

STANOVENÍ AKTIVITY DISACHARIDÁZ S POUŽITÍM SOUPRAV PRO GLUKÓZU LACHEMA

P. KOCNA

Laboratoř gastroenterologie Fakulty všeobecného lékařství University Karlovy,
Praha
Vedoucí: prof. MUDr. Přemysl Frič, DrSc.

■ Studie se zabývá porovnáním tří postupů pro stanovení koncentrace glukózy a jejich použitelnosti pro hodnocení aktivity disacharidáz v biopsích tenkého střeva. Podrobně je dále rozpracován postup s o-dianisidinem, který vykazuje pro daný účel nejvhodnější parametry.

■ Klíčová slova: disacharidázy – biopsie tenkého střeva – koncentrace glukózy – o-dianisidin.

Stanovení aktivity disacharidáz tvoří důležitou součást hodnocení biopického materiálu v diferenciální diagnostice malabsorpčního syndromu [6]. Pro stanovení enzymové aktivity se standardně používá řady disacharidů jako substrátů a výsledek se hodnotí podle množství uvolněné glukózy. K tomuto účelu lze použít běžné postupy a soupravy určené ke stanovení koncentrace glukózy. Původní Dahlqvistova metoda [3] stejně jako i její modifikace Mališem [8, 9] používají pro stanovení koncentrace glukózy enzymatický postup s glukózooxidázou, peroxidázou a o-dianisidinem. V našich laboratořích byla zavedena souprava firmy Boehringer a později z NDR souprava Fermognost-Blutzucker [4]. Lachema n. p. uvedla v roce 1978 na trh soupravu Glukóza-enzymaticky [1], ve které na rozdíl od předchozích byl chromogen nahrazen kombinací 4-aminofenazonu se 4-chlor-3-kresolem [5, 7]. V roce 1985 byla i tato souprava nahrazena novým typem s 3-methyl-fenolem [2] pod označením Oxochrom-glukóza, která je však vzhledem k nespecifické reakci s disacharidy pro stanovení aktivity disacharidáz ve sliznici tenkého střeva nevhodná.

Materiál a metodika

- Kinetiku reakce** jsme hodnotili na spektrofotometru Beckman DU-8 s programem Kinetic-II. Inkubační směs obsahovala 2 ml pracovního roztoku a 0,1 ml 1 mmol/l roztoku glukózy, absorbanci jsme měřili po dobu 45 minut v šedesátek sekundových intervalech v termostatované kyvetě při 37 °C. Vlnová délka pro obě soupravy Lachema byla 500 nm a pro metodu s o-dianisidinem 450 nm.
- Absorpční spektra** chromogenů jsme měřili na spektrofotometru Beckman DU-8 s programem Lambda-III v rozmezí vlnových délek 330 – 630 nm při rychlosti změny 100 nm/min.
- Kalibrační křivky** pro glukózu a jednotlivé disacharidy jsme získali shodným postupem pro všechny tři metody. Inkubační směs obsahovala 1,5 ml pracovního roztoku a 0,2 ml roztoku glukózy nebo disacharidu odpovídající množství 0, 20, 50, 100 a 200 nmolu glukózy resp. 0, 2, 5, 10 a 20 µmolu disacharidu. Inkubace probíhala

při 37 °C ve vodní lázni 15 minut a vzorky jsme měřili při 530 nm pro o-dianisidin resp. 500 nm pro oba postupy souprav Lachema. Před měřením byly objemy vzorků doplněny na shodné množství, tj. 0,5 ml redestilované vody resp. 0,5 ml 16N kyseliny sírové pro metodu s o-dianisidinem.

4. Pracovní roztoky

a) Glukóza-enzymaticky (Glu-enz) Bio-La-Test, Lachema obsahuje dle originálního postupu TRIS-tlumič pH 8,3, 0,68 mmol/l 4-aminoantipyrin, 0,60 mmol/l 4-chlor-3-kresol, 4 – 5 U/ml glukózooxidázy (GOD) a 0,5 – 0,8 U/ml peroxidázy (POD).

b) Oxochrom glukóza (Glu-GP) Bio-La-Test, Lachema obsahuje dle originálního postupu 0,14 mol/l fosfátový tlumič pH 7,0, 1 mmol/l 4-aminofenazon, 10 mmol/l 3-methylfenol, 10 U/ml glukózooxidázy a 1 U/ml peroxidázy.

c) Modifikace postupu s o-dianisidinem obsahuje 0,5 mol/l T_RIS-tlumič pH 7,0 stabilizovaný Tritonem X-100 (2 mg/ml) v ethanolu (8 mg/ml), 0,1 mg/ml o-dianisidin, 20 U/ml glukózooxidázy a 2 U/ml peroxidázy. Pracovní roztok je připraven rozpouštěním 1 dílu chromogenu (5 mg o-dianisidinu v 0,5 ml redestilované vody) a 1 dílu směsi enzymů (5 mg GOD a 0,5 mg POD v 0,5 ml tlumiče) v 50 ml tlumiče. Roztoky chromogenu a směsi enzymů jsou uchovány po rozpipetování v ampulích při -20 °C.

Výsledky

Analýzou spektra výsledného barevného komplexu (obr. 1) jsme prokázali, že u obou souprav Bio-La-Test se 4-aminofenazonem je maximum absorbance při 500

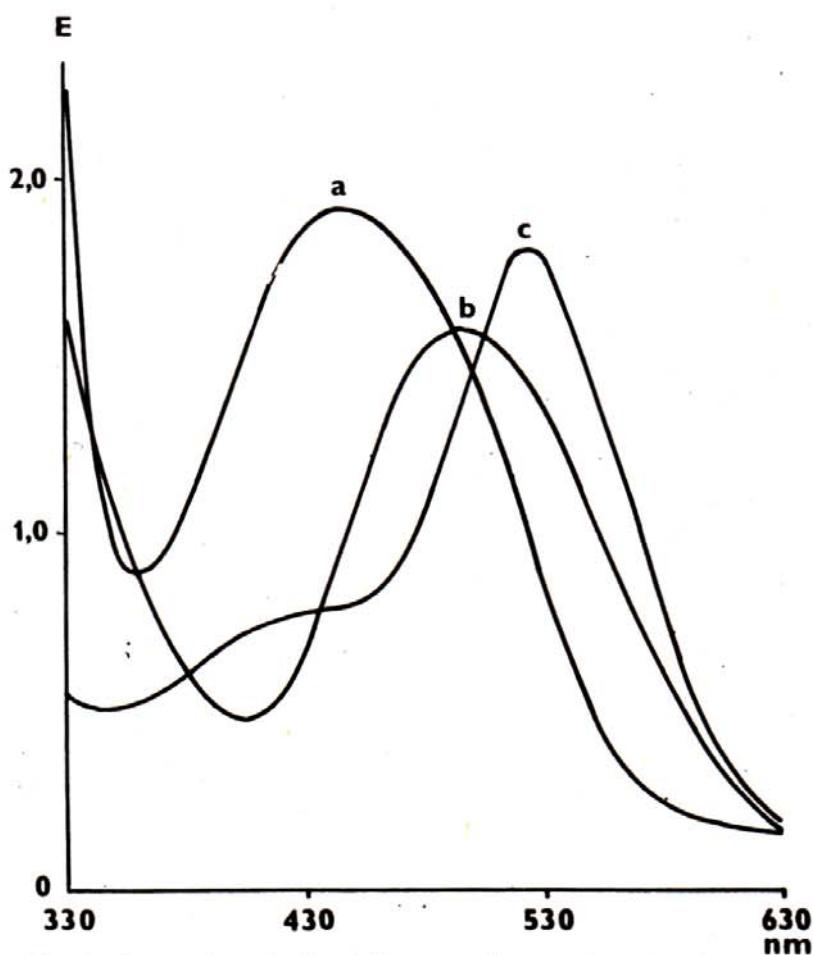


Fig. 1. Spectral analysis of dye-complexes using 4-aminophenazon (b), o-dianisidin before (a) and after reaction (c) with sulfuric acid.

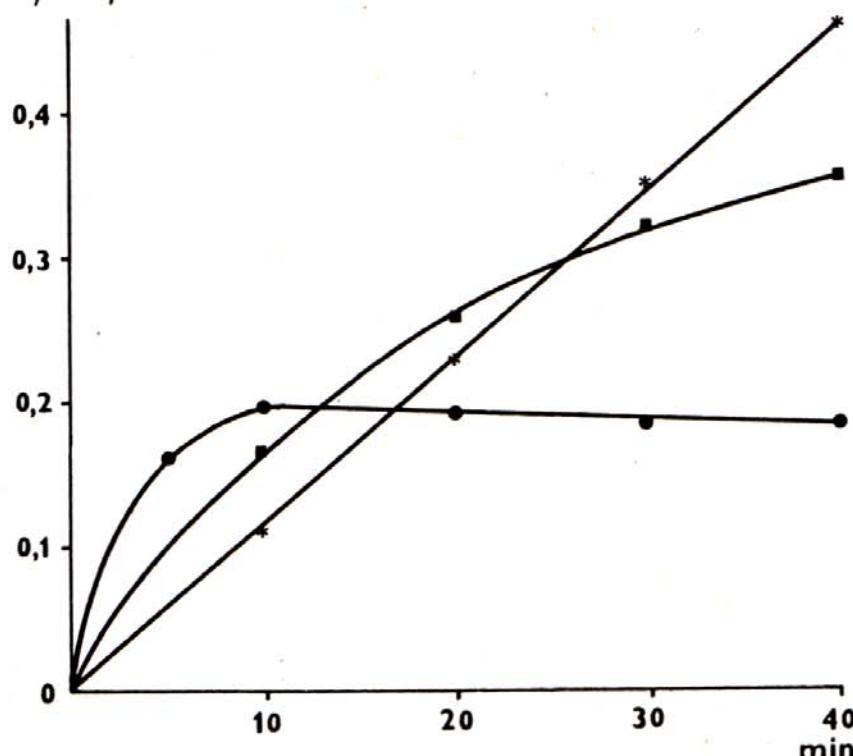


Fig. 2. Reaction kinetic of the methods Glucose-enzymatic (■ — ■), Oxochrom-glucose (● — ●) and with o-dianisidine (*) — *) for free glucose.

nm, přičemž relativně plochý vrchol umožňuje měření v širokém rozmezí od 480 do 520 nm. Pro metodu s o-dianisidinem jsme prokázali vrchol s maximem 450 nm, který se však výrazně posouvá, je-li měření provedeno „end-point“ formou a reakce je zastavena 16 N kyselinou sírovou. V tomto případě jsme našli ostrý vrchol s maximem při 525 nm.

Kinetické měření absorbance v šedesátisekundových intervalech ukázalo značně odlišný průběh reakce všech tří porovnávaných postupů (obr. 2). Původní metoda Glu-enz vykazuje trvalý přírůstek absorbance s časem a extinkce za 20 minut při 500 nm je 0,274. Nová souprava Glu-GP je charakteristická rychlým vzrůstem absorbance během 7 – 8 minut, po kterých se již výrazně nemění. Extinkční hodnota za 20 minut při 500 nm je 0,190. Přírůstek absorbance u metody s o-dianisidinem byl v průběhu sledovaných 45 minut dokonale lineární a za 20 minut při 450 nm jsme prokázali extinkci 0,228.

Reakce s disacharidy. Souprava Glu-enz (obr. 3a) je zcela necitlivá k trehalóze, fruktóze, laktóze a sacharóze, kdy absorbance při 500 nm dosahuje za 15 minut maximální hodnoty 0,044 pro 20 µmolů disacharidu. S maltózou však vzniká vysoká nespecifická reakce a za 15 minut dosahuje extinkční hodnoty 1,150 pro 10 µmolů maltózy.

Při použití novější soupravy Glu-GP (obr. 3b) jsme prokázali shodně minimální reakci s trehalózou, laktózou a fruktózou (maximum extinkce je 0,039 pro 20 µmolů), s maltózou je nespecifická reakce nižší než u metody Glu-enz (0,780 pro 10 µmolů za 15 minut), ale podstatný rozdíl jsme našli u sacharózy, se kterou vzniká značně vysoká nespecifická reakce s extinkční hodnotou 0,839 za 15 minut pro 20 µmolů.

Postup s o-dianisidinem (obr. 3c) vykazuje shodně s oběma soupravami Bio-La-Tes-tu minimální citlivost na trehalózu, fruktózu, laktózu, ale rovněž minimální citlivost na

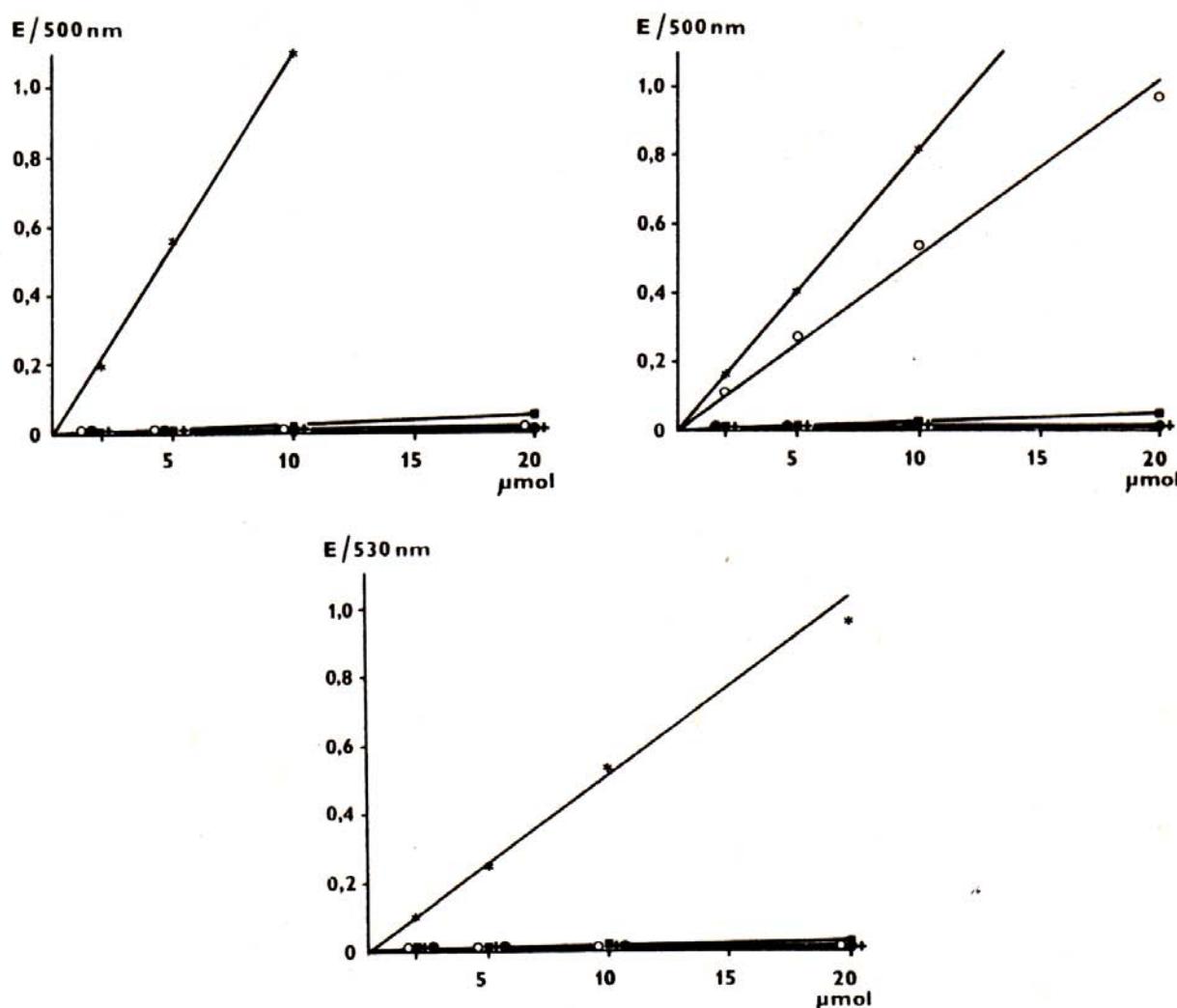


Fig. 3. Reactivity of the lactose (● — ●), trehalose (+ — +), fructose (■ — ■), saccharose (○ — ○) and maltose (*) — *) using the methods Glu-enz (a), Glu-GP (b) and o-dianisidin (c).

sacharózu (0,024 za 15 minut pro 20 μmol). Nespecifická reakce s maltózou je ze všech tří studovaných postupů nejnižší (0,540 za 15 minut pro 10 μmol) a v relativním vyjádření představuje hodnotu 0,469 v porovnání s metodou Glu-enz a Glu-GP (0,678 a 1,000).

Diskuse

Pro stanovení aktivity disacharidáz ve sliznici tenkého střeva vypracoval Mališ v roce 1968 přímou metodiku s použitím homogenátů bioptického materiálu [8 – 10]. Vlastní hodnocení je založeno na stanovení koncentrace uvolněné glukózy enzymatickým štěpením, pro které se využívá běžných postupů.

Souprava Glukóza-enzymaticky [1], která nahradila do té doby dováženou soupravu Fermognost-Blutzucker [4] z NDR, se jevila nevýhodnou především pro nutnost dodržet přesné intervaly při měření (± 5 sekund), vzhledem k tomu, že enzymatická reakce není před měřením ukončena a dochází k trvalému přírůstku absorbance s časem. Tuto nevýhodu odstranila nová souprava Lachemy Oxochrom-glukóza, jejíž ne-lineární kinetika je pro praxi výhodnější, neboť absorbance se po rychlém vzestupu během prvních minut stabilizuje a po deseti minutách se již výrazně nemění. Pro sta-

novení disacharidázové aktivity je však tato souprava nevhodná vzhledem k vysoké nespecifické reaktivitě se sacharózou.

Metoda s o-dianisidinem je na základě této studie jedinou použitelnou metodou pro stanovení koncentrace glukózy při hodnocení aktivity disacharidáz. Kinetika reakce je dokonale lineární a po ukončení inkubace je enzymová reakce zastavena 16N kyselinou sírovou. Tím je přesně definována doba inkubace, dochází k posunu absorpčního maxima za 450 nm na 525 nm a současně i ke zvýšení molárního extinkčního koeficientu. Postup s o-dianisidinem vykazuje nejnižší nespecifickou reakci s maltózou a rozhodující nízkou citlivost k sacharóze, která je čtyřicetkrát nižší než při použití metody Glu-GP. Tato studie podává kromě porovnání jednotlivých metod i podrobný postup metody s o-dianisidinem vhodný pro stanovení volné glukózy.

Poděkování

Za cenné konzultace v průběhu práce děkuji prof. MUDr. P. Fričovi, DrSc. a za poskytnutí vzorků chromogenů děkuji ing. V. Chromému, CSc. z n. p. Lachema Brno.

LITERATURA

1. Bio-La-Test glukóza enzymaticky (Glu-enz), souprava chemikálií pro 160 stanovení glukózy v biologických tekutinách. Pracovní návod, Lachema 1978.
- 2. Bio-La-Test Oxochrom glukóza (Glu-GP), souprava pro 250 ml glukózového čnidla na enzymové stanovení glukózy metodou GOD-POD. Pracovní návod, Lachema 1985.
- 3. DAHLQVIST, A.: Method for the assay of intestinal disaccharidases. Anal. Biochem., 7, 1964, s. 18 – 25.
- 4. Fermognost Blutzucker-Test zur enzymatischen Bestimmung der Glukose im Blut nach DAB 7 (D.L.). Pracovní návod, Germed, 1968.
- 5. FISCHER, J., CHROMÝ, V., VOZNÍČEK, J.: Enzymové stanovení glukózy. I. Výběr metody a optimální reakční podmínky Biochem. Clin. Bohemoslov., 10, 1981, s. 41 – 45.
- 6. FRIČ, P.: Enzymy sliznice tenkého střeva u malabsorpčního syndromu. Pokroky v gastroenterologii ed. Z. Mařatka, Avicenum 1975, s. 225 – 251.
- 7. CHROMÝ, V., VOZNÍČEK, J., FISCHER, J.: Enzymové stanovení glukózy. II. Analýza biologických tekutin. Biochem. clin. bohemoslov., 10, 1981, s. 123 – 126.
- 8. MALIŠ, F.: Přímé stanovení disacharidázové aktivity v homogenátech sliznice tenkého střeva. I. Stanovení kvalitativní a semikvantitativní. Sborník lék., 70, 1968, s. 321 – 325.
- 9. MALIŠ, F.: Přímé stanovení disacharidázové aktivity v homogenátech sliznice tenkého střeva. II. Stanovení kvantitativní. Sborník lék., 70, 1968, s. 325 – 329.
- 10. MALIŠ, F., LOJDA, Z., FRIČ, P., JODL, J.: Aktivity disacharidáz v jejunaálních biopsiích doospělých a dětí. Srovnávací biochemická, histochemická a histologická studie. Čas. lék. čes., 111, 1972, s. 32 – 35.

Do redakcie došlo: 23. 3. 1987

Adresa autora: MUDr. Petr Kocna, Laboratoř Gastroenterologie FVL UK, Karlovo nám. 32, 121 11 Praha

П. Коцна

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТЕЙ ДИСАХАРИДАЗ ПРИ ПОМОЩИ ТЕСТОВ ЛАХЕМА ДЛЯ УСТАНОВЛЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ

Резюме

Определение активностей дисахарида兹 представляет важную составную часть при оценке биоптического материала при дифференциальном диагнозе малабсорбционного синдрома. Стандартные методы содержат определение концентрации глюкозы. В рамках исследования мы проводили сравнение двух методов Лахема (Глюкоза-энзиматически и Оксочром-глюкоза) с модификацией основанной на реакции с o-дианисидином. Последний метод является самым удобным по своим кинетическим и спектральным свойствам и, в сопоставлении всех трех методов, он оказывает

самые низкие неспецифические реакции. В качестве оптимального метода для определения концентрации глюкозы при оценке активностей дисахаридаз он был подробно разработан.

P. Kocna

DETERMINATION OF DISACCHARIDASE ACTIVITIES USING THE
LACHEMA - KITS FOR GLUCOSE

Summary

The determination of disaccharidase activities takes an important part of evaluation of the intestinal biopsies for differential diagnostics of the malabsorption-syndrome. The standard methods include determination of glucoses. The usefulness of Lachema-Kits (Glucose-enzymatic and Oxochrom-Glucose) has been compared with our modification, based on the reaction with o-dianisidine. This method gives most advantageous kinetic and spectral parameters and in comparison with the two others has minimal unspecific reactions with disaccharides. This method for optimal determination of glucose concentration for evaluation of disaccharidase activities has been elaborated in details.

P. Kocna

BESTIMMUNG DER DISACCHARIDASE-AKTIVITÄT MIT LACHEMA
TESTS FÜR GLUKOSE

Zusammenfassung

Die Bestimmung der Disaccharidase-aktivität ist ein wichtiger Teil der Biopsie-Wertung in der differentialen Diagnostik des malabsorption Syndromes. Die standarten Methoden enthalten die Bestimmung der Glukose-konzentration und die vorgelegte Studie vergleicht die Benützbarkeit des Lachema-Tests (Glukosa-enzymatisch und Oxochrom-glukosa) mit unserer Modifikation, die an der Reaktion mit o-dianisidinen gegründet ist. Diese Methode zeigt die optimalen kinetischen und spektralen Parameter, und hat im Vergleich aller drei Methoden die niedrigsten unspezifischen Reaktionen mit Disacchariden. Diese optimale Methode zur Bestimmung der Glukose-konzentration bei Bewertung der Disaccharidase-aktivität wurde detailliert ausgearbeitet.

POROVNÁNÍ AKTIVITY ALP V LIDSKÉM SÉRU A V KONTROLNÍCH
SÉRECH PŘI RŮZNÉM ZPŮSOBU STARTU ENZYMOVÉ REAKCE

Autoři porovnávali metodu IFCC s metodou pracující se stejnými koncentracemi složek, ale prováděnou na Centrifichemu. Rozdíl byl v tom, že metoda IFCC startuje reakci přidáním substrátu do směsi séra a pufru, na Centrifichemu se startuje smícháním séra s kompletním činidlem. Při paralelních analýzách čerstvých lidských sér nebyl mezi oběma variantami nalezen vůbec žádny rozdíl, výsledky byly rovnocenné, referenční interval společný. Jiná byla situace u kontrolních lyofilizovaných sér, kde při metodě IFCC (start substrátem) vycházely výsledky vyšší, a to od 1 až 24 % podle druhu séra. Rozdílné chování lidských nativních sér a rekonstituovaných lyofilitzátů je známo již řadu let a v současné době je nutné si tento rozdíl připomínat při případném plánovaném využívání sérových enzymových kalibrátorů a též při hodnocení okruhových analýz.

Ch. W. Lim, L. M. Walis, W. N. Chisnall: Alkaline phosphatase activities in fresh serum and lyophilized controls by the AACC reference method or IFCC method compared with that of Bowers and McComb. Clin. Chem. 32, 12, 1986, 2205.

B. Friedecký