecie wobec wody. Stwierdzono, że wyznaczona przez autorów długość fali 420 nm nie stanowi maksimum absorpcji badanego związku.

2. Maksimum absorpcji barwnego związku, powstającego w wyniku reakcji amoniaku z odczynnikiem fenolo-podchlorynowym

Oznaczenia wykonano na roztworze wzorcowym siarczanu amonu o stężeniu 60 µg/ml oraz na 2% homogenacie wątroby myszy. Absorpcję mierzono na spektrofotometrze Beckman B w zakresie długości fal 400—700 nm w 10 mm kuwecie wobec wody. Z otrzymanych danych wynika, że maksimum absorpcji indofenolu mieści się w zakresie 610—620 nm, czyli jest przesunięte o 20 nm w stosunku do wartości wyznaczonej przez *Martineka*. W toku dalszych badań pomiar absorpcji wykonywano przy maksimum wyznaczonym w naszych warunkach doświadczalnych.

3. Trwałość barwnego związku, powstającego w wyniku reakcji amoniaku z odczynnikiem Nesslerera

Badania przeprowadzono na surowicach, do których dodano gumy arabskiej w stężeniach: 2 g/100 ml, 5 g/100 ml i 10 g/100 ml, a absorpcję mierzono w różnych odstępach czasu po dodaniu odczynnika Nesslerera tj. po 2, 5, 10, 15, 30 i 60 minutach.

Na podstawie uzyskanych wyników nie stwierdzono wyraźnego wpływu stężenia użytego stabilizatora na wynik pomiaru. Wartości absorpcji wrażliwej tendencja ta występuje w okresie 15—60 min.

4. Trwałość barwnego związku powstającego w wyniku reakcji amoniaku z odczynnikiem fenolo-podchlorynowym

Doświadczenie wykonano na 10 surowicach w czterech wariantach, różniących się od siebie okresem inkubacji mieszaniny reakcyjnej po dodaniu odczynnika fenolo-podchlorynowego. Wartości absorpcji powstałego indofenolu mierzono po upływie 5, 15, 30-minutach i 24 godz. po zakończeniu inkubacji mieszaniny reakcyjnej.

Uzyskane rezultaty wskazują, że dopiero 20- i 30-minutowy okres inkubacji pozwala na uzyskanie stabilizacji barwy powstałego produktu reakcji. Zgodnie z osiągniętymi wynikami przeto, że optymalny okres ustalenia równowagi reakcji w temperaturze 37°C wynosi 20 minut.

5. Powtarzalność oznaczeń w metodzie Koehlera i Benza oraz w metodzie Martineka

W tym celu wykonano obiema metodami po 20 równoległych oznaczeń na surowicy zlewanej (po 10 surowic). Wyniki zestawiono w tabeli I.

Tabela I
Porównanie powtarzalności oznaczeń metodami Koehlera i Benza oraz Martineka

	Metoda Koehlera i Benza	Metoda Martineka
Średnia \pm błąd standardowy średniej w $\mu\text{g NH}_3\text{-N/ml}$	21,75 \pm 0,62 (20) ^a	22,74 \pm 0,07 (20)
Skrajne wartości	20,4—22,8	22,4—23,1
Różnica pomiędzy skrajnymi wartościami	2,4	0,7
Współczynnik zmienności	12,69	1,32

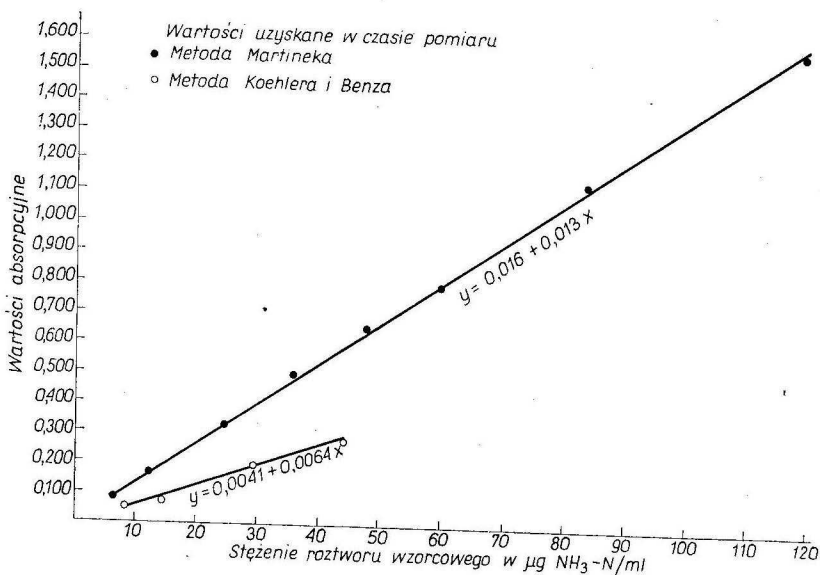
a — liczba oznaczeń

Z porównania danych liczbowych wynika, że w metodzie Martineka są mniejsze różnice pomiędzy skrajnymi wartościami, a współczynnik zmienności jest prawie 10-krotnie niższy, niż w metodzie Koehlera i Benza.

KALIBROWANIE

a) Metoda Koehlera i Benza

Oznaczenia wykonano na roztworze wzorcowym siarczanu amonu o stężeniu 0,3 mg $\text{NH}_3\text{-N/ml}$. Przez odpowiednie rozcieńczenie otrzymano zakres stężeń od 9—45 μg azotu na 1 ml. Na podstawie uzyskanych wartości absorpcji i odpowiadających im stężeń azotu amonowego sporządzono wykres opisany równaniem regresji $y = a + bx$. Otrzymane wyniki ($y = 0,0041 + 0,0064x$) pozwalają stwierdzić w badanym zakresie stężeń zgodność z prawem Lamberta-Beera.



Ryc. 1. Wykresy kalibracyjne dla metody: Koehlera i Benza oraz Martineka.

b) Metoda Martineka

Oznaczenia wykonano na roztworze wzorcowym siarczanu amonu o stężeniu 0,3 mg $\text{NH}_3\text{-N/ml}$. Stosując odpowiednie rozcieńczenia otrzymano roztwory w zakresie stężeń 6—120 μg azotu na 1 ml. Na podstawie uzyskanych wartości absorpcji i odpowiadających im stężeń azotu amonowego sporządzono wykres opisany równaniem regresji $y = a + bx$. Otrzymane wyniki ($y = 0,016 + 0,013x$) pozwalają stwierdzić w badanym zakresie stężeń zgodność z prawem Lamberta-Beera.

DYSKUSJA

Powszechnie wiadomo, że odczynnik Nesslera jest bardzo czułym wskaźnikiem do wykrywania śladowych ilości amoniaku, nie jest jednak wygodny w chemicznej analizie ilościowej. W wyniku reakcji jodku rtęciowo-potasowego z amoniakiem w środowisku zasadowym powstaje związek trudno rozpuszczalny, który ma tendencję do wypadania z roztworu. Związek ten pozostaje w trwałym rozproszeniu w roztworze jedynie przy bardzo niewielkiej zawartości amoniaku. Sprzyja temu dodatek koloidu ochronnego (13). Z przeprowadzonych badań wynika, że koloid ochronny, niezależnie od użytego stężenia, stabilizuje barwę produktu reakcji w pewnym tylko krótkim przedziale czasu. Czas ten przyjęto za optymalny do wykonania pomiaru. Jakkolwiek Koehler i Benz (8) pomijają w swym opracowaniu ten parametr metodyczny, wydaje się, że jest on niezbędny do utrzymania standardowych warunków pomiaru oraz do uzyskania powtarzalnych wyników. Niedogodność omawianej metody polega jeszcze na konieczności odbiałczania badanego materiału po inkubacji enzymatycznej. Fakt ten bardzo komplikuje i przedłuża procedurę.

Uzyskane rezultaty wskazują również, że zależność absorpcji od stężenia amoniaku jest prostoliniowa do poziomu odpowiadającego 45 μg azotu na 1 ml. Powyżej tej granicy nie obserwuje się proporcjonalnego przyrostu wartości. Fakt ten ogranicza w dużym stopniu zakres czułości omawia-

nej metody. Ponieważ autorzy zalecają roztwór wzorcowy o stężeniu 30 µg azotu na 1 ml, jako najwyższy punkt referencyjny, dyskusyjną wydaje się ich propozycja rozcieńczenia badanego materiału dopiero przy wartościach przekraczających 50 µg azotu na 1 ml. Należy jeszcze podkreślić, że wyraźnie ujemną stroną metody *Koehlera* i *Benza* (8) jest stosunkowo duża (2 ml) ilość surowicy potrzebna do wykonania jednego badania. Warunek ten jest szczególnie niewygodny w badaniach u dzieci. Istnieje wprawdzie możliwość miniaturyzacji tego postępowania pod warunkiem stosowania odpowiednio małych kuwet pomiarowych.

Reakcja między amoniakiem a podchlorynem i fenolem w środowisku zasadowym znana jest od 1859 roku (1). Mechanizm jej nie jest jednak dotychczas całkowicie wyjaśniony. Powstawanie indofenolu, jako produktu reakcji odbywa się przypuszczalnie wg schematu podanego przez *Bolleterę* i wsp. (2) oraz *Dambachera* i wsp. (4).

Maksimum absorpcji indofenolu, w zależności od rodzaju fotokolorymetru, określano przy długości fali 578 nm (11), 635 nm (5) oraz 640 nm (12). W toku własnych doświadczeń ustalono, że najwyższe wartości absorpcji otrzymuje się przy 610—620 nm.

Szybkość reakcji powstawania indofenolu zależy od czasu, temperatury i objętości inkubowanego roztworu (2). Ze wstępnych badań, jak również z piśmiennictwa (20) wynika, że podgrzanie mieszaniny reagującej do temperatury 56°C daje efekt trwałości barwy już po 5 minutach. Jednak ze względów praktycznych utrzymywano temperaturę 37°C.

Czas zakończenia reakcji tworzenia indofenolu w temperaturze 37°C wynosi wg *Martineka* (12) 15 minut. Na podstawie własnych obserwacji oraz zgodnie ze spostrzeżeniami innych autorów (5, 14) przyjęto, że optymalny okres inkubacji barwnego związku wynosi alternatywnie 20 i 30 minut. Stwierdzono ponadto wbrew zastrzeżeniom *Martineka*, że osiągnięta barwa nie zmienia się w ciągu 24 godzin. Wiadomo (2), że reakcja Berthelota jest wrażliwa na wpływ pewnych związków, jak sole miedzi, żelaza, cynku, bromki, woda utleniona, aminy aromatyczne. Ujemną interferencję wywołuje również bufor Tris nawet w bardzo małych stężeniach (6 i obserwacje własne). Niezbędnym więc warunkiem dobrej powtarzalności wyników jest odpowiednia czystość szkła laboratoryjnego. Przeprowadzone badania wykazały, że nieprawidłowo umyte próbówki mogą spowodować odchylenie w wynikach rzędu 100% wartości.

Zarówno znacznie lepsza powtarzalność metody *Martineka* w porównaniu z metodą *Koehlera* i *Benza*, jak również uproszczone postępowanie, wyeliminowanie procedury odbiażania oraz zastosowanie do badań 20-krotnie mniejszej ilości materiału, upoważniają do preferowania tej metody w badaniach rutynowych. Na uwagę zasługuje także fakt, iż preparatykę podchlorynu sodu można zastąpić handlowym preparatem tego związku w postaci antyforminy (20).

Я. Рачиньска-Гаевска

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПО НЕКОТОРЫМ МЕТОДАМ,
ПРИМЕНЯЕМЫМ ДЛЯ ОБОЗНАЧЕНИЯ АКТИВНОСТИ
АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Содержание

Сравнительные исследования касались двух колориметрических методов обозначения активности аденозиндезаминазы: метода Келера и Бенца и метода

Мартинек. На основании полученных результатов установлено, что метод Мартинек характеризуется многократно большей устойчивостью концентраций цветного соединения, вдвое большим диапазоном чувствительности колориметрической реакции и почти 10-кратно меньшим коэффициентом изменчивости.

J. R a c z y ń s k a - G a j e w s k a

COMPARATIVE STUDIES ON SOME METHODS OF SERUM ADENOSINE
DESAMINASE ASSAY

S u m m a r y

The comparative studies concerned two colorimetric methods of the assay of adenosine desaminase activity: the method of Koehler and Benz and that of Martinek. The latter was found to produce more stable concentrations of the coloured product, double range of the sensitivity of the colour reaction and almost 10-fold smaller variation coefficient.

PIŚMIENNICTWO

1. Berthelot M. P.: Répert. Chim. Appl., 1859, 1, 284. — 2. Bolleter W. T., Bushman C. J., Tidwell P. W.: Analytical Chem., 1961 33, 592. — 3. Chaney A. L., Marbach E. P.: Clin. Chem., 1962, 8, 130. — 4. Dambacher M., Gubler A., Haus H. G.: Clin. Chem., 1968, 14, 615. — 5. Galanti B., Biusti G.: Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim., 1967, 42, 1316. — 6. Giusti G., Galanti B.: Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim., 1967, 42, 1312. — 7. Kalckar H. M.: J. Biol. Chem., 1947, 167, 461. — 8. Koehler L. H., Benz E. J.: Clin. Chem., 1962, 8, 133. — 9. Kotlarek-Haus S.: Pol. Tyg. Lek., 1961, 16, 541. — 10. Krawczyński J., Raczyńska J., Jonas S., Wencel J., Howiecka K.: Clin. Chim. Acta, 1965, 11, 227.
11. Krawczyński J. (red.): Diagnostyka enzymologiczna w medycynie praktycznej, PZWL, Warszawa 1970, wyd. II. — 12. Martinek R. G.: Clin. Chem., 1963, 9, 620. — 13. Minczewski J., Marczenko Z.: Chemia Analityczna, PWN Warszawa, 1965. — 14. Müller-Beissenhritz W., Keller H.: Dtsch. Med. Wschr., 1966, 91, 159. — 15. Raczyńska J., Jonas S., Krawczyński J.: Clin. Chim. Acta, 1966, 13, 151. — 16. Raczyńska J., Jonas S., Krawczyński J.: Diagn. Labor., 1967, 2, 65. — 17. Sassowa J.: Pol. Tyg. Lek., 1962, 17, 1408. — 18. Sassowa J.: Pol. Tyg. Lek., 1962, 17, 1450. — 19. Straub F. B., Stephaneck O., Acs G.: Biochimija, 1957, 22, 118. — 20. Oznaczenie mocznika metodą ureazową. (Metoda zalecana przez Komisję Standaryzacji Metod Laboratoryjnych działającą przy Radzie Naukowej przy Ministrze Zdrowia i Opieki Społecznej).

Wpłynęło dnia 20. V. 1972.

Adres autorki: Warszawa, ul. Broniewskiego 53a, m. 20.