

Opracowanie metody oznaczania aktywności pepsyny w soku żołądkowym

Development of method to assay pepsin activity in gastric juice

Anna Krywult¹, Michał Długaszek¹, Magdalena Szumska¹, Krystyna Tyrpień-Golder¹, Tomasz Wielkoszyński²

¹Katedra i Zakład Chemii, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

²Laboratorium Analityczno-Bakteriologiczne, Niepubliczny Zakład Opieki Zdrowotnej,
Zakład Pulmonologii w Tarnowskich Górach

STRESZCZENIE

WSTĘP: Celem niniejszych badań było opracowanie metody oznaczania aktywności pepsyny w soku żołądkowym na podstawie metody opisanej w piśmiennictwie, która w badaniach laboratoryjnych okazała się nie w pełni efektywna. Podjęta praca jest próbą udoskonalenia metody polegającej na trawieniu hemoglobiny wołowej przez pepsynę i wprowadzenia skutecznych zmian, aby uzyskane wyniki mogły być użyteczne w diagnostyce klinicznej.

MATERIAŁ I METODY: Przeprowadzono badania z wykorzystaniem hemoglobin różnych gatunków zwierząt i człowieka, zmiany czasów inkubacji, stężeń oraz objętości reagentów.

WYNIKI: Próby oparte na wykorzystaniu roztworu pepsyny wykazały, że najskuteczniejsza w oznaczaniu aktywności enzymu jest hemoglobina ludzka. Pierwotnie proponowane czasy inkubacji zostały wydłużone, a do hamowania reakcji użyto kwasu trichlorooctowego o wyższym stężeniu, niż sugerowano, równocześnie zmniejszając o połowę objętości reagentów. W próbach przeprowadzonych z użyciem oczyszczonego enzymu wykazano korelację między stężeniem enzymu a absorbancją supernatantu zawierającego produkty reakcji enzymatycznego trawienia hemoglobiny.

WNIOSEK: Wprowadzone modyfikacje pozwalają na udoskonalenie procesu oznaczania aktywności pepsyny w soku żołądkowym i efektywnego wykorzystania w praktyce laboratoryjnej.

SŁOWA KLUCZOWE

pepsyna, enzymy trawienne, hemoglobina ludzka

ABSTRACT

INTRODUCTION: The aim of this study was to develop a method to assay the activity of pepsin in gastric juice based on the method described in the references, which was not entirely effective in laboratory tests. The study aims to improve the aforementioned method based on the digestion of bovine hemoglobin by pepsin and to introduce effective changes so that the results may be useful for diagnostic purposes.

MATERIALS AND METHODS: To achieve this, tests were carried out using the hemoglobin of different species of animals and human hemoglobin, changing the incubation periods, concentrations and volumes of reagents.

Received: 01.08.2014

Revised: 29.09.2014

Accepted: 29.09.2014

Published online: 29.06.2015

Adres do korespondencji: Michał Długaszek, Katedra i Zakład Chemii Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, ul. Jordana 19, 41-808 Zabrze, tel. +48 693 962 272, e-mail: michaldlugaszek@gmail.com

Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
www.annales.sum.edu.pl

RESULTS: Tests based on the use of purified (crystalline) pepsin revealed that the most effective in the assay of enzyme activity is human hemoglobin. The originally proposed incubation periods were extended, and in order to inhibit the reaction, trichloroacetic acid was used in a higher concentration than suggested, while reducing by half the volume of reactants. In the tests carried out using a purified enzyme, a correlation between the known concentration of the enzyme and the absorbance of supernatant containing the reaction products of enzymatic digestion of hemoglobin was proved.

CONCLUSIONS: Introducing changes leads to more effective diagnostic use.

KEY WORDS

pepsin, digestive enzymes, human hemoglobin

WSTĘP

Aktywność enzymatyczna pepsyny decyduje o aktywności proteolitycznej soku żołądkowego. W literaturze jest niewiele danych na temat oznaczania aktywności pepsyny w soku żołądkowym, co może wynikać z trudności w pobraniu materiału oraz braku danych na temat łatwej do wykonania i powtarzalnej metody analitycznej. W Bursa Dörtçelik Children's Hospital oznaczanie pepsyny metodą fluorymetryczną użyto do wykazania zależności między występowaniem chronicznego zapalenia zatok przynosowych a refluksem krtaniowo-gardłowym [1]. Samuels i Johnston z Medical College w Wisconsin rozważyli dwie metody oznaczania pepsyny w wydzielinie dróg oddechowych u pacjentów cierpiących na refluks pozaprzłykowy – enzymatyczną i immunochemiczną [2]. Naukowcy z Uniwersytetu w Mansourze, szukający zależności między wysiękowym zapaleniem ucha środkowego u dzieci a refluksem krtaniowo-gardłowym, wykorzystywali do oznaczania pepsyny metodę ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*, test immunoenzymatyczny) [3]. Już w 1938 r. Anson opracował metodę oznaczania aktywności proteaz polegającą na trawieniu hemoglobiny wołowej [4]. Wynn w 1954 r., w publikacji dotyczącej oznaczania pepsyny w soku żołądkowym, stwierdził, że metoda Ansona jest technicznie trudna do wykonania w laboratoriach [5].

Rozwój chemii analitycznej skłania do próby wykorzystania omawianej metody w nowoczesnym laboratorium ze względu na prostotę wykonania i niewielki koszt użytych odczynników. Kilkukrotne próby wykorzystania oryginalnej metodyki Ansona w badaniach własnych przyniosły wyniki o małej powtarzalności, a sama metoda nie pozwoliła oznaczyć aktywności pepsyny w próbkach o małym stężeniu. Potwierdza to tylko potrzebę modyfikacji tej metody.

W literaturze brak danych na temat użycia metody Ansona w oryginalnej formie do oznaczenia aktywności pepsyny w soku żołądkowym. Celem naszych badań było opracowanie skutecznej, prostej i powtarzalnej metody oznaczania aktywności pepsyny w soku żołądkowym, aby możliwe było jej wykorzystanie w chemii analitycznej.

MATERIAŁ I METODY

Zastosowane odczynniki: kwas chlorowodorowy (HCl; 10 mmol/L i 300 mmol/L), 10% roztwór kwasu trichlorooctowego (TCA) i pepsynogen ludzki typu I (Sigma-Aldrich, USA). Jako substratu dla enzymu użyto 2,5% roztworów hemoglobiny trzech gatunków: świńskiej, ludzkiej i końskiej.

Hemoglobiny otrzymywano przez lizę metodą szoku osmotycznego odwirowanych i przemytych w 0,9% roztworze NaCl krwinek czerwonych. Uzyskane hemolizaty poddawano dializie w 0,9% roztworze NaCl, a po przesączeniu oznaczano w nich stężenie hemoglobiny metodą Drabkina [6] i modyfikowano do stężenia 2,5%. Roztwór roboczy pepsyny uzyskano przez rozpuszczenie 10 mg pepsynogenu typu I w 10 ml 10 mM kwasu chlorowodorowego. Otrzymany roztwór enzymu o stężeniu 1 mg/mL przechowywano w temp. 4°C między wykonywanymi analizami danego dnia; roztworu pepsyny nie przechowywano dłużej niż 6 godzin. Robocze roztwory enzymu przygotowano w stężeniach: 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125; 0,015625 mg/mL, rozcieńczając roztwór macierzysty w 10 mM roztworze HCl.

Zmodyfikowana procedura oznaczeń przedstawiona została w tabeli I. Pracę rozpoczęto od inkubacji 2,5 mL 2% hemoglobiny (uzyskanej przez zmieszanie 2 mL 2,5% roztworu hemoglobiny i 0,5 mL 0,3 M HCl) w temp. 37°C przez 10 min, zarówno próby badanej, jak i kontrolnej. Następnie do próby badanej dodano 0,5 ml roztworu pepsyny, wymieszano zawartość probówek. Zastosowany w oryginalnej metodzie 10-minutowy czas inkubacji enzymu z substratem uznano za niewystarczający, gdyż stosując go w poprzednich badaniach własnych nie wykazano aktywności pepsyny w próbkach z dwoma najmniejszymi stężeniami pepsyny (0,03125 i 0,015625 mg/mL). Wydłużając czas inkubacji w kolejnych eksperymentach do 20, 30 i 40 min uzyskano wyniki aktywności we wszystkich próbkach, dlatego też do dalszych badań wybrano najkrótszy z efektywnych czasów inkubacji, wynoszący 20 min. Obie próby poddano kolejnej inkubacji w temp. 37°C przez dokładnie 20 min. W celu zahamowania reakcji do obu prób

dodano 5 mL 10% kwas trichlorooctowego (TCA); wytrącono niestrawione białko z roztworu (TCA powoduje wzrost hydrofobowości peptydów, a to prowadzi do zwiększenia oddziaływań hydrofobowych między nimi i precypitacji z roztworu) [7]. Próbę kontrolną uzupełniono 0,5 mL roztworem pepsyny, aby dopełnić do objętości końcowej 8 mL. Zawartość próbek zmieszano oraz poddano ostatniej inkubacji w 37°C przez 10 min.

Uzyskane produkty reakcji poddano przesączaniu przez bibułę filtracyjną. Zmierzono absorbancję otrzymanego w ten sposób przesącza w kuwetach kwarcowych ($d = 10$ mm), przy długości fali $\lambda = 280$ nm, wykorzystując spektrofotometr Shimadzu 160A (Shimadzu, Japonia).

Otrzymane wyniki podstawiono do wzoru w celu obliczenia aktywności w jednostkach Ansona.

1 j. Ansona jest to $\Delta A_{280 \text{ nm}}$ o 0,001 na minutę, przy $\text{pH} = 2$ w temp. 37°C, spowodowana powstaniem rozpuszczalnych w kwasie trichlorooctowym produktów enzymatycznego trawienia hemoglobiny.

Wzór na obliczenie aktywności pepsyny:

$$j. \frac{\text{Ansona}}{\text{mL}} \text{ enzymu} = \frac{(A_{280 \text{ badanej}} - A_{280 \text{ kontrolnej}})(df)}{(\Delta A_{280 \text{ nm}})(t)(v)}$$

df – współczynnik rozcieńczenia,

$\Delta A_{280 \text{ nm}}$ – zmiana absorbancji o 0,001 na minutę przy $\text{pH} = 2$ w temp. 37°C,

$T = 20$ [s] – czas inkubacji enzymu z substratem,

$V = 0,5$ [mL] – objętość enzymu.

W stosunku do oryginalnej metody [4] zmianie uległy czasy inkubacji, które zostały wydłużone dwukrotnie, objętości reagentów zmniejszono o połowę, a także zwiększono z 5% do 10% stężenie kwasu trichlorooctowego. Oznaczenia przeprowadzano w czterech powtórzeniach.

Analizy danych dokonano w programie STATISTICA 10.0. (StatSoft, Polska). Normalność rozkładu sprawdzono testem Kołmogorowa-Smirnowa, następnie poddano analizie współzależność zmiennych, obliczając współczynnik R Spearmana. Za poziom istotności

statystycznej przyjęto $p < 0,05$. Sporządzono wykresy rozrzutu i zaznaczono 95% przedziały ufności. Współczynnik zmienności (CV) dla badanej metody wyniósł 9,2%. Obliczono go opierając się na ilorazie odchylenia standardowego i średniej arytmetycznej, uzyskano względne odchylenie standardowe i przedstawiono w procentach jako CV.

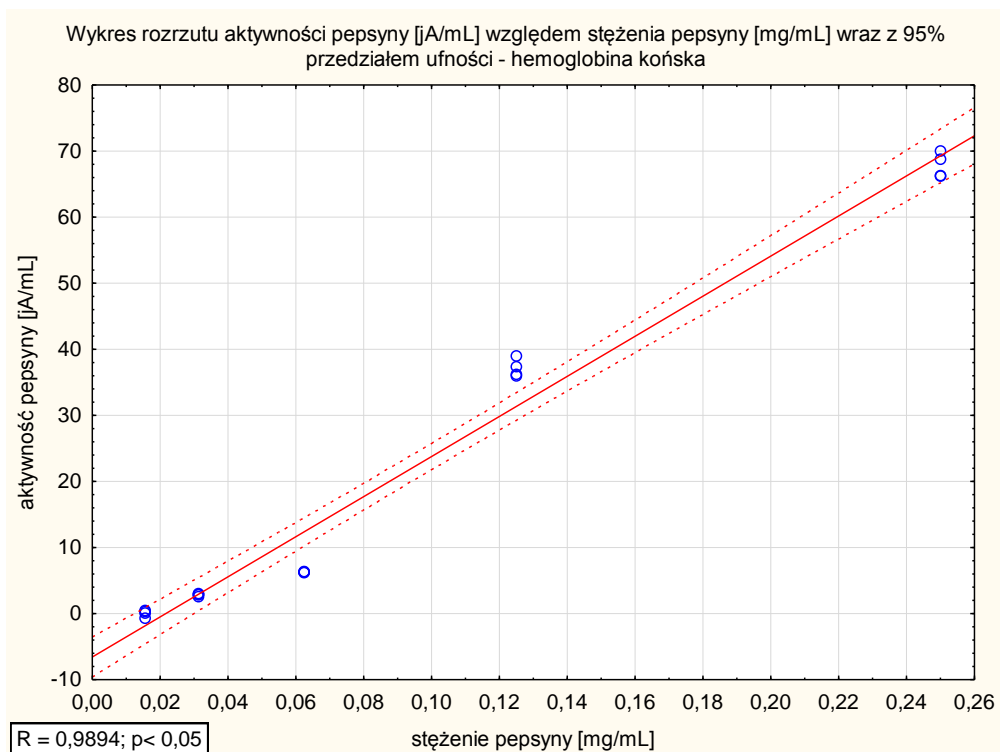
WYNIKI

Wyniki badań aktywności enzymatycznej pepsyny przeprowadzonych z użyciem hemoglobin trzech różnych gatunków przedstawiono w formie graficznej jako zależność aktywności pepsyny (j. Ansona/mL próbki) od stężenia pepsyny (mg/mL próbki). Dla każdego z nich obliczono współczynniki korelacji R , którego wartość traktowano jako wskaźnik liniowości metody. Dla hemoglobiny końskiej $R = 0,9852$, dla hemoglobiny świńskiej $R = 0,9926$, dla hemoglobiny ludzkiej $R = 0,9987$ (ryc. 1, 2, 3). Spośród badanych hemoglobin najwyższy współczynnik korelacji, bliski zupełnej korelacji dodatniej, wykazano dla hemoglobiny ludzkiej.

Opracowanie metody oznaczania aktywności pepsyny w soku żołądkowym wymagało udoskonalenia, uproszczenia i standaryzacji metody oryginalnej. Wydłużając czas inkubacji z 10 do 20 min uzyskano poprawienie precyzji metody, uzyskując aktywność pepsyny we wszystkich badanych rozcieńczeniach. Objętości wszystkich reagentów zmniejszono dokładnie o połowę w celu uproszczenia techniki wykonania oznaczenia. Przy zastosowaniu TCA o oryginalnym stężeniu 5% mierzone absorbancje prób kontrolnych były wyższe niż prób badanych, a próbki pozostawały mętne. Zastosowanie TCA 10% pozwoliło uzyskać przejrzyste roztwory i mierzalne, wiarygodne absorbancje. Prawdopodobnie stężenie 5% okazało się nieskuteczne w usunięciu hemoglobiny, która nie uległa wytrąceniu, co zaburzyło odczyt absorbancji.

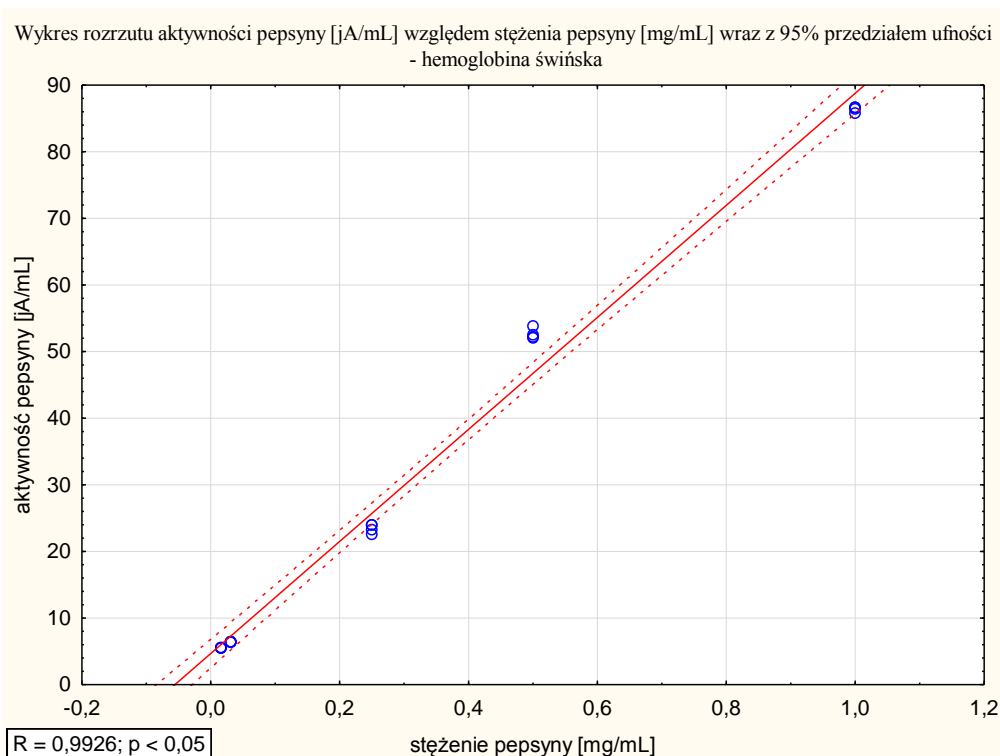
Tabela I. Zmodyfikowana procedura oznaczania aktywności pepsyny
Table I. Modified procedure for assaying pepsin activity

	Próba badana	Próba kontrolna
2,5% roztwór Hb	2,0 mL	2,0 mL
0,3 mol/L HCl	0,5 mL	0,5 mL
	inkubacja w 37°C przez 10 min	
Roztwór enzymu	0,5 mL	X
	mieszanie, inkubacja w 37°C przez dokładnie 20 min	
10% roztwór TCA	5 mL	5 mL
Roztwór enzymu	X	0,5 mL
	Mieszanie, inkubacja w 37°C przez 10 min, sączenie, pomiar spektrofotometryczny przy długości fali 280 nm	



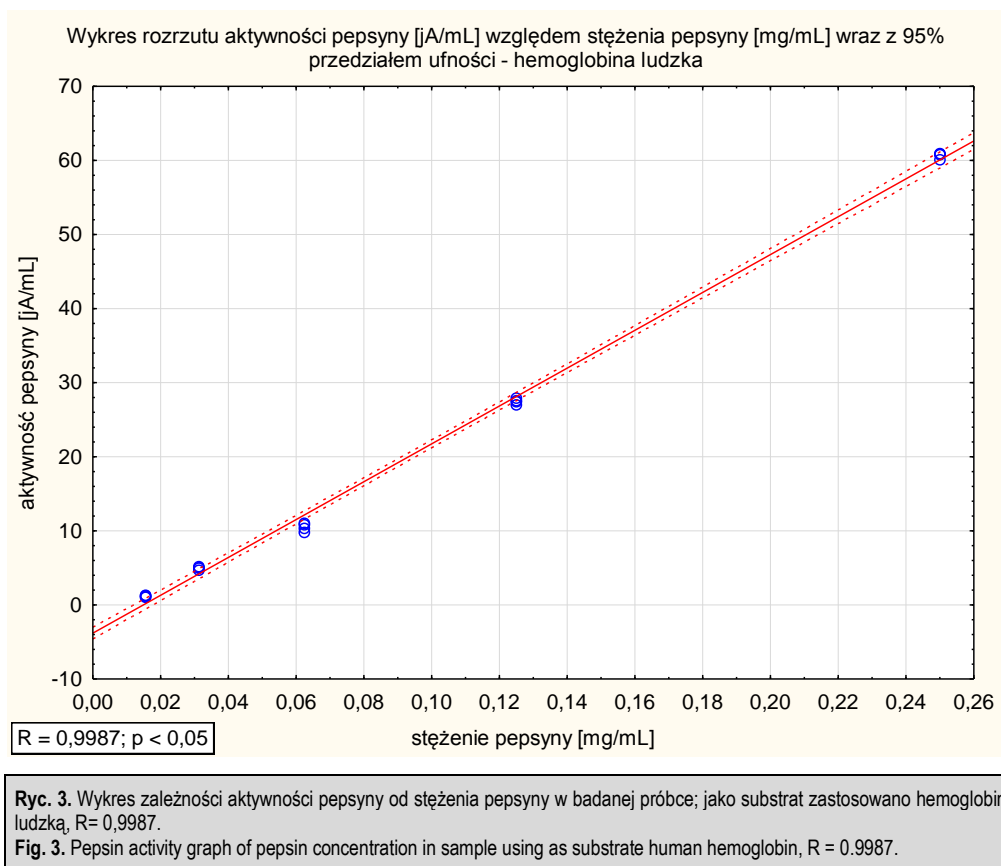
Ryc. 1. Wykres zależności aktywności pepsyny od stężenia pepsyny w badanej próbce; jako substrat zastosowano hemoglobinę końską, $R = 0,9894$.

Fig. 1. Pepsin activity graph of pepsin concentration in sample using as substrate horse hemoglobin, $R = 0.9894$.



Ryc. 2. Wykres zależności aktywności pepsyny od stężenia pepsyny w badanej próbce; jako substrat zastosowano hemoglobinę świńską, $R = 0,9926$.

Fig. 2. Pepsin activity graph of pepsin concentration in sample using as substrate porcine hemoglobin, $R = 0.9926$.



W zmodyfikowanej metodzie Ansona substratem do oznaczenia aktywności pepsyny w soku żołądkowym powinna być hemoglobina ludzka, ponieważ w porównaniu z pozostałymi zależność aktywności od stężenia jest najbardziej zbliżona do liniowej. Nieco sprzecznych wyników dostarcza badanie z hemoglobina końska, wobec której pepsyna ludzka okazała się najaktywniejsza, jednak korelacja aktywności i stężenia pepsyny jest najniższa z badanych, co zmniejsza liniowość metody w tym przypadku. Przy badaniu hemoglobiny świńskiej osiągnięto najniższe aktywności pepsyny, co pozwala stwierdzić, że powinowactwo enzymu do substratu w tych samych warunkach było niższe niż w badaniach z hemoglobina końska i ludzką.

Autorzy sądzą, że przed rozpoczęciem analizy należy zmierzyć pH badanej próbki, które powinno wahać się w granicach od 1,5 do 2,5, co także czyniono, aby zachować pH panujące w soku żołądkowym. W stanach achlorhydrii i hipochlorhydrii pH osiąga wartości powyżej 3,5 i są to stany, w których pepsyna nie znajduje się w optymalnym dla jej działania środowisku i osiąga nieprawidłowe wartości aktywności enzymatycznej [8].

Przedstawione udoskonalenia prowadzą do stworzenia metody, która może być użyteczna w analizie aktywności pepsyny w soku żołądkowym, jednak wymaga to dalszych badań.

DYSKUSJA

Opracowanie powtarzalnej metody oznaczania aktywności pepsyny skłania do dyskusji nad jej zastosowaniem. W erze problemu schorzeń układu pokarmowego istotna jest ciągła praca naukowców nad tworzeniem nowych technik w walce z nimi. Kontrola aktywności pepsyny w soku żołądkowym może być pomocna we wczesnym wykrywaniu, monitorowaniu oraz leczeniu takich schorzeń, jak choroba wrzodowa żołądka i dwunastnicy, refluks żołądkowo-przełykowy, zespół Zollinger-Ellisona, w którym guz produkujący gastrynę powoduje patologiczne zwiększenie wydzielania soku żołądkowego [9], zespół Cushinga, w którym zwiększona ilość kortyzolu powoduje pobudzenie sekrecji żołądkowej, a także u pacjentów po częściowej gastrektomii.

Abu-Erreish i Peanasky udowodnili wpływ inhibitorów enzymów trawiennych wytwarzanych przez glistę ludzką na aktywność pepsyny [10]. Monitorowanie aktywności pepsyny może zatem być przydatne w ocenie skuteczności leczenia przeciwpasożytniczego u pacjentów z zaburzeniami wchłaniania w przebiegu intestacji tym pasożytem.

Poza zastosowaniem diagnostycznym metoda może służyć do oznaczania aktywności pepsyny używanej

do proteolizy przeciwciał do fragmentów F(ab')₂ stosowanych w metodach immunochemicznych i terapii [3]. Metoda stanowić może również dodatkowe źródło wiedzy na temat kinetyki samego enzymu.

Wielokierunkowych badań wymaga także ocena bezpieczeństwa stosowania żywności modyfikowanej genetycznie (Genetically Modified Organisms, GMO). Naukowcy uczestniczący w Food Allergy Research and Resource Program (FARRP) z Department of Food Science & Technology, University of Nebraska-Lincoln oceniali aktywności pepsyny świńskiej w trawieniu białek występujących w GMO [11]. Zastosowanie opracowanej metody może pozwolić na podjęcie badań z pepsyną pochodzenia ludzkiego, co w przyszłości może pozwolić na ocenę ewentualnego działania alergizującego GMO.

Oznaczanie pepsyny w soku żołądkowym stało się obiektem zainteresowania także naukowców

z dziedziny medycyny sądowej, w celu wykrywania wymiocin [12].

W przyszłości metoda może posłużyć jako podstawa opracowania metody badania aktywności pepsyny na pobranych od pacjenta wycinkach żołądka i wykonanych z nich homogenatach tkankowych. Pozwoli to określić różnice w aktywności enzymatycznej między różnymi okolicami żołądka, umożliwiając wczesne wykrycie patologii na poziomie komórek głównych gruczołów żołądkowych.

Autorzy artykułu planują – opierając się na opisanej metodzie – przeprowadzenie badań w grupie pacjentów cierpiących na schorzenia przewodu pokarmowego, w celu oznaczenia zależności między aktywnością enzymatyczną pepsyny w soku żołądkowym, a rodzajem i stadiem choroby.

Author's contribution

Study design – T. Wielkoszyński, M. Szumska, K. Tyrcień-Golder

Data collection – M. Długaszek

Data interpretation – A. Krywult, M. Długaszek

Statistical analysis – M. Długaszek

Manuscript preparation – A. Krywult, M. Długaszek

Literature research – A. Krywult, M. Długaszek

PIŚMIENNICTWO

1. Ozmen S., Yücel O.T., Sinici I., Ozmen O.A., Süslü A.E., Öğretmenoğlu O., Onerci M. Nasal pepsin assay and pH monitoring in chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2008; 118: 890–894.
2. Samuels T.L., Johnston N. Pepsin as a marker of extraesophageal reflux. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 2010; 119: 203–208.
3. Abd El-Fattah A.M., Abdul Maksoud G.A., Ramadan A.S., Abdalla A.F., Abdel Aziz M.M. Pepsin assay: a marker for reflux in pediatric glue ear. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2007; 136: 464–470.
4. Anson M.L. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 1938; 22: 79–89.
5. Wynn W.A. A Simple Method for the Estimation of Pepsin in Gastric Juice. *J. Clin. Pathol.* 1955; 8: 85.
6. Balasubramaniam P., Malathi A. Comparative study of hemoglobin estimated by Drabkin's and Sahli's methods. *J. Postgrad. Med.* 1992; 38: 8–9.
7. Yvon M., Chabanet C., Pellissier J. Solubility of peptides in trichloroacetic acid (TCA) solutions. Hypothesis on the precipitation mechanism. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1989, 34: 166–176.
8. Dembińska-Kieć A., Naskalski J. Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej. Wyd. II uzupełnione i poprawione, Urban & Partner, Wrocław 1998, s. 633–636.
9. Kokot F. Choroby wewnętrzne. Tom I. Wyd. VIII zmienione i unowocześnione. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2006, s. 326.
10. Abu-Ereish G.M., Peanasky R.J. Pepsin inhibitors from *Ascaris lumbricoides*. Pepsin-inhibitor complex: stoichiometry of formation, dissociation, and stability of the complex. *J. Biol. Chem.* 1974; 249: 1566–1571.
11. Oföri-Anti A.O., Ariyaratna H., Chen L., Lee H.L., Pramod S.N., Goodman R.E. Establishing objective detection limits for the pepsin digestion assay used in the assessment of genetically modified foods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2008; 52: 94–103.
12. Yamada S., Hirata K., Tsugawa N., Bunai Y., Ohya I. Vomit identification by pepsin assay using a fibrin blue-agarose gel plate. *Forensic Sci. Int.* 1992; 52: 215–221.