

Oznaczanie N-acetylo- β -heksozaminidazy w surowicy krwi z podwyższonym stężeniem bilirubiny

Elimination of bilirubin interference on determination of serum N-acetyl- β -hexosaminidase activity

Sylwia Chojnowska¹, Alina Kęпка², Sławomir Dariusz Szajda³,
Napoleon Waszkiewicz³, Krzysztof Zwierz¹

¹Instytut Medyczny, Państwowa Wyższa Szkoła Informatyki i Przedsiębiorczości w Łomży, Łomża, Polska

²Zakład Biochemii, Radioimmunologii i Medycyny Doświadczalnej, Instytut – Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka, Warszawa, Polska

³Klinika Psychiatrii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Białystok, Polska

Streszczenie

Wprowadzenie: Bilirubina zakłóca kolorymetryczne oznaczenia poziomu szeregu biochemicznych parametrów w surowicy krwi.

Cel: Eliminacja interferencji bilirubiny na oznaczenie aktywności N-acetylo- β -heksozaminidazy (HEX) w surowicy krwi.

Materiał i Metoda: Aktywność HEX oznaczono w surowicy krwi: bez i z dodatkiem 4,3 mg/dL egzogennej bilirubiny, metodą standardową i zmodyfikowaną. Modyfikacja polegała na odejmowaniu absorbancji mieszaniny reakcyjnej bez substratu od absorbancji mieszaniny reakcyjnej po inkubacji z substratem.

Wyniki: Aktywność HEX w surowicy oznaczana metodą standardową wynosiła (nKat/L): 179,7 \pm 74,6 bez egzogennej bilirubiny i 291,4 \pm 77,9 z egzogenną bilirubiną oraz metodą zmodyfikowaną: 160,5 \pm 69,7 bez egzogennej bilirubiny i 164,9 \pm 76,8 z egzogenną bilirubiną. Współczynnik korelacji, pomiędzy wynikami oznaczania HEX w surowicy krwi bez bilirubiny i z egzogenną bilirubiną, uzyskanymi zmodyfikowaną metodą wynosił 0,997.

Wniosek: Egzogenna bilirubina (4,3 mg/dL) istotnie ($p \leq 0,001$) zawyża wyniki oznaczania HEX w surowicy krwi metodą standardową. Proponowana modyfikacja eliminuje zakłócenia, powodowane przez bilirubinę, podczas oznaczania HEX w surowicy krwi.

Summary

Aim: Elimination interference of bilirubin on determination serum N-acetyl- β -hexosaminidase (HEX) activity.

Material and Methods: We determined HEX activity in sera without and with exogenous bilirubin (4.3 mg/dL) using unmodified and modified method. Modification consists in subtraction absorbance of reaction mixture without substrate, from absorbance of reaction mixture incubated with substrate.

Results: HEX activity (nKat/L) amounted: 179.7 \pm 74.6 without and 291.4 \pm 77.9 with exogenous bilirubin (standard method); 160.5 \pm 69.7 without and 164.9 \pm 76.8 with exogenous bilirubin (modified method). Correlation coefficient between results of HEX determination in serum without bilirubin and with exogenous bilirubin, obtained with modified method was 0.997.

Conclusion: Exogenous bilirubin (4.3 mg/dL) significantly overestimates ($p \leq 0.001$) HEX activity in blood serum determined by the standard method. Proposed modification eliminates interference of bilirubin on determination of HEX activity in blood serum.

Słowa kluczowe: bilirubina, N-acetylo- β -heksozaminidaza, surowica krwi.

Key words: bilirubin, blood serum, N-acetyl- β -hexosaminidase.

Wstęp

N-acetylo- β -heksozaminidaza (HEX) jest najbardziej aktywną egzoglikozydazą lizosomalną [1], degradującą łańcuchy oligosacharydowe glikokoniugatów (glikoprotein, glikolipidów i proteoglikanów). Aktywność HEX odzwierciedla intensywność rozkładu i przebudowy tkanek [2]. HEX jest uznanym markerem uzależnienia od alkoholu [3]. Istotnie podwyższoną aktywność

HEX w surowicy krwi stwierdzono w chorobach nowotworowych [4] oraz w stanach zapalnych, niezależnie od ich etiologii [5]. Oznaczanie aktywności HEX jest oparte na spektrofotometrycznym ($\lambda=410$ nm) pomiarze 4-nitrofenolu, uwolnianego przez HEX ze sztucznego substratu (4-nitrofenylo-N-acetylo- β -glukozyaminidu). Oznaczanie aktywności HEX i innych egzoglikozydaz lizosomalnych w surowicy krwi u niektórych noworod-

ków, uniemożliwia obecność bilirubiny. Bilirubina intensywnie absorbuje światło pomiędzy 340 nm a 500 nm dł. fali, co zakłóca spektrofotometryczny pomiar 4-nitrofenolu [6] i innych substancji [7, 8, 9]. W surowicy krwi występują dwie formy bilirubiny: wolna i związana, które składają się na tzw. bilirubinę całkowitą [10]. U zdrowych dorosłych ludzi poziom bilirubiny całkowitej w surowicy krwi nie przekracza 1,1 mg/dL. U osób dorosłych hiperbilirubinemia jest zwykle objawem choroby hemolitycznej, uszkodzenia wątroby lub zatrucia [11], natomiast jest często spotykana u dzieci urodzonych o czasie (około 75%) i wcześniaków (100%). W surowicy krwi około 40% zdrowych noworodków, pomiędzy 12 a 24 godziną życia, jest obecne 4-5 mg/dL całkowitej bilirubiny [12].

Celem ogólnym naszych badań była eliminacja wpływu bilirubiny na wynik oznaczania aktywności N-acetylo- β -heksozoaminidazy (HEX) w surowicy krwi noworodków. Tradycyjna metoda oznaczania HEX, proponowana przez Marciniak i wsp. [13] nie uwzględnia stosowania surowiczego blanka w odczycie spektrofotometrycznym. We współczesnej diagnostyce laboratoryjnej metodyka oznaczania enzymów w surowicy, uwzględniająca próbę zerową zawierającą surowicę, wydaje się być standardowym rozwiązaniem stosowanym w pomiarze aktywności jakiegokolwiek enzymu, jednak wiadomo, że nie w każdym przypadku przynosi oczekiwane rezultaty [14]. W związku z powyższym, w niniejszej pracy podjęliśmy próbę oceny czy odejmowanie absorbancji mieszaniny inkubacyjnej bez substratu od absorbancji mieszaniny inkubacyjnej z substratem może pozwalać na uzyskanie prawidłowych wyników oznaczeń HEX w surowicy z podwyższonym stężeniem bilirubiny.

Materiał i metody

Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (protokół nr: R-I-002/404/2016).

Materiał do badań stanowiło 20 próbek surowicy krwi pozostałych po przeprowadzeniu rutynowych analiz pacjentom Kliniki Psychiatrii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (odpady laboratoryjne). Surowice (bez zażółcenia i zmętnienia) przeniesiono do czystych probówek Eppendorfa i przechowywano w -80°C do momentu wykonania oznaczeń.

Roztwór bilirubiny (43 mg/dL) sporządzono w chłodnym (8°C) i lekko zaciemnionym pomieszczeniu. Zważono 43 mg czystej (99% proszek) bilirubiny (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), którą rozpuszczono w objętości 100 mL (1 dL) roztworu 0,1 mol/L NaOH i przechowywano w ciemnej butelce.

Z każdej z 20 próbek surowic przygotowano po dwie porcje o objętości 90 μL : kontrolną i do wzbogacenia egzogenną bilirubiną.

Oznaczanie N-acetylo- β -heksozoaminidazy w surowicy krwi z egzogenną bilirubiną (metoda tradycyjna)

Ze względu na fakt, że bilirubina jest bardzo nietrwała na świetle i w podwyższonej temperaturze [15], oznaczenia HEX w surowicy krwi z egzogenną bilirubiną przeprowadzono w chłodnym (8°C) i zaciemnionym pomieszczeniu. Do 90 μL każdej z 20 próbek surowicy krwi, pochodzących od różnych pacjentów, dodano

po 10 μL roztworu zapasowego bilirubiny o stężeniu 43 mg/dL, uzyskując po dokładnym wymieszaniu w każdej próbce surowicy stężenie bilirubiny wyższe o 4,3 mg/dL od wyjściowego jej stężenia. W surowicach z egzogenną bilirubiną oznaczono aktywność HEX metodą Marciniak i wsp. [13], w następujący sposób: do 10 μL surowicy z egzogenną bilirubiną dodano 40 μL 0,1 mol/L buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 4,7 oraz 30 μL 6,7 mmol/L 4-nitrofenylo-N-acetylo- β -glukozaaminidu (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), jako substratu. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w 37°C przez 60 min. (Thermoshaker Incubator DTS4, ELMi Ltd, Łotwa). Reakcję enzymatyczną przerywano przez dodanie 200 μL 0,2 mol/L roztworu buforu boranowego o pH 9,8. Uwolniony 4-nitrofenol mierzono spektrofotometrycznie (Infinite[®] 200 PRO, TECAN, Szwajcaria) przy $\lambda = 410$ nm, wobec próby odczynnikowej (10 μL wody destylowanej + 40 μL 0,1 mol/L buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 4,7 + 30 μL substratu + 200 μL 0,2 mol/L buforu boranowego o pH 9,8). Aktywność HEX odczytywano z krzywej kalibracyjnej (wzorzec: 0,25 mmol/L 4-nitrofenolu w 0,1 mol/L buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 4,7) i wyrażano w nKat/L surowicy.

Oznaczanie N-acetylo- β -heksozoaminidazy w surowicy krwi bez dodatku bilirubiny (tradycyjną metodą)

W chłodnym (8°C) i zaciemnionym pomieszczeniu (dla zachowania takich samych warunków reakcji, jak przy oznaczeniach surowicy z dodatkiem bilirubiny), do 90 μL każdej z 20 próbek niezależnej surowicy krwi, pochodzących od różnych pacjentów, dodano 10 μL roztworu NaOH o stężeniu 0,1 mol/L. W tak przygotowanych próbkach oznaczono aktywność HEX metodą Marciniak i wsp. [13] następująco: do 10 μL surowicy z NaOH, dodano 40 μL 0,1 mol/L buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 4,7 i 30 μL 6,7 mmol/L 4-nitrofenylo-N-acetylo- β -glukozaaminidu (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), jako substratu. Mieszaniny reakcyjne inkubowano w temperaturze 37°C przez 60 min. (Thermoshaker Incubator DTS4, ELMi Ltd, Łotwa). Reakcje enzymatyczną przerywano przez dodanie 200 μL 0,2 mol/L roztworu buforu boranowego o pH 9,8. Uwolniony 4-nitrofenol mierzono spektrofotometrycznie (Infinite[®] 200 PRO, TECAN, Szwajcaria), przy $\lambda = 410$ nm, wobec próby odczynnikowej (10 μL wody destylowanej + 40 μL 0,1 mol/L buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 4,7 + 30 μL substratu + 200 μL 0,2 mol/L buforu boranowego o pH 9,8). Aktywność HEX odczytywano z krzywej kalibracyjnej (wzorzec: 0,25 mmol/L 4-nitrofenolu w 0,1 mol/L buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 4,7) i wyrażano w nKat/L surowicy.

Oznaczanie N-acetylo- β -heksozoaminidazy w surowicy krwi z egzogenną bilirubiną, z modyfikacją odczytu spektrofotometrycznego

Oznaczenia przeprowadzono zgodnie z wcześniej podaną procedurą, modyfikując jedynie odczyt spektrofotometryczny, a mianowicie odejmując, wynik dodatkowo wykonanej dla każdej surowicy, próby ślepej (10 μL surowicy z egzogenną bilirubiną + 70 μL 0,1 mol/L buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 4,7 + 200 μL 0,2 mol/L buforu boranowego o pH 9,8). Aktywność HEX odczytywano z krzywej kalibracyjnej (wzorzec: 0,25 mmol/L

4-nitrofenolu w 0,1 mol/L buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 4,7) i wyrażano w nKat/L surowicy.

Oznaczanie *N*-acetylo- β -heksozoaminidazy w surowicy krwi bez egzogennej bilirubiny, z modyfikacją odczytu spektrofotometrycznego
Oznaczenia przeprowadzono zgodnie z wcześniej podaną procedurą, modyfikując jedynie odczyt spektrofotometryczny, a mianowicie odejmując wartość, dodatkowo wykonanej dla każdej próbki surowicy, próbę ślepej (10 μ L surowicy bez egzogennej bilirubiny + 70 μ L 0,1 mol/L buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 4,7 + 200 μ L 0,2 mol/L buforu boranowego o pH 9,8). Aktywność HEX odczytywano z krzywej kalibracyjnej (wzorzec: 0,25 mmol/L 4-nitrofenolu w 0,1 mol/L buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 4,7) i wyrażano w nKat/L surowicy.

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie przy użyciu programu Statistica (wersja 10.0). Ze względu na zgodność empirycznego rozkładu zmiennych z rozkładem normalnym w ocenie istotności różnic zastosowano test T dla prób niezależnych. W celu oceny zbieżności pomiędzy wynikami uzyskanymi w surowicy krwi z i bez egzogennej bilirubiny wyznaczono współczynniki korelacji Pearson'a, uznając wartości $p \leq 0,05$ za znamienne.

Wyniki

W surowicy krwi, zawierającej egzogenną bilirubinę, aktywność HEX, odczytana tradycyjną metodą (wobec ślepej próby odczynnikowej), wynosiła $291,4 \pm 77,9$ nKat/L, a w tej samej surowicy krwi bez dodatku egzogennej bilirubiny, aktywność HEX, odczytana tradycyjną metodą (wobec ślepej próby odczynnikowej), wynosiła $179,7 \pm 74,6$ nKat/L (tab. I, ryc. 1). Uzyskane wyniki świadczą o tym,

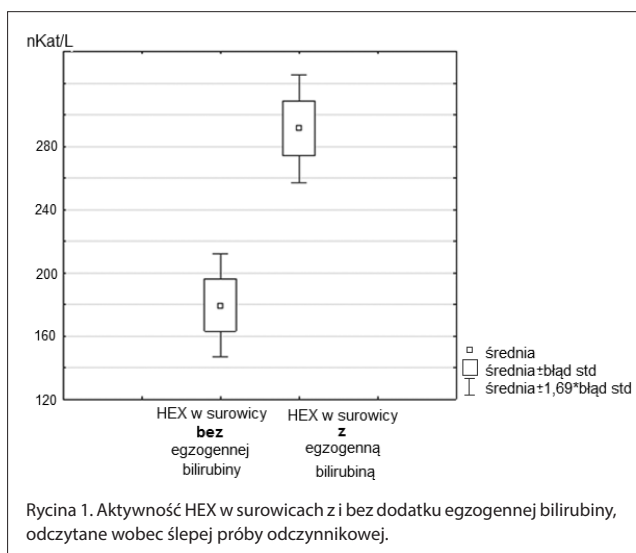
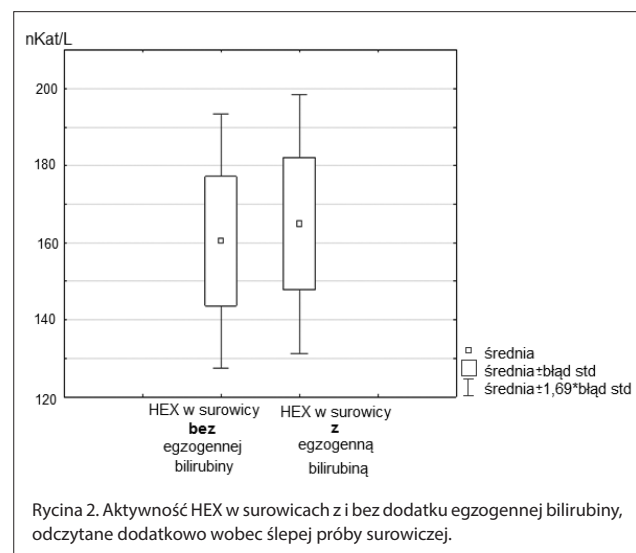
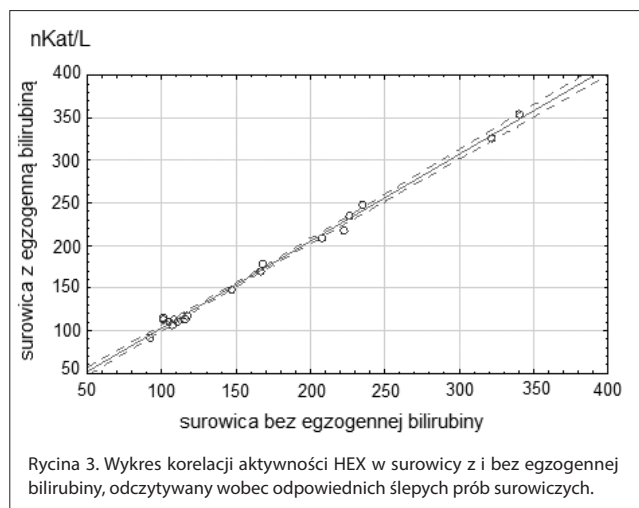


Tabela I. Wartość aktywności HEX w surowicach „z” i „bez” egzogennej bilirubiny, odczytana w tradycyjny i zmodyfikowany sposób.

	Aktywność HEX odczyta wobec ślepej próby odczynnikowej [nKat/L]		Aktywność HEX odczytana wobec ślepej próby surowicznej [nKat/L]	
	z	bez	z	bez
	egzogennej bilirubiny		egzogennej bilirubiny	
1	340,3	251,6	248,4	235,4
2	234,3	134,7	113,8	108,3
3	293,7	183,9	169,9	166,1
4	296,5	186,3	178,1	168,4
5	250,9	133,4	117,0	116,7
6	325,9	247,6	233,9	225,7
7	241,1	122,5	106,7	107,5
8	469,4	353,9	353,8	340,6
9	486,9	347,9	326,5	321,9
10	251,8	125,3	110,0	110,7
11	244,3	132,7	113,6	116,0
12	250,9	131,0	116,0	101,1
13	246,6	117,2	92,2	92,8
14	193,1	115,9	110,2	104,8
15	224,4	126,3	106,8	106,5
16	336,1	238,6	217,2	222,4
17	236,3	127,4	113,3	108,7
18	295,5	166,9	148,4	146,9
19	365,3	225,6	209,2	207,9
20	244,9	124,9	112,9	101,1
Średnia aktywność	291,4	179,7	164,9	160,5
Odczylenie standardowe	$\pm 77,9$	$\pm 74,6$	$\pm 76,8$	$\pm 75,0$

że żółty kolor bilirubiny istotnie ($p = 0,000041$) zawyża wartość odczytu spektrofotometrycznego aktywności HEX. W surowicy krwi z dodatkiem egzogennej bilirubiny aktywność HEX odczytana w zmodyfikowany sposób – wobec dwóch blanków: odczynnikowego i surowiczego, wynosiła $164,9 \pm 76,8$ nKat/L, a aktywność HEX w surowicy krwi bez dodatku egzogennej bilirubiny, odczytana w zmodyfikowany sposób – wobec dwóch blanków: odczynnikowego i surowiczego, wynosiła $160,5 \pm 69,7$ nKat/L (tab. I, ryc. 2). Pomędzy uzyskanymi wynikami występuje dodatnia liniowa korelacja Pearson'a ze współczynnikiem korelacji równym 0,997 (ryc. 3).





Dyskusja

Bilirubina we krwi noworodków oraz pacjentów: z objawami zatrucia, z hemolizą, chorobami wątroby i dróg żółciowych [11] fałszuje wyniki pomiarów kolorymetrycznych wielu substancji, w tym: kreatyniny, fosforanów, albuminy, glukozy, cholesterolu, triacylogliceroli i kwasu moczowego [15, 16, 17, 18, 19, 20]. Prezentowane badania, dowodzą, że egzogenna bilirubina istotnie ($p = 0,000041$) zawyża również wyniki oznaczania aktywności HEX w surowicy krwi (o blisko 70%), co wiąże się z koniecznością eliminacji zakłóceń spowodowanych przez bilirubinę. Haesaig i wsp. [21] proponują usunięcie ingerencji barwy bilirubiny w oznaczanie analizów, poprzez wstępne inkubowanie żółtych próbek surowicy z dodatkiem oksydazy bilirubiny. Niestety, pre-inkubacja żółtaczkowej surowicy z oksydazą bilirubiny wydłuża proces analityczny, podnosi jego koszt oraz może powodować częściową denaturację nietrwałych enzymów. Z uwagi na to, że nierozpuszczalna w wodzie bilirubina wiąże się z białkami osocza, można próbować strącać białka surowicy krwi związane z bilirubiną kwasem trichloroocetowym, po inkubacji enzymu z substratem [14]. Proponujemy jednak prostszą i tańszą alternatywę eliminacji interferencji bilirubiny w oznaczenia kolorymetryczne w surowicy, polegającą na odejmowaniu absorbancji mieszaniny inkubacyjnej bez substratu od absorbancji mieszaniny inkubacyjnej z substratem.

Wniosek: Nasza prosta i tania modyfikacja, skutecznie eliminuje interferencję bilirubiny w oznaczanie HEX w surowicy krwi. Prawdopodobnie nasza modyfikacja może być zastosowana do eliminacji interferencji bilirubiny w oznaczanie (w zakresie 340 nm – 500 nm) innych parametrów krwi.

Podziękowania: Dziękujemy Instytutowi Medycznemu Państwowej Wyższej Szkoły Informatyki i Przedsiębiorczości w Łomży za sfinansowanie niniejszych badań.

Piśmiennictwo

1. Zwierz K, Gindziński A, Głowacka D, et al. The degradation of glycoconjugates in the human gastric mucous membrane. *Acta Med Acad Sci Hung* 1981; 38: 145-152.

2. Chojnowska S, Kępka A, Szajda SD, et al. Exoglycosidase markers of diseases. *Biochem Soc Trans* 2011; 39(1): 406-409.
3. Waszkiewicz N, Popławska R, Konarzewska B, et al. Biomarkery nadużywania alkoholu. Część II. Nowe biomarkery oraz ich interpretacja. *Psychiatr Pol* 2010; 44(1): 137-146.
4. Szajda SD, Borzym-Kluczyk M, Snarska J, et al. N-acetyl-beta-D-hexosaminidase and its isoenzymes A and B in blood serum and urine, as a potential colon cancer markers. *Hepatogastroenterology* 2009; 56: 1287-1298.
5. Pancewicz S, Popko J, Rutkowski R, et al. Activity of lysosomal exoglycosidases in serum and synovial fluid in patients with chronic Lyme and rheumatoid arthritis. *Scand J Inf Dis* 2009; 41(8): 584-589.
6. Berk PD, Howe RB, Bloomer JR, et al. Studies of bilirubin kinetics in normal adults. *J Clin Invest* 1969; 48: 2176-2190.
7. Glick M, Ryder K, Glick S, Woods J. Unreliable visual estimation of the incidence and amount of turbidity, hemolysis and icterus in serum from hospitalized patients. *Clin Chem* 1989; 35: 837-839.
8. Grafmeyer D, Bondon M, Manchon M, et al. The influence of bilirubin, hemolysis and turbidity on 20 analytical tests performed on automatic analyzers. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33: 31-52.
9. Saibaba KSS, Vijaya Bhaskar M, Srinivasa Rao PVLN, et al. Interferences in clinical chemistry analysis. *Ind J Clin Biochem* 1998; 13(2): 55-62.
10. Fevery J. Bilirubin in clinical practice: a review. *Liver Int* 2008; 28(5): 592-605.
11. Kamisako T, Kobayashi Y, Takeuchi K, et al. Recent advances in bilirubin metabolism research: The molecular mechanism of hepatocyte bilirubin transport and its clinical relevance. *J Gastroenterol* 2000; 35: 659-64.
12. Wasiluk A, Polewko A, Ozimirski A. Współczesna diagnostyka i leczenie żółtaczek u noworodków i niemowląt. *Diagn Lab* 2012; 48(4): 405-441.
13. Marciniak J, Zalewska A, Popko J, et al. Optimization of an enzymatic method for the determination of lysosomal N-acetyl-beta-D-hexosaminidase and beta glucuronidase in synovial fluid. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 933-937.
14. Chojnowska S, Kępka A, Szajda SD, et al. Determination of N-acetyl-beta-hexosaminidase in hemolyzed blood. *Clin Biochem* 2016; 49: 811-815.
15. Aoki Y, Ihara H, Nakamura H, et al. Effects of serum bilirubin on determination of uric acid by the uricase-peroxidase coupled reaction. *Clin Chem* 1992; 38(7): 1350-1352.
16. Cobbaert CM, Baadenhuijsen H, Weykamp CW. Prime time for enzymatic creatinine methods in pediatrics. *Clin Chem* 2009; 55: 549-558.
17. Hullin DA, McGrane MT. Effect of bilirubin on uricase-peroxidase coupled reactions. Implications for urate measurement in clinical samples and external quality assessment schemes. *Ann Clin Biochem* 1991; 28: 98-100.
18. James DR, Price CP. Interference in colorimetric reactions for measuring hydrogen peroxide. *Ann Clin Biochem* 1984; 21: 398-404.
19. Penhaker M, Kasik V, Hrvolova B. Advanced bilirubin measurement by a photometric method. *Elektron Elektrotech* 2013; 19(3): 47-50.
20. Wang Z, Guo H, Wang Y, et al. Interfering effect of bilirubin on the determination of alkaline phosphatase. *Int J Clin Exp Med* 2014; 7(11): 4244-4248.
21. Haesaig LK, Feldbruegge DH, Urban EA, et al. A utilitarian procedure to avoid bilirubin interference on creatinine assays. *Clin Chem* 1991; 37: 932.

Autor do korespondencji:

dr n. med. Sylwia Chojnowska

Instytut Medyczny

Państwowa Wyższa Szkoła Informatyki i Przedsiębiorczości w Łomży

18-400 Łomża, ul. Akademicka 14

tel. +48 86 2168270

e-mail: schojnowska@pwsip.edu.pl

Otrzymano: 26.06.2017

Akceptacja do druku: 22.07.2017

Konflikt interesów: nie zgłoszono