

## Tranzamináz-aktivitás mérése alkoholos kálilug nélkül

Írta: **Dávid Gábor** dr. orvosalezredes és **Gyarmati László** dr. gyógyszerész-százados

A tranzamináz-aktivitás meghatározása az utóbbi években a klinikai laboratóriumi diagnosztika rutin feladatává vált. Számos hazai (2,10) és külföldi szerző (1, 2 hivatkozásait) szerint differenciáldiagnosztikai jelentőségű, részben máj-parenchima léziókban, részben pedig szívinfarktusokban.

Az eredeti *Karmen—Wroblewski—La Due* (6, 8, 9) féle módszer a kórházi laboratóriumok részére költséges és eszközigényes. Szellemes megoldást közölt *Dubach* (4, 5), aki a tranzamináz-aktivitást piroszöllősav-fenilhidrazon alapon mérte, mégpedig a fenilhidrazonok azon tulajdonságát használva fel, hogy lúgos közegben közönséges fotométerrel is mérhető színeződést adnak. A piroszöllősav dinitrofenilhidrazonját először toluolba rázza át, majd pedig innen alkoholos kálilúggal extrahálja. Ennek a módszernek a hátránya tehát a kétszeres kirázás — ami nehézkessé teszi —, másrészt oldószer-igényessége, ugyanis sem az alkoholt, sem pedig a toluolt tisztán visszanyerni nem lehet. Ez pedig széria-vizsgálatoknál jelentős költséghatással jár, továbbá az alkoholos kálilug hosszabb ideig nem tárolható.

Ezért e módszer alkalmazása során ezen utóbbi nehézségeket kívántuk kiküszöbölni. *Koepsell* és *Sharpe* (7) a hidrazonnak a toluolból történő kivonására vizes alkalikus oldatokat használt és a mérést 3 különböző hullámhosszon végezte és 3 szimultán egyenletből számította ki a piroszöllősav, illetve a még feleslegben levő ketoglutársav mennyiségét. *Dubach*, *Koepsell* és *Sharpe* módszerének alapján olyan eljárást dolgoztunk ki, melynek segítségével a módszer lényegesen egyszerűsíthető azáltal, hogy a kirázásokat követő nem elegyedő fázisok leválasztását egyszerűsítettük és az alkoholos kálilug alkalmazását kiküszöböltük.

### A módszer leírása:

#### A) Szükséges reagensek:

##### 1. oldat:

dl-aszparaginsav .....	2,66 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	2,00 g
$\alpha$ -ketoglutársav .....	0,60 g

A három anyagot 1 n kálilúgban feloldjuk és 7,4 PH-ra beállítjuk, és 100 ml-re feltöltjük.

##### 2. oldat:

110 g triklórecetsavat 100 ml-re töltjük fel desztillált vízzel.

##### 3. oldat:

5 g citromsavat 5 ml desztillált vízben oldunk és hozzáadunk 5 ml anilint.

##### 4. oldat:

100 mg 2—4-dinitrofenilhidrazint 20 ml koncentrált sósavban oldunk, hozzáadunk 80 ml desztillált vizet. Szűrjük.

##### 5. oldat:

Toluol, vízzel telített.

##### 6. oldat:

5%-os káliumhidrokarbonát oldat

##### 7. oldat:

10%-os nátriumhidroxid oldat.

### B) Kivitelezés:

0,1—0,2 ml savóhoz hozzáadunk 0,5 ml 1. oldatot (szubsztrát). Pontosan 20 percig 25 fok C-on ( $\pm 1$  fok C) inkubáljuk. 20 perc után a reakciót leállítjuk 2 csepp 2. oldattal. Egyidejűleg hozzáadjuk a 3. oldat 2 cseppjét is. 20 perc állás után 1 ml 4. oldatot adunk hozzá és *pontosan* 5 perc múlva 2 ml vízzel telített toluollal kirázzuk és a fázisok elválásának gyorsítása végett centrifugáljuk. Ezután a toluolos fázis 0,4 ml alikvotját 5 ml 5 százalékos  $\text{KHCO}_3$  oldattal (6. oldat) rázzuk össze és szükség szerint centrifugáljuk. A toluolos fázist pálcikára csavart vatta-tamponnal leitatjuk. A káliumhidrokarbonátos oldat 4 ml-es alikvotjához 1 ml 7. oldatot adunk és pontosan 10 perc ( $\pm 1$  perc) múlva (3) mérjük S—53 szűrőn 50 mm-es kis küvetében, vak oldattal szemben. (A vak-oldat előállítása: a vizsgálatival azonos mennyiségű savóhoz a szubsztrát (1. oldat) hozzáadásával egyidejűleg az enzimaktivitás felfüggesztésére 2 csepp 2. oldatot adunk. A továbbiakban ugyanúgy járunk el, mint a vizsgálati anyaggal.)

### C) Értékelés:

Ismert különböző töménységű piroszöllősav oldatokkal a fenti eljárás szerint felvett kalibrációs görbe szerint történik. Egységnyi aktivitással rendelkezik az a savó, melynek 1 ml-e 20 perc alatt 25 fok C-on ezen eljárás szerint 1  $\mu\text{g}$  piroszöllősavat képez.

### D) Megjegyzés:

A fent leírt módszer a S—GOT meghatározására alkalmas, a S—GPT meghatározása ugyanezzel az eljárással lehetséges, ebben az esetben az 1. oldat (szubsztrát) összetétele: alanin és  $\alpha$ -ketoglutarát ekvimoláris oldata. Tekintve, hogy ekkor közvetlenül piroszöllősav keletkezik, a 3. oldat alkalmazása felesleges (11).

### Megbeszélés:

A módszer megbízhatóságát ellenőrizendően ismert mennyiségű, illetve töménységű piroszöllősav oldatokkal kalibrációs görbéket vettünk fel, úgyhogy

1. számú táblázat

Bemért piroszöllősav $\mu\text{g}$ -ban	MÉRT EXTINKCIÓK				
	I.	II.	III.	IV.	V.
20	0,16	0,18	0,17	0,16	0,15
40	0,27	0,27	0,26	0,27	0,25
60	0,37	0,36	0,37	0,36	0,35
80	—	0,46	0,46	0,47	0,45
120	0,64	0,66	0,67	0,64	0,65
160	—	0,87	0,90	0,86	0,88

a fent leírt eljárást teljes mértékben végigvittük. Eredményeinket az 1. számú táblázat tünteti fel. (Táblázatunkban minden egyes adat 3 mérés középértékét jelzi.)

Miután így a módszer megbízhatóságáról meggyőződünk, ellenőriztük a módszer reprodukálhatóságát különböző ismeretlen aktivitású szérumokkal, egyrészt úgy, hogy azonos szérumokból több párhuzamos vizsgálatot végeztünk, különböző mennyiségeket használva, másrészt pedig úgy, hogy a szérumokhoz ismert mennyiségű piroszöllősavat adtunk.

Eredményeinket a 2. és 3. sz. táblázat tünteti fel.

A táblázatokból látható, hogy az általunk kidolgozott eljárás a rutin klinikai laboratóriumi diagnosztika igényeit kielégíti és lényeges egyszerűsítést

2. számú táblázat

sor-száma	Savó		Extinkció	Mért piroszöllősav $\mu\text{g}$	Tranzamináz Egység
	mennyisége ml				
1.	0,5		0,20	28	56
	0,5		0,17	25	50
	0,2		0,10	10	50
2.	0,5		0,11	11	22
	0,2		0,08	5	25
	0,2		0,07	4	20
3.	0,5		0,24	39	72
	0,2		0,13	14	70
	0,2		0,12	13	65

3. számú táblázat

Savó mennyisége ml	Eredeti piroszöllősav $\mu\text{g}$	Hozzáadott $\mu\text{g}$ piroszöllősav	Összesen mért piroszöllősav $\mu\text{g}$	Eltérés	
				$\mu\text{g}$ -ban	$\Delta$ %-ban
0,5	30	40	72	+2	+2,8
0,2	10	60	76	+6	+7,9
0,5	13	20	37	+4	+10,7
0,2	5	40	47	+4	+8,5
0,2	8	40	48	$\pm 0$	$\pm 0$
0,5	34	20	60	+6	+10,0
0,5	34	20	52	-2	-3,9
0,2	10	20	28	-2	-7,2
0,5	112	20	130	-8	-3,2

jelent. Természetesen az oldószerek és a kivonó folyadékok mennyiségének és a kiemelt alikvotok változtatása útján a módszer érzékenységet növelni és a szükséges savó mennyiségét pedig csökkenteni lehet.

### Összefoglalás:

Szerzők ismertetik egyszerűbb tranzamináz-aktivitás meghatározási módszerüket, melynek előnye az általában elterjedt módszerekkel szemben az, hogy az alkoholos kálilug helyett vizes oldatokat használnak.

### IRODALOM:

1. *Aspen A. J.—Meister A.*: Methods of Biochem. Analysis. Vol.: VI, 131, 1958.
2. *Braun P.—Horváth I.*: O. H. 99:1210, 1958.
3. *Dávid G.—Gyarmati L.*: O. H. 100:774, 1959.
4. *Dubach U. C.*: Schw. Med. Wschr. 87:185, 1957.
5. *Dubach U. C.*: Triangel. 3:234, 1958.
6. *Karmen A.—Wroblewski F.—La Due J. S.*: Journ. Clin. Invest. 34:126, 1955.
7. *Koepsell H. J.—Sharpe E. S.*: Arch. Biochem. Biophys. 38:443, 1952.
8. *La Due J. S.—Wroblewski F.*: Circulation. 11:871, 1955.
9. *La Due J. S.—Wroblewski F.—Karmen A.*: Science. 120:497, 1954.
10. *Tényi M.*: O. H. 99:1207, 1958.
11. *Umbreit W. W.—Kinsley G. R.—Shaffert R. R.—Siplet H. J.*: Laborat. Clin. Med. 49:454, 1957.

Köszönetünket fejezzük ki *Erdei Mártonné* tud. munkaerőnek a vizsgálatok elvégzésében nyújtott segítségért.

Подполковник мед. службы д-р Г. Давид, капитан фарм. службы д-р Л. Дьярмати:

### ИЗМЕРЕНИЕ ТРАНСАМИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ БЕЗ СПИРТОВОГО РАСТВОРА ЕДКОГО КАЛИЯ

Авторы описывают более простой метод определения трансаминазной активности. Преимущество метода заключается в том, что вместо широко распространенного использования спиртового раствора едкого калия применяют водные растворы.

*Dr. G. Dávid*, Oberstl. d. San., *Dr. L. Gyarmati*, Apoth.-Hauptm.:

### BESTIMMUNG DER TRANSAMINASE-AKTIVITÄT OHNE ALKOHOLISCHE KALILAUGE

Verfasser veröffentlichen eine einfache Transaminase-Aktivitätsbestimmungsmethode, deren Vorteil gegen die allgemein verbreiteten Methoden besteht darin, dass statt alkoholische Kalilauge wässrige Lösungen benützt werden.