# Ispitivanje stabilnosti NSE (neuron specifične enolaze) u različitim uvjetima pohrane uzorka

**Mišković, Valentina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2017**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split / Sveučilište u Splitu**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:176:978640

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-28**

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the University Department for Health Studies, University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Valentina Mišković**

# ISPITIVANJE STABILNOSTI NEURON SPECIFIČNE ENOLAZE U RAZLIČITIM UVJETIMA POHRANE

**Završni rad**

Split, 2017. godina

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Valentina Mišković**

# ODREĐIVANJE STABILNOSTI NEURON SPECIFIČNE ENOLAZE U RAZLIČITIM UVJETIMA POHRANE

## NEURONE SPECIFIC ENOLASE ANALYSIS AFTER DIFFERENT STORAGE CONDITION

**Završni rad/ Bachelor's Thesis**

Mentor:

**Dr. sc. Nada Bilopavlović, spec. med. biokemije i lab. medicine**

Split, 2017. godina

# KRATICE

**ECLIA –** elektrokemiluminiscencijska imunokemijska metoda (eng. electrochemiluminescence immunoassay)

**NSE –** neuron specifična enolaza

**CK –** kreatin kinaza (eng. creatine kinase)

**AFP –** alfa - fetoprotein (eng. alpha - fetoprotein)

**MCHC –** prosječna koncentracija hemoglobina (eng. mean corpuscular hemoglobin concentration)

**EDTA –** etilendiamintetraoctena kiselina (eng. ethylendiaminetetraacetic acid)

**$pO_2$ –** parcijalni tlak kisika

**$pCO_2$ –** parcijalni tlak ugljikovog dioksida

**SCLC –** rak pluća malih stanica (eng. small cell lung cancer)

# SADRŽAJ:

1. UVOD ..... 1
1.1. Uzroci varijabilnosti laboratorijskih nalaza ..... 3
1.1.1. Predanalitički čimbenici ..... 4
1.1.2. Predanalitička faza kao izvor pogrešaka ..... 7
1.1.3. Pohrana uzoraka za laboratorijske analize ..... 8
1.2. NEURON SPECIFIČNA ENOLAZA ..... 10
1.2.1. Biomarker NSE ..... 11
1.2.2. Pohrana uzoraka za određivanje NSE ..... 12
2. CILJEVI ..... 13
3. MATERIJALI I METODE ..... 14
3.1. Ispitanici ..... 14
3.2. Pohrana uzoraka ..... 14
3.3. Određivanje NSE metodom ECLIA ..... 14
3.4. Statistika ..... 15
4. REZULTATI ..... 17
5. RASPRAVA ..... 20
6. ZAKLJUČCI ..... 20
7. LITERATURA ..... 22
8. SAŽETAK ..... 24
9. ABSTRACT ..... 26
10. ŽIVOTOPIS ..... 28

# 1. UVOD

Medicinsko biokemijska djelatnost se smatra jednom od najvažnijih zdravstveno-dijagnostičkih djelatnosti kojoj je glavni zadatak analiza biološkog materijala. Analize obuhvaćaju vrlo širok raspon mjerenja različitih sastojaka, najčešće u uzorcima krvi i mokraće, u svrhu probiranja bolesti u populaciji, prepoznavanja ranih znakova bolesti, postavljanja dijagnoze, praćenja tijeka bolesti i učinka terapije (1).

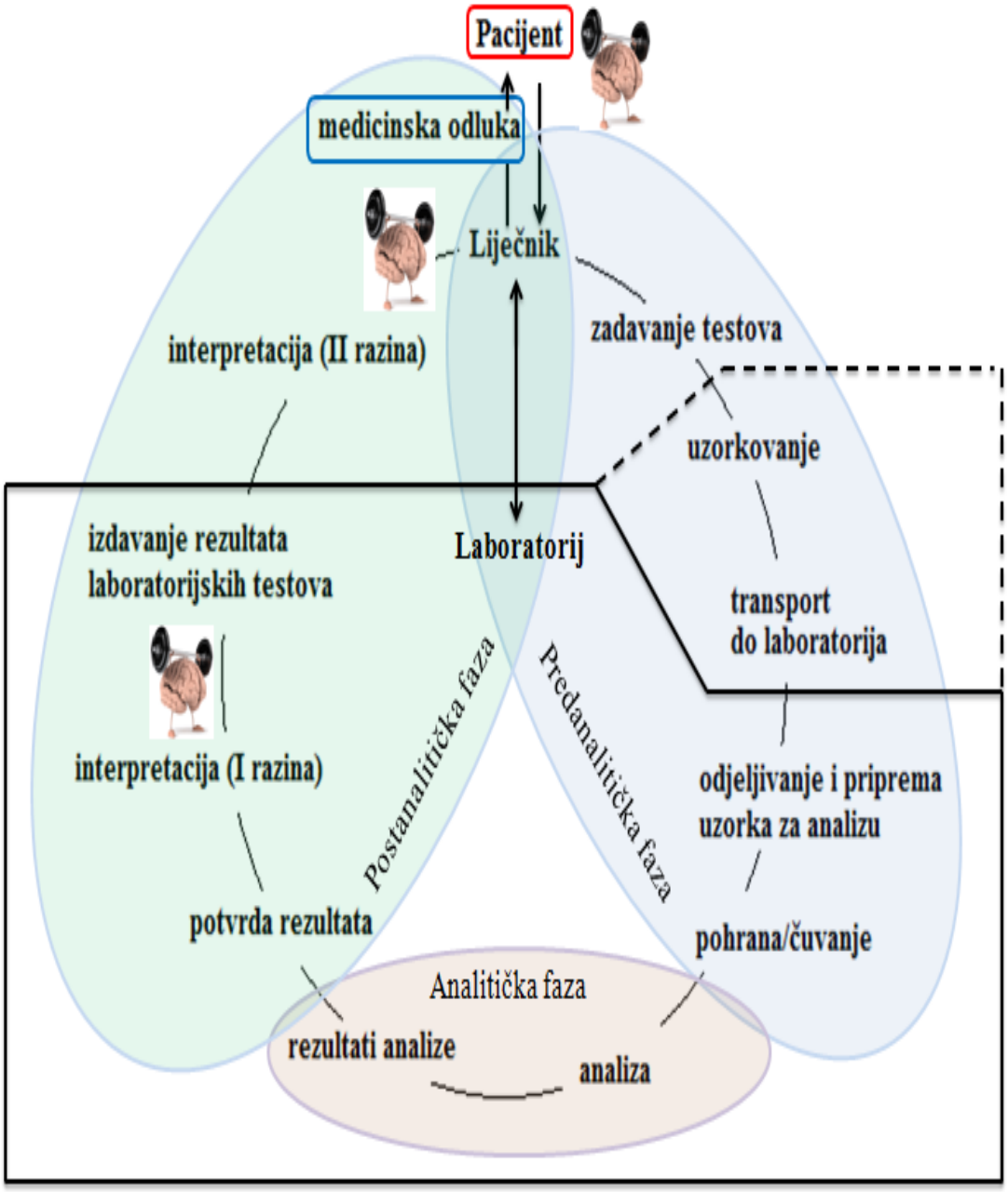
Primjena mnogih kemijskih, bioloških, fizikalnih i molekularnih metoda uz razvijenu informatičku tehnologiju danas osiguravaju vjerodostojan nalaz koji liječnik može interpretirati.

Pouzdan laboratorijski nalaz interpretira liječnik, a interpretacija je moguća ukoliko je laboratorijska pretraga odabrana racionalno te ima dijagnostičku i diferencijalnodijagnostičku vrijednost za zdravstveno stanje koje se ispituje. Prema tome, laboratorijske pretrage se odabiru na osnovu liječničkog iskustva i medicine temeljene na dokazima primjenom definiranih i provjerenih smjernica i algoritama te se shodno tome i interpretiraju. No da bi interpretacija rezultata laboratorijskih pretraga bila objektivna i ispravna, potrebno je poznavati brojne čimbenike koji mogu utjecati na konačni rezultat pojedine pretrage, a prisutni su u svakoj fazi laboratorijskog procesa.

Cjelokupni proces laboratorijskog testiranja se može prikazati Lundbergovom petljom (Slika 1.) a uključuje korake od zadavanja pretraga, preko ispravnog postupka uzimanja i transporta, pripreme i čuvanja uzorka, zatim njegovog analiziranja do tumačenja dobivenih rezultata i izdavanja nalaza. (Slika 1.)

Sam proces dobivanja nalaza se jednostavnije može podijeliti u 3 faze:

1) predanalitičku,
2) analitičku i
3) postanalitičku fazu.




Slika 1. Lundbergova petlja (2)

Prema toj klasičnoj podjeli, razlikujemo čimbenike koji se javljaju u određenom dijelu procesa i uzrokuju varijabilnost laboratorijskih nalaza. Čimbenici utjecaja na laboratorijski nalaz mogu se svrstati u dvije grupe:

1. biološki (dugotrajni/nepromjenjivi ili kratkotrajni/ promjenjivi) i
2. metodološki (1).

Biološki dugotrajni su : genetički (spol, rasa, nasljedne greške), čimbenici povezani sa procesom života (životna dob- novorođenčad, starija životna dob, reprodukcijski ciklus), cikličke promjene, tjelesni ustroj i navike (1). Kratkotrajni biološki su: metabolički (prehrana, tjelesni napor, lokalne metaboličke promjene), hemodinamički, dnevni ritam, oštećenja stanica, indukcija mikrosomskih jetrenih enzima i brojni drugi (1). Za pravilnu i točnu procjenu nalaza, potrebno je razumijevanje svih bioloških (fizioloških) i metodoloških čimbenika. Metodološki čimbenici se odnose na uzimanje uzorka krvi i postupak s uzorkom prije analize. Primjeri metodoloških čimbenika koji mogu utjecati na rezultat laboratorijskih pretraga su: primjena podveze krvne žile duljeg trajanja, palpacija prostate, intramuskularne injekcije nekih lijekova, hemolitični uzorak i brojni drugi.

Pri samoj procjeni rezultata utjecaj nepromjenjivih čimbenika se uzima u obzir jer se na njih ne može utjecati, a utjecaje metodoloških i promjenjivih čimbenika se nastoji svesti na najmanju moguću mjeru. To se postiže preciznijom i boljom pripremom pacijenta i standardizacijom svih postupaka u laboratoriju (3).

## 1.1. Uzroci varijabilnosti laboratorijskih nalaza

Postupak koji prethodi izdavanju laboratorijskog nalaza je kompleksan i uključuje više koraka pa shodno tome i mogućnost pogreške, odnosno varijabilnost nalaza, može biti velika. Uzroci koji mogu dovesti do pogreške su različiti i mogu se dogoditi u bilo kojem dijelu laboratorijskog procesa, od uzorkovanja do izdavanja nalaza.

Po vremenu trajanja, najduži, a samim time i najkritičniji dio laboratorijskog procesa je predanalitički dio. U tom dijelu se javlja najveći broj pogrešaka, 46 – 68% ukupnog broja svih laboratorijskih pogrešaka (3).

Veći dio predanalitičke faze se odvija izvan izravnog nadzora laboratorija, a sama faza obuhvaća: identifikaciju bolesnika i njegovu pripremu za uzimanje odgovarajućeg

uzorka za traženu pretragu, odgovarajući način prikupljanja uzorka i prijenos do laboratorija ili pohranu uzorka (3). Dio koji se odvija pod izravnim nadzorom laboratorija obuhvaća: prihvaćanje i/ili uzimanje uzorka, pripremu uzorka za analizu i raspodjelu po radnim mjestima u samom laboratoriju (3). Svaki od tih dijelova radnog procesa predstavlja potencijalni izvor pogreške.

Mnoge pogreške u predanalitičkoj fazi su uzrokovane nesukladnim uzorkom. Predanalitički postupci čije pogrešno provođenje ima za posljedicu nesukladan uzorak vezani su za sam postupak vađenja krvi, primjerice preduga primjena podveske, pritiskanje ubodnog mjesta, mućkanje spremnika s krvi umjesto miješanja, pogrešno vrijeme uzorkovanja ili nepridržavanje preporuka uzorkovanja na tašte. Posljedica takvih nepravilnih postupanja je potreba za ponovljenim uzorkovanjem, što uzrokuje produženo vrijeme izrade i izvještavanja te dodatne napore svih djelatnika uključenih u radni proces (3). Zbog toga svaki laboratorij treba u svojim postupcima dobre prakse jasno odrediti i provoditi postupke identifikacije nesukladnih uzoraka i načine uklanjanja njegovih uzroka (3).

Velik utjecaj na rezultate imaju i sami pacijenti. Zbog toga je veoma važna njihova odgovarajuća priprema. Priprema je različita i ovisi o analizi koja se provodi, a najčešće se odnosi na prethodnu prehranu, tjelesnu aktivnost, vrijeme dana ili ciklusa te eventualno uzimanje nekih lijekova.

Čest uzrok neprihvatljivosti uzorka za analizu je neispravna pohrana uzorka koja dovodi do degradacije analita i samim time mijenja njihove koncentracije i uzrokuje varijabilne i netočne nalaze. Upravo zbog toga laboratoriji moraju imati točan vodič glede pohrane različitih uzoraka za sve vrste laboratorijskih pretraga.

### 1.1.1. Predanalitički čimbenici

Svaki rezultat laboratorijske analize ovisi o velikom broju predanalitičkih čimbenika koji izravno utječu na rezultat mjerenog parametra. Osim podjele na biološke i metodološke čimbenike, prema učinku se predanalitički čimbenici još mogu svrstati u čimbenike *in vivo* i *in vitro* (4).

**Biološki čimbenici *in vivo*** su:

- Spol – muškarci i žene imaju različite koncentracije spolnih hormona ( npr. estradiol, testosteron); parametre krvne slike (hemoglobin i eritrociti su kod žena niži nego kod muškaraca); aktivnost kreatin kinaze i koncentraciju kreatinina budući su oba parametra ovisna o mišićnoj masi
- Dob – koncentracije različitih parametara se mijenjaju ovisno o dobi (npr. u pubertetu i menopauzi raste razina kolesterola; novorođenčad ima veći broj eritrocita i veću koncentraciju hemoglobina; u fazi rasta je povišena aktivnost alkalne fosfataze),
- Genetika – genetski određeni parametri utječu i na druge čimbenike (npr. krvna grupa 0 ima nižu aktivnost von Willebrandovog faktora; Afrikanci imaju veću koncentraciju vitamina B12, CK i α-amilaze, kao i niži broj granulocita i monocita u odnosu na bijelu populaciju),
- Stil života:

  - prehrana (ishrana) – post dovodi do pada koncentracije albumina i proteina u krvi, porasta koncentracije mokraćne kiseline i kreatinina; prehrana bogata ugljikohidratima povećava koncentraciju triglicerida,

  - pušenje – nakon konzumacije cigareta, mjere se povećene koncentracije hormona kortizola, adrenalina i aldosterona,

  - alkohol – konzumacija velikih količina smanjuje koncentraciju mokraćne kiseline i razinu glukoze u krvi, a povećava koncentraciju laktata,

  - kava – konzumacija 2 šalice kave s kofeinom povećava razinu kortizola za oko 40%,

  - droge – zlouporaba uzrokuje varijabilnost laboratorijskih parametara,
- Lijekovi – uzrokuju namjerne (terapijske) promjene i nenamjerne (nuspojave),
- Cirkadijalni ritam – ovisno o dobu dana, pojedini parametri pokazuju značajna odstupanja (npr. kortizol- najviša koncenracija kortizola je u ranim jutarnjim satima, tijekom dana se smanjuje, a najmanja koncentracija kortizola je oko 23:00 sata)
- Godišnje doba i bioritam – najpoznatiji primjer za utjecaj promjene godišnjeg doba je vitamin D (najveća koncentracija je ljeti pod sunčevim zračenjem, a najmanja koncentracija je zimi), a za bioritam je menstruacijski ciklus s promjenjivim koncentracijama spolnih hormona,

- Fizička aktivnost – povećanje uzrokuje povećan filtracijski tlak u kapilarama što djeluje na promjenu koncentracije: korpuskularnih elemenata (leukocita, eritrocita i trombocita), velikih proteina (imunoglobulina, makroglobulina), te molekula vezanih za proteine i željeza,
- Položaj tijela – premještanje iz ležećeg u sjedeći položaj smanjuje volumen plazme,
- Trudnoća i kontracepcija – tijekom trudnoće se povećava volumen plazme, smanjuje se hemoglobin i hematokrit, mijenjaju se trudnički hormoni (npr. estradiol, prolaktin, alfa - fetoprotein); kod kontracepcije inhibitori ovulacije djelomično oponašaju trudnoću pa mogu dovesti do razlika u koncentraciji pojedinih hormona i parametara zgrušavanja (4).

**Biološki čimbenici in vitro** svoj učinak pokazuju za vrijeme vađenja ili nakon uzimanja uzorka. Izazivaju promjene pa rezultat ne odgovara stvarnoj in vivo vrijednosti mjerenog parametra. Mogu biti endogeni i egzogeni (4).

*U skupinu endogenih čimbenika pripadaju:*

- Hemoliza – pucanje membrana krvnih stanica uzrokuje izlaženje staničnih sastojaka (hemoglobina) u izvanstaničnu tekućinu, pa samim time i povišene koncentracije hemoglobina u krvi kao i drugih analita prisutnih unutar krvnih stanica.
- Lipemija – uočava se nakon centrifugiranja i odvajanja seruma ili plazme ako je prisutna hiperlipoproteinemija. Prepoznaje se kao mliječna zamućenost seruma, a uzrokuju je hilomikroni ili trigliceridi. Postaje vidljiva oku pri koncentraciji triglicerida većoj od 3,4 mmol/L. Dovodi do poremećaja fotometrijskih mjerenja, ponajviše u spektru 300 – 500 nm. Gotovo su sva spektrofotometrijska mjerenja pod utjecajem zamućenosti uzrokovane lipemijom. Analiza krvne slike u slučaju lipemije može pokazivati povišene vrijednosti hemoglobina i MCHC vrijednosti te preniske vrijednosti hematokrita. Lipemija može biti uzrokovana stvarnim poremećajem metabolizma lipoproteina ili pak predanalitički nepoštivanjem dvanaesatnog gladovanja pred uzorkovanje.
- Ikterija – zelenkasto-žuta obojenost seruma ili plazme zbog povišene koncentracije bilirubina. Utječe na spektrofotometrijska mjerenja, posebice u području spektra apsorpcije bilirubina (450 – 460 nm).

- Proteini – imunokemijske analize ometaju hladni aglutinini, krioglobulini i ljudska antimišja protutijela te mogu biti uzrokom pogrešno izmjerenih koncentracija analita koji se određuju imunokemijskim metodama (4).

Egzogeni čimbenici su tvari koje ulaze u krv prije, tijekom ili nakon vađenja krvi i mogu ometati laboratorijske analize.

*U skupinu egzogenih čimbenika spadaju:*

- EDTA – može uzrokovati lažno sniženu mokraćnu kiselinu jer EDTA inhibira urikazu,
- Puder iz rukavica, gumeni čepovi ili kateteri – mogu uzrokovati promjene u koncentraciji pojedinih analita npr. povećanje koncentracije cinka,
- Deterdženti – mogu povećati koncentraciju željeza i fosfata,
- Dezinfekcijska sredstva – mogu povećati koncentraciju alkohola u krvi (4).

Edukacija nelaboratorijskog osoblja (medicinske sestre na odjelima, liječnici primarne zdravstvene zaštite, pacijenti) uključenog u predanalitičku fazu laboratorijskog procesa ključna je za razumijevanje utjecaja različitih čimbenika na kvalitetu uzorka, te dobivanja kvalitetnog uzorka a time i točnog laboratorijskog nalaza (3).

Prema standardima kvalitete svaki medicinsko biokemijski laboratorij pojedinačno, a temeljem stručnih standarda, mora uspostaviti, dokumentirati i primjenjivati kriterije za prihvaćanje i odbijanje primarnih uzoraka koji su tada jasni pokazatelji kvalitete prijeanalitičke faze (3). Pri prihvaćanju uzorka u laboratorij postupak i odluku prihvata olakšavaju potvrdni odgovori na sljedeća pitanja: radi li se o pravom pacijentu, je li provedena potpuna i točna identifikacija, je li provedena pravilna priprema pacijenta, je li uzorak biološkog materijala odgovarajući, je li pravilno dostavljen u laboratorij te je li sve vrijeme pravilno rukovano uzorkom (3). Tek potvrdni odgovori na sva navedena pitanja osiguravaju potpuno prihvatljiv uzorak za provođenje laboratorijske pretrage (3).

### 1.1.2. Predanalitička faza kao izvor pogrešaka

Neispravni postupci u predanalitičkoj fazi mogu biti uzrokom neprihvatljivog uzorka ili pak uzrokom pogrešnog nalaza. Od svih predanalitičkih pogrešaka koje se mogu susresti, hemoliza je jedan od najčešćih učinaka nepravilnog postupanja, a može nastati tijekom vađenja krvi ili poslije vađenja te je glavni uzrok odbacivanje uzorka (5)(6).

Razni čimbenici mogu pogodovati razvoju hemolize, kao što su aspiracija uzorka, snažno miješanje epruvete, visoka brzina centrifugiranja u laboratoriju i neadekvatna temperatura okoliša (5). Nastanak se povezuje sa raspadom krvnih stanica pri čemu se u okolnu plazmu oslobađaju unutarstanični elementi. Razlika između hemolitičnog i nehemolitičnog uzorka je u većini slučajeva vidljiva prostim okom jer hemoglobin boji krvnu plazmu u crveno čiji intenzitet ovisi o stupnju hemolize.

Budući da eritrociti sadrže neuron specifičnu enolazu, hemolizom se i NSE oslobađa u cirkulaciji pri čemu se lažno povećava koncentracija NSE u plazmi ili serumu. Zbog toga se hemolitični uzorci moraju odbaciti kod mjerenja NSE, odnosno prije samog analiziranja uzorka potrebno je odrediti stupanj hemolize. To se uglavnom i radi u rutinskom radu jer je potvrđeno da hemoliza i odgođeno centrifugiranje krvi (serum se mora odvojiti od ugruška u roku jednog sata od uzimanja uzorka) mogu lažno povećati koncentraciju NSE (5).

### 1.1.3. Pohrana uzoraka za laboratorijske analize

Budući da je obrada ili priprema uzoraka za obradu ponekad dugotrajan i zahtijevan proces, javlja se potreba za pohranom uzorka na određeni vremenski period. Sami uzorci su često divergentni i pokazuju različitu osjetljivost na pojedine fizikalno-kemijske promjene, pa je potrebno za svaki uzorak pojedinačno eksperimentalno odrediti optimalne uvjete pohrane (7).

U nekom idealnom slučaju bi sastav, kemijska i fizikalna svojstva, kao i biološka aktivnost uzorka tijekom vremena ostali nepromijenjeni. Nažalost, u praksi to nije tako. Zbog toga je potrebno optimizirati uvjete pohrane i skratiti vrijeme pohrane.

U različitim biološkim uzorcima (krv, serum, tkivo) čiji se sastav analizira u ispitivanju bolesnih stanja, mogu se javiti spontane reakcije i enzimski procesi koji mogu transformirati ili degradirati analit koji nam je od važnosti (7). Kako bi se to spriječilo, potrebno je ukloniti potencijalno reaktivne komponente iz uzorka ili omogućiti uvjete kojima će se ukloniti ili umanjiti njihov utjecaj.

Najjednostavniji primjer je uklanjanje vode liofilizacijom, točnije sušenje zamrzavanjem. Jednostavno uklanjanje vode iz uzorka može inhibirati brojne neželjene reakcije i često se primjenjuje u dehidraciji proteina i otopina nukleinskih kiselina (7).

Osim liofilizacije, kao najjednostavniji način za sprječavanje degradacije analita se preporučuje snižena temperatura. Prema tome, uzorci se mogu skladištiti na više različitih temperatura: u tekućem dušiku (na temperaturi -192˚C), u posebnim laboratorijskim zamrzivačima (na -80˚C), u jednostavnim zamrzivačima (na -20˚C), na ledu (0˚C) ili u hladnjacima (+4˚C) (7).

Pohrana na ledu (0˚C) se uglavnom koristi za kratkotrajne pohrane, najčešće pri transportiranju uzorka od mjesta uzorkovanja do laboratorija (4). Na kraće vrijeme se uzorci pohranjuju i na temperaturi od 4˚C do 8˚C.

Duljina vremena pohrane u kojoj neće biti promjene aktivnosti ili koncentracije je različita i ovisi o samom analitu. Za neke analite se vrijeme pohranjivanja uzorka pri temperaturi 4˚C – 8˚C kreće u satima, a primjerice većina hormona je relativno nestabilna i ne može se pohraniti na toj temperaturi (7). Općenito je analizu najbolje učiniti odmah nakon dobivanja uzorka, ali ukoliko to nije moguće, uzorak se sprema pod optimalnim uvjetima predviđenim s obzirom na analit koji će se u njemu određivati.

Za dugotrajno pohranjivanje uzoraka, opet ovisno o analitu, potrebno je uzorke pohranjivati na -20˚C, -80˚C ili u tekućem dušiku. Tekući dušik je pohranjen u Dewar tikvicama koje umanjuju razmjenu topline između pohranjene tekućine i okoline. Pod utjecajem atmosferskog tlaka, tekući dušik konstantno ključa, a budući da je to endotermni proces, temperatura ostaje konstantna (-192˚C). Može se povisiti jedino u slučaju da sav tekući dušik ispari. Uzorci se u tom slučaju pohranjuju u kriogene kutije i onda stavljaju u tekuće nosače i spremnike (7).

Većina uzoraka se može pohraniti i u laboratorijskim zamrzivačima na -80˚C. Uzorci tkiva, otopine proteina i drugi uzorci se mogu pohraniti na -80 ˚C ili -20˚C, ovisno o vremenu skladištenja i svojstvima uzorka koji se skladišti. Hladnjaci su prikladni za otopine pufera i za neke kemikalije, ali ne i za dugoročno skladištenje bioloških uzoraka. (7)

Prije analize uzorka koji je bio pohranjen, potrebno je provesti njegovo odmrzavanje. Ono se provodi sporo i na nešto višim temperaturama.

Za pojedine analize uzorke uopće nije moguće pohraniti (npr. uzorak za određivanje acido-baznog statusa ili uzorak za određivanje krvne slike).

Uzorak za određivanje acido-baznog statusa nije moguće pohraniti iz slijedećih razloga:

- $pO_2$ će se smanjiti, a $pCO_2$ povećati jer će stanice krvi i nakon napuštanja tijela neko vrijeme nastaviti svoj metabolizam i trošenje kisika, a stvaranje $CO_2$
- pH se smanjuje zbog promjena $pCO_2$ i glikolitičkih reakcija,
- koncentracija $Ca^{2+}$ se povećava jer promjena pH utječe na spajanje kalcijevog kationa sa proteinima,
- usljed glikolize se smanjuje koncentracija glukoze, a povećava koncentracija laktata (8).

Budući da će se svi ti parametri mijenjati, rezultati ABS-a nakon bilo kakvog oblika pohrane će biti različiti od stvarnih rezultata, tako da pohrana takvih uzoraka nije prihvatljiva.

Uzorak za određivanje parametara krvne slike se također ne pohranjuje jer su analiti koji se određuju u kompletnoj krvnoj slici zapravo stanični elementi koji se s vremenom mijenjaju i degradiraju što utječe na morfološki izgled stanica kao i na njihov ukupan broj i koncentraciju. Ukoliko je morfološki pregled uključen u analize koje je potrebno provesti, postojat će odstupanja između dobivenih vrijednosti i stvarnog stanja. Koncentracija leukocita, eritrocita i hemoglobina je uglavnom stabilna i nepromjenjiva tijekom dužeg perioda (>72 h), dok koncentracija eozinofila i limfocita ima tendenciju pada tijekom vremena (9). Koncentracija monocita, MCV i hematokrit se uglavnom povećavaju tijekom vremena (9).

## 1.2. NEURON SPECIFIČNA ENOLAZA

Neuron specifična enolaza (također poznata kao NSE, enolaza 2 ili gama enolaza) je citoplazmatski enzim uključen u glikolitički put (10). Osim enolaze 2, u toj porodici postoje enolaza 1 i enolaza 3. Serumska razina enolaze 2 kod zdravih osoba je niska, ali ukoliko dođe do neke neuronalne ozljede, otpušta se iz oštećenih stanica u cerebrospinalnu tekućinu ili cirkulaciju gdje joj se povećava koncentracija (10).

Molekularna masa NSE je oko 87 kDa (11). Sastoji se od 434 aminokiseline i dijeli 83% građe sa humanom enolazom 1 i 3 i 99% građe sa svojim mišjim homologom (10). Postoji u obliku nekoliko tkivno specifičnih izoenzima, kao homo ili heterodimer sastavljen od triju različitih monomernih oblika (α, β i γ) (12). Postoji 5 mogućih kombinacija od kojih svaku sintetiziraju različite stanice:

- γγ podjedinice proizvode neuroni i neuroendokrine stanice, primjerice u tankom crijevu, plućima i endokrinim organima kao što su pankreas, hipofiza i štitnjača,
- αα - enolazu proizvode glija stanice i brojne druge neneurološke stanice koje su rasprostranjene po cijelom tijelu,
- ββ- enolazu proizvode mišićne stanice,
- αβ- srce i
- αγ - neuroni i neuroendokrine stanice (12).

Izoenzimi αγ i γγ su prisutni u neuronima i neuroendokrinim stanicama pa se stoga za njih koristi termin neuron specifična enolaza. Osim što je prisutna u neuronima, NSE ima visoku stabilnost u biološkim tekućinama. Kao slobodni topivi protein, može lako difundirati u izvanstanične medije i cerebrospinalnu tekućinu prilikom ozljede membrane neurona. Zahvaljujući tome, mjerenje NSE u cerebrospinalnoj tekućini može biti biljeg za procjenu neuronalnog oštećenja. Osim u neuronima i neuroendokrinim stanicama, NSE također može biti prisutna i u plazma stanicama, eritrocitima i trombocitima (10).

### 1.2.1. Biomarker NSE

Mjerenje koncentracije enolaze 2 se koristi kao biomarker za neke tumore, a u posljednje vrijeme sve češće i kao pokazatelj kod nekih neurodegenerativnih bolesti.

Koncentracija NSE je povećana kod bolesnika s tumorima koji imaju neuroendokrino podrijetlo poput karcinoma pluća malih stanica (SCLC), neuroblastoma, feokromocitoma, karcionoida, medularnog karcinoma štitnjače, melanoma i endokrinih tumora gušterače (1).

U najvećem postotku (70-80%) povećana se koncentracija NSE mjeri kod bolesnika sa SCLC-om te samo u 17% bolesnika s karcinomom pluća druge histološke građe (1). Određivanje NSE-a se iz tog razloga preporučuje pri diferencijalnoj dijagnozi između SCLC-a i ostalih histoloških tipova karcinoma (1).

Mjerenje NSE u cerebrospinalnoj tekućini može poslužiti u diferencijalnoj dijagnostici različitih neurodestruktivnih i neurodegenerativnih poremećaja. Česta je primjena u diferencijalnoj dijagnostici demencija, kao što je Creutzfeld-Jacob bolest, a postoji i

velik broj dokaza da se povišena razina NSE u serumu može povezati sa lošijim ishodima bolesnika u komi (1).

Mjerenje razine NSE u serumu ima najvažniju ulogu u praćenju pacijenata sa bilo kojom vrstom tumora za koju je dokazano da luči NSE.

Ukoliko se primijeni odgovarajuća terapija, serumske koncentracije bi se trebale smanjiti u prosjeku kroz 24 sata (13). Postojane povišene razine NSE, u odsutnosti drugih mogućih uzročnika, ukazuju na perzistentni tumor (13). Rastuće razine upućuju na širenje tumora, dok pad na normalne razine NSE u krvi upućuju na oporavak (14).

### 1.2.2. Pohrana uzoraka za određivanje NSE

Budući da je neuron specifična enolaza nestabilan analit, a njena stabilnost na različitim temperaturama i u različitim uvjetima pohrane još uvijek nije dovoljno ispitana, u praksi se određuje odmah nakon vađenja i obrade uzorka uz odvajanje seruma ili plazme.

Ukoliko određivanje NSE nije moguće odmah odvajanjem seruma ili plazme nakon vađenja, potrebno je uzorak seruma ili plazme pohraniti u odgovarajućim uvjetima. Moguća je pohrana uzoraka u zamrzivače na temperaturi -20 ˚C i -80 ˚C.

# 2. CILJEVI

1. ispitati stabilnost NSE u serumu pri pohrani uzorka seruma na -20 ˚C
2. ispitati stabilnost NSE u serumu pri pohrani uzorka seruma na -80 ˚C
3. ispitati koja je temperatura prikladnija za pohranu s obzirom na stabilnost

# 3. MATERIJALI I METODE

## 3.1. Ispitanici

U istraživanju je korišteno 10 uzoraka seruma pacijenata sa zahtjevom za određivanje NSE zaprimljenih u Zavodu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Split. Uzorci seruma dobiveni su obradom pune krvi pohranjene u sterilne epruvete sa crvenim ili narančastim čepom. Epruvete sa uzorkom su centrifugirane tijekom 10 minuta na 3000 okretaja/min nakon dovršenog koagulacijskog procesa. Svaki odabrani uzorak seruma je razdijeljen u 3 porcije pri čemu je u jednoj porciji koncentracija NSE određivana odmah, dok su preostale dvije porcije predviđene za pohranu.

## 3.2. Pohrana uzoraka

Uzorci pacijenata su paralelno pohranjeni na dvije različite temperature tijekom mjesec dana.

0,5 µL uzorka svakog pacijenta je pohranjeno u Eppendorf epruvete i stavljeno na -20 ˚C, dok je drugih 0,5 µL uzorka pohranjeno u cryo.s, PP, volumena 2 mL, sterilni spremnik proizvođača Greiner bio-one na temperaturu -80 ˚C.

Nakon mjesec dana, uzorci su izvađeni i odleđeni na sobnoj temperaturi. Potom su promiješani kako bi se smjesa homogenizirala i reanalizirani na Roche Cobas e601 aparatu.

## 3.3. Određivanje NSE metodom ECLIA

Koncentracija NSE-a je određivana u serumu metodom ECLIA na analizatoru Roche Cobas e601. ECLIA test je imunokemijski test koji se zasniva na sendvič metodi s dva monoklonalna protutijela i služi za kvantitativno određivanje neuron specifične enolaze (NSE) u humanom serumu (11).

Elektrokemiluminiscentni „ECLIA“ test je namijenjen za rad na Elecsys i Cobas analizatorima (11).

Metoda se sastoji od dvije inkubacije koje zajedno traju 18 minuta. U prvoj inkubciji 20 µl uzorka, monoklonsko antitijelo na NSE vezano biotinom i drugo monoklonsko antitijelo specifično za NSE obilježeno rutenij kompleksom, stvaraju sendvič kompleks (11).

U drugoj inkubaciji se, nakon dodavanja mikročestica obilježenih streptavidinom, vežu biotin i streptavidin zbog čega se stvara i fiksira kompleks na čvrstoj fazi (11).

Nakon dvije inkubacije reakcijska smjesa se aspirira u mjernu stanicu gdje se mikročestice magnetski vežu za površinu elektrode, a nevezane čestice se ispiru pomoću otopine ProCell/ ProCell M.

Povećanje napona na elektrodi uzrokuje prijenos elektrona te kemiluminiscentnu emisiju rutenijevog kompleksa čiji se signal mjeri fotomultiplikacijski. Količina svjetla stvorenog u kemiluminiscentnoj reakciji je proporcionalna količini antigena u uzorku. Rezultati se određuju pomoću kalibracijske krivulje koja je pohranjena u računalu analizatora (11).

Mjerni instrument: ELECSYS 2010

Reagensi: Koriste se originalni reagensi proizvođača. Reagensi su stabilni neotvoreni, do datuma isteka ako se čuvaju na temperaturi od 2 do 8 ˚C.

Kalibracija: Kalibracija u 2 točke s Roche specifičnim kalibratorom.

Program: Kalibracijske postavke, uvjeti mjerenja i preračunavanje rezultata određeni su programom analizatora i nalaze se na hard disku instrumenta i na radnoj disketi.

Validacija: Mjerni raspon je 0.05 – 370 ng/mL. Ako vrijednosti prelaze gornju granicu mjernog raspona, uzorak se razrjeđuje s originalnim diluentom proizvođača.

Analitička kontrola: Originalni Roche kontrolni serumi (normalni i patološki).

Referentni raspon: 0 – 16,3 ng / mL (11).

## 3.4. Statistika

Statistička analiza je provedena pomoću programske podrške MedCalc 10. 1. 2. 0. (MedCalc, Mariakerke, Belgium).

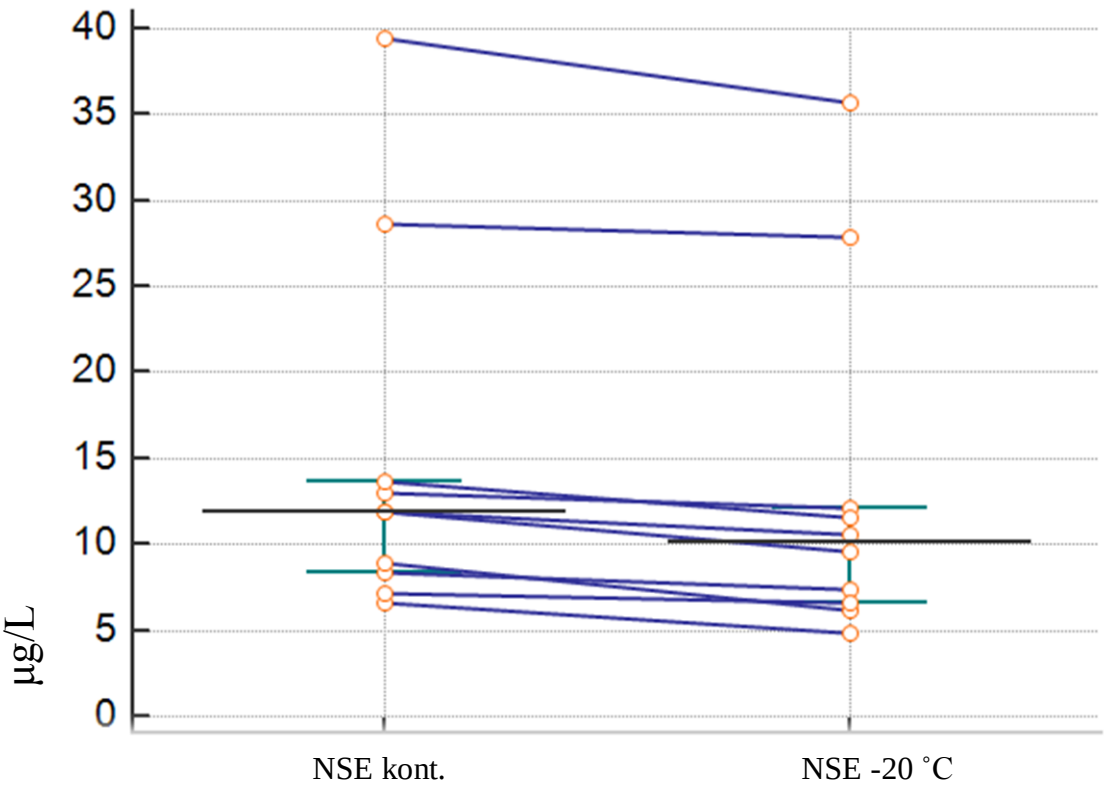
Normalnost distribucije je ispitana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Rezultat testa je pokazao da se ne radi o normalnoj distribuciji, stoga su podaci prikazani medianom i interkvartilnim rasponom.

Usporedba rezultata dobivenih iz uzoraka pohranjenih na temperaturama - 20 ˚C i - 80 ˚C sa rezultatima kontrolnih uzoraka provedena je Wilcoxonovim testom. Kao kontrolni uzorci su korišteni uzorci čija je koncentracija neuron specifične enolaze određena odmah nakon uzorkovanja.

# 4. REZULTATI

U ovom istraživanju je procijenjen utjecaj temperature na stabilnost NSE usporedbom rezultata izmjerenih koncentracija NSE kontrolne skupine uzoraka i koncentracija NSE skupina uzoraka koji su bile pohranjeni na temperaturama -20 ˚C i -80 ˚C.

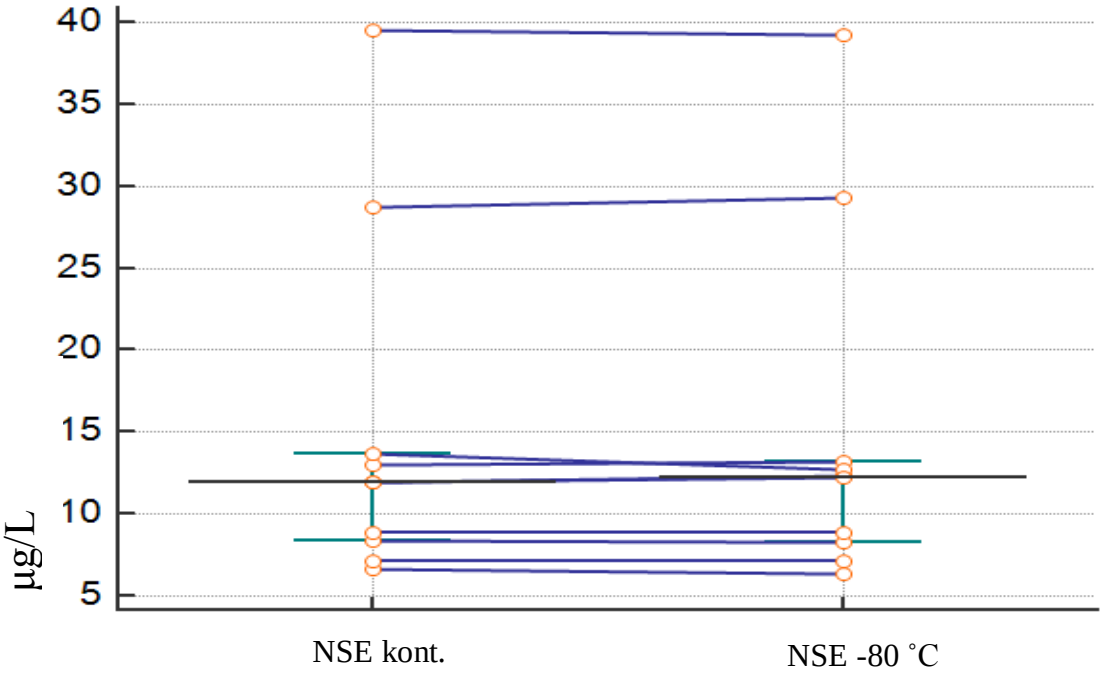
Median kontrolne skupine uzoraka iznosi 11,9, a interkvartilni raspon izmjerenih vrijednosti je od 8,40 do 13,7, median skupine uzoraka koja je bila pohranjena na -20 ˚C iznosi 10,12, a interkvartilni raspon od 6,65 do 12,13, dok je median skupine uzoraka koji su bili pohranjeni na -80 ˚C 12,45, a interkvartilni raspon od 8,30 do 13,29. Usporedba koncentracija kontrolne skupine i koncentracija skupine uzoraka pohranjenih na -20 ˚C provedena Wilcoxonovim testom pokazuje statistički značajnu razliku između skupina ( p=0,002 ). Koncentracije NSE uzoraka koji su bili zaleđeni na -20 ˚C su niže u odnosu na koncentracije NSE kontrolne skupine (Graf 1).




Graf 1. Usporedba koncentracija NSE kontrolne skupine i koncentracije NSE -20 ˚C Wilcoxonov test; p= 0,002

x- kontrolni uzorci (lijevo) i uzorci pohranjeni na temperaturi -20 ˚C (desno); y - koncentracije NSE

Razultati usporedbe Wilcoxonovim testom između koncentracija NSE uzoraka koji su bili pohranjeni na temperaturi -80 ˚C i kontrolnih uzoraka (Graf 2) pokazuju da nema statistički značajne razlike između koncentracija NSE kontrolne skupine i koncentracija NSE skupine uzoraka pohranjenih na -80 ˚C (p=1,000).




Graf 2. Usporedba koncentracija NSE kontrolne skupine i koncentracija NSE -80 ˚C (Wilcoxonov test; p = 1,000)

x- kontrolni uzorci (lijevo) i uzorci pohranjeni na temperaturi -80 ˚C (desno); y - koncentracije NSE

# 5. RASPRAVA

Pohrana uzoraka je važan dio predanalitičke faze i kao takva ima velik utjecaj na rezultate laboratorijskih mjerenja. Budući da brojne spontane reakcije i enzimski procesi mogu degradirati ili transformirati analit koji mjerimo, ukoliko nije pohranjen na pravilan način, potrebno je za svaki odrediti optimalne uvjete pohrane.

U ovom istraživanju se nastojalo odrediti koji su najbolji uvjeti pohrane uzoraka za određivanje koncentracije neuron specifične enolaze koja je inače nestabilna. Ispitano je kako na vrijednosti mjerene koncentracije NSE utječe zaleđivanje na -20 ˚C, a kako zaleđivanje na -80 ˚C.

Rezultati koji su dobiveni nakon pohrane su uspoređeni s kontrolnim rezultatima, odnosno rezultatima koji su dobiveni analiziranjem neposredno nakon uzorkovanja.

Dobiveni rezultati su pokazali da postoji značajna razlika između kontrolnih uzoraka i uzoraka koji su bili pohranjeni na temperaturi -20 ˚C ($p=0,002$). Svi uzorci pohranjeni na -20 ˚C su pokazivali niže izmjerene koncentracije NSE u odnosu na kontrolne uzorke.

Usporedba kontrolnih uzoraka i uzoraka koji su bili zaleđeni na -80 ˚C nije pokazala statistički značajnu razliku u mjerenju koncentracije NSE ($p=1,000$). Izostanak značajne promjene mjerenih koncentracija NSE nakon pohrane na temperaturi -80 ˚C ukazuje na stabilnost mjerenog analita pri odabranoj temperaturi pohrane što nije slučaj za pohranu na temperaturi -20 ˚C.

Prema tome, rezultati ovog istraživanja upućuju na to da je pohrana uzoraka za određivanje koncentracije NSE na temperaturi -80 ˚C prikladnija od pohrane uzoraka na -20 ˚C budući da je pri temperaturi -80 ˚C stabilnost NSE očuvana.

Prema dobivenim rezultatima bi se pohrana uzoraka na -80 ˚C mogla preporučiti ukoliko nije moguće mjeriti NSE nakon uzorkovanja i obrade krvi uz odvajanje seruma ili plazme.

Za donošenje konačne odluke o stabilnosti NSE u različitim uvjetima pohrane trebalo bi napraviti dodatno istraživanje na većem broju uzoraka seruma ili plazme budući da je ovo istraživanje provedeno na malom broju uzoraka.

# 6. ZAKLJUČCI

1. koncentracija NSE u uzorcima koji su bili pohranjeni na -20 ˚C su snižene u odnosu na koncentraciju NSE kontrolnih uzoraka
2. koncentracija NSE u uzorcima koji su bili pohranjeni na -80 ˚C se ne razlikuju od koncentracija izmjerenih u kontrolnim uzorcima
3. uzorci za mjerenje koncentracije NSE bi se trebali pohranjivati na -80 ˚C prema rezultatima ovog ispitivanja

# 7. LITERATURA


1. Čepelak I, Božidar Štraus B. U: Čvorišćec D, Čepelak I, ur. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.
2. Jasna Leniček Krleža; Laboratorijska medicina: predanalitička pogreška, interferencije i interpretacija laboratorijskih nalaza; Klinika za dječje bolesti Zagreb
3. Honović Lorena, stručni rad, Zašto nam je važna i kako provoditi kvalitetnu prijeanalitičku fazu laboratorijske dijagnostike
   Preuzeto s:
   file:///C:/Users/hp/Downloads/Zasto_nam_je_vazna_i_kako_provoditi_kvalitetnu_prijeanaliticku_fazu_laboratorijske_dijagnostike%20(3).pdf
4. Synlab; Predanalitika; Izvadci iz akademske dokumentacije
5. Yin P, Lehmann R, Xu G. Effects of pre-analytical processes on blood samples used in metabolomics studies. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2015;407(Supl 17):4879-92
6. Šimundić AM. Hemoliza. U: Šimundić A, ur. Predanalitička faza laboratorijskog rada. Zagreb: Medicinska naklada; 2012. str. 45-50
7. Jimmie B. Vaught and Marianne K. Henderson; Storage of biological samples; Chapter 1. Common laboratory tools and equipment used in biochemistry and molecular biology
   Preuzeto s:
   http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/IntroductionToPracticalBiochemistry/ch01s11.html
8. Ruth Lock, Laboratory Manager, University of Copenhagen Hospital, at Glostrup, Kenneth Francke M. Sc, Radiometer Medical ApS and Brian Notzli M. Sc, Radiometer
   Medical ApS; 2004. Radiometer Medical ApS, Denmark
   Preuzeto s:
   http://www.newtechnologyba.com/media/uzorci_iz_pune_krvi.pdf
9. G. Zini, International Council for Standardization in Haematology (ICSH); Stability of complete blood count parameters with storage: toward defined specifications for different diagnosis aplications

Preuzeto
http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijlh.12181/full

10. Quantikine ELISA; Human Enolase 2/ Neuron-specific Enolase Immunoassay; Catalog Number DENL20; R&D Systems Europe, Ltd.
11. NSE Cobas User manual; 2014.
12. Burghuber OC, Worofka B, Schernthaner G, et al: Serum neuron-specific enolase is a useful tumor marker for small cell lung cancer
13. Test catalog; Mayo Clinic, Mayo medical laboratories, Test ID: NSE
    Preuzeto s:
    http://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/80913
14. Riley RD, Heney D, Jones DR, et al: A systematic review of molecular and biological tumor markers in neuroblastoma. Clin Cancer Res 2004.

# 8. SAŽETAK

**UVOD:**

Svaki analit koji se određuje ima određenu stabilnost i definirani način pohrane do izrade same analize. Kako bi koncentracija analita dulji period ostala nepromijenjena, potrebno je voditi računa o optimalnim uvjetima pohrane. Ovo istraživanje ispituje mogućnost pohrane uzoraka za određivanje koncentracije neuron specifične enolaze koja je nestabilan analit. Općenito neuron specifična enolaza je priznati biomarker za procjenu neurološkog ishoda kod različitih neuroloških bolesti. Ima važnu ulogu kod praćenja bolesnika s malignim bolestima.

**MATERIJALI I METODE:**

Za istraživanje je korišteno 10 uzoraka koji su zaprimljeni u Zavodu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Split za određivanje koncentracije NSE. Uzorci seruma su dobiveni centrifugiranjem nakon koagulacijskog procesa. Svaki uzorak je razdijeljen u 3 porcije, pri čemu je jednoj odmah ECLIA metodom određena razina NSE, a ostale dvije porcije su pohranjene. Uzorak kojemu je odmah određena vrijednost je kontrolni uzorak . Drugi uzorak je bio pohranjen na temperaturi od -20 ˚C, a treći na -80 ˚C. Pohrana je trajala mjesec dana, a potom je uslijedila reanaliza. Nakon reanaliziranja je napravljena usporedba između rezultata kontrolnih uzoraka i rezultata pohranjenih uzoraka.

**CILJ:**

Cilj istraživanja je bio otkriti kakav utjecaj imaju različiti temperaturni uvjeti pohrane uzoraka na mjerene koncentracije NSE u krvi odnosno procijeniti stabilnost NSE na različitim temperaturama.

**REZULTATI:**

Koncentracija NSE u uzorcima koji su bili pohranjeni na -20 ˚C je pokazala značajnu razliku u odnosu na kontrolne uzorke, dok koncentracija NSE u uzorcima pohranjenim na -80 ˚C nije pokazala značajnu razliku.

**ZAKLJUČAK:**

Pohrana uzoraka seruma za mjerenje koncentracije NSE nije preporučljiva zaleđivanjem na - 20˚C jer su mogući lažno sniženi rezultati, ali je preporučljiva pohrana zaleđivanjem na -80 ˚C.

**KLJUČNE RIJEČI:**

Biomarkeri, pohrana, neuron specifična enolaza, NSE, ECLIA.

# 9. ABSTRACT

**INTRODUCTION:**

Each analyte has its own stability and storage conditions if analysis could not be done immediately. It's important to take care of optimal storage conditions in order to keep constant concetration of the analyte for longer period. This research describes storage possibilities of samples that are used for determination of neuron specific enolase which is considered as unstable analyte. Neuron specific enolase (NSE) is a recognized biomarker for assesment of neurological outcome in different neurological diseases. It has important role in many tumors.

**METHODS:**

Ten blood samples for NSE testing were chosen for this research. Samples were centrifuged after the coagulation process. Every sample was divided into three portions. NSE is determined from one portion with ECLIA method and the other two portions were stored. The sample which was analysed for NSE concentration first after the blood sampling was control sample. The other sample was put on the temperature -20 ˚C and the third was frozen on temperature -80 ˚C. Samples were stored for a month in the laboratory, and then reanalysed. After that, a comparison was made between results of control samples and of those that were stored with Wilcoxon's statistical test.

**OBJECTIVES:**

The aim of this study was to investigate the effect of different storage condition on NSE stability in serum as well as to find out which storage condition could be recommended for NSE analysis in serum.

**RESULTS:**

Concetration of NSE in samples that were stored on temperature -20 ˚C showed significantly different results from the control samples, while the NSE concentrations of the samples that were stored on temperature -80˚C did not show the difference.

**CONCLUSION:**

The temperature -80 ˚C is recommended for storage of serum samples for NSE assaying because that storage option shows lower variability in test results than storage on -20 ˚C.

**KEYWORDS:**

Biomarkers, storage, neuron specific enolase, NSE, ECLIA.

# 10. ŽIVOTOPIS

## OSOBNI PODACI

| | |
|---|---|
| Ime i prezime | Valentina Mišković |
| Adresa | Stara Bila, Vitez 72250 |
| Država | Bosna i Hercegovina |
| Kontakt | 0919423636 |
| E-mail adresa | valentina.miskovic@hotmail.com |
| Mjesto i datum rođenja | Nova Bila, 12. 03. 1996. |

## OBRAZOVANJE

| | |
|---|---|
| Vrijeme (od - do) | 2010. – 2014. |
| Institucija | Katolički školski centar „Petar Barbarić“ Travnik<br>Školska 1, Travnik 72 270, BiH |

| | |
|---|---|
| Vrijeme (od – do) | 2014. – 2017. |
| Institucija | Sveučilišni odjel zdravstvenih studija<br>Preddiplomski sveučilišni studij<br>Medicinsko laboratorijska dijagnostika<br>Ruđera Boškovića 35, 21 000 Split |

## RADNO ISKUSTVO

| | |
|---|---|
| Vrijeme (od – do) | 01. svibnja – 01. lipnja 2016. |
| Poslodavac | ACI Marina Split, Big Blue; Uvala Baluni 8. 21 000 Split |
| Radno mjesto | Prodavač karata za prijevoz brodom |

| | |
|---|---|
| Vrijeme (od – do) | 01. srpnja – 01. rujna 2016. |
| Poslodavac | OTUU „Obzor“; Rastića 1, Čiovo, 32 223 Okrug Gornji |
| Radno mjesto | Ugostitelj |

| | |
|---|---|
| Volonterski rad (od – do) | 14. – 16. Veljače 2015. „Ditetu o jubavi“; City Center One, 21 000 Split<br>13. – 15. Lipnja 2017. Konferencija IAFMHS; 21 000 Split |

**DODATNA ZNANJA**

| | |
|---|---|
| STRANI JEZICI | Engleski jezik (aktivno)<br>Njemački jezik (pasivno) |
| RAČUNALNE VJEŠTINE | Rad u Microsoft office paketu (Word, Excel, Power Point), služenje internetom |
| OSTALE SPOSOBNOSTI | Odgovornost<br>Spremnost za rad u timu<br>Samopouzdanje u prilagodbi novim sredinama |