

Glukoz Oksidaz Yöntemine Lipeminin Etkisi

Effect of Lipemia on Glucose Oxidase Method

Cihan ÖZER, Çiğdem TOPKAYA, Berrin BERÇİK İNAL,
Pınar TONBAKLAR BİLGİ, Hale ARAL, Güvenç GÜVENEN

ÖZET

Amaç: Klinik biyokimya analiz sonuçlarını etkileyen birçok faktör tanımlanmıştır. Lipemi de biyokimya sonuçlarını etkileyen bu faktörler arasında önemli bir yer tutmaktadır. Bu çalışmada, laboratuvarımızda kullandığımız Siemens Advia sistemlerindeki glukoz ölçümlerinde eksojen lipit ilavesiyle bildirilen lipemi interferansını araştırmayı planladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda eksojen lipit ilavesi yerine, trigliserit (TG) düzeyi yüksek hastalardan oluşturduğumuz 5 farklı düzeydeki serum havuzunu kullandık ve farklı glukoz konsantrasyonları için dışardan glukoz ilave ettik.

Bulgular: Normal glukoz düzeylerindeki havuzlarımızın referans yöntem (hekzokinaz yöntemi) ile karşılaştırıldığında pozitif % değişim oranları sırasıyla: 2,28; 2,08; 2,11; 2,10; 2,85 iken; glukoz ilavesiyle düzeyi 160 mg/dl'ye getirilen havuzlarda % değişim oranları: 3,17; 2,97; 3,09; 3,09; 4,06 olarak bulundu.

Sonuç: Çalışma sonuçlarımız, lipemi interferansı çalışmalarında eksojen ve endojen TG kullanımının farklı interferans oranları bildirimine yol açabileceği görüşünü desteklemektedir.

Anahtar sözcükler: Glukoz oksidaz; lipemi; interferans.

SUMMARY

Objectives: Many factors have been defined that affect clinical biochemistry results. Lipemia holds an important place among these factors. In this study, we planned to investigate the reported lipemia interference by adding exogenous lipid during glucose measurements/analysis using the Siemens Advia system.

Methods: We used 5 different levels of serum pools obtained from patients with high triglyceride levels. Instead of adding exogenous lipid, we added glucose to obtain different glucose concentrations.

Results: As compared with the reference method, the variation rates in pools with normal glucose concentration were: 2.28, 2.08, 2.11, 2.10, and 2.85, respectively. In pools with 160 mg/dl glucose concentration, the variation rates were: 3.17, 2.97, 3.09, 3.09, and 4.06, respectively.

Conclusion: Our results support the idea that use of exogenous and endogenous triglycerides can produce different interference rates in lipemia interference studies.

Key words: Glucose oxidase; lipemia; interference.

GİRİŞ

Biyokimya laboratuvarlarında interferansa neden olan birçok hata kaynağı tanımlanmıştır. Bu hata kaynakları pre-analitik (analiz öncesi), analitik (analiz sırasında) ve post-analitik (analiz sonrası) olmak üzere başlıca üç ana grupta incelenmektedir.^[1,2] Li-

pemi de pre-analitik etkenler arasında değerlendirilen önemli bir interferans kaynağıdır.^[3] Lipemi biyokimyasal sonuçlar üzerindeki etkisini ölçüm yöntemine göre bazı analitler için ışık saçılımını artırarak, bazı analitler için ise analitlerin polar (sulu) ve nonpolar (lipit) fazlarda dağılımını değiştirerek gös-

terir.^[4] Lipeminin ışık saçılımına neden olmasındaki temel mekanizma şilomikronlar ve *very-low-density lipoprotein*'in (VLDL) serumda süt benzeri bir bulanıklık yapmasına bağlıdır. Çünkü laboratuvarlarda kullanılan ölçüm yöntemlerinin çoğu belirli reaksiyon koşullarında, ölçülen örnekten yansıyan, geçen ya da absorbe edilen ışık enerjisinin ölçümüne dayanan fotometrik ölçüm yöntemleridir.^[5] Literatürde çeşitli testlerde lipemi interferansı ve lipemik örneklerdeki interferansı gidermek için yapılan çok sayıda çalışma bize lipeminin önemli bir interferans kaynağı olduğunu ve test sonuçlarını önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir.^[6-8]

Laboratuvarımızda kullandığımız Siemens Advia 2400 glukoz oksidaz kit prospektüsünde (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.,USA) lipit çözeltisi (triolein) ile yapılan lipemi interferansı çalışmalarını üst sınır referansına yakın trigliserit (TG) düzeylerinde (156 mg/dl) normal glukoz düzeyleri (74 mg/dl) için +%18,0 interferans bildirilirken, 160 mg/dl glukoz düzeyi için anlamlı bir interferans bildirilmemektedir (< %10).

Normal trigliserit ve glukoz düzeylerinde bildirilen bu interferans oranı özellikle klinik karar düzeylerinde hatalara yol açabilir. Bu amaçla bildirilen düzeylerdeki lipit interferansını endojen TG ile araştırmak ve referans yöntem heksokinazın interferans oranları ile karşılaştırmayı planladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada 2010 yılı Temmuz-Ağustos ayları arasında laboratuvarımıza gelen, TG düzeyleri dışında tüm biyokimyasal parametreleri normal 100 hasta örneği kullanıldı. Bu örneklerden TG düzeyleri sırasıyla 148; 264; 358; 455; 565 mg/dl olan 5 ayrı se-

rum havuzu oluşturuldu. Her serum havuzundan heksokinaz ve glukoz oksidaz yöntemleri ile ikişer defa glukoz çalışıldı. Daha sonra dışardan glukoz ilavesi ile bütün havuzların glukoz konsantrasyonu 160 mg/dl'ye getirildi ve aynı ölçümler tekrarlandı.

Glukoz oksidaz metodu, modifiye Keston metoduna dayanmaktadır.^[9] Glukozun glukoz oksidaz ile enzimatik oksidasyonu ile oluşan hidrojen peroksit peroksidad aracılığı ile fenol ve 4-aminofenazonla reaksiyona girerek kırmızı-mor renkli kinoneimin oluşturur. Oluşan renk 505/694 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.^[10]

Hezokinaz yöntemi ise hezokinaz ve glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimlerinin kullanıldığı Slein'e ait metoda dayanmaktadır.^[11] Burada glukoz, hezokinaz varlığında adenosin trifosfat (ATP) tarafından fosforillenir. Oluşan glukoz 6-fosfat, glukoz 6-fosfat dehidrogenaz ile oksidize olurken nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺), NADH'ye redüklenir. Oluşan NADH absorbansı 340/410 nm'de bir endpoint reaksiyonu olarak ölçülür.^[10]

BULGULAR

Normal glukoz düzeylerindeki havuzlarımızın referans yöntem (heksokinaz yöntemi) ile karşılaştırıldığında pozitif % değişim oranları sırasıyla: 2,28; 2,08; 2,11; 2,10; 2,85 iken; glukoz ilavesiyle düzeyi 160 mg/dl'ye getirilen havuzlarda % değişim oranları: 3,17; 2,97; 3,09; 3,09; 4,06 olarak bulundu. Bulunan glukoz değerleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Değerlendirmede Westgard'ın glukoz için bildirdiği kabul edilebilir total hata yüzdesi (%6,9) kullanıldı. Buna göre gruplar arasında yüzde değişimin istatistiksel olarak anlamlılığı ki-kare yöntemine göre değerlendirildi ve anlamlı bulunmadı (p=0,693) (Şekil 1, Şekil 2).

Tablo 1. Farklı trigliserit değerlerine göre gruplara ayrılmış serum havuzlarının glukoz eklenmeden önceki ve sonraki glukoz değerleri

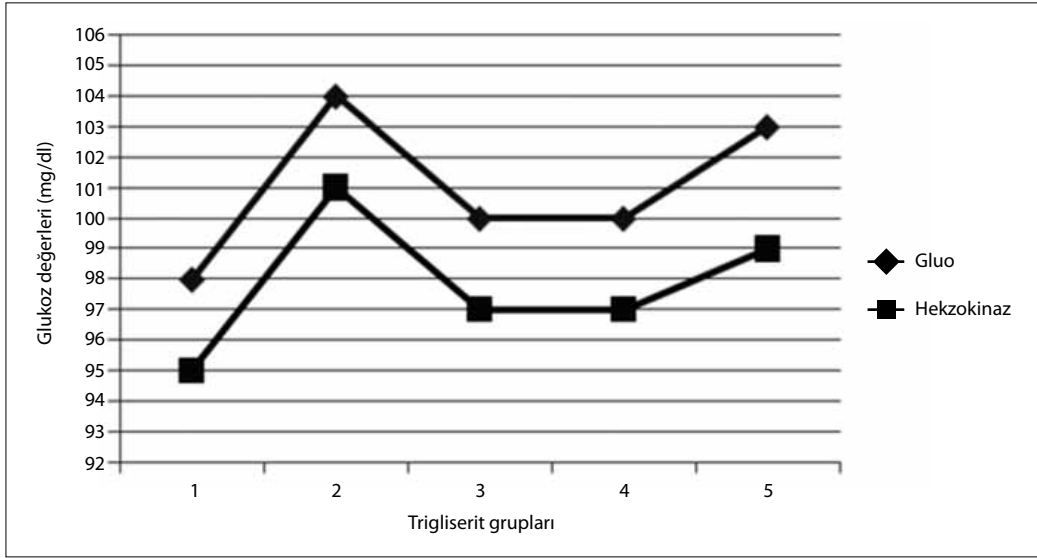
Trigliserid	1. Grup (148 mg/dL)	2. Grup (264 mg/dL)	3. Grup (358 mg/dL)	4. Grup (455 mg/dL)	5. Grup (565 mg/dL)
Glukoz oksidaz (1)	98	104	100	100	103
Hezokinaz (1)	95	101	97	97	99
Glukoz oksidaz (2)	180	172	170	170	163
Hezokinaz (2)	176	169	166	167	158

Glukoz eklenmeden önce (1), glukoz ekledikten sonra (2) (glukoz değerleri mg/dL olarak verilmiştir.)

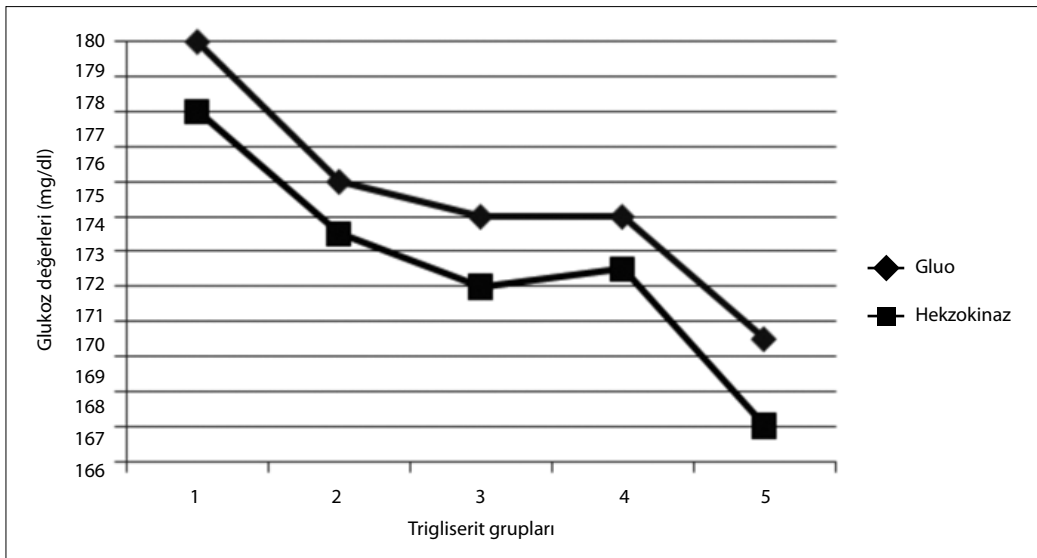
TARTIŞMA

Klinik laboratuvarlarda lipemi interferansı sık karşılaşılan bir sorundur. Tokluk dışında diabetes mellitus, kronik böbrek yetmezliği, alkol kullanımı, pankreatit, primer biliyer siroz, sistemik lupus eritematosus, total parenteral nutrisyon ve ilaç kullanımı (steroidler, östrojen vb.) gibi birçok nedenin lipemiye yol açtığı bildirilmektedir.^[12] Bazı lipemik serumlarda li-

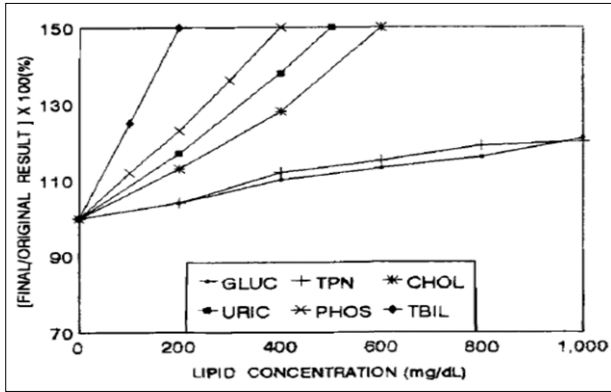
peminin değeri yüksek olmamasına rağmen interferansın daha yüksek olduğu görülmektedir. Bilindiği üzere lipeminin kaynağı şilomikronlar ve VLDL'dir. VLDL küçük (27-35 nm) orta (35-60 nm) ve büyük (60-200 nm) olmak üzere 3 ayrı fraksiyona ayrılır. Orta ve büyük boyutlu VLDL partüküllerinin ışık saçılımı yaparak interferansa neden olduğu bilinmektedir. Bu nedenle lipemi düzeyi az olsa bile VLDL par-



Şekil 1. Trigliserit değerlerine göre ayrılmış grupların glukoz oksidaz (GLUO) ve hegzokinaz yöntemlerine göre çalışılmış glukoz değerleri (Glukoz eklenmeden önce).



Şekil 2. Trigliserit değerlerine göre ayrılmış grupların glukoz oksidaz (GLUO) ve hegzokinaz yöntemlerine göre çalışılmış glukoz değerleri (Glukoz eklendikten sonra).



Şekil 3. Saibaba ve ark.'nın klinik kimyada yaptıkları interferans çalışması.

tikülleri büyükse interferans görülebilir. Şilomikronların büyüklükleri de kişiler arasında farklılık göstermek üzere 70-1000 nm arasındadır.^[12,13]

Yayınlanmış birçok lipemi interferansı çalışmasında olduğu gibi birçok kit prospektüsünde de lipemi interferansı lipit solüsyonları ilavesiyle elde edilen TG konsantrasyonlarına göre değerlendirilmektedir. Yine yapılan bazı çalışmalarda sentetik lipit eklenerek yapılan *in vitro* lipemi interferansının lipit fraksiyonu farklılıkları nedeniyle *in vivo* lipemi interferansını tam olarak yansıtmayacağı öne sürülmektedir. Sentetik lipemide görülüp, endojen lipemide görülmeyen ya da tam tersi endojen lipemide görülüp sentetik lipemide görülmeyen lipemi interferansları çeşitli çalışmalarda bildirilmektedir.^[13-15] Bizim sonucumuz da sentetik lipemi interferansının, endojen lipemi interferansını yansıtmayacağı görüşünü desteklemektedir. Bu nedenle bu tür çalışmaların doğal lipemik örneklerle yapılmasının klinik laboratuvarlar için daha değerli olacağını düşünmekteyiz. Saibaba ve ark.'nın yaptığı çalışmada lipit konsantrasyonu arttıkça elde edilmesi gereken sonuçtan yüzde olarak ne kadar uzaklaşıldığı gösteren diyagram Şekil 3'te gösterilmiştir.^[16]

Sonuç olarak, heksokinaz yöntemi referans alındığında kullanılan Siemens Advia 2400 sistemi için glukoz oksidaz kit prospektüsünde normal glukoz ve trigliserit düzeyleri için verilen yüksek interferans oranını destekleyen bir veriye ulaşamadık. Üretici firma tarafından intralipid solüsyonları ile bildirilen lipemi interferansı sonuçları değerlendirilirken endojen lipemi interferansını yansıtmayabileceği dikkate alınmalıdır.

KAYNAKLAR

- Guder WG, Narayanan HW, Zawta B. Samples: From the Patient to the Laboratory, 1996.
- Young DS, Bermes EW, Haverstick DM. Specimen collection and processing. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis. 2006. p. 41-58.
- Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical comparisons of interferences in clinical chemistry instrumentation. Clin Chem 1986;32:470-5.
- Lacher DA, Elsea AR. Effect of a lipid-clarifying reagent on results of Beckman ASTRA methods. Clin Chem 1986;32:394.
- Hindriks FR, Groen A. Pitfalls of use of lipemic serum with the Technicon SMAC and Du Pont aca. Clin Chem 1978;24:2062-3.
- Ng RH, Altaffer M, Statland BE. Effects of lipemia on Technicon RA-1000 measurements. Clinical Chemistry 1987; 33: 913.
- Hutton PS, Conn RB. Interference by hyperlipidemia: A comparison of results obtained on Ektachem 400 and the ACA III or Astra-8 before and after ultracentrifugation. Clinical Chemistry 1982;28:1632.
- Musiala ST, Dubin A. Effects of chylomicrons and their removal on spectrophotometric analyses. Clinical Chemistry 1977;23:1121.
- Keston A. Paper presented at the 129th meeting of the American Chemical Society 1956; 31c.
- Siemens Advia Chemistry Glukoz Oksidaz ve Hekzokinaz yöntemi kit prospektüsü.
- Slein MW, Cori GT, Cori CF. A comparative study of hexokinase from yeast and animal tissues. J Biol Chem 1950;186:763-80.
- Kroll MH. Evaluating interference caused by lipemia. Clin Chem 2004;50:1968-9.
- Park Y, Grellner WJ, Harris WS, et al. A new method for the study of chylomicron kinetics in vivo. Am J Physiol Endocrinol Metab 2000;279:E1258-63.
- Bornhorst JA, Roberts RF, Roberts WL. Assay-specific differences in lipemic interference in native and intralipid-supplemented samples. Clin Chem 2004;50:2197-201.
- Koch DD, Burmeister B, Garber CC. Use of intralipid parenteral nutrition solution causes major interference with several common chemistry tests. Clinical Chemistry 1983;29:1248.
- KSS Saibaba, M Vijaya Bhaskar, PVLN Srinivasa Rao, et al. Interferences in clinical chemistry analysis. Indian Journal of Clinical Biochemistry 1998;13:55-62. DOI: 10.1007/BF02867865