

IFCC metode m mjerenje kataličkih koncentracija enzima. 1. dio - Temeljne pretpostavke kod određivanja katalitičke koncentracije enzima u krvnom serumu i plazmi čovjeka

Flögel, Mirna; Juretić, Dubravka

Source / Izvornik: **Glasnik Hrvatskog društva medicinskih biokemičara, 1992, 2, 9 - 23**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:246002>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Preporuke

IFCC metode za mjerenje katalitičkih koncentracija enzima
1. dio - Temeljne pretpostavke kod određivanja katalitičke koncentracije enzima u krvnom serumu i plazmi čovjekaMirna Flögel i Dubravka Juretic¹**Uvod**

Preporuke Internacionalne federacije kliničke kemije za mjerenje katalitičkih koncentracija enzima (1) izdjelali su i usuglasili svjetski eksperti, a odobrio ih je Odbor za standarde. Uskladenost stajališta o metodologiji analitičkog rada i načina prezentacije rezultata izuzetno je važna radi univerzalnog razumijevanja, jednoznačnosti izražavanja i uklanjanja svih nepotrebnih razlika u profesionalnom sporazumijevanju. U tu svrhu zahtijeva se jasno definiranje relevantnih pojmova, količina i jedinica, te detaljna specifikacija uvjeta i načina rada kao i prikaza analitičkih rezultata. Savjet IFCC-a prihvatio je tako formulirane i usklađene preporuke na temelju provedene ankete.

Članovi Ekspertne grupe za enzime (EPE) i Odbora za standarde (CS) Međunarodne federacije kliničke kemije (IFCC) smatraju da se izbor metode koja treba poslužiti kao međunarodno prihvaćena referentna metoda za mjerenje katalitičke aktivnosti određenog enzima mora temeljiti na eksperimentalnim opažanjima, provjerenim u brojnim laboratorijima. Sve takve metode u daljnjem će se tekstu zvati IFCC metode.

Postignuta suglasnost odnosi se na detaljno definiranje metode, a ne na specifikaciju alternativnih ili komplementarnih putova za određivanje referentnih podataka o enzimima. Cilj je ovog međunarodnog napora kliničke enzimologije postići opće prihvaćanje IFCC metoda.

Sve definicije pojmova i nazivlja moraju biti jasne i jednoznačne, kako ne bi dolazilo do nesporazuma i zabuna. Članovi organizacijskih tijela koja predlažu metode

¹Zavod za medicinsku biokemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

ne uključuju se osobno u eksperimentalna istraživanja. Oni upozoravaju na nedoumice, na još neusuglašene razlike i nepotpune eksperimentalne sadržaje, kako bi stimulirali znanstvene krugove da poduzmu potrebna istraživanja i objavljuju rezultate na standardni način.

Ciljevi

Središnja svrha napora Ekspertne grupe za enzime jest da se uspije tako definirati IFCC metodu, da bude zajamčena maksimalna pouzdanost i osigurani optimalni uvjeti, da se tom metodom postiže maksimalna reproducibilnost analiza unutar svakog pojedinog laboratorija kao i među laboratorijima širom svijeta. Prema tome od osnovnog su značenja osjetljivost, specifičnost, preciznost i točnost svakog definiranog mjernog sustava.

Uvođenje IFCC metoda u kliničku enzimologiju ne smije kočiti daljnja istraživanja, razvitak ili unapređenja tako da se mora osigurati mehanizam naknadnog unošenja odgovarajućih pozitivnih izmjena. Svako provjereno poboljšanje preporučit će se kao nova IFCC metoda pa će na taj način novi postupci zamijeniti ranije preporučene.

Dijagnostičko značenje i valjanost određivanja katalitičke aktivnosti pojedinih enzima u krvnom serumu ili plazmi pokazali su se kao izuzetno važni činioci u medicini. Njihova se važnost mora ne samo zadržati na toj razini nego je treba dalje produbljivati i širiti. Svaka metoda mora doprinijeti raspoznavanju zdravih osoba od oboljelih pojedinaca za čiju se bolest zna da utječe na povećanje ili smanjenje katalitičke koncentracije pojedinog enzima. Pri tome treba voditi računa ne samo o učinku bolesti izraženom u promjeni ukupne aktivnosti određenog enzima, nego i o međusobnom odnosu raznorodnih molekularnih oblika u kojima se taj enzim pojavljuje.

Ne treba očekivati da će IFCC metode biti odmah prihvaćene u svim uslužnim laboratorijima jer je prirodno da će uhodane rutinske metode, prilagođene mehaniziranoj analitičkoj opremi pružati otpor, pa ipak ne smije se dozvoliti da inercija ugrozi dalekosežno jedinstvo i svestranu prikladnost IFCC metoda.

1. Pojmovi, nazivlje i definicije

Nomenklatura. Unutar Internacionalne unije biokemije i molekularne biologije (IUBMB) djeluje posebna Komisija za biokemijsku nomenklaturu. Preporuke te komisije treba dosljedno poštivati u vezi nomenklature, klasifikacije i simbola. (2,3)

Nazivlje koje se koristi u propisima i opisu IFCC metoda ne smije sadržavati trivijalna imena i laboratorijski žargon, nego se mora strogo pridržavati onih naziva koje je prihvatila Komisija za biokemijsku nomenklaturu.

Nazivlje IFCC metoda u suglasju je i temelji se na preporukama IFCC Ureda za referentne materijale i metode. Međutim, da dokumenti i prijedlozi Ekspertne grupe za enzime budu neprijeporno jasni i jednoznačni, da postignu svoju svrhu, tj. da budu svuda jednako shvaćeni i u primjeni jednako valjani, potrebno je protumačiti upotrebljeno stručno nazivlje i precizno definirati sve relevantne pojmove kako slijedi u daljnjem tekstu.

Optimalni uvjeti su takvi reakcijski uvjeti koji osiguravaju maksimalni katalitički efekt kod odabrane temperature, a uključuju slijedeće činioce:

- a) identitet i koncentracije supstrata, kofaktora, aktivatora, pufera i alosteričkih efektoru;
- b) katalitičku koncentraciju indikatorskog (-skih) enzima i pomoćnog (-nih) enzima;
- c) pH i ionsku jakost reakcijske smjese i
- d) ostale varijable (primjerice isključenje poznatih inhibitora).

Optimirana metoda je metoda kojom se nastojalo podesiti reakcijske uvjete što bliže optimalnim uvjetima, ali tako da je dosegnut primarni cilj, a taj je osigurati postizanje maksimalne reproducibilnosti konačnog mjernog sustava. Reakcijski uvjeti optimirane metode su zbog različitih eksperimentalnih ograničenja najčešće blago modificirani u odnosu na optimalne. Prije nego što se određena metoda predloži kao potencijalna IFCC metoda, tu metodu treba prethodno optimirati, ili drugim riječima, treba optimirati sve varijable kojima su definirani reakcijski uvjeti.

Serumski enzim je naziv koji treba izbjegavati, jer ono, na što se taj termin odnosi, jest **enzim koji se pojavljuje u serumu**. Pravilno je dakle kazati "aminotransferaza u serumu", a ne valja reći "serumska aminotransferaza".

Kinetička metoda (ili tehnika) je naziv koji treba izbjegavati, ako se pri tome misli na kontinuirano praćenje tijeka reakcije diskretnim ili kontinuiranim bilježenjem eksperimentalnih točaka, koje odgovaraju napredovanju reakcije. Umjesto "kinetička metoda" preporuča se izraz **kontinuirana metoda** ili **metoda kontinuiranog praćenja reakcije**. Činjenica je da kinetičke tehnike uključuju i metode koje se temelje na mjerenju podmaklosti reakcije mjerenjem samo jedne točke (metode "jedne točke"), dviju točaka (metode "dvije točke") ili mjerenjem krajnje točke (metode "krajnje točke").

Sve se te metode temelje na brzini ili kinetici reakcije, ali ne i na kontinuiranom mjerenju kinetike. Takve se kinetičke metode koriste i za određivanje koncentracija supstrata.

Kod određivanja enzimске aktivnosti u mjernim sustavima, u kojima se odvijaju dvije ili više vezanih reakcija koristi se slijedeće nazivlje:

a) **primarna reakcija**, b) **indikatorska reakcija** i c) **pomoćna reakcija**.

Izvor enzima koji katalizira primarnu reakciju je serum, dok indikatorski i pomoćni enzimi sudjeluju u reakcijskom sustavu kao reagensi.

Katalitička aktivnost (simbol z) je jedini prihvaćeni termin umjesto svih ranije predlaganih i korištenih izraza, kao što su količina enzima, katalitička količina, enzimska aktivnost ili katalitička sposobnost.

Katalitička aktivnost enzima je svojstvo koje se mjeri katalitičkom brzinom reakcije koja se odnosi na specifičnu kemijsku reakciju u definiranom reakcijskom test-sustavu.

Katalitička aktivnost odnosi se na enzim izvornog sustava koji je sadržavao taj enzim, a ne na reakcijsku smjesu. Zbog toga postoji bitna pojmovna razlika između brzine reakcije i katalitičke aktivnosti, iako se katalitička aktivnost mjeri tom brzinom reakcije. Katalitička aktivnost je ekstenzivno svojstvo, što znači, ako se udvostruči sustav koji sadrži enzim, udvostručit će se i katalitička aktivnost. Nasuprot tome koncentracija (o kojoj ovisi brzina reakcije) je intenzivno svojstvo: koncentracija ostaje ista uzme li se primjerice 2 ml otopine ili 4 ml iste otopine.

Katalitička brzina reakcije je opažena brzina reakcije umanjena za spontanu brzinu reakcije.

Katalitička aktivnost je izvedena veličina koju se može smatrati ekvidimenzionalnom veličinom brzini reakcije samo ako brzinu reakcije izrazimo dimenzijom količina tvari (mol) podijeljena vremenom (s).

U klasičnoj kinetici brzina se reakcije definira kao promjena koncentracije tvari (mol/l) u pripadnom vremenu (s). Kako u praksi najčešće određujemo promjenu koncentracije u pripadnom vremenu (primjerice kod fotometrijskih mjerenja određuje se promjena apsorbancije u pripadnom vremenu $\Delta A/\Delta t$, a promjena apsorbancije direktno ovisi o promjeni koncentracije), promjena količine tvari dobiva se množenjem promjene koncentracije tvari odgovarajućim volumenom.

Jedinica katalitičke aktivnosti je katal (simbol kat). Alternativna jedinica je mol u sekundi (mol/s).

Prema svojoj definiciji katalitička se aktivnost mjeri istom SI jedinicom kao brzina reakcije, tj. mol/s. Međutim, posebno ime "katal", koje ne pripada SI jedinicama, preporuča se u kontekstu enzimske i kliničke kemije. Nije potrebno objašnjavati da je upotreba jednog naziva i jednog simbola spretnija od složene jedinice. To postaje posebno bjelodano kad se iz takve složene jedinice izvode još složenije, kao što je na primjer katalitička koncentracija.

Jedinica "katal", kao svaka jedinica, nezavisna je o reakcijskom test-sustavu. Nasuprot tome, izmjerena katalitička aktivnost (određenog enzima u reakcijskom sustavu), koja se odnosi na jednu metodu određivanja razlikuje se od katalitičke aktivnosti izmjerene drugom metodom. Prema tome vezanost uz metodu ne dolazi do izražaja u definiciji jedinice nego kod kvantitativnog izricanja katalitičke aktivnosti.

Katal je dakako jedinica koja je kompatibilna s SI sustavom.

Do nedavna u upotrebi je bila jedinica za enzimsku aktivnost (simbol U) definirana kao $1U = 1 \mu\text{mol}/\text{min}$. Ta se jedinica potpuno napušta. Izrazi li se u katalima vrijedi odnos: $1U = 16.67 \text{ nmol}/\text{s} = 16.67 \text{ nkat}$.

Koncentracija katalitičke aktivnosti ili katalitička koncentracija (simbol b) izražava se jedinicom katal po litri (kat/l, kat l^{-1} ili $(\text{mol}/\text{s})/\text{l}$) odnosno $\text{mol s}^{-1}\text{l}^{-1}$. Skraćeni naziv "katalitička koncentracija" prihvaćen je u praksi. Volumen koji se uzima u račun kod izražavanja katalitičke koncentracije odnosi se na izvorni sustav koji sadrži enzim, a ne na test sustav. Preporuča se da se volumen izražava u litrama, a ne u mililitrima. Vrijedi relacija $1U/\text{l} = 16.67\text{nkat}/\text{l}$.

2. Reakcijska temperatura

Svaka metoda provodi se kod točno određene temperature koja je sastavni dio metode. Temperatura se izražava u Celsiusovim stupnjevima. Gdje god je to moguće, preporuča se izvoditi sve IFCC metode kod iste temperature i to kod 30.00°C .

Kontrola temperature

Točnost. Nakon otpočinjanja enzimski katalizirane reakcije reakcijska smjesa mora biti u temperaturnoj ravnoteži na radnoj temperaturi i odstupanja ne smiju biti veća od $\pm 0.05^\circ\text{C}$. Radna temperatura bit će dakle $30.00 \pm 0.05^\circ\text{C}$.

Preciznost. Metode, postupci i oprema za kontrolu temperature pri miješanju uzorka s reagensima i pri unošenju reakcijske smjese u mjerni uređaj moraju se tako podesiti da za cijelo vrijeme promatranja reakcijske smjese izmjerena temperatura u

središtu sustava ne varira za više od $+0.1^{\circ}\text{C}$ što se iskazuje standardnom devijacijom od najmanje 16 mjerenja temperature slijedeći isti postupak i upotrebljavajući iste reagense kao i kod određivanja katalitičke aktivnosti.

Temperaturni senzor

Točnost i preciznost određene reakcijske temperature mora se moći provjeriti uređajem za mjerenje temperature nezavisno od kontrolnog uređaja za podešavanje i održavanje reakcijske temperature. Taj nezavisni uređaj za mjerenje temperature mora imati specificirana svojstva, koja jamče pouzdanost i odgovarajuću točnost.

Točnost očitavanja temperature. Srednja vrijednost reakcijske temperature mora biti mjerena standardiziranim temperaturnim senzorom, kalibriranim na nekoliko temperatura u temperaturnom području od $24\text{--}38^{\circ}\text{C}$. Mjerna skala takvog termometra treba imati linearnu podjelu s naznačenim podjeljcima od 0.05°C .(4)

Termička masa, toplinski kapacitet i vodljivost.

Toplinski kapacitet imerzijskog elementa, uključujući njegove električne vodiče, mora biti manji od 0.01 (1%) toplinskog kapaciteta ukupnog volumena reakcijskog sustava.

Termička vodljivost imerzijskog članka mora biti takva da i kod ekstremnih razlika temperature okoline i temperature tekućine u kiveti ne utječe na točnost temperaturnog mjerenja. Eventualna promjena temperature, nastala zbog tog uzroka (ili zbog Joulove topline unutar senzora), mora biti manja od 0.05°C za vrijeme cijelog promatranja.

Brzina odgovora mjernog instrumenta na promjenu. Radi sigurnosti da se registriraju značajne kratkotrajne (prolazne) temperaturne promjene, vremenska konstanta eksponencijalnog odgovora imerzijskog članka i mjernog sustava mora biti manja od 0.1 (10%) od predviđenog vremena promatranja u tijeku kojeg se mjeri katalitička aktivnost.

3. Izbor metode

Pri izboru metode za određivanje katalitičke aktivnosti enzima treba osim suglasja s općenitim tvrdnjama, izrečenim pod naslovom "Ciljevi", voditi računa i o slijedećem nizu kriterija:

Preporučena metoda mora biti dovoljno specifična da se osigura njezina dijagnostička valjanost. Kod utvrđivanja optimalnih uvjeta optimira se između ostalog i specifičnost reagensa, jer je specifičnost test-sustava izuzetno važan činitelj u procjeni prikladnosti metode. Na primjer, tosil-arginin-metil-ester hidrolizira velikom brzinom uz pomoć trombina, pa bi na prvi pogled mogao poslužiti kao optimalni supstrat. Međutim, mnoge druge proteaze hidroliziraju isti supstrat i zbog toga se ne preporuča metoda, u kojoj bi se nespecifični supstrat koristio kao supstrat u test reakciji za određivanje trombina u plazmi. Analogna razmišljanja neizostavna su kod odlučivanja o izboru preporučenih supstrata za kiselu fosfatazu, lipazu, aminopeptidazu, arilamidazu (EC 3.4.11.2), kolinesterazu (EC 3.1.1.8) i druge hidrolaze.

Kod izbora tehnika mjerenja prednost imaju one tehnike mjerenja kojima se izravno i kontinuirano prati napredovanje reakcije. Treba izbjegavati tehnike diskretnih mjerenja uz postupno uzimanje alikvotnih uzoraka za mjerenje, jer zahtijevaju dodatno rukovanje. Međutim, bez obzira na upotrijebljenu tehniku, važno je imati dovoljno podataka, odnosno dovoljno izmjerenih točaka, da krivulja, koja predstavlja napredovanje reakcije, bude jasno definirana.

Za izračunavanje katalitičke aktivnosti koristi se onaj dio kinetičke krivulje koji je nultog reda s obzirom na koncentraciju substrata, dakle početni linearni dio krivulje. Taj dio kontinuiranog kinetičkog mjerenja odnosi se na početnu brzinu enzimske reakcije koja se ustali tek nakon što je reakcijska smjesa dobro promiješana i nakon eventualnog početnog zastoja, koji se ponekad ne može ukloniti podešavanjem reakcijskih uvjeta.

Broj i vrste operacija treba svesti na minimum kako bi se izbjegle suvišne pogreške uslijed višekratnog pipetiranja i kontakta sa stijenkama posuda. Kadgod je to moguće, treba umjesto pojedinačnog dodavanja reagensa upotrebljavati unaprijed priredene smjese reagensa.

Opis metode treba biti potpun i detaljan. On treba sadržavati sve potrebne podatke, kojima se osiguravaju optimalni uvjeti, i sve elemente o kojima ovisi pouzdanost i reproducibilnost metode.

Kod definiranja metode za mjerenje katalitičke koncentracije enzima koji se mogu pojaviti kao smjesa izoenzima u serumu ili plazmi susrećemo slijedeći opći problem: nemoguće je predskazati relativni udio različitih oblika enzima u pojedinom uzorku. Ne samo da stupanj oštećenja utječe na odnos među enzimima, nego postoje različiti odnosi izoenzima u različitim organima iz kojih se enzimi oslobadaju.

Uvjeti za mjerenje brzine reakcije koju katalizira nekolicina enzima ili izoenzima, svaki svojim individualnim katalitičkim značajkama mogu se odrediti koristeći dva različita pristupa.

Prvi pristup sastoji se u tome da izaberemo dobro ispitani preparat jednog enzimskog oblika i odredimo optimalne uvjete za taj enzim. Prikladnost specificiranih uvjeta možemo u tom slučaju lako provjeriti na reproducibilnom izvoru enzima. Valjanost takvog pristupa može se umanjiti, ako taj referentni enzim ne odgovara u potpunosti svojstvima enzima u uzorku, na koji će se primijeniti metoda, jer izabrani reakcijski uvjeti ne moraju odgovarati stvarnom uzorku.

Drugi pristup određivanju optimalnih reakcijskih uvjeta koristi serum kao izvor enzima u test-sustavu. Uzorci seruma za tu svrhu sadrže smjesu enzimskih oblika koji približno odgovaraju stvarnim uzorcima na koje će se primjenjivati metoda.

Bez obzira kojim se pristupom ispituje test sustav, izbor konačnih uvjeta treba dokumentirati grafičkim i tabelarnim prikazom rezultata istraživanja. U takvu dokumentaciju spadaju na primjer grafički prikazi koji omogućuju određivanje kinetičkih konstanti ili oni koji sadrže podatke različitih relevantnih ispitivanja vezanih uz alternativni pufer ili alternativne supstrate.

Volumen test smjese mora sadržavati fiksni volumni udio uzorka u ukupnoj reakcijskoj smjesi. Omjer volumena uzorka prema ukupnom volumenu mora se podesiti tako da se ukloni bilo kakav mogući učinak puferskog kapaciteta uzorka, i da se efekti prisutnih inhibitora, kofaktora, metabolita i drugih enzima u uzorku svedu na minimum.

Početna brzina reakcije teorijski neograničeno raste s porastom koncentracije enzima uz pretpostavku da je supstrat prisutan u saturacijskoj koncentraciji. U praksi, međutim, nailazimo na ograničenje koje je nametnuto činjenicom da je potrebno određeno minimalno konačno vrijeme da bi se registrirala krivulja koja predstavlja napredovanje reakcije.

IFCC metoda mora biti tako oblikovana da se omogući izravno određivanje katalitičkih koncentracija enzima u maksimalnom rasponu katalitičkih koncentracija, a da pri tom nije potrebna nikakva prethodna dodatna obrada uzorka, kao što je primjerice razređivanje. Nemoguće je naime preporučiti univerzalno prikladan način razređivanja uzoraka koji sadrže enzime, pa treba prihvatiti činjenicu da za svaku metodu postoji određeni raspon koncentracija izvan kojeg rezultati metode postaju manje pouzdani, čak i kad određena metoda za slučaj potrebe predviđa i preporuča specifični postupak razređivanja uzorka.

Za određivanje analitičke varijabilnosti metode treba upotrebljavati uzorke humanog seruma koji po mogućnosti sadrže katalitičke koncentracije koje najbolje diferenciraju zdrave ispitanike od onih za koje se zna da zbog specifične bolesti posjeduju katalitičke koncentracije enzima u serumu izvan referentnog raspona.

Internacionalna komisija eksperata za enzime smatra da svaka IFCC metoda mora biti napisana i objavljena na posve određeni način. U naslovu treba pisati preporučeno ime enzima (bivše trivijalno ime) nakon čega slijedi sistematsko ime i broj, oboje u zagradi. Rezultate treba prikazati razumljivo.

Primjer:

IFCC metoda (1976) za aspartat aminotransferazu (l-aspartat:2-oksoglutarat aminotransferaza, EC 2.6.1.1.).

Mjerenje katalitičke koncentracije u humanom serumu

Uvod i izbor metode (Kratko opis enzima i sve ostale informacije koje su potrebne zbog jasnoće).

Princip (Prikaz reakcijske sheme tako da je pokazan smjer mjerenja i kratko izložena tehnika mjerenja).

Optimalni uvjeti za mjerenje.

Oprema

Reagensi

Izvor i uzimanje uzorka, način prenošenja i skladištenja.

Postupak mjerenja.

Analitička varijabilnost.

Interpretacija.

Bibliografski podaci.

Dodaci.

4. Oprema

Svojstva mjernih instrumenata i druge opreme koja se koristi u analitičkom radu mora biti u skladu sa specificiranim zahtjevima kako bi se smanjile pogreške mjerenja od laboratorija do laboratorija zbog instrumentacije.

Svaka metoda mora dakle, uz ostalo, specificirati i zahtjeve koji se odnose na instrumentalna mjerenja. Tako specifični zahtjevi koji se odnose na valjanost spektrometrijskih mjerenja uključuju: točnost valne duljine, širinu spektralne vrpce, raspon apsorbancije i linearnost unutar raspona, pomak, rasap energije radijacije i izbor valne

duljine. Fotometrijske pogreške često se zanemaruju, a one mogu izazvati sistematičke relativne razlike u apsorbanciji od 0.01 do 0.05, što ni u kojem slučaju nije dozvoljeno. Pogreške zbog fluorescentnog učinka mogu također stvarati probleme, posebno kod mjerenja koja se odnose na reducirani NAD.

Odgovarajuće specifikacije moraju se naznačiti i za instrumente koji se ne odnose na spektrometriju, a koje, kad se ne poštuju, mogu izazvati sistematičke pogreške.

Kivete moraju imati paralelne stijenke izrađene od optičkog stakla ili kvarca da prenose svjetlo bez smanjenja intenziteta zbog apsorpcije, refleksije ili rasipanja svjetlosnih zraka. Na snop svjetla ne smiju utjecati zidovi kiveta ili površinski efekti stijenki, a unutarnja duljina svjetlosnog puta treba biti 10.00 mm i ne smije od toga odstupati za više od ± 0.01 mm. Ako se upotrebljavaju kivete drugih dimenzija, također valja poštovati navedene specifikacije, jer o njima ovisi valjanost mjerenja.

pH-metre treba kalibrirati kod reakcijske temperature upotrebljavajući pouzdane puferske standarde za koje jamči autoritet proizvođača (primjerice IUPAC ili NBS). Kod podešavanja konačnog pH mjerenjem uz pomoć pH-metra treba paziti da se izbjegnu pogreške zbog nelinearnosti baždarne krivulje, zbog natrijevih iona kod visokog pH ili zbog graničnih potencijala. U tom smislu treba specificirati zahtjeve na izvedbene mogućnosti opreme.

Volumetrijsko staklo treba biti usklađeno sa specificiranim zahtjevima (nacionalni standardi, NBS, klasa A, ili vlastita kalibracija korisnika). Treba provesti korekcije za volumnu ekspanziju tekućina, ukoliko je kalibracija provedena kod temperature koja se razlikuje od temperature reakcije.

Sve površine u kontaktu s uzorkom, reagensima ili reakcijskom smjesom moraju biti kemijski čiste i bez tragova kiselina, teških metala ili detergenata, ili drugih spojeva koji bi mogli interferirati s mjerenjima katalitičke aktivnosti enzima.

5. Reagensi

Izvor tvari koje služe kao reagensi, uključujući vodu i enzime, mora biti autoritativan i čistoća tvari mora biti specificirana. Ako takvi izvori tvari nisu dostupni, ili ako čistoća tvari ne jamči uspješnost metode, potrebna je dodatna specifikacija.

Komercijalne kemikalije kao reagensi

Svi reagensi moraju biti poznate čistoće i oslobođeni svih nečistoća koje mogu utjecati na brzinu reakcije. Pokazalo se naime, da su za neke reagensije potrebni posebno

specificirani zahtjevi, kao na primjer da osiguravaju odsutnost inhibitora laktat dehidrogenaze u reduciranom NAD, koji se koristi kod mjerenja katalitičke koncentracije laktat dehidrogenaze u serumu.

Zahtjevi na kakvoću reagensija detaljno su opisani i obrazloženi (5-7).

Voda kao reagens

Zahtjevi na čistoću vode su veliki i jamstvo da su oni zadovoljeni mora biti autoritativno i specificirano. Svi inhibitori ispitivanih enzima, ukoliko su prisutni, moraju biti provjereno manje koncentracije od najmanje koncentracije koja može inhibitorno djelovati. Te minimalne koncentracije treba specificirati. Sterilna voda (bez ikakvih dodataka) koristi se za otopine reagensa koje se skladište na neko vrijeme.

Enzimi kao reagensi

Enzimi, koji se upotrebljavaju kao reagensi (indikatorski i pomoćni enzimi), moraju biti definirane kakvoće i po specifikacijama pouzdanog izvora moraju odgovarati propisanim zahtjevima. Načelno enzimi ne smiju biti kontaminirani drugim enzimima, metabolitima ili nečistoćama, koje bi mogle utjecati na mjerenu brzinu primarne ili sekundarne reakcije. Ako su primjese ili nuzgredne aktivnosti neizbježne, njih treba posebno opisati.

"Standardi"

Sastav i čistoća standardnih reagensija (standarda) mora se posebno, dodatno specificirati. Skupini tih reagensija obično pripadaju supstrati, produkti, koenzimi, ali ne i enzimi.

Molarni apsorpcijski koeficijent za standarde valja odrediti u linearnom području ovisnosti absorbanceje o koncentraciji kod različitih koncentracija ispitivane tvari u uvjetima koji odgovaraju uvjetima testa.

Puferi

Pufere treba priređivati strogo se držeći propisa kojim se osigurava reproducibilnost i koji detaljno opisuje tehniku rada, jasno definira reagense i specificira zahtjevanu čistoću. Puferski kapacitet mora biti dovoljan da održava pH reakcijske smjese u unaprijed određenim granicama. Te granice moraju biti takve da svaka promjena pH, bez

obzira na izvor, ne unosi za vrijeme mjerenja relativne promjene u mjerenoj katalitičkoj aktivnosti koje su veće od 0.01 (1%).

Dozvoljeno vrijeme skladištenja pufera treba ograničiti tako da promjene pH, do kojih dolazi uslijed dekompozicije u toku skladištenja, ne izazovu promjene veće od 0.005 (0.5%). Tvari, koje služe za pripravu pufera, ne smiju reagirati s bilo kojom komponentom analitičkog sustava, a da to nije posebno opisano (primjerice transfosforilacija s aminoalkoholnim puferima u metodama za alkalnu fosfatazu).

6. Uzimanje uzorka, transport i skladištenje

Priprema ispitanika i uzimanje uzorka

Katalitička koncentracija enzima u humanom serumu (ili drugom biološkom materijalu) fiziološki se može razlikovati iz mnogo razloga. Razlike mogu biti posljedica dobi, spola, životnih navika, tjelesne težine, hrane i pića, izgladnelosti, dijetalnih navika, fizičkog napora ili diurnalnog ritma (primjerice katalitička koncentracija kreatinkinaze, aspartat-aminotransferaze i laktat- dehidrogenaze u krvnom se serumu povećava kod pojedinaca nakon teškog fizičkog napora). Opažene su također razlike koje su obilježje različitih rasa, profesija, te geografskih, klimatskih i drugih utjecaja okoline. Zbog toga, čak i kod dobro definiranih uvjeta pripreme pacijenta i upotrebe dogovoreni IFCC metoda za mjerenje katalitičke koncentracije enzima, u širokim grupama svjetske populacije bit će u budućnosti potrebno detaljno proučiti osobitosti pojedinaca unutar svake skupine.

Uzorci plazme ili seruma

Ukoliko se kao analitički uzorak koristi plazma, a ne serum, potrebno je navesti vrstu i koncentraciju upotrebljenog antikoagulansa i provjeriti da dodatkom tog antikoagulansa ne dolazi do promjene enzimске aktivnosti. Serum ili plazma koji na vidljiv način pokazuju hemolizu, lipemiju ili prekomjernu obojenost (pigmenti) mogu kod mjerenja aktivnosti izazvati interferencije, pa u opis metode, kao posebni dio metode, treba uključiti i opis potrebnih mjera opreza.

Stabilnost uzorka

Metoda treba sadržavati informaciju o stabilnosti enzima u svježe izvedenoj krvi i odvojenom serumu u vremenu koje prethodi analizi kod različitih temperatura pohrane uzorka.

Zamrznuti serum ili rekonstituirani liofilizirani kontrolni enzim i drugi kalibracijski materijal može pokazati ekstremne varijacije u aktivnosti. Takve varijacije ovise o vremenu i treba ih posebno opisati.

Druge tjelesne tekućine i tkiva

Za sve ostale tjelesne tekućine i tkiva potrebno je držati se posebnih propisa pripreme ispitanika, s detaljnim opisima uzimanja uzorka odnosno bioptata. Propis treba sadržavati opis načina pohrane uzoraka i svih mjera opreza koje mogu utjecati na analitički rezultat.

7. Postupak mjerenja

Propis o rukovanju i postupku mjerenja katalitičke koncentracije enzima mora sadržavati sve potrebne detalje.

Instrumentalni dio

Propis navodi valnu duljinu kod koje se izvodi mjerenje i dopuštene granice tolerancije za širinu snopa svjetla (primjerice $\pm 2\text{nm}$ kod polovične visine maksimalne apsorbancije).

Eksplicitno treba opisati korekcije za slijepu probu, kontrolu neenzimskih promjena i naznačiti vremena očitavanja.

Potrebno je opisati sve pojedinosti koje se odnose na temperaturnu kontrolu, termičko uravnoteženje kivete i njezinog držača kao i na prijenos otopina.

Analitički sustav

Sve upute treba dati tabelarno prema priloženom predlošku:

| Pipetiraj | Volumen (ml) | Konačne koncentracije komponenata u smjesi |
|---|--------------|--|
| 1. pufer + smjesa reagensa | ... | ...mol/l |
| 2. serum (uzorak) | ... | volumni udio =... |
| Inkubiraj kod 30°C ...min | | |
| 3. inicijatorski reagens | ... | ...mol/l |

Dobro promiješaj i bilježi promjene apsorbancije kodnm u vremenu od ...sekundi. Izračunaj $\Delta A/\Delta t$, prosječnu promjenu apsorbancije u vremenu (s^{-1}). Korigiraj za dogovarajući rezultat slijepe probe.

Izračunavanje katalitičke koncentracije

$$b = \frac{V}{\epsilon l v} (\Delta A / \Delta t)$$

b se mjeri u katal l^{-1}

V je reakcijski volumen (u litrama, l)

ΔA je promjena apsorbancije

Δt je vrijeme u kojem je nastala opažena promjena (u sekundama, s)

l je duljina puta kivete (u metrima, m)

ϵ je molarni (linearni) apsorpcijski koeficijent ($mol^{-1}m^{-1}$ ili m^2mol^{-1}).

8. Interpretacija

Varijabilnost metode

Pravilno vrednovanje bilo kojeg prijedloga, preporuke ili konačne IFCC metode zahtijeva temeljitu statističko-eksperimentalnu obradu koja povezuje napore nekoliko laboratorija. Svaki laboratorij mora dobiti ili sakupiti i obraditi uzorke na identičan način, tako da se uklone razlike zbog načina rada. Zatim treba provesti ponovljene analize na svakom uzorku prema dogovorenom propisu da se mogu odrediti varijacije od dana do dana i od mjerenja do mjerenja. Detaljno treba naznačiti izvor tkiva ili krvi bilo kojeg referentnog enzimskog materijala kao i sastav otapala.

Opažanja u zdravlju i bolesti

Podaci o katalitičkoj koncentraciji enzima, određeni u tjelesnim tekućinama ili tkivima zdravih ispitanika i bolesnika, proizvod su primijenjene metode i zbog toga ne čine sastavni dio metode. Analiza dobivenih podataka i iskustvo stečeno primjenom bilo koje od IFCC metoda može se prikazati u posebnom dodatku.

Izvori pogreške

U posebnom dodatku treba navesti sve poznate interferencije izazvane bilo lijekovima bilo drugim farmakološkim (in vivo) ili mjernim (in vitro) efektima.

Prikazane opće preporuke Ekspertata za enzime Međunarodnog saveza kliničke kemije o tome što sve sadrži (ili treba sadržati) propis IFCC metode, o čemu sve treba

voditi računa kod pravilne primjene te metode i što sve treba znati i razumjeti da se metoda može pravilno primijeniti bez sumnje će povećati pouzdanost i reproducibilnosti intra- i interlaboratorijskih rezultata, a njihova sveopća primjena jamčit će potpuno razumijevanje među onima koji te metode koriste.

U slijedećem nizu članaka prikazat će se pojedinačne IFCC metode za određivanje katalitičke koncentracije konkretnih enzima.

LITERATURA

1. IFCC, Committee on Standards, Expert Panel on Enzymes, IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes. Clin Chem 1980;18:89-95.
2. Enzyme Nomenclature, Recommendations of the Commission on Biochemical Nomenclature and Classification of Enzymes, Elsevier, Amsterdam, 1972.
3. Enzyme Nomenclature, Recommendations of the Nomenclature Committee of the IUB, Academic Press, New York, London, 1979.
4. Magnum BW. Clin Chem 1974;20:670-672.
5. Reagent Chemicals, 4.izdanje, Amer.Chem.Soc., Washington, 1968.
6. Specification and Criteria for Biochemical Compounds, 3. izdanje, Publ 1344, Natl Acad Sci Natl Res Council, Washington, 1973.
7. Bergmeyer HU. Methods of Enzymatic Analysis, Academic Press, New York, 1974:417-556.

I z s t r u k e

Osobitosti kratkotrajnog uzgoja stanica koštane srži i tumačenje nalaza kultivacije

Mladen Petrovečki¹

Kratkotrajni ili primarni uzgoj stanica koštane srži *in vitro* (engl. short-term bone marrow cell culture) rutinska je metoda za procjenu brojnosti živih i za diobu sposobnih matičnih stanica (engl. stem cell) u koštanoj srži, tj. za procjenu njihove

¹ Imunološki odjel Zavoda za kliničkolaboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Zagreb