

PËRCAKTIMI I FOSFOLIPIDEVE NË BILE ME METODËN ENZIMATIKE E ME DIGJESTION

TEUTA DEDEJ, STILIAN BUZO, BASHKIM RESULI*

Summary

ENZYMATIC AND DIGESTIVE METHOD FOR THE DETERMINATION OF PHOSPHOLIPIDS IN BILE

A simple, sensitive and rapid method for measuring the phospholipid (PL) content in bile was described. The method is based on the use of a combination of three enzymes: phospholipase D, which hydrolyze biliary phospholipids, choline oxidase which oxidizes the liberated choline and peroxidase which action couples 4-aminoantipyrine and phenol to form a red pigment. The assay was shown to be specific, sensitive, accurate and precise. In the present study the result obtained with the upmentioned method were compared with those obtained by a modified Fiske and Subbarow (Svanborg method) on the same sample. This method involves preliminary digestion of phospholipids with acid as an obligatory step for the conversion of organic into inorganic phosphorus. We found the results of the two methods to be in close agreement ($r=0.98$). The first method combines a short analysis time with an elevated precision. The conventional method gives a slight overestimation of phospholipids in bile.

Përcaktimi fosfolipideve në bile ka marrë një rëndësi të veçantë këto vitet e fundit në studimet mbi formimin e gurëve të kolesterolit në vezikën biliare si dhe në monitorimin e pacientëve të trajtuar me acidin ursodeoksikolik (UDCA), një agjent i aftë të shkrijë këto gurë. (1,2,3) Në fakt kolesteroli në bile, solubilizohet me anë të micelave mikse të përbëra nga PL e acidet biliare. Acidet biliare janë esenciale për solubilizimin e PL. PL nga ana e tyre, janë të domosdoshme për të solubilizuar e gjendur në bile. Përcaktimi i njëkohshëm i tre lipideve na lejon të përcaktojmë "indeksin" a saturimit në kolesterol" të biles.

Ky indeks paraqet një rëndësi klinike në

monitorimin e pacientëve me gurë kolesteronike biliare apo të pacientëve me risk për të formuar të tillë. (4,5)

Metoda konvencionale e përcaktimit të PL përfshin një "digjestion" paraprak të PL me anë të acidit, si një hap obligator për kthimin e fosforit organik në inorganik, i ndjekur nga përcaktimi i fosfateve, i bazuar në reduktimin e acidit fosfomobdik në një kompleks me ngjyrë. (6) Në këtë punim është shqyrtuar mundësia e përdorimit të një përcaktimi direkt të PL në bile duke evidentuar kështu digjestionin paraprak me acid dhe përdorimin e reagentëve korrozive të përdorur në metodën konvencionale.

* Dërguar në Redaksi më 3 Tetor 2004, miratuar për botim më 15 Mars 2005.

Nga Shërbimi i Laboratorëve, Shërbimi i Gastrohepatologjisë, QSUT "Nënë Tereza" Tiranë.

Adresa për letërkëmbim: Dedej T.: Shërbimi i Gastrohepatologjisë, QSUT "Nënë Tereza" Tiranë.

Materiali dhe metodat

U përcaktuan PL në biletë e 31 pacientëve me gurë në kolecistë me metodën direkte enzimatiqe dhe atë me digjestion. Kampionet e biletë u përfutuan me anë të sondimit duodenal pas stimulit të kolecistit me Ceruletine (Takus, Farmitalia Carlo Erba GmbH, Hamburg, Germany). Për metodën enzimatiqe, u përdor kit Phospholipid B i Wako Chemicals, USA, Inc. bila u hollua paraprakisht me isopropanolol (1/10).

Principi i metodës enzimatiqe: PL që përmbajnë kolinë si lecina, lizolecitina e sfingomielina hidrolizohen nga enzima fosfolipaze D me pasojë formimin e kolinës si dhe respektivisht të acidit fosfatik, acidit lizofosfatidik dhe N-acilsfingofosfatik. Kolina e çliruar oksidohet nga enzima kolinoksidaza në betinë, me prodhimin simultan të peroksidit të hidrogjenit. Ky i fundit në presencë të enzimës peroksidaze reagon me 4-aminoantipirinën dhe fenolin duke prodhuar një kromogjen me absorbim maksimal në $\lambda = 555\text{nm}$.

Matjet u kryen në spektrofotometër ANTHOS 2010 me filtër 492nm. Për metodën me digjestion apo me mineralizim u përdor gjithashtu kampionet bile të holluara me isopropanolol 1/10.

Principi i metodës me digjestion: Matriksi organik (në këtë rast fosfori), "tretë" (transformohet në komponime inorganike) në një ambient acid dhe në temperaturë të lartë; më tej fosfori inorganik përcaktohet me metodën kolorimetrike.

Ekzistojnë mjaft variante të kësaj metode, por në përdorim atë të Svanborg, në të cilën përdoret një përzierje e acidit sulfuric me atë perklorik në

një temperaturë 180°C (12 orë) për procesin e digjestionit e më tej shfrytëzohet formimi i një kompleksi fosfomolibdik me ngjyrë blu me absorbim maksimal në 800nm. Koncentrimi i fosforit inorganik të formuar i korrespondon atij të fosforit organik apo PL të pranishme në bile, vetëm nëse në kampion nuk është i pranishëm fosfor inorganik (fosfate).

Matjet u kryen në spektrofotometri PERKIN ELMER Bio 20, $\lambda = 800\text{nm}$. Për çdo metodë u përcaktua koeficientët e variacionit në % intra-assay dhe inter-assay. Koeficienti i korrelacionit midis dy metodave u llogarit sipas Pearson.

Rezultatet

Kurba e kalibrit, për metodën enzimatiqe, ishte lineare në koncentrimin nga 0 deri 1000mg/100ml duke përdorur kolinën dhe lecitinën si standarte. Përgjigja e njëjtë për të dy standartet konfirmon hidrolizën complete të lecitinës nga ana e fosfolipazës B. riprodhueshmëria e kurbës standarte u vlerësua në 5 matje të ndryshme. Çdo pikë e kurbës përfaqëson mesataren e $\pm 2\text{DS}$.

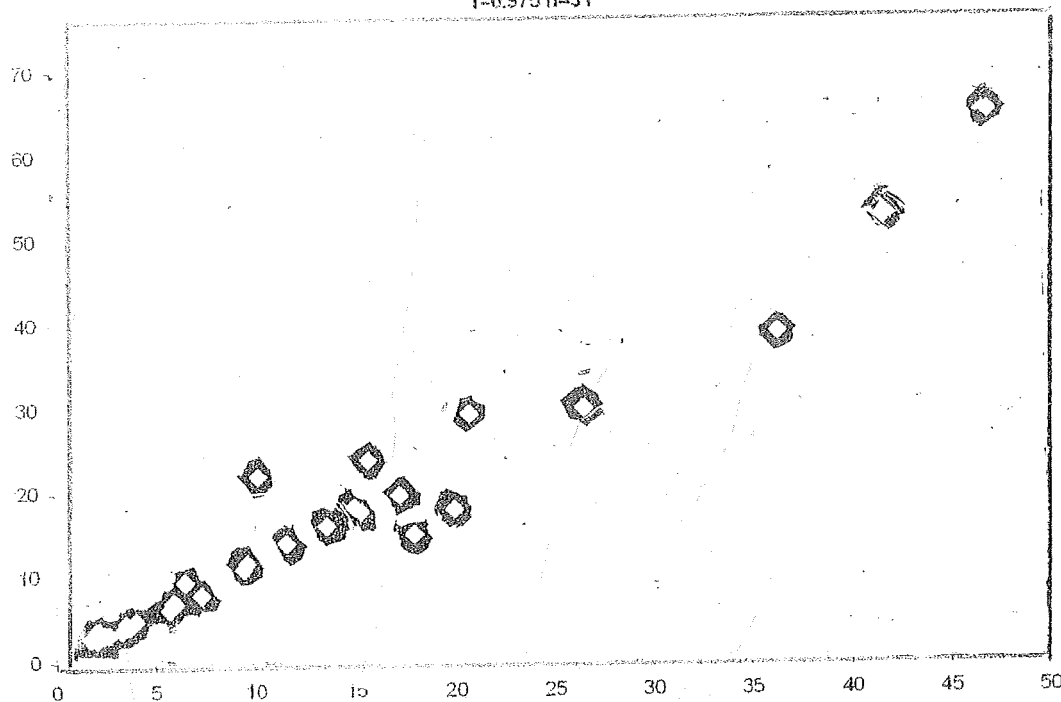
Në tabelën nr.1 tregohen vlerësimet intra-assay dhe inter-assay për të dy metodat duke përdorur tre "pool" të ndryshme të biletë, për koncentrimet të ulta, të mesme dhe të larta të PL në bile. Të dhënat tregojnë se saktësia dhe përsëritshmëria e metodës enzimatiqe është më e mirë se ajo e metodës me digjestion.

Krahasimi i dy metodave ka treguar një përputhje të mirë të vlerave të PL në kampionet tona të përfutua me të dy metodat. (figura nr.1)

Intra - assay							
	Metoda me digjestion				Metoda enzimatiqe		
	No	X	SD	CV%	X	SD	CV%
Vlerat e ulta	5	0.80	0.02	2.5	0.79	1.01	1.2
Vlerat mesatar	5	3.55	0.05	1.4	3.50	0.03	0.8
Vlerat e larta	5	9.60	0.10	1.04	9.55	0.04	0.4

Intra - assay							
	Metoda me digjestion				Metoda enzimatiqe		
	No	X	SD	CV%	X	SD	CV%
Vlerat e ulta	5	0.97	0.07	9	0.76	0.03	3.9
Vlerat mesatar	5	4.12	0.21	6.1	3.35	0.08	2.4
Vlerat e larta	5	12.3	0.26	2.8	9.43	0.11	1.2

Paraqitja grafike e korelacioneve ndërmjet dy metodave të matjes së PL.
 $r=0.975$ $n=31$



Diskutimi

Metodat klinike të përcaktimit të PL në bile janë të gjata dhe elaboative. Dizavantazhi i këtyre metodave qëndron në faktin se ato përdorin substanca mjaft korrozive si acidi perklorik e acidi sulfurik, konsumojnë kohë të gjatë dhe nuk mund të aplikohen në një autoanalizator. (6) Paraqitja e një metode enzimatike direkte për të matur PL është një avantazh të madh në analizën e lipidit biliar. Në fakt lipidet e tjerë biliarë si kolesteroli dhe acidet biliare mund të përcaktohen enzimatikisht duke përdorur metoda direkte. Metoda enzimatike bën të mundur që dhe PL të përcaktohen në këtë mënyrë. Kjo metodë bën të mundur të fitohet informacion mbi përbërjen lipidike biliare dmth mbi "indeksin e saturimit të biles në kolesterol", disa orë pas drenimit biliar, duke kthyer këtë indeks në një test me vlerë klinike. (7)

Metoda enzimatike është relativisht e thjeshtë në ekzekutim dhe më e shpejtë; është mjaft specifike për lecitinën (që përbën rreth 98% të PL biliare) dhe lipidet e tjerë nuk interferojnë në vlerat e saj. Kjo veçori specifike është mjaft e rëndësishme pasi vetëm fosfori organik kombinohet me kolesterolin dhe acidet biliare për të formuar micelat mikes në bile.

Metoda me digjestion, pa një ekstraksion paraprak të PL jep një mbivlerësim të tyre si pasojë e prezencës në bile të fosforit inorganik; Wiegard et al. kanë treguar se në bile ka një sasi të

dedektueshme të fosforit inorganik (5-10% të fosforit total) e cila korrelohet me sasinë e fosforit organik. (8)

Zbritja e fosforit inorganik është mjaft e rëndësishme kur llogaritet indeksi i saturimit të biles, veçanërisht në kampione bile realtivisht të hollëra. Çdo mospërputhje ndërmjet PL të amtura me metodën e digjestionit dhe atë enzimatike mund të jetë pasojë e presencës në kampionin e biles të fosforit inorganik. Në fakt shihet dhe në këtë punim një mbivlerësim i lehtë i PL gjatë aplikimit të metodës me digjestion.

Efekti i bilirubinës në përcaktimin e PL biliare është studiuar nga Roda et al; në fakt, raporti molar i PL ndaj bilirubinës është më i vogël në bile se sa në serum (afërsisht 10 në bile e 100 në serum). (9) Në këto kushte autori ka treguar një mbivlerësim të PL në vlera 5-8%. Ky efekt i dedikohet absorbancës të bilirubinës në 505nm dhe është e mundur të eliminohet ky fenomen duke matur blankun për çdo kampion. Kolina endogjene prezente në bile është një substrat specifik për enziminë kolinë oksidazë dhe për këtë arsye është e nevojshme të evitohet kjo me anë të një blanku shtesë: fatkeqësisht kjo në përdorim nuk siguron enzima ndarazi për të mundësuar vlerësimin e sasive të tyre. Nga ana tjetër korelacioni i mirë me metodën me digjestion, i vërejtur edhe në punimin tonë, përjashton një ndërhyrje të rëndësishme të kolinës prezente në kampionet e biles. (9,10,11)

Përfundimi

Metoda enzimatike rezulton më specifike dhe sensitive e më përsëritshmëri më të mirë se ajo me digjestion, kështu që ajo përbën një alternative të

vlefshme ndaj metodës konvencionale në përcaktimin e PL në bile. Kjo metoda mund të përdoret si një test rutinë në analizën e lipideve biliare dhe të adaptohet në një autoanalizator.

BIBLIOGRAFI

1. **Erlinger S:** "La lithiase biliare"; Gastroenterol Clin Biol, 26, 1018-1025, 2002.
2. **Fracchia M., Pellegrino S., Secreto, et la:** "Biliary lipid composition in cholesterol microlithiasis"; Gut 48, 702-6, 2001.
3. **Apstein MD, Carey MC:** "Pathogenesis of cholesterol gallstones: a parsimonious"; Eur J Clin Invest, 26, 343-52, 1996.
4. **Northfield, Hofmann AF:** "A simple calculation of the lithogenic index of bile, expressing lipid composition in rectangular coordinates" 65, 698-700, 1978.
5. **Sharma CB, Agarwa DC et la:** "Bile lithogenic and gallbladder emptying in patients with microlithiasis: effect of bile acid therapy"; Gastroenterol, 115, 124-128, 1998.
6. **Murrison J., Festi D., Ross PE:** "The estimation of phospholipids in bile"; Clin Chim Acta, 68, 1976.
7. **Roda A., Roda E., D'Ascenzo G., Barbara L.(Ed):** "La bile, aspetti chimici farmacologici e fisiologici. Metodi elettrochimici e chemiometrici nella determinazione del indice litogenico", Bologna 1995.
8. **Campanella L., Tomassetti M., Sammartino M.:** "Enzyme sensor for the determination of choline-containing phospholipids in some biological fluids", Analyst, 113, 77, 1988.
9. **Wiegard J., Murphy GM:** "Inorganic phosphate in bile and bile rich duodenal aspirates", Clin Chim Acta, 98, 196-175, 1998.
10. **Roda A., Geminiani S., Rossi R., Festi D., Barbara L.:** "Enzymatic determination of phospholipids in bile", J Res Lab Med, vol 8, 119-122, 1981.
11. **Van Erpecum KJ, Carey MC:** "Influence of bile salt on molecular interaction between sphingomyelin formation and stability", Biophys Acta, 1345, 269-262, 1997.