

ÇEŞİTLİ YÖNTEMLERLE SERUM LİPAZ
ETKİNLİK DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

DJAVANI, M., SESSİZ, T.H.

ÖZET: Bu çalışmada 48 sağlıklı bireyin serum örnekleri incelendi. Değişik substratları kullanılan kolorimetrik yöntem ile ve çeşitli t cihazlar kullanılan turbidimetrik yöntemler ile bu serumların lip aktiviteyi saptandı. Tüm yöntemler, varyasyon katsayısı açısından yeterince duyarlı bulundu (CV,%2.9-7.2). Lipaz aktivite sonuçlarının istatistiksel analizinde ise yöntemler arasında anlamlı fark gözlenmedi ($p > 0.05$). Turbidimetrik reaktif yöntemler; kısa reaksiyon süresi, kolaylığı ve az miktarda harcama gibi üstünlükleri ile, kolorimetrik yöntemlere göre daha kullanışlı bulundu.

ABSTRACT: Mahmoud DJAVANI, Hüseyin T.SESSİZ, Department of Biochemistry Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine. Determination of serum lipase levels using different methods.

Serum specimens from 48 clinically healthy persons have been investigated. Serum lipase activities were measured with colorimetric techniques using different substrates and turbidimetric assays using different types of instruments. The sensitivities of the techniques have been found at a sufficient level (CV,%2.9-7.2). The differences between the levels of serum lipase activities which were determined with the methods were not found to be statistically significant ($p > 0.05$). With the advantages of short reaction time, easiness and small reagent volumes, turbidimetric methods were found more useful than colorimetric methods.

Anahtar sözcükler: Serum lipaz aktivite, substrat olarak triolein zeytin yağı, turbidimetrik-kolorimetrik karşılaştırılması, pankreatiti
Key words: Serum lipase activity, triolein and olive oil as substrate, turbidimetry-colorimetric compared, pancreatitis.

GİRİŞ: Gastrointestinal sistemde lipaz (EC 3.1.1.3) besinlerle alırlı trigliseridlerin sindirilmesinde rol oynar. Yüksekmiş bir serum lipaz düzeyinin araştırılması pankreatik hastalığın en güvenilir göstergeler

Mahmoud DJAVANI, MS. Hüseyin T. SESSİZ, Prof.Dr.Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı.

den biridir (4,15,16). Lipaz aktivitesinin ölçülmesi akut pankreatit tanısında klinik açıdan en faydalı yöntem olarak düşünülmektedir(1,2,3,5,6,7,9,10,17). Turbidimetrik yöntem, serum lipazın hızlı bir şekilde kantitatif ölçümünü sağladığından akut pankreatit'in erken ve doğru tanısı için yararlı bulunmaktadır(8,10).

Bu gerçeklerden hareket ederek serum lipaz düzeyleri kolorimetrik ve turbidimetrik tekniklerle analiz edilerek yöntemler arasında bir karşılaştırma yapılması düşünüldü. Turbidimetrik yöntem RA-1000 otoanalizörüne de uyarlandı. Bunun için ticari serum lipaz kitinden ve serum poolerinden yararlanıldı.

Bu çalışmada amaç; kolorimetrik ve turbidimetrik tekniklerle serum lipaz aktivitesini saptayıp karşılaştırmak ve doğruluk, kesinlik, duyarlılık açısından üstün olan yöntemi belirleyerek (kısa süreli ve kolay bir teknik) rutin laboratuvar analizlerine katkıda bulunmaktır.

MATERYAL METOD: Denek grubu, yaşları 18-77 (ortalama 39.6) arasında olan 25'si erkek, 22'si kadın, toplam 48 sağlıklı kişiden oluşturulmuştur. Ayrıca Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Hastanesi çeşitli kliniklerinde tedavi edilen 12 hastadan kan örnekleri alınmış ve lipaz aktivite düzeylerine göre patolojik örnekler elde edilmiştir. Serumda lipaz aktivite tayini için, spektrofotometrik ($\lambda=502\text{nm}$) ve turbidimetrik ($\lambda=340\text{nm}$) çalışmalarda "LKB Ultrospec 4050 Biochrom" spektrofotometresi ve "Technicon RA-1000" otoanalizörü kullanılmıştır.

Serum lipazın katalitik aktivitesi, hem Ziegenhorn'un(16), kolipaz ile aktivite edilmiş turbidimetrik (Boehringer, Mannheim, FRG) yöntemi ile hem de Massion ve Mc Neely'nin(7) kolorimetrik yöntemi ile ölçülmüş ve bu yöntemler arasında istatistiksel karşılaştırma yapılmıştır.

BULGULAR: Denek grubunu oluşturan bireylerin lipaz aktivite düzeyleri değişik yöntemlere göre cinsiyet ve yaşları ile ilgili istatistiksel bulgularla birlikte Tablo 1'de gösterilmiştir. Değişik substratlarla çalışılan kolorimetrik ve çeşitli cihazlarla çalışılan turbidimetrik yöntemlere ilişkin lipaz aktivitesi bulguları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi ($p > 0.05$).

Yöntemler arası uygulanan lineer regresyon analizlerinde şu regresyon denklemleri elde edildi: Kolorimetrik (rafine zeytinyağı substratı kullanılan) yöntem ile manuel turbidimetrik yöntem arasında $Y = -16.8 + 24.4 X$, manuel ve otoanalizörde çalışılan turbidimetrik yöntemler arasında ise, $Y = 1.3 + 0.9 X$, kolorimetrik (rafine zeytinyağı substratı kullanılan) yöntem ile turbidimetrik (otoanalizör) yöntem arasında ise $Y = -19.8 + 24.6 X$ olarak bulundu (Şekil 1).

Tablo 1. Çeşitli yöntemlerle elde edilen lipaz aktivite sonuçları:

Denek N=34	Yaş	Kolorimetrik yöntem Triolein R.zeytinyağı		Turbidimetrik Yöntem	
		LIPAZ(U/ml)	LIPAZ(U/ml)	Manuel LIPAZ (U/L)	Otoanalizör LIPAZ(U/L)
X	39.97	3.58	3.67	70.67	70.61
SD	2.55	0.15	0.19	5.43	5.99
SD	± 14.89	± 1.10	± 1.12	± 31.68	± 32.63
Min	-	1.9	1.9	20	12
Max	-	6.3	6.0	154	144
%CV	-	30.7	30.5	43.8	46.2

2. Substrat olarak triolein ve rafine zeytin yağının kullanıldığı klorimetrik yöntemler ile trioleinin kullanıldığı turbidimetrik (manuel ve otoanalizör) yöntemlere ait istatistiksel değerlendirmeler.

Denek N=40	Yaş	Kolorimetrik yöntem R.zeytinyağı		Turbidimetrik Yöntem	
		LIPAZ (U/ml)	LIPAZ (U/ml)	Manuel LIPAZ (U/L)	Otoanalizör LIPAZ(U/L)
X	38.96	3.63	3.63	71.84	67.42
SD	2.04	0.15	0.15	4.28	4.59
SD	± 14.16	± 1.00	± 1.00	± 29.60	± 31.04
Min	-	1.9	1.9	20	12
Max	-	6.0	6.0	154	144
%CV	-	27.6	27.6	41.4	45.9

1. Substrat olarak rafine zeytin yağının kullanıldığı klorimetrik yöntem ile trioleinin kullanıldığı turbidimetrik yöntemlere ait istatistiksel değerlendirmeler.

Tablo 2. Tüm denekler için elde edilen lipaz aktivite değerlerine göre yöntemler arası arasındaki korelasyonlar (r):

Yöntemler	Kolorimetrik yöntem		Turbidimetrik Y.	
	(Triolein)	(Triolein)	(Manuel)	(Otoanalizör)
Kolorimetrik Y. (R. zeytinyağı)	0.92	-	0.87	0.77
Kolorimetrik Y. (Triolein)	-	-	0.88	0.63
Turbidimetrik Y. (Manuel)	-	-	-	0.89

Tablo 3: Bazı hastalarda serum lipaz aktivite düzeyleri

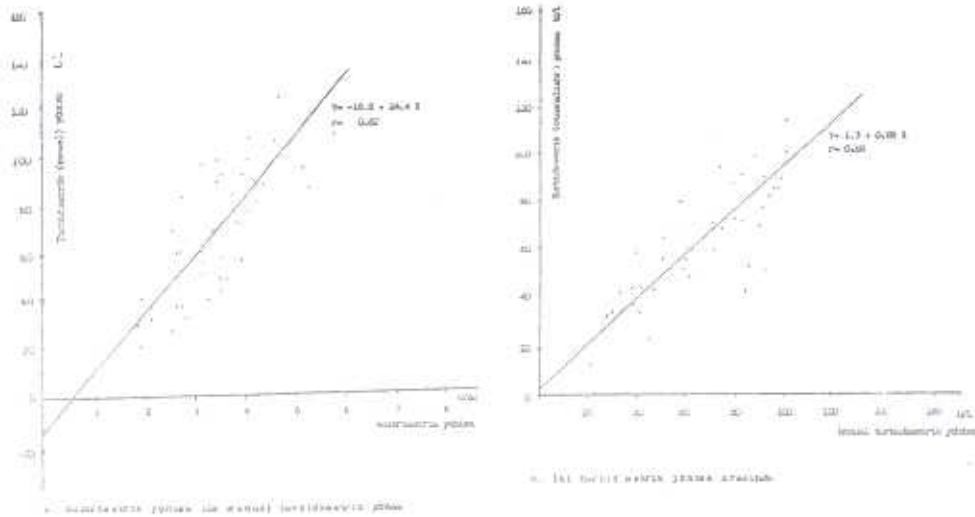
OLGU	YAŞ	Kolorimetrik yöntem*		Turbidimetrik yöntem**	
		R.zeytinyağı	Triolein	Manuel	Otoanalizör
		LİPAZ U/ml	LİPAZ U/ml	LİPAZ U/L	LİPAZ U/L
1 E	51	10.6	-	358	381
2 E	51	7.4	-	223	242
3 K	44	21.0	25.0	294	323
4 K	61	18.2	18.0	470	467
5 E	60	7.4	7.7	181	129
6 E	50	-	-	143	156
7 K	62	-	-	351	363
8 K	52	-	-	375	375
9 E	50	-	-	146	-
10 E	47	-	-	619	-
11 E	70	-	-	598	-
12 E	43	-	-	757	-

*Kolorimetrik yöntemde normal serum lipaz aktivitesi 2.0-7.5 U/ml

**Turbidimetrik yöntemde normal serum lipaz aktivitesi 190 U/L'ye kadardır.

(1,2,3,4 ve 6 nolu olgular "akut pankreatit" 5. olgu "polytravma" 7. olgu "apandisit ve akut G.İ.S kanama" 8. olgu "mide ve duodenum perforasyonu", 9. olgu "solunum yetmezliği" 10. olgu aspirasyon pnömonisi-TBC" 11. olgu "solunum yetmezliği" ve 12. olgu ise "kafa travması tanısı almıştır.

Şekil 1. Yöntemler arası lineer regresyon doğrusu



TARTIŞMA VE SONUÇ: Deney yöntemlerinin irdeelenmesinde hazır standart ve serum pool'lerinden yararlanıldı. Kolorimetrik yöntem için stearik asit standardından üç değişik konsantrasyon (0.25, 0.50 ve 0.75 uEq/ml alınarak, standardizasyon yapıldı (Tablo 4). %CV değerlerinde (2.7, 3.0 2.9) her üç standart düzeyinde dar bir değişim aralığı olduğu görüldü. Serum lipaz aktivitesinin kolorimetrik yöntemler ile ölçülmesinde kullanılan iki değişik substrat (triolein, safleştirilmiş rafine zeytinyağı emülsiyonu) uygunluk açısından karşılaştırıldı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p > 0.05$). Tietz ve ark.(13) ise bu iki substrat ile serumda lipaz aktivitesini ölçmüşler ve en yüksek aktiviteyi triolein substratı ile elde etmişlerdir. Kolorimetrik yöntemin doğruluğu ve keskinliği, büyük oranda emülsiyondaki homojen ve nabiz partiküllü büyüklüğüne bağlıdır(15). Bu yöntemin dezavantajları, inkübasyon süresinin ve santrifügasyon işleminin uzunluğu olarak özetlenebilir.

Tablo 4. Kolorimetrik yöntemle ait standardizasyon değerleri

N=20	Standartların absorbanları		
	0.25 uEq/ml	0.50 uEq/ml	0.75 uEq/ml
	A st.1	A st. 2	A st.3
X	0.328	0.463	0.606
SX	0.002	0.003	0.004
SD	+ 0.009	+ 0.014	+ 0.018
%CV	2.7	3.0	2.9

Tablo 5. Turbidimetrik (manuel ve otoanalizör) yöntemlere ait standartizasyon değerleri

N=25	Manuel st.	Serum pool'lerinin lipaz aktivitesi	
		Manuel U/L	Otoanalizör U/L
X	0.111	111.0	111.0
SX	0.001	1.509	1.602
SD	± 0.008	± 7.548	± 8.010
%CV	5.7	6.8	7.2

Turbidimetrik teknikte lipaz standardı ve serum pool'leri kullanılarak yöntemin duyarlılık ve güvenilirlik bakımından istatistiksel olarak değerlendirilmesi yapıldı (Tablo 5). Manuel turbidimetrik yöntemde lipaz standardı kullanılarak standart absorban değerlerinden elde edilen varyasyon katsayısı %5.7 olarak bulundu. Otoanalizöre adapte edilen turbidimetrik yöntemde ve manuel turbidimetrik yöntemde serum pool'leri kullanılarak elde edilen varyasyon katsayıları ise sırasıyla %7.2 ve %6.8 olarak hesaplandı ve yöntemlerin duyarlılıklarının yeterli düzeyde olduğu saptandı. Shihabi ve Bishop(11) turbidimetrik teknikte "Moni-Trol IIX" kontrol serumunu kullanarak lipaz aktivitesini saptamış-

lar ve yöntemin tekrarlanabilirliği için varyasyon katsayısını %7.2 bulmuşlardır. Hoffmann ve ark.(2) ise turbidimetrik yöntemin sonunda oluşan serbest yağ asitlerinin miktarını enzimatik bir yöntemle saptadıklarında normal düzeyler için %7.9-%11.3 arasında varyasyon katsayıları hesaplamışlardır.

Turbidimetrik teknikte iki değişik cihaz kullanılıp serumda lipaz aktivitesi ölçülerek karşılaştırma yapıldı (Tablo 1-b). Manuel ve otoanalizörle çalışılan turbidimetrik yöntemler arası karşılaştırmada anlamlı bir fark gözlenmedi ($p > 0.05$). Ayrıca bu iki yöntem arasında ileri derecede korelasyon ($r=0.89$) saptandı.

Tüm denekler için elde edilen lipaz aktivite değerlerine göre yöntemler arasındaki korelasyonlar Tablo 2'de verilmiştir. Substrat olarak saflaştırılmış rafine zeytinyağı emülsiyonu kullanılan kolorimetrik yöntem ile triolein kullanılan kolorimetrik yöntem, manuel ve otoanalizörle çalışılan turbidimetrik yöntemler arasında sırayla $r=0.92$, $r=0.82$ ve $r=0.77$, triolein substratı kullanılan kolorimetrik yöntem ile manuel ve otoanalizörle çalışılan turbidimetrik yöntemler arasında sırayla $r=0.88$ ve $r=0.85$, iki turbidimetrik yöntem arasında ise $r=0.89$ gibi ileri derecede korelasyonlar saptandı.

Bazı patolojik olgularda elde edilen yüksek değerler (Tablo 3) yöntemlerin normal sınırın üstünde de duyarlı olduğunu göstermektedir. Nitekim, Orda ve ark.(8) akut pankreatit tanısı konan hastalarda lipaz enziminin aktivitesini turbidimetrik yöntemle saptayarak kontrol grubuna göre anlamlı farklar elde etmişlerdir.

Sonuç olarak, çalışılan tüm yöntemlerin duyarlı ve korelasyonlarının yüksek olmasına karşın, maliyetinin düşük, çalışma hızının yüksek olması açısından, geliştirilen otomatize turbidimetrik yöntemin klinik biyokimya laboratuvarında kullanılması önerildi.

KAYNAKLAR

- 1.Ceriotti, F. Bonini, P.A. Murone, M. Barenghi, L. Luzzana, M. Mosca, A. et al.: Measurement of lipase activity by a differential pH technique. Clin Chem 1985; 31(2): 257-260.
- 2.Hoffman, G.E. Neumann, U. Hoffman, S. Kaspar, P. and Weise, L.: An enzymatic method for calibration of serum lipase assays. Clin Chem 1986; 32(3): 545-547.
- 3.Hoffman, G.E. and Weise, L.: Specific serum pancreatic lipase determination with use of purified colipase. Clin Chem 1980; 26(12): 1732-1733.
- 4.Imamura, S. Tshiski, H. Arai, T. Takao, K. and Misaki, H.: An enzymatic method using 1,2-Diglyceride for pancreatic lipase test in serum. Clin Chem 1989; 35(6): 1126.

5. Krooka, S. Okamoto, S. and Hashimoto, M.: A novel and simple colorimetric assay for human serum lipase. *J Biochem* 1977; 81: 361-369.
6. Kurooka, S. and Kitamura, T.: Properties of serum lipase in patients with various pancreatic diseases. *J Biochem* 1978; 84(6): 1459-1466.
7. Massion, C.G. and Mc Neely, M.D.D.: An improved photometric method for lipase activity suitable for both routine and reference work. *Ann Clin Lab Sci* 1972; 444-452.
8. Orda, B. Orda, S. Baron, J. and Wiznitzer, T.: Lipase turbidimetric assay and acute pancreatitis. *Digestive Diseases and Sciences*. 1984; 29(4): 294-296.
9. Panteghini, M. and Pagani, F.: Diagnostic value of serum pancreatic lipase (LPS) and P3 isoform of pancreatic amylase isoenzyme in hyperamylase patients. *Clin Chem* 1988; 34(6): 1288.
10. Rizzotti, P. Dehecchi, C. Zanchetta, M. Zaninotto, M. Plebani, M. and Burlina, A.: Anzyme immunoassay for pancreatic lipase; comparison with turbidimetric method in pancreatic diseases. *Clin Chem* 1985; 18: 290-32.
11. Shihabi, Z.K. and bishop, C.: Simplified turbidimetric assay for lipase activity. *Clin Chem* 1971; 17(12): 1150-1153.
12. Song, H. Tietz, N.W. and Tan, C.: Usefulness of serum lipase, esterase, and amylase estimation in the diagnosis of pancreatitis, a comparison. *Clin Chem* 1970; 16(4): 264-268.
13. Tietz, N.W. and Repique, E.V.: Proposed standard method for measuring lipase activity in serum by a continuous sampling technique. *Clin Chem* 1973; 19(11): 1268-1275.
14. Tietz, N.W. Shuey, D.F. and astles, J.R.: Turbidimetric measurement of lipase activity-Problems and some solutions. *Clin Chem* 1987; 33(9): 1624-1629.
15. Yang, J.S. and Biggs, H.G.: Rapid, reliable method for measuring serum lipase activity. *Clin Chem* 1971; 17(6): 512-518.
16. Ziegenhorn, J. Neumann, U. Knitsch, K.W. Zvez, W. Roeder, A. and Lenz, H.: Lipase-Test characteristics. *Medica* 1980; (11): 1-7.
17. Ziegenhorn, J. et al.: Determination of serum lipase. *Clin Chem* 1979; (23).