

вање на псевдоартрозата. Интрамедуларната фиксација треба да биде адекватна на широчината и должината на тибијата. Во спротивен случај ќе се случи миграција и свиткување на пинот. Сметаме дека вниманието за време на оперативниот третман треба да биде на тибијата, фибулата и скочниот зглоб. Компликациите од третманот се инфекција кај три пациенти и свивање на пинот кај 4 пациенти.

За несреќа ампултацијата е единственото решение кај случаите каде што не успеал хируршкиот третман. Понекогаш поради екстремно скратување на ногата, ампултацијата е одбрана од пациентот кој сака да ги одбегне хируршките процедури што следат за издолжување на ногата.

На последната контролна рендгенграфија кај повеќето пациенти бил присутен инегалитет на долните екстремитети и деформитет на скочниот зглоб.

Скратувањето на ногата е еден од најважните проблеми во третманот на псевдоартрозата. Епифизиодезата на подолгиот екстремитет и Илизаров методата за издолжување на ногата се методи за егализација на дискрепанцата во должината на екстремитетите. Кај оние пациенти каде инегалитетот е под два или три сантиметри, ортотскиот третман е идеално решение.

Сметаме дека најдобра возраст за зараснување на псевдоартрозата на тибијата е помеѓу пет и седум години. Добрата центрираност на тибијата и фибулата е важен фактор во оперативниот третман за финалниот резултат.

Третманот и зараснувањето на фибулата е многу важен фактор во третманот на псевдоартрозата на тибијата.

За време на лекувањето треба да бидеме свесни за валгус деформитетот на скочниот зглоб, инегалитетот на ногата од која зависи и финалниот резултат на третманот.

Литература

1. Andersen SK. Radiological classification of congenital pseudarthrosis of the tibia. Acta Orthop. Scand. 1973;44:719-727.
2. Boyd BH. Pathology and natural history of congenital pseudarthrosis of the tibia. Clin. Orthop. 1982; 166:5-13.
3. Morrissy RT, Riseborough EJ, Hall JE. Congenital pseudarthrosis of the tibia. J Bone Joint Surg [Am] 1981;63:367-75.
4. Crossett LS, Beaty JH, Betz RR, Warner W, Clancy M, Steel HH. Congenital pseudarthrosis of the tibia: long term follow-up study. Clin Orthop 1989;245:16-8
5. Gilbert A, Brockman R. Congenital pseudarthrosis of the tibia: long-term followup of 29 cases treated by microvascular bone transfer. Clin Orthop 1995; 314:37-44.
6. Wiltse LL. Valgus deformity of the ankle. J Bone Joint Surg 1972;54-A:595-60.
7. Langenskiold A. Pseudarthrosis of the fibula and progressive valgus deformity of the ankle in children: treatment by fusion of the distal tibial and fibular metaphyses. J. Bone Joint Surg. 1967;49:463
8. Paterson D. Successful treatment of congenital pseudarthrosis of the tibia using electrical stimulation. In Proceedings of the Seventh Combined meeting of the Orthopaedic Associations of the English Speaking World. J Bone and Joint Surg. 1982;64-B(5):632.
9. Paley D, Catagni M, Argenti F. Treatment of congenital pseudarthrosis of the tibia using the Ilizarov technique. Clin Orthop 1992;280:81-93.
10. Uchida Y, Kojima T, Sugioka Y. Vascularised fibular graft for congenital pseudarthrosis of the tibia. J Bone Joint Surg 1991;74B: 846-850.
11. Charnley J. Congenital pseudarthrosis of the tibia treated by the intramedullary nail. J Bone Joint Surg 1956; 38-A 283 - 290.

Македонски медицински преглед, 55, 170-174 (2001).

МЕДИЦИНСКИ ЦЕНТАР – БИТОЛА

ЕФЕКТИ НА ТЕМПЕРАТУРАТА И ВРЕМЕТО НА ЧУВАЊЕ НА СЕРУМОТ ВРЗ АКТИВНОСТА НА НЕКОИ ЕНЗИМИ

INFLUENCE OF THE TEMPERATURE AND PERIOD OF STORAGE TIME ON THE ENZYMATIC ACTIVITIES

Ц. ТОМОВСКА, Б. БОГДАНОВ

Испитувано е влијанието на температурата и времето на чување на серумот врз одредувањето на активностите на 5 ензими: *ALP* (алкална фосфатаза), *ALT* (аланин аминокиселинотрансфераза), *AST* (аспартат аминокиселинотрансфераза), *CK* (креатин киназа) и *LDH* (лактат дехидрогеназа). Испитувања-

та се вршени во природни "pool" серуми, а активностите се одредуваат со комерцијални китови на реагенси. Мерењата се изведувани пред чување и по чување за време од 1, 2, 3, 5, 10 и 15 денови на 3 различни температури (18 °C, 4 °C и -20 °C), без и со криопротекцијата 0,1 % натриум азид.

Истио така испитувана е активносѝа на ензимите во "pool" серум после повеќекрајно замрзнување и одмрзнување. Констатиравме дека ензимите **CK** и **LDH** покажуваат 15 дневна стабилност ако се чуваат на +4 оС или -20 оС без криопротектанти, **ALT** е стабилен ако се чува на +4 оС со криопротектанти, а ензимите **ALP** и **AST** се стабилни при услови на чување од -20 оС со криопротектанти 0,1% натриум азид. При повеќекрајно замрзнување и одмрзнување активносѝа кај сите ензими се губи.

Summary

Five enzymes ALP, ALT, AST, CK and LDH have been analyzed in already prepared 'pool' serum, whose activity is influenced by the environment, the temperature and the period of storage time, in which they are kept. Commercial kits of reagents have determined the activity before and after containing the serums for the periods of 1, 2, 3, 5, 10 and 15 days at three different temperatures (18 оС, 4 оС and -20 оС) with and without cryo protector 0.1% NaN₃. The enzymatic activities were different, some were very active and others inactive. The activity of LDH and CK in a serum kept for 15 days on 4 оС and -20 оС without cryo protector. Alt is stable at 4 оС with 0.1% NaN₃. ALP and AST kept activity at the temperature of -20 оС up to 15 day with cryo protector. In several times frozen and unfrozen serum the activity of all enzymes are significant different.

Во последните децении е незамисливо поставување дијагноза без резултати добиени од клиничките биохемиски лаборатории. Денес се применуваат голем број дијагностички тестови кои можат да не доведат до нивна погрешна употреба или до погрешно толкување на резултатите. Така, секогаш абнормален тест не значи присуство на болест, ниту пак нормален тест значи отсуство на болест.

Одредувањето на активносѝа на ензимите во дијагностички цели се користи при следниве нарушувања и патолошки состојби:

1. ензимопатии - вроден дефицит или недостаток на некој ензим и тоа го менува нормалниот метаболички процес,

2. стекнат дефицит при патолошки состојби, обично од нарушување на функцијата на некој орган на пр., намалување на синтезата на ензимите во црниот дроб,

3. разни патолошки состојби при кои доаѓа до оштетување на клетките и излегување на ензимите во екстрацелуларните биолошки течности.

Активносѝа на ензимите се одредува преку количината на супстратот што се трансформира во единица време (намалување на концентрација-

та на супстратот или зголемување на концентрацијата на продуктот на катализираната реакција). Од особена важност е лабилносѝа на нивната структура. Промените во структурата или денатурацијата резултираат со загуба на ензимската активносѝа [1]

На лабораториските дијагностички тестирања влијаат повеќе фактори кои произлегуваат од следниве фази на испитувања: преданалитичка, аналитичка и постаналитичка фаза. Денес најголемо внимание му се посветува на испитувањата во преданалитичката фаза. Валидносѝа на резултатот не зависи само од технички добро изведен тест со примена на најсоодветниот метод, туку и од многу фактори кои произлегуваат од преданалитичката фаза.

Научните сознанија покажале дека 60 % од грешките можат да се објаснат со неаналитичка грешка, а тоа значи дека причината е во преданалитичката фаза. Така 57 % од времето на целиот лабораториски процес (20,2 % надвор од лабораторија и 37,1 % во лабораторија) отпаѓа на преданалитичката фаза, а 25 % на аналитичката фаза[2, 3].

Во однос на биолошкиот материјал кој се користи за анализа во англисаксонското говорно подрачје постојат два изрази: specimen и sample, односно примерок од материјалот и примерок за анализа. Примерок на материјалот претставува дел од материјал кој е земен како репрезентативен од изворен субјект за испитување на пример, венска крв од кој се добива серум. Примерокот за анализа е материјал кој во суштина се анализира на пример серум. Преданалитичката фаза и работењето со биолошкиот материјал се состои од неколку степени:

1. подготовка на пациентот за испитување,
2. собирање на материјалот,
3. издвојување на примерокот за анализа од примерокот на материјалот,
4. транспорт на примерокот на материјалот и примерокот,
5. чување на примерокот на материјалот и примерокот за анализа,
6. претретман на примерокот за ензимска анализа.

Каталитичката концентрација на ензимот може да се промени во сите степени на преданалитичката фаза, било под дејство на биолошки фактори или од фактори кои интерферираат со активносѝа на ензимот. При работењето со биолошкиот материјал во преданалитичката фаза ние се задржавме на степенот - чување на примерокот на материјалот и примерокот за анализа.

Фактори во преданалитичката фаза кои влијаат на промената на каталитичката активносѝа на

ензимот се : земањето на материјалот (епруветите кои треба прописно да бидат означени, иглата, затворачите, адитивите, антикоагулансите, мешањето); транспортот (мешањето, вибрацијата, температурата, времето, светлоста, стабилизаторите); издвојувањето на примерокот (центрифугирањето, сепараторите, филтрите, пипетите); дистрибуцијата (волуменот, идентификацијата, температурата) и чувањето (влажност, време, температура). За да се зголеми стабилноста на примерокот, се користат затворени епрувети со кои се спречува испарувањето, хемиската и бактериската контаминација, како и кондензацијата на водата при чување на температура од 4 0C . Бидејќи примероците се чуваат подолго време неопходно е пред анализата добро да се хомогенизираат со умерено мешање. Пред мерење на активноста на ензимот треба серумот (од фрижидер или ако е замрзнат серум) 15 мин да стои на собна температура, не треба да се изложи на директна светлина бидејќи некои ензими (како СК) се фотосензитивни [4, 5, 6].

2. Резултати и дискусија

Под втабилност на анализата се подразбира способност на примерокот да ја задржи почетната вредност на конститuentот што се мери, и тоа во одредено време, во одредени граници кога се чува под дефинирани услови. Нестабилноста е поврзана со критериумите за аналитичка прецизност. Стабилноста на анализата за време на преданалитичката фаза е одредена од неговата природа, од температурата, ракувањето со примерокот и времето на неговото чување. Бидејќи времето на чување има главна улога во промената на активноста на ензимот, стабилноста се изразува преку максимално дозволено време на чување на примерокот под дефинирани услови. Тоа е период на време во кое анализата ќе сочува 95% од својата вредност. Времето на чување на примерокот се изразува во соодветни единици за време (мин, часови, денови). Треба да се прави разлика помеѓу чување на примарен примерок (крв) и чување на аналитички примерок (серум) [7, 8].

Фактори кои влијат на ензимската активност се: температурата, рН, концентрацијата и јонската јачина на пуферот, концентрацијата на супстратот, присутноста на коензимите, активаторите и инхибиторите. Брзината на ензимската реакција се зголемува со зголемувањето на температурата, но поради протеинската природа на ензимот на повисоки температури настанува денатурација и постепен инхибиција на ензимот. Денатурацијата на висока температура најчесто е ирверзибилна и е резултат од присуството на слабата хидрофобна, водородна и јонска врска во молекулата на ензимот. На ниски температури

кога не доаѓа до денатурација, голем број ензими имаат свој температурен и временски оптимум. По постигнување на тој температурен оптимум настанува дезактивација и денатурација на протеините. Има драстична промена во ензимите чувани на висока температура. Повеќето ензими се разликуваат според нивната отпорност на температурата. Некои ензими се доста стабилни на висока температура и имаат активност дури на 100 0C, на пр., фосфолипази. Други ензими се осетливи дури и на ниски температури, како, на пр., митохондриска ALT и AST, кои ја губат активноста под 5 0C [9].

Нашето лабораториско тестирање беше со *in vitro* анализа да ја одредиме активноста на ензимите во серумот во времето на земање на примерокот (пред чување). Тоа време го означивме како почетен - нулти ден, а групата серуми чија активност на ензимите ја измеривме се однесува како контролна група во текот на целата работа. Предмет на ова истражување се преданалитичките фактори т.е. влијанието на температурата и времето на чување на серумот врз одредувањето на активноста на некои ензими. Испитувани беа пет ензими кои рутински се одредуваат во секојдневната лабораториска практика и тоа: алкална фосфатаза (ALP), аланин аминотрансфераза (ALT), аспартат аминотрансфераза (AST), креатин киназа (CK), лактатдехидрогеназа (LDH). Исто така, покрај влијанието на температурата и времето на чување на серумот врз одредувањето на активноста на наведените ензими, цел на истражувањето се и ефектите на криопротектантите. За оваа цел беше користен 0,1 % натриум азид (NaN₃).

Активноста на ензимите е одредувана на +18 0C, +4 0C и -20 0C, со и без криопротектанти. За секоја температура е мерена активноста пред чувањето, по еден ден, два, три, пет, десет и петнаесет денови. За секој ензим се приготвени по десет впулг серуми. Покрај овие ефекти, испитувано е и влијанието на повеќекратното замрзнување и одмрзнување на серумот врз одредувањето на активноста на наведените ензими.

Одредувањето на активноста на ензимите е извршено со стандардни (комерцијални) китови и аналитички методи кои се користат во секојдневната рутинска работа.

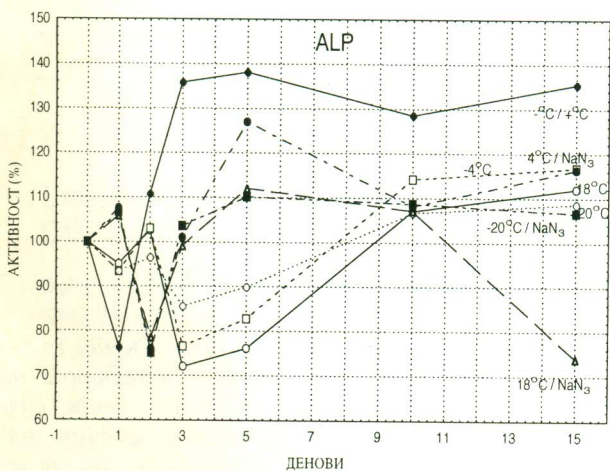
Изборот на темата произлезе од секојдневните проблеми. Имено комерцијалните китови за одредување на ензими, кога ќе се приготват, се наменети за одреден број анализи (на пример 20) и неопходно е истиот ден тие да се употребат. Поради ова, се наметнуваат проблеми сврзани со подготовката на серумите, нивното собирање, чување, сè додека не се собере доволен број примероци кој одговара на соодветниот кит.

Бидејќи станува збор за релативно скапи реагенси, од посебно значење се сознанијата за ефектите на температурата и времето на чување на серумот врз одредувањето на активноста на ензимите. Производителите на китовите (реагенсите) во своите проспекти не ја земаат предвид оваа варијанта на штедење.

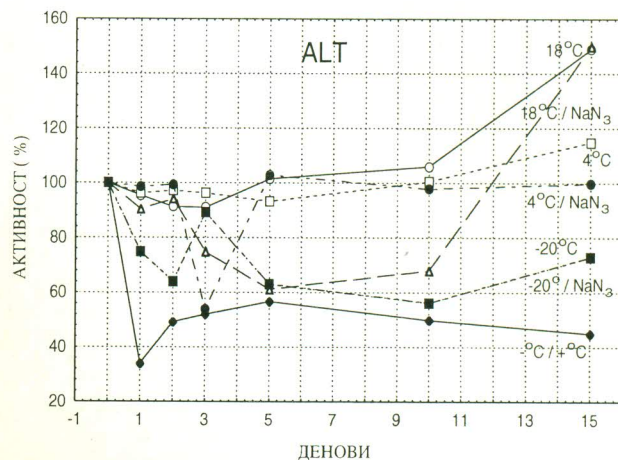
Добиените резултати се прикажани графички (сл. 1 до сл. 5) за секој ензим поодделно и во табелата 1 како оптимална стабилност на ензимите при различни начини на чување.

Табела 1. Оптимална стабилност на ензимите при различни начини на чување

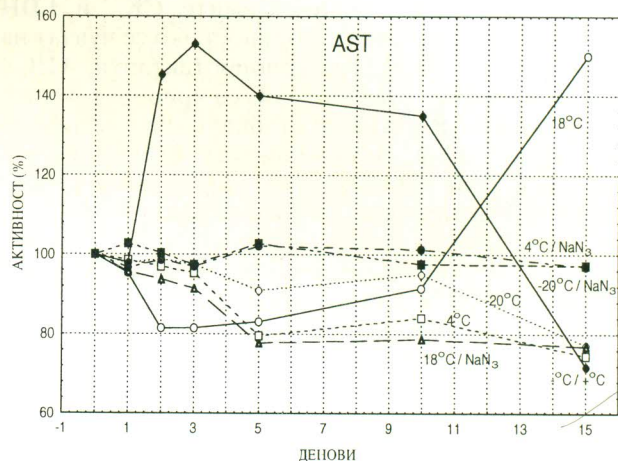
Начин на чување	Ензими (стабилност во денови)				
	ALP	ALT	AST	CK	LDH
18°C	2	10	1	10	10
4°C	2	10	3	15	15
-20°C	15	0	10	15	15
18°C со NaN ₃	3	2	3	2	10
4°C со NaN ₃	3	15	15	2	10
-20°C со NaN ₃	15	0	15	10	10
одмрзнување и замрзнување	0	0	0	0	0



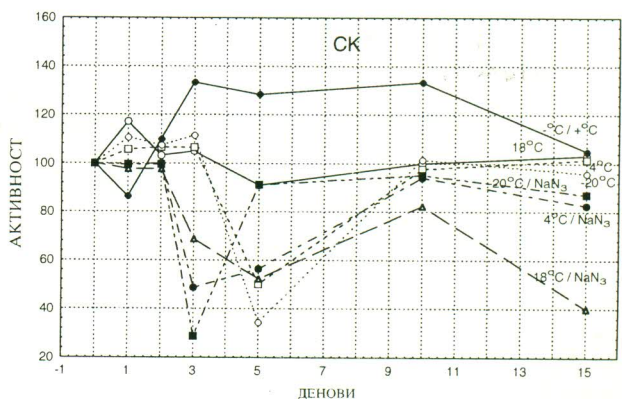
Сл. 1. Промена на активноста на ALP ензимот во шекој на 15 денови на три различни температури, без и со нитриум азид (NaN₃)



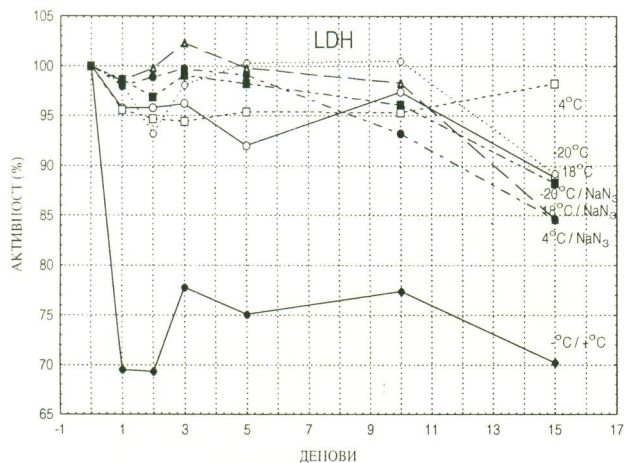
Сл. 2. Промена на активноста на ALT ензимот во шекој на 15 денови на три различни температури, без и со нитриум азид (NaN₃)



Сл. 3. Промена на активноста на AST ензимот во шекој на 15 денови на три различни температури, без и со нитриум азид (NaN₃)



Сл. 4. Промена на активноста на CK ензимот во шекој на 15 денови на три различни температури, без и со нитриум азид (NaN₃)



Сл. 5. Промена на активността на LDH ензимот во тешкој на 15 денови на три различни температури, без и со натриум азид (NaN₃)

Констатиравме дека ензимите CK и LDH покажуваат 15 дневна стабилност ако се чуваат на +4 °C или -20 °C без криопротектанти, ALT е стабилен ако се чува на +4 °C со криопротектант, а ензимите ALP и AST се стабилни при услови на чување од -20 °C со криопротектант 0,1% натриум азид. При повеќекратно замрзнување и одмрзнување активността кај сите ензими се губи.

Во клиничка лабораторија најчесто примероците се чуваат на собна температура од 18 °C, на 4 °C или на -20 °C за одложени временски периоди (два, три, пет дена). Резултатите од неколку студии во врска со стабилноста на AST на 4 °C и -20 °C се контрадикторни. Според едни истражувања

на 4 °C AST е стабилен 28 дена, додека според другите, тој е стабилен за помалку од еден ден [1,5, 6]. Резултатите од литературата за стабилноста за ALT се конфузни. Чуваните серуми за ALT не покажаа промена и по 14 дена чување на 4 °C. Според други за 2 дена активността на ALT се намалува за 20 % на 22 °C, а за 6 % на температура од 4 °C; според трети, чувањето на серумот на -20 °C резултира со загуба на активността на ALT од 46% за 6 дена.

3. Литература

1. I. Berkes, P. Tomasevic-Berkes, Opsta i medicinska enzimologija, Medicinska knjiga, Beograd, Zagreb, 1975
2. W. G. Guder, S. Narayan, H. Wisser, B. Zatwa, The Impact of Preanalytical Variables on the Quality of Laboratory Results, Git Verlag, 1996
3. W. G. Guder, S. Narayan, H. Wisser, B. Zatwa, List of Analites, Preanalytical Variables, Enclosure to Guder, 1996
4. Expert Panel on Enzymes (IFCC), J. Clin. Chem. Clin. Biochem., **21**, 633, (1983)
5. B. Straus, D. Bajakis, I. Cepelak, V. Oberiter, B. Kunovic, Z. med. Lab. diagn., **26**, 138, (1985)
6. B. Straus, Medicinska biokemija, Jugoslovenska medicinska naklada – Zagreb, (1988)
7. L. A. Kaplan, A. J. Pesu, Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation, St. Louis, Electronic Version, 1998
8. N. Majkic-Singh, Klinicka enzimologija, Beograd, 1993
9. Provisional Recommendation (1974) of IFCC Methods for Measurement of Catalytic Concentration of

ИНСТИТУТ ЗА МЕДИЦИНСКА И ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА БИОХЕМИЈА, МЕДИЦИНСКИ
 ФАКУЛТЕТ–СКОПЈЕ
 КЛИНИКА ЗА ЕНДОКРИНОЛОГИЈА, ДИЈАБЕТЕС И МЕТАБОЛИЧКИ БОЛЕСТИ, МЕДИЦИНСКИ
 ФАКУЛТЕТ–СКОПЈЕ
 ИНСТИТУТ ЗА ИМУНОЛОГИЈА, МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ – СКОПЈЕ

ДИСТРИБУЦИЈА НА HDL СУПКЛАСИ КАЈ ПАЦИЕНТИ СО ДИЈАБЕТЕС

HDL SUBCLASS DISTRIBUTION IN DIABETIC PATIENTS

С. АЛАБАКОВСКА, Д. ЛАБУДОВИЌ, К. ТОШЕСКА, М. ЈУРХАР, Ч. ДИМИТРОВСКИ, Б. ТОДОРОВА

Со градиентна (3%-31%) полиакриламид гел електрофореза беа сепарирани 5 HDL суќласи. Дистрибуцијата на HDL суќласите беше истражувана кај 80 пациенти со дијабетес тип-2 (инсулин независен diabetes mellitus) и кај 230 здрави крводарители.

Резултатите покажаа дека кај пациентите со дијабетес постои тенденција за поголема застапеност на помалите HDL3a и HDL3b суќ-

ласи (25%) во споредба со контролната група (4,5%). Средната големина на дијаметарот на HDL суќласите (9.02 ± 0.32 nm) беше сигнификантно помала во споредба со контролната група (9.780.82 nm; p<0.001). Големината на доминантните HDL суќласи беше во сигнификантно негативна корелација со плазма концентрацијата на триацилглицеролите (p<0,005). Значајна позитивна корелација беше