

*Originalni članci/
Original articles*

Correspondence to:

Mr sci pharm **Vesna Vuković-Dejanović**, spec med biohem
Institut za rehabilitaciju Beograd,
Sokobanjska 17
tel: 064/2137616,
e-mail: vdvesna@gmail.com

**POREĐENJE SPEKTROFOTOMETRIJSKE I
TURBIDIMETRIJSKE METODE PRI
ODREĐIVANJU REFERENTNIH VREDNOSTI
LIPAZE U SERUMU**

**COMPARISON OF SPECTROPHOTOMETRIC
AND TURBIDIMETRIC METHODS FOR
DETERMINATION OF SERUM LIPASE
REFERENCE VALUES**

Vesna D. Vuković-Dejanović¹, Bratislav B. Dejanović²

¹ Institut za rehabilitaciju, Beograd, Srbija

² Vojno-medicinski centar „Karaburma”, Beograd, Srbija

Ključne reči

lipaza, turbidimetrija,
spektrofotometrija, referentne vrednosti

Key words

lipase, turbidimetry, spectrophotometry,
reference values

Sažetak

Lipaze su enzimi koji hidrolizuju estre glicerola i masnih kiselina dugih lanaca. Određivanje aktivnosti serumske lipaze za detekciju oboljenja pankreasa se pokazalo specifičnijim i osetljivijim markerom od određivanja aktivnosti α -amilaze, i uvršteno je u neophodna određivanja kada se javi abdominalni bol. Zbog rasnih i etničkih razlika, razlika u ishrani, fizičkoj aktivnosti, i uopšte u načinu života, neophodno je da se referentne vrednosti biohemijskih parametara odrede za svaku populaciju pojedinačno. Prikazano ispitivanje bilo je usmereno na ispitivanje slaganja dve različite metode, turbidimetrijske i spektrofotometrijske, za određivanje aktivnosti lipaze u serumu, kao i na određivanje referentnih vrednosti za ove dve metode. U te svrhe kod ukupno 252 ispitanika (125 žena i 127 muškaraca) starosti od 20 – 80 godina, određena je aktivnost lipaze u serumu ispitanika pomoću obe metode. Rezultati su pokazali visoko slaganje ove dve metode ($r=0,75$, $p<0,01$). Dobijene referentne granice za aktivnost serumske lipaze spektrofotometrijskom metodom kod odraslih osoba su 9-57 U/L; granice referentnih vrednosti su 9-62 U/L kod žena i 9-48 U/L kod muškaraca. Za turbidimetrijsku metodu su dobijene referentne granice kod odraslih osoba 29-236 U/L; referentni interval je 26-228 U/L kod žena i 29-257 U/L kod muškaraca. U populaciji Srbije kod zdravih odraslih osoba žene imaju statistički značajno više vrednosti aktivnosti lipaze u serumu i višu gornju granicu referentnih vrednosti određene spektrofotometrijskom metodom u odnosu na muškarce. Aktivnost lipaze kod odraslih osoba izmerena turbidimetrijskom metodom raste sa starenjem.

UVOD

I Humana pankreasna lipaza

Lipaze (EC 3.1.1.3. triacilglicerol acilhidrolaze) su grupa hidrosolubilnih enzima koji imaju sposobnost da deluju na međupovršini između vodene i organske faze. Oni primarno hidrolizuju estre glicerola i masnih kiselina dugih lanaca. Određivanje aktivnosti serumske lipaze se koristi u dijagnostici akutnog i hroničnog karcinoma pankreasa (1), nemalighnih hepatobilijarnih oboljenja i gastrointestinalnih bolesti (kao što je opstrukcija ductus pancreaticus-a i ductus choledochus-a), sepse, bubrežne i plućne disfunkcije, potkožnih krvarenja (2), cistične fibroze. Određivanje aktivnosti serumske lipaze za detekciju oboljenja pankreasa se pokazalo specifičnijim i osetljivijim markerom od određivanja aktivnosti α -amilaze (3), i uvršteno je u neophodna određivanja kada se javi abdominalni bol (4)

Postoji više metoda za određivanje aktivnosti serumske lipaze: spektrofotometrijske, turbidimetrijske, nefelometrijske, imunohemijske, metode koje se zasnivaju na biosenzorima (5).

Turbidimetrijsku metodu je uveo Neumann (6), a princip ove metode je merenje smanjenja zamućenja supstrata nakon dodatka seruma koji ima određenu aktivnost lipaze. Merenje intenziteta zamućenja vrši se na 340 nm. Kao supstrat se koristi trioleinska emulzija koja je stabilizovana dodavanjem žučnih kiselina, koji je specifičan za pankreasnu lipazu (7). Pri dovoljno visokim koncentracijama žučne soli stabilizuju trigliceridne emulzije i inhibiraju esterazu, kao i pankreasnu i nepankreasnu lipazu. Međutim, u prisustvu kolipaze, očuva se aktivnost pankreasne lipaze (8). Glavni nedostatak turbidimetrijske metode je ograničena linearnost. Porast koncentracije holesterola i triglicerida u seru-

mu dovodi po porasta koncentracije aktivnosti lipaze izmerene turbidimetrijskom metodom, o čemu se mora voditi računa pri analiziranju lipemičnih uzoraka. Hemoglobin do 7,5 g/L, ukupni bilirubin do 37,5 $\mu\text{mol/L}$ i direktni do 18,7 $\mu\text{mol/L}$ ne interferiraju sa ovom metodom.

Spektrofotometrijsku metodu je razvio Panthegini (9), a u upotrebi je od 2001 godine. U ovoj metodi se kao supstrat koristi 1,2-o-dilauril-rac-glicero-(6-metil rezurofin) estar glutarne kiseline. Ovaj supstrat je emulgovan od strane žučnih kiselina i na njega deluje lipaza u prisustvu kolipaze u baznoj sredini uz prisustvo jona Ca^{++} i tom prilikom nastaje glutarna kiselina i metil rezorufin. Intenzitet stvorenog obojenja se meri na 570nm. Hemoglobin do 3 g/L, ukupni bilirubin do 37,5 $\mu\text{mol/L}$ i direktni do 18,7 $\mu\text{mol/L}$ ne interferiraju sa spektrofotometrijskom metodom.

II Koncept referentnih vrednosti

Cilj standardizacije u laboratorijskoj medicini je da obezbedi da rezultati merenja parametara u uzorcima pacijenata budu tačni, sledljivi, nezavisni od procedure određivanja, kao i vremena i mesta njenog izvođenja. Održavanje tačnosti laboratorijskih rezultata merenja tokom vremena postiže se uspostavljanjem i održavanjem sledljivosti do referentnog sistema, kao i definisanjem preciznosti. Preciznost rezultata merenja zavisi od postupka merenja uključujući i posao operatera i određuje se procenom rezultata ponovljenih merenja obavljenih pod definisanim uslovima. Procedure za procenu preciznosti merenja postupaka opisani su u smernicama kao što su dokumenti Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (CLSI) (10).

Proces dobijanja referentnih vrednosti uključuje:

- Definisanje referentne populacije
- Izbor referentnih osoba
- Dobijanje i obradu uzoraka
- Statističku obradu dobijenih podataka

Pri definisanju referentne populacije važno je znati u koje svrhe će biti korišćene referentne vrednosti: za postavljanje dijagnoze i određivanje terapije; praćenje toka bolesti; procenu stanja zdravlja neke populacije; identifikaciju osoba sa rizikom za razvoj neke bolesti. Takođe je, pri definisanju referentne populacije, važno uzeti u obzir dodatne kriterijume koji se odnose na: pol, starost, rasu, etničko poreklo, geografsku lokaciju, genetske markere (krvna grupa, histokompatibilni antigeni, prisustvo ili odsustvo fenotipova proteina plazme), fiziološke faktore (faza menstrualnog ciklusa, odmaklost trudnoće), hronobiološke faktore, socioekonomski status (11).

Referentne osobe mogu biti odabrane *direktnim* načinom iz referentne populacije prema tačno definisanom kriterijumu, ili *indirektno*, kada se iz postojeće baze podataka odabiraju vrednosti sa zahtevanim karakteristikama. Kriterijumi za izbor referentnih osoba isključuju:

1. *bolest* – za isključivanje osoba iz referentne grupe koristi se lista bolesti koja je data od skandinavskog komiteta za referentne vrednosti: sistemske bolesti, insuficijencija bubrega, kongestivne bolesti srca, bolesti jetre, hronične respiratorne bolesti, malapsorpcioni sindromi.

2. *faktori rizika* – gojaznost, hipertenzija, profesionalni i genetski uslovljeni rizici; specifični laboratorijski nalazi: prisustvo proteina i glukoze u urinu, povećana sedimentacija

eritrocita, povećane koncentracije holesterola i triglicerida u krvi, snižen hematokrit

3. *unošenje farmakološki aktivnih supstanci* – lekovi, oralni kontraceptivi, alkohol, narkotici, duvan

4. *promenjena fiziološka stanja* – trudnoća, intenzivno vežbanje, fiziološki i mentalni poremećaji kao što su stres i depresija, uzimanje hrane neposredno pre uzimanja uzoraka.

Biohemijski parametri ne predstavljaju fiksne veličine već podležu većim ili manjim variranjima. Najviše su izražena variranja jednog parametra usled individualnih razlika u nekoj populaciji (interindividualna varijacija). Intraindividualna variranja za jedan parametar su obično daleko manja (12). Interindividualna variranja nekog parametra su najvećim delom posledica bioloških variranja uslovljenih genetskim faktorima karakterističnim za svakog pojedinca. Međutim, ona mogu biti posledica delovanja i spoljašnjih faktora, kao što su ishrana, fizičko naprezanje, vežbanje, pušenje, konzumiranje kafe, itd. Uzorak za određivanje referentnih vrednosti uzima se pod standardizovanim preanalitičkim uslovima da bi slučajna greška bila što manja, i da bi se smanjio ili eliminisao mogući uticaj na intra- i interindividualnu varijaciju.

Vrednosti dobijene od referentnih osoba zahtevaju statističku obradu da bi iz njih mogao da se izračuna referentni interval, odnosno raspon između granica referentnih vrednosti.

Zbog rasnih i etničkih razlika, razlika u ishrani, fizičkoj aktivnosti, i uopšte u načinu života, neophodno je da se referentne vrednosti biohemijskih parametara odrede za svaku populaciju pojedinačno. Do sada nije rađeno ispitivanje u kome su određene granice referentnih vrednosti za aktivnost lipaze u serumu u populaciji Srbije pomoću dve najčešće korišćene metode u rutinskom radu.

CILJEVI RADA

Prikazano ispitivanje bilo je usmereno na ispitivanje slaganja dve različite metode za određivanje aktivnosti lipaze u serumu: turbidimetrijskom metodom zasnovanom na razgradnji supstrata triacilglicerola, i spektrofotometrijskom metodom koja kao supstrat koristi 1,2-o-dilauril-rac-glicero-(6-metil rezurofin) estar glutarne kiseline, kao i na određivanje referentnih vrednosti za ove dve metode. Ciljevi rada su bili:

1. Ispitati slaganje turbidimetrijske i spektrofotometrijske metode za određivanje aktivnosti lipaze

2. Odrediti aktivnost lipaze u serumu zdrave populacije i ispitati uticaje pola i starosti na nivo aktivnosti lipaze određene ovim metodama.

MATERIJAL I METODE

Za potrebe određivanja referentnih vrednosti kod ukupno 252 ispitanika (125 žena i 127 muškaraca) starosti od 20 – 80 godina, određena je aktivnost lipaze u serumu ispitanika pomoću obe metode.

Ispitanici su bile zdrave osobe na kontrolnom pregledu medicine rada ili fizijatra, pitomci vojne akademije na sistematskom pregledu, kao i pacijenti koji su došli na operaciju iz estetskih razloga.

Anamnestički podaci ukazali su da ispitanici nemaju sistemsko, inflamatorno ili neko drugo oboljenje zbog kojeg bi bili isključeni iz ovog rada. Svi ispitanici su bili nepušači i

nisu uzimali nikakve lekove u poslednjih trideset dana.

Za ispitivanje je korišćen serum ispitanika. Krv je uzimana ujutru u periodu između 8 – 10 časova na tašte nakon perioda noćnog gladovanja, a serum je odvajan centrifugiranjem (10 minuta, 3000 g). Uzorci seruma su analizirani odmah. Merenja su vršena na biohemijskom analizatoru Roche/Hitachi 902 (Hitachi Science System, Ibaraki, Japan), a korišćeni su komercijalni testovi *Lipase UV assay*, kat br LI194 (turbidimetrijski, sa trioleinom kao supstratom) i *Lipase (liquid) assay*, kat br LI7979 [spektrofotometrijski, sa 1,2-o-dilauril-rac-glicerol-(6-metil rezurofin) estrom glutarne kiseline kao supstratom] proizvođača Randox (Randox Laboratories, Crumlin, Northern Ireland). Za kalibraciju je korišćen univerzalni kalibrator za automatske sisteme (C.F.A.S., proizvođača Roche Diagnostic, kat br 155962). Proizvođač deklariše vrednosti od 93,2 U/L za aktivnost lipaze određene spektrofotometrijskom metodom, a 628 U/L za turbidimetrijski postupak.

Rezultati ispitivanja aktivnosti lipaze određeni pomoću obe metode prikazani su kao $x \pm SD$ (KV). Ispitivanje statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti testirano je Student t-testom ili analizom varijanse. Chi-kvadrat test je korišćen za ispitivanje distribucije frekvenci aktivnosti lipaze u serumu pomoću obe metode, posebno za celokupnu populaciju, i pojedinačno za žene i muškarce.

Korelacija metoda je ispitana parametarskim testiranjem nakon logaritmovanja vrednosti za aktivnost lipaze određene pomoću spektrofotometrijske metode, jer je raspodela dobijenih podataka o aktivnosti lipaze u serumima cele populacije bila log-normalna.

Referentne vrednosti određene su neparametarskim testovima koji se preporučuju za opštu upotrebu jer ne zahtevaju definisanje raspodele i jednostavni su za izračunavanje. IFCC preporučuje interpercentilni interval, odnosno određivanje fraktila (11,13). Redni broj vrednosti koja odgovara fraktilu 0,025 određuje se iz izraza $0,025*(N+1)$ i to je donja granica referentnih vrednosti. Fraktil 0,975 odnosno gornja granica referentnih vrednosti izračunava se iz izraza $0,975*(N+1)$, gde je N broj podataka.

REZULTATI

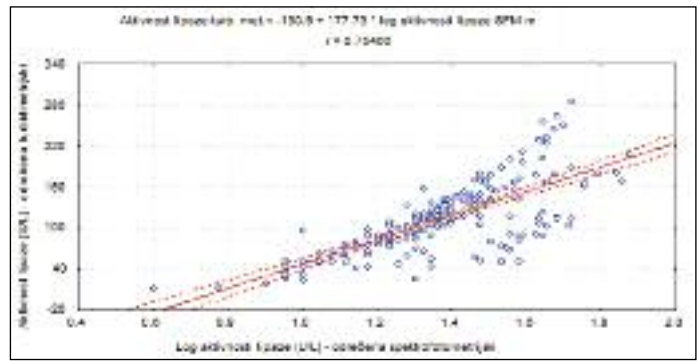
I Korelacija spektrofotometrijske metode sa turbidimetrijskom metodom za određivanje aktivnosti lipaze u serumu zdrave populacije

Za poređenje spektrofotometrijske metode sa turbidimetrijskom korišćen je parametarski test korelacije iako je raspodela podataka dobijenih za aktivnost lipaze spektrofotometrijskom log-normalna. Ovo je moguće kada se izvrši logaritmovanje dobijenih vrednosti i uporede se korelacionim testom sa vrednostima dobijenih turbidimetrijskom metodom.

Koeficijent korelacije je pokazao visoko slaganje ove dve metode $r = 0,75$, gde je slaganje rezultata sa nivoom značajnosti $p < 0,01$ (Slika 1).

II Određivanje nivoa aktivnosti lipaze u serumu zdravih osoba oba pola

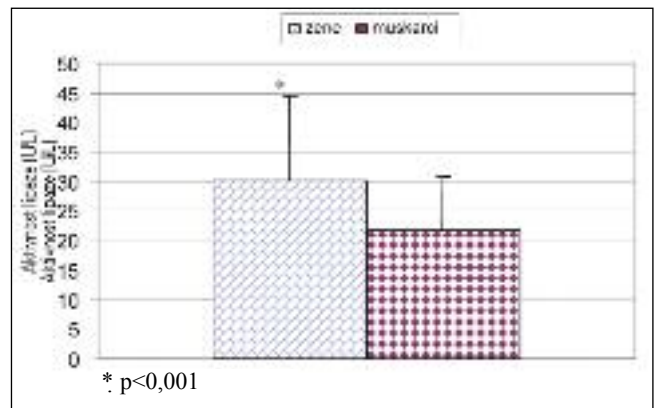
Aktivnost lipaze u serumu ispitanika određena je kod ukupno 252 ispitanika oba pola starosne dobi $39,5 \pm 10,1$ godina i indeksa telesne mase (BMI) $25,35 \pm 3,4$ kg/m². Od



Slika 1. Korelacija aktivnosti lipaze određene spektrofotometrijskom sa rezultatima dobijenih turbidimetrijskom metodom u ispitivanim uzorcima

toga je bilo 125 žena starosne dobi $41,2 \pm 11,03$ godine i BMI $23,79 \pm 3,11$ kg/m² i 127 muškaraca starosti $37,9 \pm 8,86$ godina i BMI $26,76 \pm 3,0$ kg/m².

Poređenjem dobijenih srednjih vrednosti za aktivnost lipaze u serumima žena i muškaraca, Studentovim t-testom dokazana je statistički značajna razlika ($p < 0,001$) između srednjih vrednosti aktivnosti lipaze kod žena i muškaraca koje su određene pomoću spektrofotometrijske metode (Slika 2). Kod turbidimetrijske metode ovakva razlika nije dokazana.



Slika 2. Aktivnosti lipaze u serumu žena (n=125) i muškaraca (n=127) određene pomoću spektrofotometrijske metode

Da bi se ispitao uticaj starenja na aktivnost lipaze u serumu ispitanici su podeljeni u tri starosne grupe (I 17-30 godina; II 31-44 godina; III 45-65 godina). Analizom varijanse ispitan je uticaj starosti kako u zajedničkoj grupi tako i u pojedinačnim grupama žena i muškaraca. Pronađena je statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u aktivnosti lipaze izmerene turbidimetrijskom metodom u zajedničkoj grupi i to između najmlađe i najstarije podgrupe ispitanika. Nije nađena statistički značajna razlika u aktivnosti lipaze izmerene spektrofotometrijskom metodom u zavisnosti od starosne dobi.

Kada je ispitivan uticaj starosti u podgrupama žena i muškaraca na aktivnost lipaze određene pomoću obe metode nije pronadna statistički značajna razlika u aktivnosti lipaze u zavisnosti od starosne dobi.

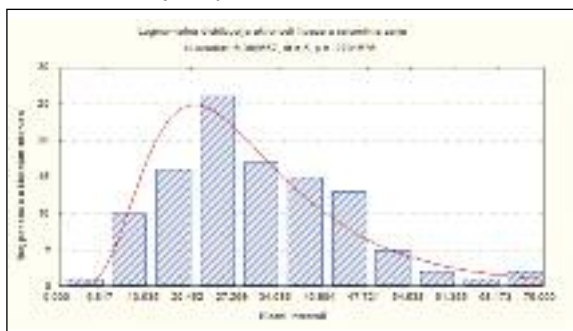
III Ispitivanje distribucije podataka

Statistički je dokazano da je raspodela log-normalana, a provera raspodele aktivnosti lipaze u serumima ispitanika urađena je Chi-kvadrat testom za obe metode. Prikaz lognormalne raspodele raspodele za spektrofotometrijsku metodu

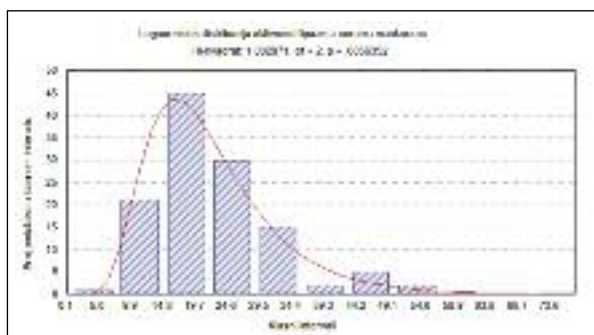
posebno kod muškaraca i žena kao i u zajedničkoj grupi dat je na slikama 3, 4 i 5.

Prikaz normalne raspodele podataka aktivnosti lipaze određene pomoću turbidimetrijske metode u celoj populaciji i pojedinačno kod muškaraca i žena dat je na slikama 6, 7 i 8.

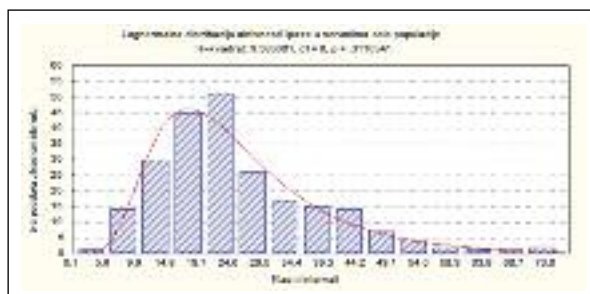
IV Određivanje referentnih vrednosti



Slika 3. Prikaz raspodele rezultata dobijenih određivanjem aktivnosti lipaze u serumima žena spektrofotometrijskom metodom



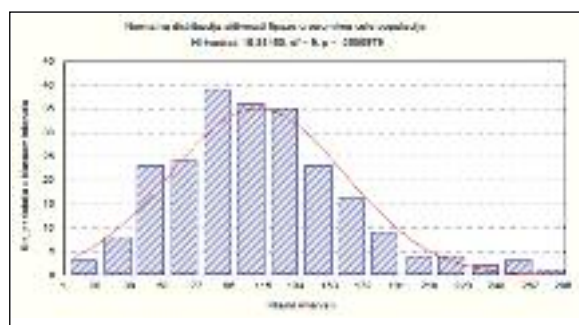
Slika 4. Prikaz raspodele podataka dobijenih određivanjem aktivnosti lipaze u serumima muškaraca spektrofotometrijskom metodom



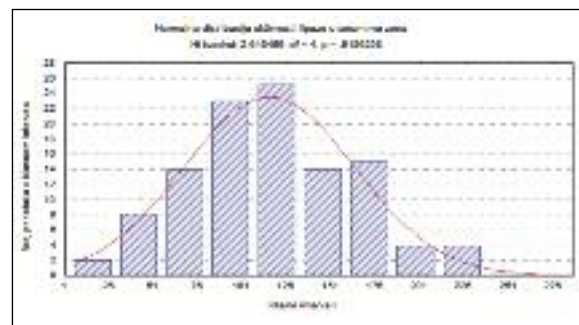
Slika 5. Prikaz lognormalne raspodele podataka dobijenih određivanjem aktivnosti lipaze u serumima cele populacije spektrofotometrijskom metodom

Referentne granice za aktivnost serumske lipaze određene spektrofotometrijskom metodom sa 1,2-o-dilauril-rac-glicero-(6-metil rezurofin) estrom gluterne kiseline kod odraslih osoba 9-57 U/L. Kod žena je istim postupkom utvrđena granica referentnih vrednosti 9-62 U/L, dok je kod muškaraca referentna granica za spektrofotometrijsku metodu 9-48 U/L.

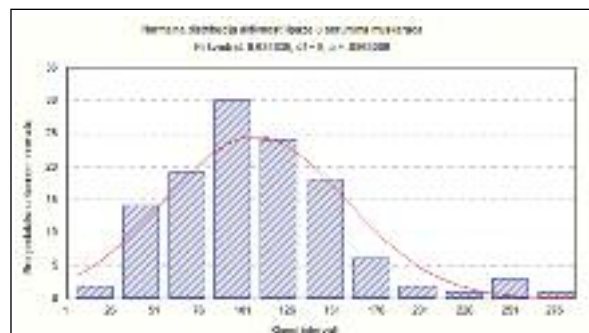
Primenom istog statističkog postupka za turbidimetrijsku metodu u kojoj se koristi triacil glicerol kao supstrat dobijene su vrednosti referentnih granica kod odraslih osoba 29-236 U/L. Kod žena je istim postupkom utvrđeni referentni interval 26-228 U/L, dok je kod muškaraca referentni interval za turbidimetrijsku metodu 29-257 U/L.



Slika 6. Prikaz normalne raspodele podataka dobijenih određivanjem aktivnosti lipaze u serumima cele populacije pomoću turbidimetrijske metode



Slika 7. Prikaz normalne raspodele podataka dobijenih određivanjem aktivnosti lipaze u serumima žena pomoću turbidimetrijske metode



Slika 8. Prikaz normalne raspodele podataka dobijenih određivanjem aktivnosti lipaze u serumima muškaraca pomoću turbidimetrijske metode

DISKUSIJA

Evaluacija kliničkih karakteristika laboratorijskih testova se sprovodi da bi se utvrdilo koliko se pouzdano testom može predvideti ili isključiti postojanje nekog oboljenja. Osetljivost testa govori o verovatnoći da test bude pozitivan u slučaju prisustva oboljenja, a specifičnost testa govori o verovatnoći da test bude negativan u slučaju odsustva oboljenja, tako da su ove dve karakteristike u inverznom odnosu. Tačnost je najfundamentalnija osobina određivanja koja daje mogućnost pravilne klasifikacije pacijenata u relevantne grupe.

Prilikom uvođenja nove metode u laboratorijsku praksu potrebno je uraditi korelaciju metoda. Na osnovu nje se može videti kakvo je slaganje dobijenih rezultata, i da li se rezultati dobijeni novom metodom mogu koristiti za praćenje toka bolesti ako je bolest utvrđena prethodnom metodom. Na tržištu Srbije u najvećoj meri su zastupljene

dve metode za određivanje aktivnosti lipaze u serumu – turbidimetrijska i spektrofotometrijska metoda. Do sada nije bilo radova u kojima su poređene ove dve metode. Rezultati u prikazanom radu su pokazali visoku korelaciju ($r=0,75$) između spektrofotometrijske i turbidimetrijske metode za određivanje aktivnosti lipaze u serumu, tako da se rezultati dobijeni bilo kojom od ove dve metode mogu koristiti za praćenje toka bolesti. Obe metode su pokazale dobru reproducibilnost, osetljivost i preciznost (dobijeni KV < 3,2% za spektrofotometrijsku, i < 2,3 % za turbidimetrijsku metodu).

Proizvođači biohemijских reagenasa preporučuju da svaka laboratorija odredi očekivane odnosno referentne vrednosti ispitivanog parametra, zbog karakteristika populacije koju data laboratorija pokriva. Referentne vrednosti omogućavaju poređenje podataka pri interpretaciji laboratorijskih rezultata pacijenata. Referentne vrednosti se mogu dobiti od „zdravih” osoba, ili, u određenim slučajevima, od pacijenata sa specifičnim bolestima ili u definisanim kliničkim stanjima. Utvrđivanje referentnih vrednosti je običan posao koji obuhvata odabir pogodnih referentnih osoba, pripremu ovih osoba za standardizovano uzimanje uzoraka, analiziranje uzoraka, statističku analizu i predstavljanje dobijenih rezultata⁽¹³⁾. Postoji mali broj podataka koji verifikuju razlike u referentnim populacijama osim za najčešće karakteristike - godine i pol, dok se druge kao što su etnička pripadnost, upotreba lekova, alkohola, pušenje, fizička aktivnost često zapostavljaju⁽¹⁴⁾. Za određivanje referentnih vrednosti IFCC preporučuje interpercentilni interval, odnosno određivanje fraktila. Fraktili su kvantitativne vrednosti između kojih (uključujući i te vrednosti) leži specifična centralna frakcija raspodele referentnih vrednosti, koja obično iznosi 0,95-ti deo raspodele (ili 95%); u tom slučaju se donja i gornja referentna granica određuju kao fraktili 0,025, odnosno 0,975^(11,13).

U ovom ispitivanju korišćena je direktna metoda za određivanje referentnih vrednosti aktivnosti lipaze za našu populaciju, pomoću dve najčešće korišćene metode. Anketirano je 252 zdrava dobrovoljca koja su negirala da imaju bilo koju bolest, nepušača, i koji ne uzimaju bilo koji lek. Od ukupnog broja ispitanika bilo je 125 žena starosti $45,3 \pm 11,93$ godina, i 127 muškaraca starosti $39,6 \pm 8,86$ godina.

U zajedničkoj grupi koju su sačinjavali svi ispitanici izmerena aktivnost lipaze spektrofotometrijskom metodom bila je $25,93 \pm 12,6$ U/L, dok je aktivnost enzima izmerena turbidimetrijskom metodom bila $113,62 \pm 51,7$ U/L.

Kod žena je izmerena aktivnost lipaze spektrofotometrijskom metodom $30,02 \pm 13,9$ U/L, dok je kod muškaraca izmerena aktivnost enzima istom metodom bila $21,6 \pm 9,6$ U/L, i ova razlika se pokazala kao statistički značajna ($p<0,001$).

Kod žena je izmerena aktivnost lipaze turbidimetrijskom metodom $118,74 \pm 50,1$ U/L, dok je kod muškaraca izmerena aktivnost enzima istom metodom bila $108,59 \pm 53$ U/L. Poređenjem srednjih vrednosti dobijenih aktivnosti za lipazu kod muškaraca i žena pomoću ove metode razlika između njih nije dokazana.

Da bi se ispitalo uticaj starosti na aktivnost lipaze u serumu ispitanici su podeljeni na osnovu starosne dobi u pet grupa (17-30; 31-40; 41-50; 51-60; i 61-80 godina).

Analizom varijanse ispitan je uticaj starosti kako u zajedničkoj grupi tako i u pojedinačnim grupama žena i muškaraca. Pronađena je statistički značajna razlika ($p<0,05$) u aktivnosti lipaze izmerene turbidimetrijskom metodom u zajedničkoj grupi i to između najmlađe i najstarije podgrupe ispitanika, dok za spektrofotometrijsku metodu nije pronadena razlika između starosnih podgrupa. Ovakva razlika u rezultatima dobijenim pomoću dve metode može se objasniti da se kod starijih osoba pojavljuje veći broj interferenata, verovatno medikamentoznog porekla, koji utiču na turbidimetrijsku, ali ne i na spektrofotometrijsku metodu. Kada je ispitivan uticaj starosti u podgrupama žena i muškaraca na aktivnost lipaze određene pomoću obe metode nije pronadena statistički značajna razlika u aktivnosti lipaze u zavisnosti od starosne dobi.

Nakon određivanja aktivnosti enzima lipaza u serumu ispitanika sa obe metode, izvršili smo ispitivanje distribucije podataka. Kod svih ispitanika za obe metode imali smo lognormalnu distribuciju podataka, što je dokazano korišćenjem Chi-kvadrat testa. Ovakva raspodela podataka je uslovlila da se za određivanje korelacije metoda mora koristiti neparametarski Spearmanov test.

Iz istog razloga prilikom obrade ispitanika određeni su percentili iz kojih su neparametarskim testom izračunate gornja i donja granica referentnih intervala za spektrofotometrijsku i turbidimetrijsku metodu. Za odrasle osobe su određene granice referentnih vrednosti aktivnosti lipaze spektrofotometrijskom metodom 9-57 U/L (13-60 U/L vrednosti date uz test proizvođača). Kod muškaraca su vrednosti bile niže i iznosile su od 9-48 U/L, dok je kod žena istim postupkom utvrđena granica referentnih vrednosti 9-62 U/L. Za populaciju SAD-a za su utvrđene referentne vrednosti 0-60 U/L date od strane Američkog udruženja za kliničku hemiju⁽¹⁵⁾.

Primenom istog statističkog postupka za određivanje referentnog intervala enzimske aktivnosti lipaze u serumu zdravih ispitanika pomoću turbidimetrijske metode u kojoj se koristi triacil glicerol kao supstrat dobijene su vrednosti referentnih granica: kod odraslih osoba 29-236 U/L; kod žena je referentni interval 26-228 U/L, dok je kod muškaraca referentni interval 29-257 U/L. Nešto više vrednosti referentnog intervala kod muškaraca u odnosu na žene se mogu objasniti prisustvom veće koncentracije lipida u serumu muškaraca u odnosu na serume žena. Poznato je da kod turbidimetrijskih metoda dvogube i trogube veze koje su prisutne na lipidima utiču na metodu zbog direktnog uticaja na izmereni turbiditet. Znajući da je nivo lipida kod žena niži u odnosu na muškarce razumljivo je što su referentne vrednosti dobijene turbidimetrijskom metodom niže kod žena u odnosu na muškarce.

Kada je u pitanju turbidimetrijska metoda za određivanje aktivnosti lipaze u serumu, referentne vrednosti za populaciju zdravih ispitanika dobijene u ovom radu razlikuju se od referentnih vrednosti koje je dao proizvođač uz test za određivanje aktivnosti lipaze sa triacilglicerolom kod odraslih osoba i koji iznosi 0-190 U/L, koliko iznosi referentni interval za populaciju Velike Britanije⁽¹⁵⁾. Ovaj podatak je ukazao na potrebu za određivanjem referentnih granica za biohemijske parametre u populaciji Srbije, a zbog već pomenutih etničkih, psihosocijalnih i razlika u ishrani.

ZAKLJUČAK

Između spektrofotometrijske i turbidimetrijske metode za određivanje aktivnosti serumske lipaze postoji visoka korelacija. Aktivnost lipaze kod odraslih osoba izmerena

turbidimetrijskom metodom raste sa starenjem. Spektrofotometrijska metoda za određivanje aktivnosti za određivanje aktivnosti lipaze ima izvesnu prednost nad turbidimetrijskom metodom zbog manjeg uticaja interferenata i većeg opsega linearnosti.

Abstract

Lipases are enzymes which hydrolyze esters of glycerol and long chain fatty acids. Determination of serum lipase in detecting pancreatic diseases is more specific and sensitive marker than determination of α -amylase activity, and has been included in necessary determining when abdominal pain appears. On racial and ethnic differences, differences in diet, physical activity, and general lifestyle, it is necessary to establish reference values of biochemical parameters for each population separately. This study was directed to examine correlation between two different methods, turbidimetric and colorimetric, for the determination of lipase activity in serum, as well as the determination of the reference values for these two methods. For this purpose, in a total of 252 patients (125 women and 127 men), ages of 20-80 years, the lipase activity was determined in the serum of patients with both methods. The results showed high agreement of these two methods ($r=0.75$, $p<0.01$). Obtained reference limits for serum lipase activity by spectrophotometric method in adults are 9-57 U/L; the limits of reference values are 9-62 U/L in women and 9-48 U/L in men. For turbidimetric method obtained reference limit for adults are 29-236 U/L; reference range are 26-228 U/L in women and 29-257 U/L in men. Healthy adult women in Serbian population have significantly higher values of lipase activity in serum and a higher upper limit of the reference values determined by spectrophotometric method compared to men. Lipase activity in adults measured turbidimetrically increases with aging.

LITERATURA

1. Tietz NW, Shuey DF. Lipase in serum- the elusive enzyme: an overview. *Clin Chem.* 1993; 39:746-756.
2. Diani G, Poma G, Novazzi F, Zanirato S, Porta C, Moroni M, et al. Increased serum lipase with associated normoamilasemia in cancer patients. *Clin Chem.* 1998;44:1043-5.
3. Thomas L. Clinical Laboratory Diagnostics: Use and assessment of clinical laboratory results. 1st ed. Frankfurt/Main:TH Books-Verl-Ges, 1998;95-97.
4. 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.
5. Stoytcheva M, Montero G, Zlatev R, Leon JA, Gochev V. Analytical methods for lipase activity determination: A review. *Curr Anal Chem* 2012;8:400-407.
6. Neumann U, et al. 1.3.1.2 Turbidimetric method, in Bergmeyer Methods of Enzymatic Analysis, Third edition, Verlag Chemie 1984; vol IV.
7. Gilham D, Lehner R. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods.* 2005;36(2):139-47.
8. Desnuelle, P. Pancreatic lipase. *Advances in Enzymology and Related areas of Molecular Biology* 2009;23.
9. 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.
10. Vesper HW, Miller WG, Myers GL. Reference materials and commutability. *Clin Biochem Rev.* 2007;28(4):139-147.
11. Majkić-Singh N, Spasić S, Stojanov M, Jelić-Ivanović Z, Kalimanovska V. Medicinska biohemija - principi i metode. Praktikum Beograd, 1995.
12. Harris EK, DeMets DL. Effects of intra- and inter-individual variation on distributions of single measurements. *Clin Chem.* 1972;18:244-249.
13. Solberg HE. The IFCC recommendation on estimation of reference intervals. The RefVal Program. *Clin Chem Lab Med* 2004;42(7):710-714.
14. Ritchie RF, Palomaki G. Selecting clinically relevant populations for reference intervals. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42(7):702-709.
15. Taes YE, et al. Prolonged Hyperamilasemia Attributed to a Novel Type of macrolipase. *Clin Chem.* 2000;46:2008-213.

■ Rad je primljen 21.10.2014. Revidiran 30.10.2014. Prihvaćen 10.11.2014.