

IFCC metoda za mjerenje katalitičke koncentracije γ -glutamilttransferaze

Flögel, Mirna; Juretić, Dubravka

Source / Izvornik: **Biochemia Medica, 1993, 3, 10 - 24**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:581999>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-10**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**IFCC metoda za mjerenje katalitičke koncentracije
 γ -glutamyltransferaze
(γ -glutamyl-peptid: aminokiselina γ -glutamyltransferaza,
EC 2.3.2.2)**

Mirna Floegel, Dubravka Juretić¹

1. Uvod

Enzim γ -glutamyltransferaza (GGT), EC 2.3.2.2., katalizira prijenos γ -glutamyl skupine na aminokiseline ili peptide. Iako je široko rasprostranjen u različitim tkivima, izrazito je aktivan u bubregu, jetri i epitelnim stanicama koje sudjeluju u procesima transporta i sekrecije tjelesnih tekućina. Zbog svoje značajne fiziološke uloge GGT ima i osobito dijagnostičko značenje. U kliničko-biokemijskoj se praksi GGT dugo određivao vrlo različitim metodama. Za izbor najpovoljnije metode kao standardne i za njezino optimiranje bilo je nužno provesti temeljita istraživanja mehanizma katalitičkog djelovanja i svih čimbenika koji utječu na kinetičko ponašanje GGT. U tom su radu od 1969-1982 sudjelovali brojni istraživači (Stromme (1), Rosalky (2), Schiele (3), Floegel(4), Shaw (5), Solberg (6), i dr.). Trebalo je izabrati radni pH, pufer i supstrate, a zatim njihove optimalne koncentracije, da sadržaj ispitivanog uzorka seruma što manje utječe na pouzdanost rezultata i da se mjernim uvjetima osigura linearnost analitičkog sustava u praktičnom rasponu katalitičkih koncentracija GGT.

Na temelju svih tih istraživanja Savjet Međunarodne federacije kliničke kemije za mjerenje katalitičke koncentracije enzima preporuča mjerenje katalitičke koncentracije GGT u serumu po metodi koju su načelno objavili Orłowski i Meister (7) i Szasz (8), te konačno izdjelali Persijn i Van der Slyk (9). U toj se IFCC metodi (10) upotrebljava L- γ -glutamyl-3-karboksi-4-nitroanilid kao supstrat-davatelj, a glicilglicin kao supstrat-primatelj. Glicilglicin istovremeno služi i kao pufer. U predašnjim propisima za pufer se upotrebljavao

¹Zavod za medicinsku biokemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

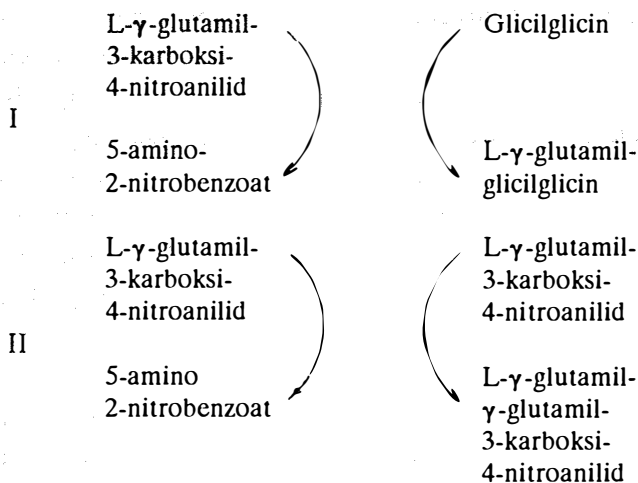
Tris(hidroksimetil)aminometan, a reakcijski sustav je sadržavao danas nepotrebne Mg^{2+} ione radi održanja L- γ -glutamyl-4-nitroanilida u otopini.

2. Načelo metode

U reakcijskom sustavu, koji sadrži supstrate L- γ -glutamyl-3-karboksi-4-nitroanilid i glicilglicin, GGT humanog seruma katalizira prijenosne reakcije prikazane na Slici 1. Uz njih dolazi i do hidrolitičke reakcije supstrata. Analitički sustav osigurava uvjete koji potiskuju hidrolitičku i samoprijenosnu reakciju u korist dominantne reakcije prijenosa γ -glutamyl skupine na glicilglicin. Očito je naime da se γ -glutamyl skupina može prenositi od supstrata-davatelja na supstrat-primatelja, no kao primatelj može poslužiti i sam γ -glutamyl-3-karboksi-4-nitroanilid, što je neželjena samoprijenosna reakcija.

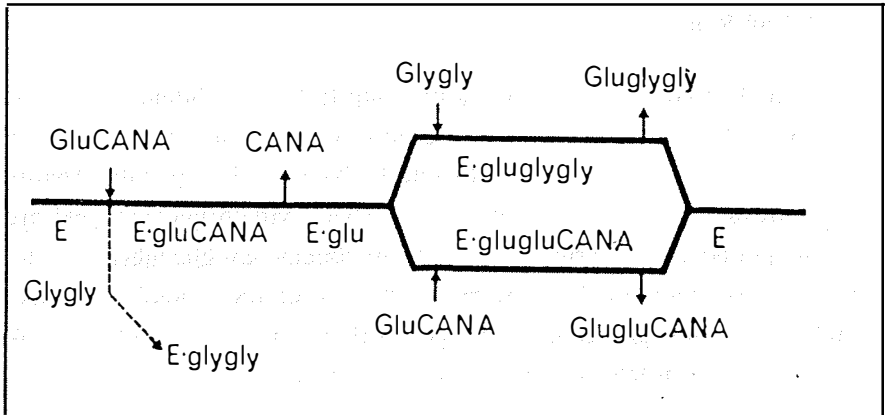
Preporučeni optimirani uvjeti mjerenja odabrani su tako da samoprijenosna reakcija (II) sudjeluje u stvaranju produkta s manje od 1% (5,6).

Uz navedene reakcije u fiziološkim koncentracijama supstrata-primatelja i uz glutation, fiziološkog supstrat-davatelja, pored prijenosne reakcije dolazi i do veoma izrazite katalitičke hidrolize (11).



Slika 1. Prijenosne reakcije analitičkoga sustava za mjerenje katalitičke koncentracije GGT

Reakcija GGT, kakva se odvija u analitičkom sustavu, slijedi ping-pong bi-bi reakcijski mehanizam prikazan na shemi Slike 2.



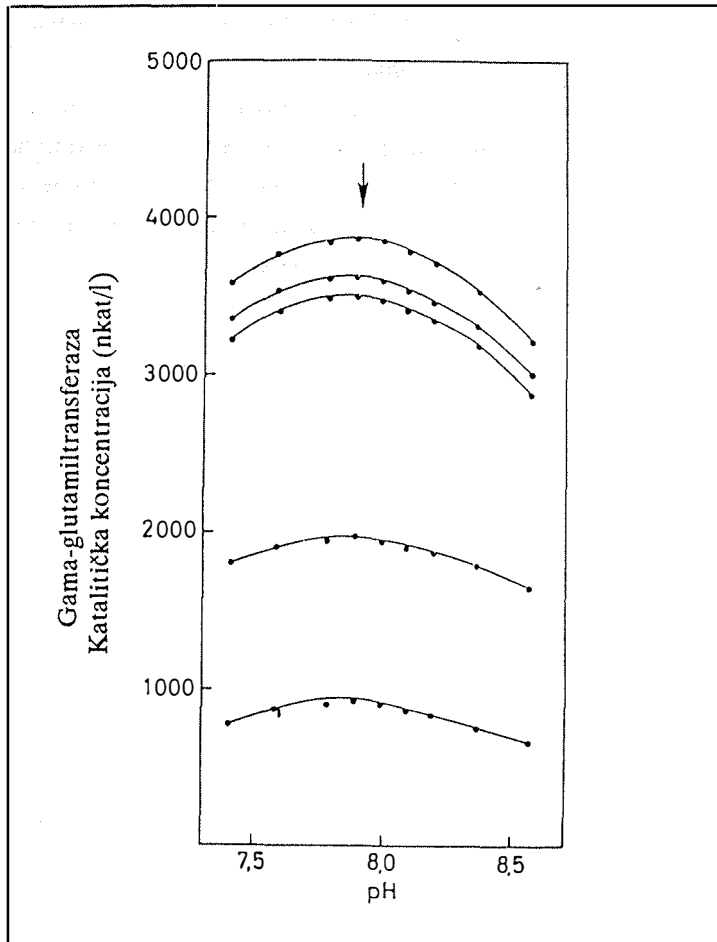
Slika 2. Clelandova shema tijeka reakcije serumske GGT sa supstratima L-glutamil-3-karboksi-4-nitroanilidom (GluCANA) i glicilglicinom (glygly).

Detaljnim mjerenjem koncentracijskog utjecaja supstrata (6) utvrđeno je da kod visokih koncentracija glicilglicina dolazi do kompetitivno inhibirane brzine katalitičke reakcije, dok kod visokih koncentracija supstrata-davatelja dolazi do smanjenja brzine zbog uplitanja samoprijenosne reakcije, tj. zbog zamjene supstrata-primatelja molekula supstrata - davatelja. Zbog toga koncentracijski odnosi analitičkog sustava osiguravaju samo 75% maksimalne brzine i tako praktički uklanjaju mogućnost inhibitornog djelovanja supstrata. Ipak, kod optimiranja svih dvosupstratnih reakcija, mnogo je koncentracijskih parova koji zadovoljavaju kriterije za postavljene rubne zahtjeve, pa je konačni izbor koncentracija supstrata ovisio o ekonomičnosti sustava te o optimiranim optičkim svojstvima sustava.

Iako je utvrđeno da dvovaljani ioni magnezija, kalcija, cinka i mangana djeluju inhibitorno na GGT, dijaliza seruma prema EDTA nije utjecala na aktivnost GGT u serumu. Za razliku od EDTA heparin kao antikoagulans znatno smanjuje izmjerenu katalitičku koncentraciju GGT. Upravo se zato GGT određuje u serumu, a ne u plazmi.

GGT je niske specifičnosti što se tiče tipa aminokiseline, ali je to izrazito stereospecifičan enzim u pogledu supstrat-primatelja. Njegova stereospecifičnost prema supstratu davatelju nije izrazita, ali je bitno da davatelj posjeduje prenosivu γ -glutamil skupinu.

Kinetičkim studijem specifičnosti GGT prema različitim aminokiselinama (12,13) ustanovljeno je da se najviše katalitičke aktivnosti postižu uz glicilglicin kao supstrat-primatelja, dok je kao supstrat-davatelj izabran L- γ -glutamil-3-karboksi-4-nitroanilid zbog lake dostupnosti čistog L-stereoizomera te zbog njegove dobre topljivosti u puferiranom vodenom mediju.



Slika 3. Utjecaj pH na katalitičku koncentraciju GGT mjerenu u pet serumskih uzoraka. Izuzevši pH svi ostali uvjeti mjerenja odgovaraju optimalnim uvjetima.

Kao pufer analitičkog sustava dugo je bio u upotrebi Tris(hidroksimetil)aminometan, no pokazalo se da taj često korišteni pufer u biokemiji ima inhibitorno djelovanje na GGT, pa njegov utjecaj varira s promjenom

koncentracije enzima u ispitivanom serumu. Glicilglicin, supstrat-primatelj, može dobro puferirati analitički reakcijski sustav, jer je njegov pKa 8.21 kod 30°C, što je dovoljno blizu optimalnom pH enzimske reakcije. Optimalna koncentracija glicilglicina kao supstrata osigurava i dovoljan puferi kapacitet (Slika 3).

3. Optimalni uvjeti mjerenja

U Tablici 1 prikazani su optimirani reakcijski uvjeti za određivanje katalitičke koncentracije GGT u serumu ispitanika.

Tablica 1. Optimirani uvjeti za mjerenje

temperatura	30.0° C
pH (30° C)	7.9
L-γ-glutamyl-3-karboksi-4-nitroanilid	6 mmol/l
Glicilglicin	150 mmol/l
Volumni udio seruma	0,091 (1:11)

4. Oprema

Za izvođenje mjerenja potreban je spektrofotometar za točno mjerenje apsorbancije kod 410 nm snabdjeven termostatisanim pretincem za kivete. Specifikacija opreme mora odgovarati preporukama u pogledu širine snopa, duljine svjetlosnog puta i točnosti temperaturne kontrole (14).

5. Reagencije

1. L- γ -glutamyl-3-karboksi-4-nitroanilid, monoamonijeva sol, monohidrat, $C_{12}H_{12}N_3O_7 \cdot NH_4 \cdot H_2O$, Mr 346.30,
2. N-glicilglicin, slobodna baza, $C_4H_8N_2O_3$, Mr 132.12,
3. 5-amino-2-nitrobenzojeva kiselina, $C_7H_6N_2O_4$, Mr 182.13,
4. Natrij klorid, NaCl, Mr 58.45

6. Čistoća reagencija

Specifikacija čistoće reagencija opisana je u posebnom dodatku publikaciji i treba se doslovce pridržavati svih preporuka koje se tiču čistoće reagencija (14).

L- γ -glutamyl-3-karboksi-4-nitroanilid:

U optimiranoj reakciji koristi se čisti L-stereoizomer jer je djelotvornost enzima uz D-stereoizomer samo 30% djelotvornosti uz L-oblik supstrata. Prisutnost D-izomera stoga umanjuje izmjerenu aktivnost enzima. Ostali mogući zagađivači ovog supstrata su L-alfa-glutamyl-3-karboksi-4-nitroanilid i 5-amino-2-benzojeva kiselina. Oni neznatno inhibiraju aktivnost enzima ali mogu doprinijeti visokoj apsorbciji slijepe probe, a uz to smanjuju stvarnu odvagu L- γ -glutamyl-3-karboksi-4-nitroanilida. U preporučenoj referentnoj metodi smiju se upotrebljavati pripravci L- γ -glutamyl-3-karboksi-4-nitroanilida s manje od 0.005 težinskog udjela L-alfa-glutamyl-3-karboksi-4-nitroanilida i manje od 0.001 težinskog udjela 5-amino-2-nitrobenzojeve kiseline.

N-glicilglicin

Pripravci glicilglicina mogu biti onečišćeni glicinom, koji je inhibitor GGT (1,9). Pripravci glicilglicina s manje od 0.001 težinskog udjela glicina

prihvatljivi su za upotrebu u preporučenoj metodi.

7. Priprava otopina

Posude za otopine treba prije upotrebe sterilizirati kako bi se spriječio rast mikroorganizama. Sve otopine priređuju se u odmjernim tikvicama s destiliranom vodom analitičke čistoće. pH matične otopine glicilglicina podešava se na 30°C uz pomoć pH metra kalibriranog standardnim referentnim puferima.

I. N-glicilglicin (183.3 mmol/l, pH 7.90 kod 30°C):

Otopi 24.22 g glicilglicina u približno 800 ml vode, podesi pH na 7.90 kod 30°C dodatkom NaOH (2 mol/l); podesi zatim temperaturu u posudi na kalibracijsku temperaturu i nadopuni do 1000 ml vodom.

II. L- γ -glutamyl-3-karboksi-4-nitroanilid (66 mmol/l):

Otopi 2.286 g L- γ -glutamyl-3-karboksi-4-nitroanilida (monoamonijeva sol, monohidrat) u vodi i razrijedi do 100.0 ml.

III. Reakcijska otopina L- γ -glutamyl-3-karboksi-4-nitroanilida, (6.6 mmol/l) i glicilglicina (165 mmol/l), pH 7.90 (30°C)

Pomiješaj 10 ml otopine L- γ -glutamyl-3-karboksi-4-nitroanilida (II) s 90 ml otopine glicilglicina (I). Apsorbancija ove otopine mjerena kod 410 nm prema vodi ne smije prelaziti 0.500.

IV. Reakcijska otopina glicilglicina (165 mmol/l), pH 7.90 (30°C)

Pomiješaj 10 ml vode s 90 ml otopine glicilglicina (I).

V. Natrij klorid (154 mmol/l)

Otopi 0.9 g natrij klorida u 100 ml vode.

8. Postojanost otopina

Otopine I i II treba pohraniti u hladnjaku na $+4^{\circ}\text{C}$ ili u zamrzivaču na -20°C (ili -80°C). Stabilnost reakcijske otopine III koja se priprema miješanjem otopina I i II traje najviše 1 mjesec na $+4^{\circ}\text{C}$ odnosno 9 mjeseci na -20°C (ili -80°C). Do kvarenja otopina dolazi zbog bakterijske kontaminacije na sobnoj temperaturi (20 - 25°C). Što više, na sobnoj temperaturi uslijed spontane hidrolize L- γ -glutamyl-3-karboksi-4-nitroanilida (otopina II) dolazi do porasta apsorbancije kod 410 nm . Nakon 5 dana stajanja na sobnoj temperaturi apsorbancija poraste za 0.3 . Brzina spontane hidrolize u otopini II čak je veća nego u reakcijskoj otopini III na sobnoj temperaturi.

9. Uzorak (uzimanje, rukovanje i pohranjivanje)

Venska krv se prikuplja uz minimalnu stazu. Serum se odvoji nakon centrifugiranja krvi u trajanju od 10 minuta pri 1000 g . Ne preporuča se upotreba plazme.

Kod $+4^{\circ}\text{C}$ GGT u serumu stabilna je najmanje 5 dana ili 9 mjeseci na -80°C .

10. Mjerenje

10.1. Uvjeti mjerenja

Valna duljina: 410 nm ($\pm 1\text{ nm}$)

Duljina svjetlosnog puta: 10.0 mm $\pm 0.01\text{ mm}$

Konačni volumen reakcijske smjese: 2.20 ml

Temperatura: $30 \pm 0.05^{\circ}\text{C}$ (u termostatisiranom pretincu za kivete)

10.2. Rukovanje otopinama

Prije pipetiranja temperaturu otopina s reagensima i uzorka treba dovesti na kalibracijsku temperaturu pipeta.

Za vrijeme inkubacije otopine u kivetama moraju doseći temperaturu od 30°C prije otpočinjanja reakcije dodatkom uzorka.

10.3. Postupci od kojih se sastoji jedno mjerenje

Tablica 2. Dvije reakcijske smjese (A i B) potrebne su za jedno mjerenje brzine reakcije GGT

Vrsta reakcije	Uzorak	Reagens
(A) Ukupna reakcija	Serum	Otopina III
(B) Reakcija slijepe probe reagensa	Otopina V	Otopina III

Tablica 3. Analitički sustav za mjerenje ukupne brzine reakcije GGT

Pipetiraj u kivete	Volumen (ml)	Sadržaj konačne reakcijske smjese
Reakcijska smjesa III	2.00	L- γ -glutamil-3-karboksi-4-nitroanilid 6 mmol/l Glicilglicin 150 mmol/l
Serum	0.20	volumni udio 0.091 (1:11) (1+10)
Pomiješaj serum i otopinu III nakon što je poprimila temperaturu od 30°C. Zatim kontinuirano prati promjenu apsorbancije u trajanju od najmanje 300 s.		

10.4. Trajanje mjerenja

Vrijednosti ($\Delta A/\Delta t$) za ukupnu reakciju GGT stalne su za vrijeme od barem 300 sekundi kod seruma s katalitičkom koncentracijom GGT do 5 ukat/l. Ako je vrijednost ($\Delta A/\Delta t$) veća od 0.215 u minuti, tada uzorak treba razrijediti 5 do 10 puta otopinom natrij klorida (otopina V) i ponoviti mjerenje.

Trajanje promatranja brzine reakcije u slijepim probama neka je isto kao za ukupnu reakciju.

10.5. Korekcije za reakcije slijepih probi

Ukupna brzina reakcije GGT (A) korigira se za reakciju slijepe probe reagensa (B). Korigirana vrijednost iznosi:

$$(\Delta A/\Delta t)_{\text{korigirano}} = (\Delta A/\Delta t)_A - (\Delta A/\Delta t)_B$$

Oznake A i B upućuju na sastav reakcijskih smjesa prikazanih u Tablici 2.

Korigirana vrijednost ($\Delta A/\Delta t$)_{korigirano} odgovara početnoj brzini konverzije koju katalizira GGT i ta se vrijednost koristi u daljnjem računu.

Reakcija slijepe probe reagensa je vrlo mala (uslijed autohidrolize L- γ -glutamil-3-karboksi-4-nitroanilida) i može iznositi 0.0002-0.0005 $A_{410\text{nm}}$ u minuti na 30°C.

Priprema slijepe probe seruma nije uvijek potrebna jer je nađeno da je najčešće jednaka nuli. U pojedinačnim slučajevima priprema slijepe probe seruma može se učiniti prema propisu u Tablici 3 tako da se umjesto 2.00 ml otopine III pipetira otopina IV. Vrijednost ($\Delta A/\Delta t$) za slijepe probe seruma oduzme se od korigirane vrijednosti ukupne brzine konverzije.

11. Računska obrada

Katalitička koncentracija enzima (b) računa se prema sljedećem izrazu:

$$b = \frac{V}{e \times l \times v} \times (\Delta A / \Delta t)_{\text{korigirano}}, \text{ kat/l}$$

gdje je V volumen reakcijske smjese (l), v je volumen uzorka (l), t je reakcijsko vrijeme (s), e je molarni apsorpcijski koeficijent ($\text{m}^2\text{mol}^{-1}$) 5-amino-2-nitrobenzoata, l je duljina svjetlosnog puta kroz kivetu (mm).

Vrijednost molarnog apsorpcijskog koeficijenta za 5-amino-2-nitrobenzoat na 410 nm u uvjetima IFCC metode je

$$e_{410\text{nm}} (30^\circ\text{C}) = 790.8 \text{ m}^2\text{mol}^{-1}$$

Izračunavanje katalitičke koncentracije (b) na temelju mjerenja kod valne duljine od 410 nm izvodi se uvrštavanjem odgovarajućih vrijednosti u izraz za (b):

$$\begin{aligned} b &= \frac{2.2 \times 10^{-3}}{7.908 \times 10^2 \times 10 \times 0.2 \times 10^{-3}} \times (\Delta A / \Delta t)_{\text{korigirano}}, \text{ kat/l} = \\ &= 1.391 \times 10^{-3} \times (\Delta A / \Delta t)_{\text{korigirano}}, \text{ kat/l} \\ &= 1.391 \times 10^3 \times (\Delta A / \Delta t)_{\text{korigirano}}, \mu\text{kat/l} \end{aligned}$$

12. Analitička varijabilnost

Kratkoročna laboratorijska nepreciznost

Za dvadeset puta uzastopno ponovljena mjerenja u uzorku katalitičke koncentracije GGT od 260 nkat/l izračunata relativna standardna devijacija (koeficijent varijacije) iznosi 0.016 (10).

Dugoročna laboratorijska nepreciznost

Dugoročna nepreciznost procijenjena je u vremenu od približno devet mjeseci na temelju 16 određivanja katalitičke koncentracije enzima u uzorcima humanog seruma (670 i 2330 nkat/l). Relativne standardne devijacije iznosile su 0.029 i 0.021 za humane uzorke. Na temelju određivanja katalitičke koncentracije enzima (270 nkat/l) u rekonstituiranom liofiliziranom poredbenom materijalu humanog porijekla (SRM 909 iz Nacionalnog ureda za standarde), izmjerena je relativna standardna devijacija od 0.054 (5 laboratorija, n=200)(15).

Međulaboratorijska nepreciznost

Međulaboratorijski nadzor valjanosti rada u Republici Hrvatskoj pokazao je na uzorku od 6 laboratorija koji sudjeluju u nadzoru, a koriste IFCC metodu za određivanje katalitičke koncentracije GGT, relativnu standardnu devijaciju od 0.1249. Aktivnost ispitivanog kontrolnog seruma bila je 689 nkat/l (16).

13. Referentne vrijednosti

Preliminarne granice referentnih vrijednosti za katalitičku koncentraciju GGT u serumu zdravih muških osoba (19-78 godina starosti) su 200-920 nkat/l.

U našim laboratorijima smatra se da raspon vrijednosti kod zdravih osoba leži između 120 i 630 nkat/l (muški) odnosno 80 i 400 nkat/l (žene), što je utvrđeno na temelju odgovarajućih mjerenja kod 5000 zdravih ispitanika zagrebačke regije (17).

LITERATURA

1. Stromme JH, Theodorsen L. Gamma-glutamyltransferase: substrate inhibition, kinetic mechanism and assay conditions. *Clin Chem* 1976; 22:417-421.
2. Rosalky SB. Lack of significant inhibition by 4-nitroaniline liberated in GGT assay. *Clin Chem* 1977; 23:147-148.
3. Schiele F, Arthur Y, Baergel D, Petitclerc C, Siest G. Measurement of plasma GGT in clinical chemistry: Kinetic basis and standardisation propositions. *Clin Chem* 1981; 112:187-195.
4. Floegel M, Žanić-Grubišić T. Gamma-glutamyltransferase: Kinetic properties and Factors influencing the measured activity. *Jugoslav med biokem* 1982; 1:31-37.
5. Shaw LM, London JW, Fetterolf D, Garfinkel D. Gama-glutamyltransferase: kinetic properties and assay conditions when gama-glutamyl-4-nitroanilide and its 3-carboxy derivat are used as donor substrates. *Clin Chem* 1977; 23:79-85.
6. Solberg HE, Theodorsen L. i Stromme JH. Gama-glutamyltransferase in human serum: an analysis of kinetic models. *Clin Chem* 1981; 27: 303-307.
7. Orłowski M, Meister A. Gama-glutamyl-p-nitroanilide; A new convenient substrate for determination and study of L- and D-glutamyltranspeptidase activities. *Biochem Biophys Acta* 1969; 73: 679-681.
8. Szasz G. A kinetic photometric method for serum gama-glutamyltranspeptidase. *Clin Chem* 1969; 15:124-135.
9. Persijn JP, Van der Slyk W. A new method for the determination of gama-glutamyltransferase in serum. *J Clin Chem Clin Biochem* 1976; 14:421-427.
10. Shaw LM, Stromme JH, London JL, Theodorsen L. IFCC Methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 4. IFCC Method for Gamma-glutamyltransferase. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983; 21:633-644.

11. Shaw LM, and Newman DA. Hydrolysis of glutathion by human liver GGT. Clin Chem 1979; 25:75-79.
12. Thompson GA, Meister A. Interrelationship between the binding sites for amino acids, dipeptides and GGT. J Biol Chem 1977; 252: 6792-6798.
13. Tate SS, Meister A. Interaction of GGT with amino acids dipeptides and derivatives and analogs of glutathione. J Biol Chem 1974; 249: 7953-7602.
14. Floegel M. Juretić D. IFCC metode za mjerenje katalitičkih koncentracija enzima. I dio. Glas HDMB, 1992; 2:9-22.
15. Bowers GN, Alvarez R, Cali JP, Eberhardt KR, Reeder DJ, Schaffer R, Uriano GA, Elser R, Ewen LM, McComb RB, Rej R, Shaw LM. The measurement of the catalytic (activity) concentration of seven enzymes in NBS human serum SRM 909, NBS special publication, 1983; 260-283.
16. Juretić D, Čepelak I. Nazor A. Izvještaj III stručnog interlaboratorijskog nadzora u Republici Hrvatskoj za 1992., Zavod za medicinsku biokemiju FBF-a Sveučilišta u Zagrebu, 1992.
17. Albert-Šubić N. Tadej D. Referentne vrijednosti klinički relevantnih sastojaka krvi i seruma. Zagreb: Školska knjiga, 1990: 323.