

*Medicinska edukacija/
Medical education*

UTICAJ HEMOLIZE, LIPEMIJE ILI
IKTERIČNOSTI SERUMA NA SPECIFIČNOST
ODREĐIVANJA AKTIVNOSTI LIPAZE
POMOĆU SPEKTROFOTOMETRIJSKE I
TURBIDIMETRIJSKE METODE

INFLUENCE OF HEMOLYSIS, LIPEMIA OR
ICTERUS OF SERUM AT SPECIFICITY OF THE
DETERMINATION OF LIPASE ACTIVITY
WITH SPECTROPHOTOMETRIC AND
TURBIDIMETRIC METHOD

Correspondence to:

Vesna Vuković-Dejanović,
Institut za rehabilitaciju Beograd,
Sokobanjska 17
Mob: 064/2137616,
e-mail: vdvesna@gmail.com

Vesna D. Vuković-Dejanović¹, Bratislav B. Dejanović²,
Biljana Milosavljević-Stanojević³

¹ Institut za rehabilitaciju, Beograd, Srbija

² Vojnomedicinski centar „Karaburma”, Beograd, Srbija

³ Dom zdravlja Smederevska Palanka, Srbija

Ključne reči

lipaza, turbidimetrija, spektrofotometrija

Key words

lipase, turbidimetry, spectrophotometry

Sažetak

Određivanje aktivnosti lipaze u serumu se koristi u dijagnostici akutnog i hroničnog pankreatitisa, karcinoma pankreasa, nemalighnih hepatobilijarnih oboljenja i gastrointestinalnih bolesti, a posebno je značajno za praćenje toka hroničnog recidivirajućeg pankreatitisa i za praćenje terapije pankreatitisa. Metode koje se najčešće koriste za određivanje aktivnosti lipaze su turbidimetrijske i spektrofotometrijske. U ovom radu ispitan je uticaj lipemije, ikterije i hemolize na određivanje aktivnosti lipaze turbidimetrijskom metodom uz triolein kao supstrat, i spektrofotometrijskom metodom uz 1,2-o-dilauril-rac-glicero-(6-metil rezurofin) estar glutarne kiseline kao supstrat. U tu svrhu je korišćen serumski pool u koji su dodavane rastuće koncentracije ispitivanih interferenata i merena je aktivnost lipaze pomoću obe metode. Kao dodaci interferenata su korišćeni uzorci seruma sa vidljivom lipemijom i ikterijom, i hemolizat opranih eritrocita. Nakon oduzimanja dodate vrednosti određen je uticaj ovih interferenata na reakcije za određivanje aktivnosti enzima. Rezultati su pokazali da hemoglobin prisutan u uzorku ima uticaja na određivanje lipaze pomoću obe metode. Hemoglobin preko 7,5 g/L interferira sa određivanjem aktivnosti lipaze turbidimetrijskom metodom, a preko 3,0 g/L sa određivanjem aktivnosti lipaze spektrofotometrijskom metodom. Sa porastom koncentracije holesterola, aktivnost lipaze se smanjuje ako se određuje spektrofotometrijskom metodom. Porast koncentracije triglicerida dovodi do povećanja aktivnosti lipaze ako se određuje turbidimetrijskom metodom. Ukupan i direktni bilirubin prisutni u uzorku ne utiču na određivanje lipaze pomoću obe metode. Ukupan bilirubin do 37,5 µmol/L, direktan bilirubin do 18,7 µmol/L, holesterol do 4,5 mmol/L i trigliceridi do 1,76 mmol/L ne interferiraju sa određivanjem lipaze pomoću obe metode.

UVOD

Lipaze (triacilglicerol acilhidrolaze, E.C. 3.1.1.3) su enzimi koji hidrolizuju estre glicerola i masnih kiselina dugih lanaca, za čije je delovanje neophodno prisustvo kolipaze. Određivanje aktivnosti lipaze u serumu se koristi u dijagnostici akutnog i hroničnog pankreatitisa⁽¹⁾, karcinoma pankre-

asa, nemalighnih hepatobilijarnih oboljenja i gastrointestinalnih bolesti (kao što je opstrukcija *ductus pancreaticus* i *ductus choledochus*-a), sepse, bubrežne i plućne disfunkcije, potkožnih krvarenja⁽²⁾ ili cistične fibroze. Određivanje lipaze je posebno značajno za praćenje toka hroničnog recidivirajućeg pankreatitisa, i za praćenje terapije pankreatitisa. Povišena koncentracija ovog enzima je najsigurniji para-

metar koji ukazuje da postoji aktivni proces bolesti (3,4). Smith i saradnici (5) su zaključili da je određivanje koncentracije lipaze u serumu mnogo bolji kao biomarker akutnog pankreatitisa nego serumska amilaza.

Metode koje se koriste za određivanje enzima lipaze su titrimetrijske, turbidimetrijske, fluorimetrijske i imunohemijske (6). Princip turbidimetrijske metode je merenje smanjenja zamućenja supstrata nakon dodatka seruma koji ima određenu aktivnost lipaze. Merenje intenziteta zamućenja vrši se na 340 nm, a kao supstrat se koristi trioleinska emulzija koja je stabilizovana dodavanjem žučnih kiselina – supstrat koji je specifičan za pankreasnu lipazu (7,8). Pri dovoljno visokim koncentracijama žučne soli stabilizuju trigliceridne emulzije, zatim inhibiraju esterazu, kao i pankreasnu i nepankreasnu lipazu. Međutim, u prisustvu kolipaze, očuvana je aktivnost pankreasne lipaze (9,10).

Kod spektrofotometrijske metode se koristi supstrat 1,2-o-dilauril-rac-glicerol-(6-metil rezurofin) estar glutarne kiseline. Ovaj supstrat emulguju žučne kiseline, i na njega lipaza deluje u prisustvu kolipaze u baznoj sredini uz prisustvo jona Ca^{++} , pri čemu nastaje glutarna kiselina i metil rezorufin. Intenzitet stvorenog obojenja se meri na 570nm (11-13).

Akutni abdomen je hitno medicinsko stanje koje zahteva brzu i pouzdanu dijagnostiku, i gde je određivanje aktivnosti serumske lipaze izuzetno važno. Kod pacijenata koji se jave sa abdominalnim bolom krv se mora odmah uzeti za analize čak i ako je pacijent već uzeo neki obrok (zbog čega je često prisutna lipemija), ili je ikterus već razvijen. Kod pacijenata kojima je flebotomiju teško izvesti može se javiti hemoliza, a hemoglobin prisutan u uzorku povećava apsorbanciju testova koji se mere u opsegu talasnih dužina 500 – 600 nm. I pored toga što proizvođači testova daju preporuke koje se odnose na uzorke, malo se zna o potencijalnom efektu interferenata na pojedine metode (14). Cilj ovog rada bio je da se ispituju interferencije ikterije, lipemije i hemolize na specifičnost turbidimetrijske i spektrofotometrijske metode za određivanje aktivnosti serumske lipaze.

MATERIJAL I METODE

U svrhu ispitivanja uticaja interferenata na dve metode za određivanje aktivnosti serumske lipaze korišćen je serumski pool u koji su dodavane rastuće koncentracije ispitivanih interferenata u odnosu 9:1. Merena je aktivnost lipaze pomoću obe metode i nakon oduzimanja dodate vrednosti određen je uticaj ovih interferenata na reakcije za određivanje aktivnosti enzima.

Kao interferenti su korišćeni serumski sa vidljivom lipemijom i ikterijom, kao i hemolizat eritrocita. U 900 μ L pool-a seruma je dodat lipemičan (na isti način i ikteričan) serum i to 0,10,20,50 i 100 μ L (da bi bio sačuvan odnos 9+1) i fiziološki rastvor, i to 100, 90, 80, 50 i 0 μ L, tako da ukupna zapremina dodatka iznosi 100 μ L.

Za analiziranje uticaja hemolize je korišćen dodatak hemolizata opranih eritrocita. U 900 μ L pool-a seruma je dodavan hemolizat i to 0, 5, 10, 20, 50 i 100 μ L (da bi se sačuvalo odnos 9+1) i fiziološki rastvor, i to 100, 90, 80, 50 i 0 μ L, tako da ukupna zapremina dodatka iznosi 100 μ L.

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD). Srednje vrednosti su poredene analizom varijanse i nakon toga Bonferroni post-hoc testom da bi se odredila koncentracija ispitivanog interferenta koja pokazuje statistički značajnu interferenciju sa ispitivanim metodama za određivanje aktivnosti lipaze. Uticaj ispitivanog interferenta na obe metode je testiran i linearnom korelacijom analizom.

REZULTATI

I Uticaj hemolize na specifičnost određivanja lipaze pomoću turbidimetrijske i spektrofotometrijske metode

Uticaj hemolize uzorka je ispitivan analiziranjem pool-a seruma u kome je aktivnost lipaze bila 39 U/L (određene spektrofotometrijskom metodom) i 106 U/L (određene turbidimetrijskom metodom), sa različitim količinama dodatog hemoglobina, dobijenog iz hemolizata opranih eritrocita. Koncentracija hemoglobina u hemolizatu je bila 150g/L, a potrebne koncentracije u dodatku su dobijene razblaživanjem hemolizata fiziološkim rastvorom. Pored toga, nakon određivanja aktivnosti enzima pomoću obe metode, u svakom uzorku su naknadno određivane i koncentracije prisutnog hemoglobina cijanmethemoglobinskom metodom.

Izračunato je da razblaživanjem ispitivanih uzoraka koncentracija hemoglobina u uzorcima treba da bude 0; 0,8; 1,5; 3,0; 7,5; i 15,0 g/L hemoglobina, a određivanjem su dobijene sledeće vrednosti: 0; 1,0; 2,0; 4,0; 7,0; i 15,0 g/L, tako da se izračunate vrednosti koncentracije hemoglobina nisu značajno razlikovale od određenih ($r=0,996$, $r^2=0,993$ ANOVA). U proračunima za interferenciju hemolize korišćene su izračunate vrednosti (Tabela 1).

Dobijeni rezultati aktivnosti lipaze su poredeni analizom varijanse i nakon toga Bonferroni testom da bi se odredila koncentracija hemoglobina koja pokazuje statistički značajnu interferenciju sa ispitivanim metodama za određivanje aktivnosti lipaze.

Tabela 1. Uticaj hemolize na određivanje aktivnosti lipaze u serumu pomoću spektrofotometrijske i turbidimetrijske metode

| Dodatak hemoglobina (g/L) | Aktivnost lipaze određena spektrofotometrijskom metodom (U/L) | Aktivnost lipaze određena turbidimetrijskom metodom (U/L) |
|---------------------------|---|---|
| 0 | 40,0 \pm 0,5 | 90,5 \pm 2,5 |
| 0,8 | 40,5 \pm 0,5 | 98,5 \pm 5,5 |
| 1,5 | 42,0 \pm 1,0 | 94,3 \pm 3,3 |
| 3,0 | 51,3 \pm 0,8 *** | 87,8 \pm 6,1 |
| 7,5 | 56,5 \pm 1,3 *** | 71,3 \pm 2,8 ** |
| 15,0 | 60,0 \pm 0,5 *** | 46,8 \pm 6,8 *** |

Vrednosti lipaze su prikazane kao srednja vrednost \pm SD

Varijable su poredene analizom varijanse

** $p<0,01$; *** $p<0,001$ vs bez dodatka hemoglobina

Rezultati pokazuju da hemoglobin prisutan u uzorku ima uticaja pri određivanju lipaze pomoću obe metode. To je dokazano i korelacionim testiranjem, a sve nađene korelacije hemoglobina i spektrofotometrijske ($r=0,911$) kao i hemoglobina i turbidimetrijske metode ($r= -0,982$) imaju statističku značajnosti $p<0,05$.

Kod spektrofotometrijske metode, koncentracija hemoglobina od 3 g/L već ima uticaj na određivanje lipaze, dok se kod turbidimetrijske metode ovaj uticaj javlja pri koncentraciji hemoglobina od 7,5 g/l.

II Uticaj lipemije na specifičnost određivanja lipaze pomoću turbidimetrijske i spektrofotometrijske metode

Uticaj lipemije je ispitivan analiziranjem pool-a seruma lipazne aktivnosti 60 U/L (određene spektrofotometrijskom metodom) i 140 U/L (određene turbidimetrijskom metodom), sa koncentracijama holesterola 4,24 mmol/L i triglicerida 1,55 mmol/L, u koji je dodat lipemičan serum u kome je koncentracija holesterola bila 6,61 mmol/L, triglicerida 3,52 mmol/L, aktivnost lipaze izmerena spektrofotometrijskom metodom 112 U/L, i 328 U/L kada je izmerena turbidimetrijskim postupkom.

Rastuća koncentracija holesterola i triglicerida uzrokovana prisustvom lipemičnog seruma je dobijena dodatkom fiziološkog rastvora da bi se postiglo odgovarajuće razblaženje. Pored toga, nakon određivanja aktivnosti enzima pomoću obe metode, u svakom uzorku su naknadno određivane i koncentracije pristunog holesterola i triglicerida koje su korišćene za određivanje njihovog uticaja na aktivnost lipaze određene pomoću obe metode (Tabela 2). Dobijeni rezultati aktivnosti lipaze su poređeni analizom varijanse i nakon toga Bonferroni testom.

Rezultati pokazuju da prisutni porast lipida u uzorku do koncentracije holesterola od 4,50 mmol/L i triglicerida 1,76 mmol/L nema uticaja pri određivanju lipaze pomoću obe metode.

Tabela 2. Uticaj lipemije na specifičnost spektrofotometrijske i turbidimetrijske metode

| Holesterol (mmol/L) | Trigliceridi (mmol/L) | Aktivnost lipaze određena spektrofotometrijskom metodom (U/L) | Aktivnost lipaze određena turbidimetrijskom metodom(U/L) |
|---------------------|-----------------------|---|--|
| 3,88 | 1,38 | 54,5 ± 2,6 | 134,8 ± 3,3 |
| 3,94 | 1,43 | 54,9 ± 4,5 | 138,5 ± 2,2 |
| 4,05 | 1,47 | 54,2 ± 4,5 | 136,8 ± 3,7 |
| 4,08 | 1,57 | 54,8 ± 6,4 | 143,9 ± 7,5 |
| 4,50 | 1,76 | 51,5 ± 4,1 | 147,1 ± 8,8 |

Vrednosti lipaze su date kao srednja vrednost ± SD
Varijable su poređene analizom varijanse

Da bi se ispitala korelacija između aktivnosti lipaze određene pomoću obe metode i koncentracije holesterola i triglicerida, urađena je korelaciona analiza, a rezultati ukazuju na statistički značajne (p<0,05) korelacije holesterola i izmerene aktivnosti lipaze spektrofotometrijskom (r=-0,936), kao i triglicerida i izmerene aktivnosti lipaze turbidimetrijskom metodom (r=0,948). Dobijeni koeficijent korelacije pokazuju da sa porastom koncentracije holesterola i triglicerida opada aktivnost lipaze ako se određuje spektrofotometrijskom metodom, a raste koncentracija ovog enzima ako se određuje turbidimetrijskom metodom.

III Uticaj ikterije na specifičnost određivanja lipaze pomoću turbidimetrijske i spektrofotometrijske metode

Za ispitivanje uticaja ikterije na određivanje aktivnosti lipaze u serumu pomoću obe metode u pool seruma lipazne aktivnosti 60 U/L (određene spektrofotometrijskom metodom) i 140 U/L (određene turbidimetrijskom metodom) sa koncentracijama ukupnog bilirubina 12,2 μmol/L i direktnog bilirubina 2,2 μmol/L dodat je ikteričan serum (u odnosu 9+1). Ikterični serum je imao lipaznu aktivnost 120 U/L (određene spektrofotometrijskom metodom) i 460 U/L (određene turbidimetrijskom metodom) gde je koncentracija ukupnog bilirubina iznosila 276,0 μmol/L a direktnog bilirubina 183,0 μmol/L. Rastuća koncentracija bilirubina usled prisustva ikteričnog seruma je dobijena dodatkom fiziološkog rastvora da bi se postiglo potrebno razblaženje. Pored toga, nakon određivanja aktivnosti enzima pomoću obe metode, u svakom uzorku su naknadno određivane i koncentracije pristunog ukupnog i direktnog bilirubina koje su korišćene za određivanje njihovog uticaja na aktivnost lipaze određene pomoću obe metode (Tabela 3).

Tabela 3. Uticaj ikterije na specifičnost spektrofotometrijske i turbidimetrijske metode

| Ukupan bilirubin (μmol/L) | Direktni bilirubin (μmol/L) | Aktivnost lipaze određena spektrofotometrijskom metodom (U/L) | Aktivnost lipaze određena turbidimetrijskom metodom(U/L) |
|---------------------------|-----------------------------|---|--|
| 11,5 ± 0,5 | 1,9 ± 0,1 | 56,3 ± 4,3 | 136,0 ± 1,9 |
| 14,0 ± 0,0 | 4,0 ± 0,7 | 53,8 ± 0,7 | 139,2 ± 2,8 |
| 17,5 ± 0,5 | 5,2 ± 0,3 | 54,6 ± 2,0 | 141,1 ± 4,4 |
| 24,8 ± 1,3 | 10,0 ± 0,5 | 54,3 ± 2,1 | 142,5 ± 4,8 |
| 37,5 ± 0,5 | 18,7 ± 0,3 | 55,3 ± 2,3 | 142,5 ± 0,9 |

Aktivnosti lipaze prikazane su kao srednja vrednost ± SD
Varijable su poređene analizom varijanse

Dobijeni rezultati aktivnosti lipaze su poređeni analizom varijanse i nakon toga Bonferroni testom da bi se odredila vrednost koncentracija ukupnog bilirubina i direktnog bilirubina koje pokazuju statistički značajnu interferenciju sa ispitivanim metodama za određivanje aktivnosti lipaze.

Rezultati pokazuju da ukupni i direktni bilirubin prisutni u uzorku nemaju uticaja na određivanje aktivnosti lipaze pomoću obe metode.

Ispitana je korelacija između koncentracije ukupnog i direktnog bilirubina i aktivnosti lipaze izmerene spektrofotometrijskom i turbidimetrijskom metodom u istim uzorcima i nije pronađena statistički značajna korelacija između ukupnog bilirubina i aktivnosti lipaze određene spektrofotometrijskom metodom (r=-0,005, p=0,993), ukupnog bilirubina i aktivnosti lipaze određene turbidimetrijskom metodom (r=0,789, p=0,113), direktnog bilirubina i aktivnosti lipaze određene spektrofotometrijskom metodom (r=-0,009, p=0,989), direktnog bilirubina i aktivnosti lipaze određene turbidimetrijskom metodom (r=0,767, p=0,130).

DISKUSIJA

Za postavljanje dijagnoze akutnog pankreatitisa neophodno je da budu pozitivna dva od tri nalaza:

- abdominalni bol (akutna pojava perzistentnog, jakog bola u epigastrijumu koji se širi ka leđima)
- aktivnost serumske lipaze i/ili amilaze bar tri puta iznad gornje granice referentnih vrednosti
- karakterističan nalaz akutnog pankreatitisa na CT ili ultrazvuku (nije neophodno raditi ako su prethodna dva nalaza pozitivna).

Akutni pankreatitis je dinamično stanje koje se razvija i čija se težina može menjati tokom bolesti, i može da progredira do multiple organske disfunkcije (15). Zbog toga je neophodno što brže identifikovati pacijente sa teškim oblikom bolesti, u čemu aktivnost serumske lipaze ima veliku ulogu.

Dobijeni rezultati u ovom radu pokazuju da se statistički značajna interferencija hemoglobina sa spektrofotometrijskom metodom za određivanje aktivnosti serumske lipaze javlja pri koncentraciji hemoglobina od 3 g/L, dok je kod turbidimetrijske metode statistički značajna razlika u određenoj aktivnosti enzima lipaze u serumu bila pri koncentraciji hemoglobina od 7,5 g/L. Interesantno je da sa porastom hemoglobina opada aktivnost lipaze kada se meri turbidimetrijskom, a raste prilikom merenja aktivnosti spektrofotometrijskom metodom.

Korelacionom analizom koncentracije hemoglobina sa izmerenom aktivnošću lipaze pomoću obe metode dobijen je visok koeficijent korelacije. Za spektrofotometrijsku metodu koeficijent korelacije između koncentracije hemoglobina i aktivnosti lipaze izmerene je iznosio 0,91, a nagib prave ukazuje na pozitivnu korelaciju sa metodom. To praktično znači da se sa povećanjem koncentracije hemoglobina iznad 3 g/L (300 mg/dL) povećava izmerena aktivnost enzima u odnosu na stvarnu, pa se u hemoliziranim uzorcima ne sme određivati aktivnost lipaze zbog mogućnosti pojave lažno pozitivnih rezultata.

Turbidimetrijska metoda je pokazala postojanje negativne korelacije sa aktivnošću lipaze (koeficijent korelacije između koncentracije hemoglobina i aktivnosti lipaze je iznosio $r=-0,98$), što znači da se sa povećanjem koncentracije hemoglobina iznad 7,5 g/L (750 mg/dL) smanjuje izmerena aktivnost enzima u odnosu na stvarnu, pa se u hemoliziranim uzorcima ne sme određivati aktivnost lipaze ni turbidimetrijskom metodom zbog mogućnosti pojave lažno negativnih rezultata.

Uticaj lipemije na određivanje aktivnosti lipaze ispitan je tako što su određene koncentracije holesterola i triglicerida koje pokazuju statistički značajnu interferenciju sa ispitivanim metodama. Dobijeni rezultati su testirani analizom varijanse i nakon toga Bonferroni post hoc testom. Rezultati su pokazali da porast holesterola i lipida u uzorku nema uticaja pri određivanju lipaze pomoću obe metode.

Da bi ispitili korelaciju između aktivnosti lipaze određene sa obe metode i koncentracije holesterola i triglicerida urađena je korelaciona analiza, a rezultati koji ukazuju na korelaciju su sa nivoom značajnosti $p<0,05$. Za spektrofotometrijsku metodu koeficijent korelacije izmerene aktivnosti lipaze sa koncentracijom holesterola je iznosio $r=-0,94$ i ukazivao je na osnovu nagiba prave na negativnu korelaciju

sa metodom. To znači da se sa povećanjem koncentracije holesterola smanjuje izmerena aktivnost enzima u odnosu na stvarnu, pa se u uzorcima sa većom koncentracijom holesterola (preko 4,50 mmol/L) može očekivati pad aktivnosti lipaze usled interferencije i pojava lažno negativnih rezultata.

Dobijen je visok koeficijent korelacije aktivnosti lipaze izmerene turbidimetrijskom metodom sa koncentracijom triglicerida ($r=0,95$), a nagib prave ukazuje na pozitivnu korelaciju sa metodom. Ovo ukazuje na mogućnost da se sa povećanjem koncentracije triglicerida povećava izmerena aktivnost enzima u odnosu na stvarnu, pa se u uzorcima sa većom koncentracijom triglicerida (preko 1,76 mmol/L) može očekivati porast aktivnosti lipaze usled interferencije i pojava lažno pozitivnih rezultata.

Za ispitivanje uticaja povišene koncentracije bilirubina na spektrofotometrijsku i turbidimetrijsku metodu napravljena je serija razblaženja ikteričnog seruma. Između aktivnosti enzima lipaze određene pomoću obe metode pri različitim koncentracijama bilirubina nije pronađena statistički značajna razlika, te se može zaključiti da aktivnost lipaze u serumu u kome je ukupan bilirubin do 37,5 $\mu\text{mol/L}$ nije pod uticajem prisutnog bilirubina, ali je uočljiv blag pad aktivnosti enzima određenog turbidimetrijskom metodom sa porašću koncentracije bilirubina.

Urgentna medicinska stanja zahtevaju brze i pouzdane analize koje će pomoći da se pacijent brzo ispita i izvrši diferencijalna dijagnostika. Zbog takvih stanja, verovatno je jedna od važnijih interferencija lipemija jer se kod ovih pacijenata krv uglavnom vadi u toku dana odnosno kada je pacijent već uzeo neki od obroka. Lipaza spada u hitne analize i važan je dijagnostički parametar u stanjima akutnog abdomena. Stoga je ispitivanju interferencije spektrofotometrijske i turbidimetrijske metode za određivanje aktivnosti enzima lipaza u serumu, sa lipemijom dat poseban značaj. Aktivnost lipaze izmerena turbidimetrijskom metodom raste sa porastom lipida, dok kod spektrofotometrijske metode pokazuje blago sniženje aktivnosti. Zbog se aktivnost lipaze turbidimetrijskom metodom mora isključivo određivati u bistrim serumima i to je glavni ograničavajući faktor za primenu ove metode u urgentnim stanjima akutnog abdomena kada je određivanje aktivnosti lipaze od izuzetnog značaja.

ZAKLJUČAK

Hemoglobin pri koncentraciji većoj od 7,5 g/L interferira sa turbidimetrijskom metodom, dok pri koncentraciji većoj od 3 g/L interferira sa spektrofotometrijskom metodom pri koncentraciji. Koncentracije holesterola do 4,5 mmol/L i koncentracije triglicerida do 1,76 mmol/L ne interferiraju sa spektrofotometrijskom i turbidimetrijskom metodom za određivanje aktivnosti lipaze u serumu. Porast koncentracije holesterola i triglicerida u serumu dovodi do porasta koncentracije aktivnosti lipaze izmerene turbidimetrijskom metodom. Ukupni bilirubin do 37,5 $\mu\text{mol/L}$ i direktni do 18,7 $\mu\text{mol/L}$ ne interferiraju sa spektrofotometrijskom i turbidimetrijskom metodom za određivanje aktivnosti lipaze u serumu pacijenata.

Abstract

Determination of lipase activity in serum is used in the diagnosis of acute and chronic pancreatitis, pancreatic cancer, non-malignant hepatobiliary and gastrointestinal diseases, and is particularly important for the monitoring chronic recurrent pancreatitis, and for monitoring the treatment of pancreatitis. Commonly used methods for determination of lipase activity in serum are turbidimetric and spectrophotometric. In this work was tested influences of lipemia, icterus and hemolysis on determination of lipase activity turbidimetrically (using triolein as substrate) and spectrophotometrically (using 1,2-o-dilauryl-rac-glycero-3-glutaric acid-(6'-methylresorufin) ester as substrate). For this purpose serum pool was collected. Increasing concentrations of tested interferences were added in the pool. Serum samples with visible lipemia and icterus, and hemolysate of washed erythrocytes were used as supplements. After subtraction of supplement added, the impact of these interferences on determination enzyme activity is defined. Results show that hemoglobin presented in sample has an influence on determining lipase with both methods. Hemoglobin at concentrations above 7.5 g/L interferes with turbidimetric method, and above 3.0 g/L interferes with spectrophotometric method. With increasing of cholesterol concentration, lipase activity decreases with spectrophotometric method. Increasing concentration of triglycerids increases activity of lipase determined turbidimetrically. Total and direct bilirubin present in the sample do not affect determination of lipase using both methods. Total bilirubin up to 37.5 $\mu\text{mol/L}$, direct bilirubin up to 18.7 $\mu\text{mol/L}$, cholesterol up to 4.5 mmol/L and triglycerides up to 1.76 does not interfere with both methods for lipase determination in serum.

LITERATURA

1. Tietz NW, Shuey DF. Lipase in serum—the elusive enzyme: an overview. *Clin Chem.* 1993; 39:746-56.
2. Diani G, Poma G, Novazzi F, Zanirato S, Porta C, Moroni M, et al. Increased serum lipase with associated normoamylasemia in cancer patients. *Clin Chem.* 1998;44:1043-5.
3. Majkić-Singh N. *Klinička enzimologija* 1993. Izdavač: AID Praktikum, Beograd.
4. Steiner JM. Diagnosis of pancreatitis. *Vet Clin N Am: Small Animal Practice.* 2003; 33:1181-95.
5. Smith RC, Southwell-Keely J, Chesher D. Should serum pancreatic lipase replace serum amylase as a biomarker of acute pancreatitis? *ANZ J Surg* 2005; 75: 399–404. doi: 10.1111/j.1445-2197.2005.03391
6. Ferard G, Lessinger JM. Human pancreatic lipase activity: review of methods and general recommendations. *Ann Biol Clin.* 1992;50(3):133-41.
7. Gilham D, Lehner R. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods.* 2005;36(2):139-47.
8. Taes Y, Louagie H, Yvergneux JP, De Buyzere M, De Puydt H, Delange J, et al. Prolonged hiperamilasemia attributable to a novel type of macrolipase. *Clin Chem.* 2000;46:2008-13.
9. Steinberg WM, Goldstein SS, Davis ND, Shammaea J, Anderson K. Diagnostic assays in acute pancreatitis. A study of sensitivity and specificity. *Ann Intern Med.* 1985;102:576-80.
10. Pietrzak A, Lecewicz-Torun B. Activity of serum lipase [EC 3.1.1.3] and the diversity of serum lipid profile in psoriasis. *Med Sci Monit.* 2002;8(1):CR.
11. Graca R, Messick J, McCullough S, Berger A, Hoffmann W. Validation and diagnostic efficacy of lipase assay with the substrate 1, 2-o-dilauryl-rac-glycero glutaric acid-(6-methyl resurofin) ester for the diagnosis of acute pancreatitis in dogs. *Vet Clin Pathol.* 2005;34(1):39-43.
12. Panthegini M, Bonora R, Pagani F. Measurement of pancreatic lipase activity in serum by kinetic colorimetric assay using a new chromogenic substrate. *Ann Clin Biochem.* 2001;38(4):365-70.
13. Cattozzo G, Franzini C, Melzi d'Eril G. Commutability of calibration and control materials for serum lipase. *Clin Chem.* 2001;47:2108-13.
14. Martinez-Subiela S, Ceron J. Effects of hemolysis, lipemia, hyperbilirubinemia and anticoagulants in canine C-reactive protein, serum amyloid A, and ceruloplasmin assays. *Can Vet J* 2005;46(7):625-629.
15. Banks P, Bollen T, Dervenis C, Gooszen H, Johnson C, Sarr M et al. Classification of acute pancreatitis – 2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut.* 2013;62:102-11.