

Paraoksonaz enzim aktivitesi ölçümünde manuel yöntemin standardizasyonu ve performans değerlendirmesi

Standardization and performance evaluation of manual measurement method for paraoxonase activity

Gökhan Çakırca¹, Osman Evliyaoğlu², Cemal Polat², Fatma Birgül Işık², Nuriye Mete²

ÖZET

Amaç: Geleneksel laboratuvar yöntemleriyle hazırlanan paraoksonaz (PON1) kitinin maliyet açısından çok daha ucuz ve reaktiflerin taze hazırlanmış olması itibarıyla de iyi analiz performansı göstereceğini varsayarak otoanalizörde PON1'in standardizasyonu ve performansının değerlendirilmesini amaçladık.

Yöntemler: Çalışmaya alınan 35 sağlıklı bireyden alınan venöz kanlardan santrifüj sonrası toplam 100 mL serum havuzu oluşturuldu. Serum havuzundan gün içi değişimleri değerlendirmek için 20 numune, günler arası değişimleri değerlendirmek için 30 numune hazırlanarak PON1 enzim aktiviteleri çalışıldı. Hazırlanan 30 örneğin PON1 enzim aktiviteleri hem manuel olarak hazırlanan kit hem de ticari kit ile otoanalizörde çalışılarak yöntem uygunluğu değerlendirildi.

Bulgular: Çalışmamızda paraoksonaz (PON1) enzim aktivitesi için: Ortalama, standart deviasyon (SD), yüzde varyasyon katsayısı (% CV) değerleri; gün içi (72,70 U/L, 0,43, 0,59) ve günler arası (74,24 U/L, 3,00, 4,04) olarak tespit edildi. PON1 enzim aktivite değerlerinin, manuel yöntem ve ticari kit arasındaki korelasyon katsayıları $r = 0,92$ ve $r^2 = 0,84$ bulundu.

Sonuç: Manuel hazırlanan reaktiflerle elde edilen sonuçların yeterli analitik performans gösterdikleri görüldü. Ayrıca hazırlanmış olduğumuz serum havuzu porsiyonize edildi ve gelecek çalışmalar için laboratuvarımızda internal kalite kontrolü yapmak için kısmen standardizasyon gerçekleştirilmiş oldu ve rastgele hasta girişlerinde kontrol serumu olarak okutulmaya başlandı. Buna rağmen, standardize kontrol serumlarının kullanılmasının, rutin laboratuvarlarda daha güvenilir olduğu düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Paraoksonaz, standardizasyon, internal kalite kontrol

ABSTRACT

Objectives: We hypothesised that using the traditional laboratory methods for preparing the kit with chemicals may represent sufficient analytic performance with commercial kits, because of the fresh reagents and cost effective. We aimed to apply the paraoxonase (PON1) study procedure to the autoanalyser and evaluate the analytic performance of the study.

Methods: Thirty five healthy individuals were included in the study. A total of 100 mL serum pool was created after centrifugation of venous blood samples. To assess the intra-assay variations of PON1 enzyme activities 20 samples and for inter-assay variations 30 samples were prepared from the serum pool and PON1 enzyme activities were studied. As well as, 30 samples were studied to evaluate the correlation between the commercial kit and the manual prepared kit from chemicals.

Results: In this study, the mean, standard deviation (SD), percent coefficient of variation (% CV) values of PON1 enzyme activities for intra-assay (72.70 U / L, 0.43, 0.59) and inter-assay (74.24 U / L, 3.00, 4.04) were determined. The correlation coefficient between the manual method and the commercial kit were $r = 0.92$ and $r^2 = 0.84$.

Conclusion: The results of manual kit were showed good analytical performance with commercial kit. Therefore, the serum pool which was partially standardized in this study was portionized for using as an internal quality control serum for future studies in our laboratory. However, the use of standardized control sera, is considered to be more reliable in routine laboratories.

Key words: Paraoxonase, standardization, internal quality control

¹ Ceylanpınar Devlet Hastanesi Biyokimya Birimi, Şanlıurfa, Türkiye

² Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD, Diyarbakır, Türkiye

Yazışma Adresi /Correspondence: Gökhan Çakırca,

Ceylanpınar Devlet Hastanesi Biyokimya Birimi, Şanlıurfa, Türkiye Email: gokhanmardin47@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received: 27.12.2012, Kabul Tarihi / Accepted: 18.03.2013

Copyright © Dicle Tıp Dergisi 2013, Her hakkı saklıdır / All rights reserved

GİRİŞ

Paraoksonaz (PON1) glikoprotein yapıda, 43-45 kDa ağırlığında ve başlıca karaciğer tarafından sentezlenen bir enzimdir [1]. PON1 enzimi yüksek yoğunluklu lipoproteinlerde (HDL) bulunan, kalsiyuma bağımlı bir ester hidrolazdır [2]. PON1 enziminin, organofosfat bileşiklerin detoksifikasyonuna katılma ve lipit peroksitlerini hidrolize ederek düşük yoğunluklu lipoproteini (LDL)'i oksidasyondan koruma fonksiyonu vardır [3]. Oksidatif stres; oksidan/antioksidan dengesindeki bozulmanın oksidan lehine kayması sonucunda, makromoleküler (proteinler, lipitler, karbohidratlar ve DNA gibi) yapılar üzerinde meydana gelen hasardır [4,5]. PON1 enziminin; ateroskleroz, diabetes mellitus, romatoid artrit, koroner arter hastalıklarının etyopatolojisinde rol oynadığı bilinmektedir [6,7,8,9].

Çalışmamızda, geleneksel laboratuvar yöntemleriyle hazırlanan PON1 kitinin, maliyet açısından çok daha ucuz ve reaktiflerin taze hazırlanmış olması itibarıyla iyi analiz performansı göstereceği varsayılarak, manuel hazırlanan PON1 kitinin otoanalizörde standardizasyonu ve performansının değerlendirilmesi amaçlandı.

YÖNTEMLER

Çalışmaya alınan 35 sağlıklı bireyden, sarı kapaklı (BD Vacutainer® SST™II Advance) tüplere 5.0 mL venöz kan alındı. Kanlar, 4000 rpm' de 10 dakika santrifüj (NF 800 R, Nüve, Ankara, Türkiye) edildi. Santrifüj sonrası elde edilen serumlardan toplam 100 mL serum havuzu oluşturuldu. Serum havuzundan örnek tüplere 1 mL aktararak gün içi değişimleri değerlendirmek için 20 numune, günler arası değişimi değerlendirmek için 30 numune hazırlanarak PON1 enzim aktiviteleri çalışıldı. Günler arası çalışma için örnekler 1mL'lik ependorf tüplerine aktarıldı ve çalışma gününe kadar -40°C' de saklandı. Çalışma gününde dondurulmuş serumlar oda şartlarında çözülürülerek çalışıldı. Hazırlanan 30 örneğin PON1 enzim aktiviteleri hem manuel olarak hazırlanan kitle hem de ticari kitle (Relassay, Gaziantep, Türkiye) Architect® c16000 (Abbott Park, Illinois, USA) otoanalizöründe çalışılarak yöntem uygunluğu değerlendirildi.

Paraoksonaz ölçümü

Serum PON1 enzim aktiviteleri, spektrofotometrik olarak modifiye Eckerson [10] yöntemi ile ölçüldü. PON1 enzim aktivitesi ölçümünde substrat olarak paraokson (0.0-diethyl-0-p-nitrophenylphosphate (Sigma Chemical Co. London, UK) kullanıldı. Paraoksonaz ölçümü, substrat olarak kullanılan paraoksonun 37°C' de 412 nm dalga boyunda enzimatik hidrolizi sonucu oluşan serbest p-nitrofenolün spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır [10,11]. Reaktif 1: 0,157g TRİZMA® Hydrochloride (tris[hydroxymethyl]aminomethane hydrochloride) alınıp biraz distile suda çözüldükten sonra üzerine 60 mikron dietil-4-nitro-fenil fosfat eklenip distile su ile 10 mL'ye tamamlandı ve pH: 7,4'e ayarlandı. Reaktif 2: 0.0825g CaCl₂, son hacmi distile su ile 250 mL'ye tamamlandı. PON1 enzim aktivite testi için reaktifler, laboratuvarımızdaki kimyasallarla hazırlandı ve 4-8°C' de saklandı.

Manuel PON1 kitinin otoanalizöre (Architect® c16000) aplikasyon değerleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Architect® c16000 otoanalizöründe; manuel PON1 kiti ve Relassay PON1 kiti aplikasyon değerleri.

	PON1 (U/L) (Manuel)	PON1 (U/L) (Relassay)
Ölçüm tipi	Fotometrik	Fotometrik
Reaksiyon modu	Rate up	Rate up
Dalga boyu	412 nm	412 nm
Reaktif-1 miktarı (µL)	250	500
Reaktif-2 miktarı (µL)	20	25
Örnek miktarı (µL)	20	25
Kalibrasyon yöntemi	Lineer	Lineer

PON1: Paraoksonaz

İstatistiki değerlendirmeler SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 15.0 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Manuel hazırlanan kit ile ticari kit arasındaki ilişki için Pearson korelasyon analizi kullanıldı.

Bu çalışma Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulu tarafından onaylandı (karar no: 760 / 13.11.2012).

BULGULAR

Yaptığımız çalışmada gün içi ve günler arası performans verileri Tablo 2 ve Tablo 3' te gösterilmiştir. Manuel kit ile ticari kit arasında korelasyon katsayıları $r=0,92$ ve $r^2=0,84$ bulundu ($p<0,001$) (Şekil 1).

Tablo 2. Manuel PON1 kiti ve Relassay PON1 kiti testlerinin gün içi performans değerleri.

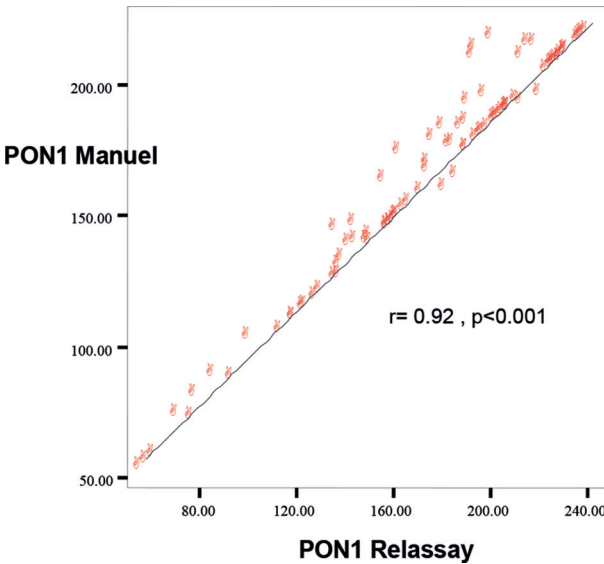
	n	Ortalama	SD ¹	Min-Maks	CV(%) ²
PON1 (U/L) (Manuel)	20	72.70	0.43	71.61-73.38	0.59
PON1 (U/L) (Relassay)	20	73.24	0.97	70.44-76.41	1.2

¹. SD: Standart sapma ². CV(%): Yüzde varyasyon katsayısı PON1: Paraoksonaz

Tablo 3. Manuel PON1 kiti ve Relassay PON1 kiti testlerinin günler arası performans değerleri.

	n	Ortalama	SD ¹	Min-Maks	CV(%) ²
PON1 (U/L) (Manuel)	30	74.24	3.00	68.49-79.51	4.04
PON1 (U/L) (Relassay)	30	83.55	4.9	72.75-88.44	8.7

¹. SD: Standart sapma ². CV(%): Yüzde varyasyon katsayısı, PON1: Paraoksonaz



Şekil 1. Manuel PON1 kiti ve Relassay PON1 kiti ile elde edilen PON1 enzim aktivite sonuçlarının korelasyon grafiği.

TARTIŞMA

Son yıllarda oksidatif stres testleri sıklıkla çalışılmaktadır ve standardizasyona gereksinimi vardır. Bu testler genellikle manuel yöntemler ile çalışıldığı için kişiye bağımlıdır ve pipetleme kusurundan kaynaklanan hatalar test sonucunu kötü etkilemektedir. Ayrıca manuel yöntem fazla hacimlerle çalışılmakta ve kit sarfiyatını arttırmaktadır. Otoanalizörlerle yapılan çalışmalarda kişiye bağımlılık ve pipetleme kusuru minimize edilmiştir. Bu nedenle hataları azaltmak ve etkin yaklaşım için otoanalizörlerle çalışma yapılmasının daha tutarlı olacağını düşünülmektedir.

PON1 enzim aktivite tayini, kimyasallar ile manuel hazırlanan kitlerle daha etkin olacaktır. Çünkü ticari kitler, hem daha pahalıdır, hem de sınırlı raf ömrüne sahiptirler. Kimyasalların kısa miad sorunu olmadığı için raf ömrü takibi söz konusu değildir. Çalışmalar için istenilen miktarda taze olarak hazırlanabilir. Çalışmamızda PON1 enzim aktivite ölçümünün performansı: Ortalama, standart deviasyon (SD), yüzde varyasyon katsayısı (%CV) değerleri; gün içi (72,70 U/L, 0,43, 0,59) ve günler arası (74,24 U/L, 3,00, 4,04) değerleri tespit edildi. Bu veriler manuel PON1 enzim aktivitesi ölçüm yönteminin rutin laboratuvarlarda, standardize kontrollerin oluşturulması halinde güvenle kullanılabilirliğini göstermektedir.

Çalışmamızda hazırlanmış olan serum havuzu porsiyonize edilerek, gelecek çalışmalar için, internal kalite kontrolünde kullanılmak üzere standardizasyonu kısmen gerçekleştirilmiş oldu ve rastgele hasta girişlerinde kontrol serumu olarak okutulmaya başlandı. Buna rağmen, standardize kontrol serumlarının kullanılmasının, rutin laboratuvarlarda daha güvenilir olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Mackness B, Mackness MI, Durrington PN, et al. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr. Opin. Lipidol* 1996;7:69-76.
2. Antikainen M, Murtomaki S, Syvanne M, et al. The Gln-Arg191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in Finns. *J Clin Invest* 1996;98:883-885.
3. Mackness MI, Durrington PN. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis* 1995;115:243-253.

4. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 2000;108:652-659.
5. Abuja PM, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta* 2001;306:1-17.
6. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:473-480.
7. Nair SP, Shah NC, Taggarsa A, Nayak U. PON1 and its association with oxidative stress in type I and type II diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr* 2011;5:126-129.
8. Tanimoto N, Kumon Y, Suehiro T, et al. Serum paraoxonase activity decreases in rheumatoid arthritis. *Life Sci* 2003;72:2877-2885.
9. Amine K, Atouk A, Moussamih S, et al. Paraoxonase-1 (PON1) activity in patients with coronary artery diseases and in diabetic patients. *Ann Biol Clin* 2011;69:671-617.
10. Eckerson HW, Wyte CM, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet* 1983;35:1126-1138.
11. Gülcü F, Gürsu MF. Paraoksonaz ve arilesteraz aktivite ölçümlerinin standardizasyonu. *Turk J Biochem* 2003;28:45-49.