

Bestimmung der γ -Glutamyltransferase mit einem gut löslichen Substrat

B. Müller-Wiegand

Forschungslaboratorien der Behringwerke AG, Marburg/Lahn

Zusammenfassung:

Die Methode fußt auf der Verwendung des weit verbreiteten Substrats γ -Glutamyl-4-nitranilid, dessen schlechte Löslichkeit bei pH-Wert 8,2 und 25°C durch die Anwendung des Hydrochlorids beseitigt werden konnte. Die Stabilität des Reagenzes ist so gut, daß die Originalpackung bei Raumtemperatur gelagert werden kann. Das rekonstituierte Reagenz ist bei 20 bis 25°C 5 Tage stabil. Die Korrelation mit Reagenzien, die γ -Glutamyl-3-carboxy-4-nitranilid als Substrat einsetzen, ist ausgezeichnet. Während für Humanserum gut vergleichbare Ergebnisse zwischen beiden Methoden erhalten werden, können in Kontrollseren in Abhängigkeit von der Menge der dosierten γ -GT nicht-humanen Ursprungs Abweichungen bis zu 30% auftreten. Der Test wird durch Hämoglobin gestört, während für Bilirubin und Antikoagulantien kein Einfluß nachgewiesen werden konnte.

Schlüsselwörter:

γ -Glutamyltransferase – Bestimmungsmethode – γ -Glutamyl-4-nitranilid – Kontrollseren

Summary:

The method is based on the application of the substrate gamma glutamyl 4-nitranilide. The known bad solubility of this substrate at pH 8.2 and 25°C is eliminated by use of the hydrochloride. The stability of this reagent allows storage of the original pack at room temperature. The reconstituted reagent can be stored for 5 days at +20 to +25°C. The correlation is excellent with reagents which utilize gamma glutamyl 3-carboxy 4-nitranilide. Both methods yield comparable results for human sera, while differences of up to 30% arise in control sera depending on the amount of spiked gamma GT of non-human origin. Hemoglobin interferes with the assay. No interference by bilirubin and various anticoagulants is seen.

Keywords:

Gamma glutamyltransferase – assay method – gamma glutamyl 4-nitranilide – control sera

Einleitung

Die Bestimmung der γ -Glutamyltransferase (γ -GT) zählt zu den Routinebestimmungen im klinisch-chemischen Labor. Die von Szasz ursprünglich entwickelte Methode (1) mit γ -Glutamyl-p-nitranilid (Glupa) als Substrat fand weite Verbreitung, zeigt jedoch auf Grund der schlechten Löslichkeit Einschränkungen bezüglich der Praktikabilität. Das Substrat muß entweder mit Salzsäure vorgelöst und anschließend auf den gewünschten pH-Wert eingestellt oder zunächst auf 40 bis 60°C erwärmt und anschließend auf die gewünschte Reaktionstemperatur abgekühlt werden. Es wurde daher ein gut lösliches Substrat, das γ -Glutamyl-3-carboxy-4-nitranilid (Carboxy-Glupa), entwickelt (2), dessen allgemeine Verwendung jedoch durch ein Patent (3) limitiert ist.

Durch die Synthetisierung des Hydrochlorids konnten wir die Löslichkeit des Substrats Glupa so weit verbessern, daß es in der praktischen Anwendung dem Carboxy-Glupa ebenbürtig ist. Außerdem konnte die Stabilität so weit verbessert werden, daß das Reagenz bei Raumtemperatur gelagert werden kann.

Methoden

Das γ -GT-Reagenz enthält folgende Substanzen: 60 mmol/l Glycylglycin, 185 mmol/l Tris-Puffer (pH-Wert 8,25), 3,3 mmol/l L- γ -Glutamyl-p-nitranilid. Die

Konzentrationsangaben beziehen sich auf den Test (Probevolumen inbegriffen).

Für die Herstellung des Hydrochlorids wird das γ -Glutamyl-4-nitranilid mit Salzsäure auf pH-Wert 2,3 eingestellt und zusammen mit Stabilisatoren lyophilisiert. Die unabhängig vom Substrat hergestellte Tris-Pufferlösung wird auf pH-Wert 9,5 eingestellt. Nach dem Auflösen des Lyophilisats mit dem Puffer stellt sich der für den Test erforderliche pH-Wert von 8,2 ein.

Die Enzymreaktion wird durch die Zugabe der Probe gestartet (1000 μ l Reagenz + 100 μ l Probe). Der Berechnungsfaktor zur Umrechnung von $\Delta E/\text{min}$ in U/l beträgt unter diesen Bedingungen 1111.

Als γ -GT-Reagenzien mit Carboxy-Glupa als Substrat wurden handelsübliche Testpackungen eingesetzt.

Ergebnisse

Löslichkeit

Das lyophilisierte Hydrochlorid des γ -Glutamyl-p-nitranilids löst sich nach Zugabe des Puffers innerhalb weniger Minuten quantitativ auf, wenn die Temperatur der Lösung 20°C nicht unterschreitet (Tab. 1). Das gelöste Substrat bleibt bei Temperaturen oberhalb 20°C in Lösung. Bei einer Erniedrigung von einigen Stunden auf Kühlschrank-

temperatur ist noch keine Ausfällung zu beobachten. Diese setzt erst nach mehr als 9 Std. ein. Ein evtl. vorhandener geringer Niederschlag löst sich bei +25°C bereits nach 5 min quantitativ auf.

Reagenzstabilität

Das gelöste Reagenz ist bei +22°C 6 Tage haltbar (Abb. 1). Bei +30°C reduziert sich die Haltbarkeit auf 3 Tage und bei +37°C auf ca. 2 Tage.

Linearität

Ein Extinktion/Zeit-Diagramm ist in Abb. 2 für 2 Humansen verschiedenen Aktivitäten wiedergegeben. Die Linearität der Kinetik erstreckt sich über mindestens 5 min.

Präzision

Die Präzision in Serie und von Tag zu Tag ist in Tab. 2 dargestellt. Sie ist erwartungsgemäß in Serie besser als von Tag zu Tag.

Richtigkeit

Die Ergebnisse dieser Methode wurden mit denjenigen für die Methode in Carboxy-Glupa als Substrat korreliert (Abb. 3). Aus der Regressionsgleichung $y = 1,02x - 3$ geht die gute Vergleichbarkeit beider Methoden und aus dem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,996$ die ausgezeichnete Korrelation hervor.

Während für Humansen beide Methoden gut vergleichbar sind, gibt es für Kontrollseren mehr oder weniger starke Abweichungen (Tab. 3). Ursache dafür ist die Dosierung von nicht-humaner γ -GT (in vielen Fällen aus Rinderniere) beim Aufstocken der Kontrollseren. Der Grad der Abweichung zwischen beiden Methoden hängt dann von der Relation humaner zu nicht-humaner γ -GT ab. Bei nahezu ausschließlichem Anteil an nicht-humaner γ -GT ist die Aktivität mit Glupa um ca. 30% höher als jene mit Carboxy-Glupa, während bei ausbleibender γ -GT-Dosierung gut vergleichbare Ergebnisse für beide Methoden erhalten werden.

Tab. 1: Löslichkeit des Glupa (3,6 mmol/l) in Abhängigkeit von der Lagertemperatur

Lagertemperatur in Grad Celsius	Niederschlag nach 17–19 Std. Lagerung
18	stark
19	schwach
20	nein
21	nein
22	nein

% der Ausgangsaktivität

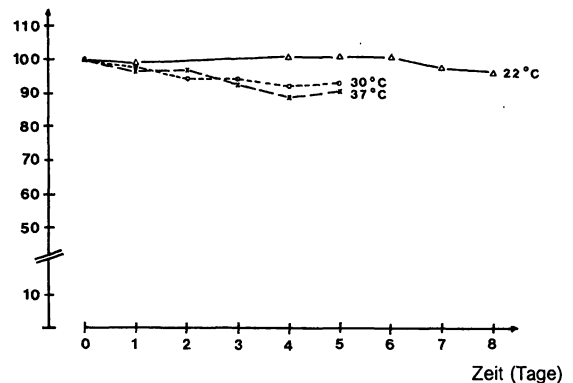


Abb. 1: Stabilität des gelösten Reagenzes bei 22°C (Δ — Δ), bei 30°C ($\circ$ — $\circ$) und bei 37°C ($\times$ — $\times$). Die angegebenen Aktivitäten sind Mittelwerte aus 5fach Bestimmungen. Als Probe wurde Kontrolllogen®-LP, Kenn-Nr. 3206 für die Stabilitätsprüfungen bei 22°C und Kenn-Nr. 3204 für 30 und 37°C verwendet

Extinktion

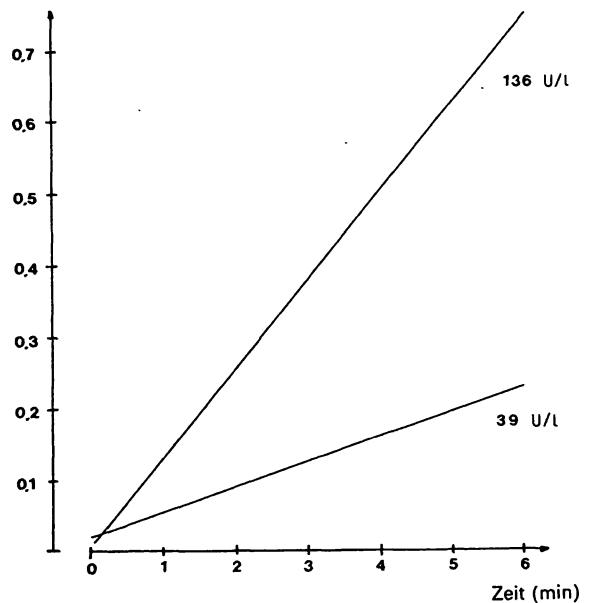


Abb. 2: Reaktionskinetiken für Humansen unterschiedlicher Aktivität

Tab. 2: Präzision der Methode mit Kontrollseren verschiedener Aktivität

Art der Präzision	Probe	N	$\bar{x}$ U/l	s U/l	VK %
in Serie	Kontrolllogen®-L, Kenn-Nr. 623121	24	35,9	0,380	1,06
in Serie	Kontrolllogen®-LP, Kenn-Nr. 623204	24	80,7	1,344	1,7
von Tag zu Tag	Kontrolllogen®-LP, Kenn-Nr. 623204	15	81,2	2,55	3,1

Tab. 3: Vergleich der Sollwertangaben für Testomar®-γ-GT plus mit denjenigen für Carboxy-Glupa als Substrat

Probe	Sollwerte (U/l) für		Prozentuale Aktivität mit Testomar®-γ-GT plus bezogen auf Carboxy-Glupa	Herkunft der γ-GT (U/l) im Kontrollserum	
	Testomar®-γ-GT plus	Carboxy-Glupa als Substrat		human, endogen	Rinderniere
Kontrollogen®-L, Kenn-Nr. 623117	35	36,5	96	38	0
Kontrollogen®-L, Kenn-Nr. 623114	29	27,5	105	20	13
Kontrollogen®-L, Kenn-Nr. 623118	34	32,5	105	31	5
Kontrollogen®-L, Kenn-Nr. 623119	35	29,5	119	13	20
Versuchsscharge 20	66	56	120	34	29
Versuchsscharge 21	149	118	126	34	98
Versuchsscharge 79	247	189	130	16	178
Kontrollogen®-LP, Kenn-Nr. 623205	124	96	129	42	80
Kontrollogen®-LP, Kenn-Nr. 623207	119	87	137	14	119

Tab. 4: Einfluß verschiedener Antikoagulantien auf die γ-GT-Aktivität mit Glupa als Substrat

Antikoagulantien	prozentuale Aktivität bezogen auf Serum ohne Zusatz (137 U/l)
Heparin, Natriumsalz 3 mg/ml	96
EDTA, Dikaliumsalz 4 mg/ml	100
Citrat, Trinatriumsalz 10 mg/ml	101
Natrium-Oxalat 4 mg/ml	99
Natriumfluorid 10 mg/ml	101

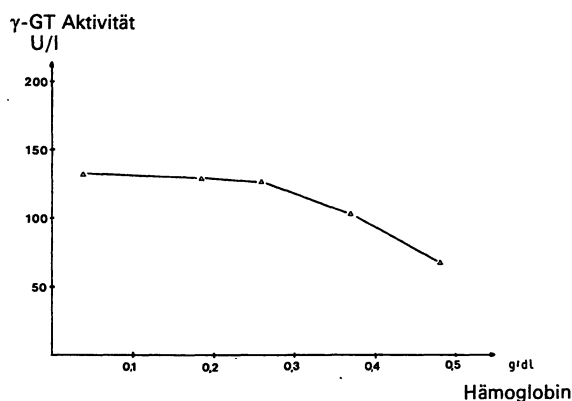


Abb. 4: Einfluß von Hämoglobin auf die γ-GT-Aktivität. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus 3fach Bestimmungen. Humanerythrozyten aus EDTA-Plasma wurden mit physiologischer Kochsalz-Lösung zweimal gewaschen, die sedimentierten Erythrozyten des 2. Waschschriffs mit dest. Wasser aufgenommen und durch zweimaliges Einfrieren (-20°C) und Auftauen lysiert. Zu einem Humanerum-Pool wurden zunehmende Volumina lysierter Erythrozyten gegeben und der Hämoglobingehalt und die γ-GT-Aktivität im Serum bestimmt

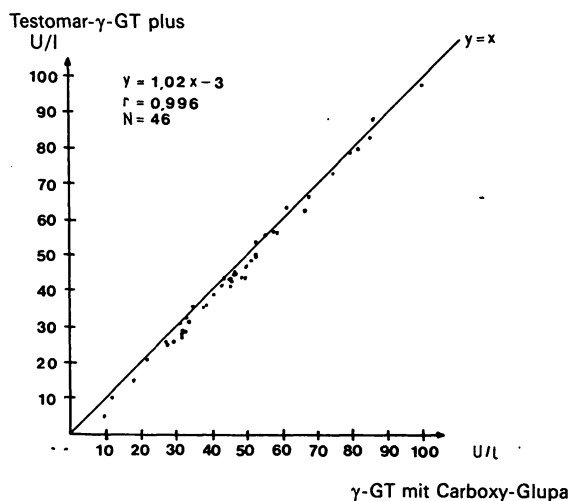


Abb. 3: Korrelation von Testomar®-γ-GT plus mit einer Methode, die Carboxy-Glupa als Substrat verwendet. Zur besseren Orientierung ist die Winkelhalbierende ($y = x$) eingezeichnet

Störungen

Hämolyse stört die γ-GT-Aktivität ab 0,2 g Hb/dl (Abb. 4), während für Bilirubin bis 20 mg/dl keine Störung festgestellt werden konnte.

Von allen untersuchten Antikoagulantien konnte selbst für stark erhöhte Konzentrationen keine Störung der γ-GT-Aktivität festgestellt werden (Tab. 4).

Diskussion

Die Löslichkeit des γ-GT-Reagenzes mit γ-Glutamyl-4-nitroanilid wurde durch die Verwendung des Hydrochlorids verbessert und zusätzlich eine hohe Haltbarkeit bei

Raumtemperatur erzielt. Das Reagenz löst sich in kurzer Zeit auf und ist bei Raumtemperaturlagerung 5 Tage stabil. Das nicht rekonstituierte Substrat ist so stabil, daß die Packung ohne Einschränkungen bei +15 bis +25°C gelagert werden kann.

Die Eigenschaften des gelösten Reagenzes unterscheiden sich im wesentlichen nicht von denen früherer Mitteilungen (1, 2, 4). Die Substratkonzentration von 3,3 mmol/l im Test wurde aus Praktikabilitätsgründen gewählt. Obwohl sie unterhalb der maximal möglichen Reaktionsgeschwindigkeit liegt, hat der Test eine ausreichend lange, lineare Reaktionskinetik (Abb. 2) und einen großen Meßbereich.

Außerdem werden an Humanseren gut übereinstimmende Ergebnisse im Vergleich zur Methode mit Carboxy-Glupa erzielt (Abb. 3). Als pH-Optimum wurde an Humanseren ein Wert von 8,2 ermittelt.

Bei entsprechender Zusammensetzung der Reagenzien für Glupa und Carboxy-Glupa wurden bereits von Adolph (5) praktisch die gleichen Ergebnisse in Humanseren gefunden. Dem steht das abweichende Verhalten in Kontrollseren gegenüber, in denen in Abhängigkeit von der Dosierung der γ -GT aus Rindernieren bis zu 30% höhere Werte für die Glupa-Methode auftreten können.

Auf diesen Befund wiesen vor kurzem auch Gorka und Häusler (6) hin, wobei die Abweichungen je nach Herkunft der dosierten γ -GT positiv, wie in unserem Beispiel, oder negativ sein können. Wenn keine γ -GT zugesetzt wird, sind die Ergebnisse ähnlich gut vergleichbar wie in nativen Humanseren. Konstante Faktoren für die Umrechnung der Ergebnisse von einer Methode in die andere sind auf Grund der Variabilität in Abhängigkeit von der Herkunft und von der Menge des zugesetzten Enzyms nicht anwendbar.

Auf Grund dieser zum Teil beträchtlichen Abweichungen ist es erforderlich, eigene Sollwerte für beide Methoden anzugeben. Auf die durch Hämoglobin beobachtete Stö-

rung wurde bereits früher (7) für die Methode mit Carboxy-Glupa hingewiesen. Bei einer Hämolyse von 0,2 g Hämoglobin/dl beträgt die Hemmung ca. 5%, so daß der Einfluß bis zu dieser Konzentration gering ist. Angaben in der Literatur (8-10) über eine Störung der γ -GT-Bestimmung durch Bilirubin sind widersprechend. Bei Einsatz von nicht glukuronisiertem, an Albumin gebundenem Bilirubin konnte selbst bei 20 mg Bilirubin/dl kein Einfluß beobachtet werden.

Schrifttum:

1. SZASZ, G.: A kinetic photometric method for serum γ -glutamyl transpeptidase. Clin. Chem. 15, 124-137 (1969).
2. SZASZ, G., PERSIJN, J. P., WEINMANN, G., STÄHLER, F., WAHLEFELD, A.-W.: New substrates for measuring γ -glutamyl transpeptidase activity. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 12, 228 (1974).
3. Deutsche Patentschrift Nr. 2259512, patentiert für BOEHRINGER MANNHEIM GmbH: γ -Glutamyl-4-nitranilid-3-carbonsäure, deren Salze, Verfahren zur Herstellung dieser Verbindungen und deren Verwendung.
4. SHAW, L. M., LONDON, J. W., FETTEROLF, D., GARFINKEL, D.: γ -Glutamyltransferase: Kinetic properties and assay conditions when γ -glutamyl-4-nitroanilide and its 3-carboxy derivative are used as donor substrates. Clin. Chem. 23, 79 (1977).
5. ADOLPH, L.: Neuer Test zur Bestimmung der γ -Glutamyltransferase. Ärztl. Lab. 22, 121-126 (1976).
6. GORKA, G., HÄUSLER, H.: Zur Problematik eines Sollwerts für verschiedene Bestimmungsmethoden der γ -Glutamyltransferase. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 21, 395-396 (1983).
7. PERSIJN, J. P., van der SLIK, W.: A new method for the determination of γ -glutamyltransferase im Serum. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 14, 421-427 (1976).
8. DICKSON, A. D., BECK, P. R.: γ -Glutamyltransferase activity and bilirubin concentration. Clin. Chem. 24, 723 (1978).
9. THEODORSEN, L., STRÖMME, J. H.: Inhibition of γ -glutamyltransferase: Influence of instrumental error. Clin. Chem. 24, 2215-2217 (1978).
10. FRASER, A. D.: Bilirubin inhibition of γ -glutamyltransferase on the DuPont aca. Clin. Chem. 25, 812 (1979).

Anschrift des Verfassers

Dr. Bruno Müller-Wiegand
Abt. Forschung Diagnostika
Behringwerke AG
Postfach 1140
D-3550 Marburg/Lahn 1

