

Beschouwingen

Enzymologie en temperatuur: een Siamese tweeling

C. van der HEIDEN¹, J. BOOTSMA², E.M. SMIT³, R. OOSTEROM⁴, F.P.A.M.N. PETERS⁵, J.H.M. SOUVERIJN⁶, L.W.J.J.M. WESTERHUIS⁷

Het meten van enzymactiviteiten in serum bij een bepaalde temperatuur, waaraan op historische gronden de voorkeur wordt gegeven, wordt besproken. Het verschil tussen de referentiemethoden en de methoden, die in de dagelijkse praktijk worden toegepast, zal in dit verband de aandacht krijgen. De voor- en nadelen in de dagelijkse praktijk van de uitvoering van de analyse bij 37 °C zullen ter discussie worden gesteld.

Trefwoorden: temperatuur, katalytische activiteit, activiteitsconcentratie

Recente ontwikkelingen

In de procedure voor het meten van enzymactiviteiten speelt de temperatuur een essentiële rol. Nadat het lange tijd stil is geweest in de discussie over de keuze van de temperatuur is de dialoog over 30 °C danwel 37 °C tussen klinisch chemici recentelijk weer gestart sinds de publikaties van de Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie (DGKC). In 1992 en 1993 heeft de DGKC nieuwe aanbevelingen gepubliceerd voor het meten van de katalytische activiteitsconcentratie van creatinekinase (CK), aspartaataminotransferase (ASAT), alanine-aminotransferase (ALAT), γ -glutamyltransferase (γ -GT), lactaatdehydrogenase (LD) en alkalische fosfatase (AF) bij 37 °C (1,2,3). In de aanbevelingen voor het meten van de katalytische activiteitsconcentratie van CK, ASAT, ALAT en γ -GT zijn de reagentiasamenstelling in het incubatiemedium en de meetcondities niet essentieel verschillend van die gepubliceerd door de enzymcommissie van de NVKC in 1988 (4). Alleen de monsterfractie is verkleind. Grote verschillen zijn wel aanwezig in de reagentiasamenstelling van het incubatiemedium voor het meten van AF activiteit. Wat betreft de LD activiteit zijn zowel de optimale condities voor het meten bij 30 °C als bij 37 °C opgenomen (5,6). Naar aanleiding van de nieuwe aanbevelingen opgesteld

door collega's in Duitsland is het zinvol terug te blikken naar de achtergronden van de aanbeveling van de temperatuur van 30 °C in 1977 (7) en de voor- en nadelen na te gaan van het gebruik van een andere dan de thans aanbevolen temperatuur. Het artikel over dit onderwerp geschreven door prof. dr. H.U. Bergmeyer, een expert op het gebied van de enzymologie, is de moeite van het (her)lezen waard (8).

Historische achtergronden

In 1975, 1979 en 1980 werden door het destijds functionerende Expert Panel on Enzymes (EPE) publikaties (9,10) uitgebracht waarin alle condities nauwkeurig werden beschreven waaraan metingen van enzymactiviteiten zouden moeten voldoen. In deze "General considerations..." werd voor alle details van de enzymanalyse nagegaan of deze gecontroleerd konden worden op juistheid, betrouwbaarheid en herleidbaarheid.

Voor de samenstelling van het incubatiemedium werd aangegeven op welke wijze de diverse componenten geanalyseerd en gecontroleerd zouden kunnen worden. Daarnaast werden de fysische parameters beschreven zoals de nauwkeurigheid van de lichtweglengte, het vaststellen van de optimale golflengte, etc. Aan de temperatuur werd veel aandacht geschonken. Er werd een temperatuur gekozen die gerelateerd zou kunnen worden aan een goed gedefiniëerde fysische eigenschap van een stof zoals b.v. een smeltpunt. Door deze benadering werd ook de temperatuur herleidbaar en controleerbaar. Gekozen werd voor het smeltpunt van Gallium (smp: 29,711 ± 0,002 °C). Deze temperatuur die zeer dicht ligt bij de 30 °C werd door het EPE aanbevolen als referentietemperatuur. Exacte definiëring van dergelijke parameters is een absolute voorwaarde om te komen tot een referentiemethode. De temperatuur van 30 °C was niet bepaald een temperatuur waarmee in de dagelijkse praktijk goed te werken viel. Wanneer de IFCC zou wensen dat deze temperatuur mondiaal voor enzymmetingen gebruikt zou worden dan zou dit grote problemen op kunnen roepen gezien grote klimaatverschillen die er bestaan tussen de diverse landen. Niet alle laboratoria zijn uitgerust met apparatuur voor klimaatbeheersing. Terecht was dit geen argument voor de IFCC om af te zien van een goed gedefiniëerde en controleerbare temperatuur van 30 °C.

Immers de methode zoals beschreven door het EPE van de IFCC betrof een referentiemethode, en geen

BCO Centrum voor Onderzoek¹, Breda; "Refaja" Ziekenhuis, Stadskanaal²; Zuiderzeeziekenhuis Lelystad³; Ikazia Ziekenhuis, Rotterdam⁴; Sint Anna Ziekenhuis, Oss⁵; Academisch Ziekenhuis Leiden⁶; De Wever-Gregorius Ziekenhuis, Heerlen/Brunsum⁷

Correspondentie: Dr. C. van der Heiden, BCO Centrum voor Onderzoek, Bergschot 69-71, 4817 PA Breda.
Ingekomen: 25.10.94

methode die onder alle omstandigheden in de dagelijkse praktijk gerealiseerd zou moeten worden. In de enzymologie, speciaal voor die enzymen die dagelijks in serum worden gemeten, is het voorhanden hebben van een referentiemethode een absolute noodzaak. In diverse landen was het streven erop gericht om nationale aanbevelingen te ontwerpen die een zo exact mogelijke weergave moesten zijn van de IFCC referentiemethode.

Keuze van de meettemperatuur in Nederland en omliggende landen

Het zo nauw mogelijk aansluiten van nationale meetmethoden bij de referentiemethode is de reden geweest dat ook in Nederland bij het publiceren van aanbevelingen in 1978 en 1979 de temperatuur van 30 °C werd geïntroduceerd (11,12). Een temperatuur van 30 °C is gezien de klimatologische omstandigheden in Nederland goed te handhaven in de klinisch chemische laboratoria. Ook in andere landen zoals Duitsland, Frankrijk, België, Spanje, Italië, Zwitserland was in principe de intentie aanwezig om enzymactiviteiten te gaan meten bij een temperatuur van 30 °C. Dit kwam regelmatig aan de orde in vergaderingen van standaardisatiecommissies in Europees of in internationaal verband. Het is bekend dat in Zwitserland door hoofden van klinisch-chemische laboratoria met een zeer krappe meerderheid tenslotte werd gekozen voor een temperatuur van 37 °C. Of andere Europese landen een definitieve keuze gemaakt hebben is niet in officiële publikaties vastgelegd.

Stimulerende en remmende factoren

De drang tot harmonisatie van methoden, inclusief de temperatuur, met als sterk positief resultaat onderling vergelijkbare enzymactiviteiten is de stuwende kracht geweest achter het doen van aanbevelingen. Deze harmonisatiedrang is vervolgens bevorderd door de industrie die apparatuur en reagentiakit leverde om bij 30 °C te kunnen meten. Zodra de IFCC haar goedkeuring had gehecht aan de EPE aanbevelingen kwamen al snel de eerste kits op de markt met de aanduiding volgens de "IFCC methode". De 30 °C methode werd hiermede geïntroduceerd in de dagelijkse praktijk. Het aanwezige instrumentarium in de laboratoria heeft daarentegen remmend gewerkt op de introductie van de 30 °C, omdat veelal deze temperatuur niet ingesteld kon worden op de gebruikte analyseapparatuur. Ook met de meer geavanceerde analytische apparatuur kon slechts met een vastingestelde temperatuur gemeten worden, meestal de temperatuur van 37 °C. Zonder veel aandacht te besteden aan de concentraties van de reagentia die slechts voor één van beide temperaturen waren gedefinieerd werden commercieel verkrijgbare reagentia pakketten gebruikt voor het meten van enzymen zowel bij 30 °C als bij 37 °C.

Temperatuurconversiefactoren

Een exact gedefinieerde temperatuur had belangrijke consequenties. Het noodzaakte laboratoria om temperatuurconversiefactoren in te voeren voor het omre-

kenen van enzymactiviteiten. Over temperatuurconversiefactoren zijn zeer veel uiteenlopende gegevens gepubliceerd. Een complicerende factor daarbij was dat temperatuurconversiefactoren, bepaald in kwaliteitscontrolesera veelal van dierlijke origine, dikwijls verschilden van die vastgesteld in vers afgenomen patiëntensera.

Hiermee werd een nieuw probleem geïntroduceerd dat tot op heden nog niet is opgelost. Zowel om deze reden als om diverse theoretische redenen betreffende de invloed van de temperatuur op interacties van substraten en enzymen, heeft de enzymcommissie destijds ontraden om activiteiten om te rekenen met behulp van temperatuurconversiefactoren (7).

Desondanks bleef het belangrijkste doel van de harmonisatie van methoden de onderlinge vergelijkbaarheid van enzymactiviteiten gemeten in controlesera en vers afgenomen patiëntensera aanzienlijk te verhogen. Een belangrijke bijdrage daaraan werd geleverd door de SKZL die, via de resultaten vastgesteld in de interne en externe controlemonsters, in staat was deze onderlinge vergelijkbaarheid in kaart te brengen. Het gebruik van monsters van dierlijke oorsprong is daarbij altijd een groot nadeel geweest.

Het verkrijgen van onderling vergelijkbare referentiewaarden was eveneens een belangrijk doel. Realisering daarvan zou betekenen dat, wanneer een patiënt naar een externe locatie verwezen zou worden, de enzymactiviteiten, waar ook bepaald, direct gebruikt zouden kunnen worden bij de verdere behandeling van de patiënt. Hermeten was dan niet nodig, hetgeen ook een financieel-economisch voordeel met zich mee zou brengen.

Bij harmonisatie van methoden kan het verloop van de enzymparameters bij bepaalde ziektebeelden onafhankelijk van externe overplaatsingen van een patiënt, gecontinueerd worden. Het is moeilijk na te gaan of laatst genoemde reden stimulerend gewerkt heeft op de introductie van gestandaardiseerde methoden voor het meten van katalytische activiteitsconcentraties van enzymen. De indruk bestaat dat dit niet het geval is geweest.

Onderzoek naar de mate van standaardisatie van metingen van enzymactiviteiten

Door van der Heiden en medewerkers is in 1979 een enquête gehouden over de omstandigheden waaronder in de diverse ziekenhuizen enzymactiviteiten werden gemeten. De resultaten daarvan zijn gepubliceerd door de enzymcommissie van de NVKC (13). Recentelijk is een dergelijke inventarisatie uitgevoerd door Baadenhuijsen en van Benthem gebaseerd op SKZL resultaten, verkregen van de deelnemende ziekenhuislaboratoria (14). De conclusie van de auteurs is dat de onderlinge vergelijkbaarheid van enzymmetingen nog te wensen overlaat. Dit is aanleiding geweest de temperatuurskeuze opnieuw ter discussie te stellen. De wijze waarop de vragen van de enquête door de SKZL werden gesteld daarvoor de zorgvuldigheid waarmee de vragen beantwoord werden o.a. ten aanzien van het gebruik van temperatuurconversiefactoren zou deze enigszins ongenueanceerde conclusie beïnvloed kunnen hebben.

Reden tot wijziging van de temperatuur

De bovengenoemde inventarisatie blijkt een impuls te hebben gegeven om voortaan enzymactiviteiten te gaan meten bij 37 °C. Hoewel klinisch chemici de vrijheid hebben om deze beslissing zelf te nemen - immers aanbevelingen zijn niet bindend - hebben de nog geldende aanbevelingen velen ervan weerhouden zo'n beslissing te nemen. De wens tot een officieel standpunt in deze aangelegenheid vanuit de NVKC is sterk voelbaar.

Er zijn twee belangrijke redenen om enzymactiviteiten bij 37 °C te willen meten. Enerzijds de grotere snelheid waarmee enzymen in het aangeboden aantal monsters gemeten kunnen worden en anderzijds een grotere onderlinge vergelijkbaarheid van enzymactiviteiten door een betere beheersing van de temperatuur van 37 °C binnen het laboratorium.

Gebrek aan een referentiekader voor de controle op deze temperatuur speelt een ondergeschikte rol. Desondanks zijn beide bovengenoemde argumenten toch valide te noemen. Wanneer de klinisch-chemische parameters inclusief de enzymen gemeten worden bij een temperatuur van 37 °C, zal het gebruik van temperatuurconversiefactoren langzamerhand tot het verleden gaan behoren. Het is de verwachting dat hierdoor de spreiding tussen de enzymactiviteiten, gemeten in controlesera verkregen via rondzendingen door de SKZL, als gevolg van omrekeningen met (niet correcte) temperatuurconversiefactoren sterk zal afnemen. Dit zal de beheersing van de kwaliteit van metingen van enzymactiviteiten zeker ten goede komen.

Nadelen van het meten van enzymactiviteiten bij 37 °C

Vooraf voor systemen waarvan de detectie gebaseerd is op de consumptie van een indicator is een hogere temperatuur een nadeel. De belangrijkste voorbeelden daarvan betreffen de consumptie van NADH bij het meten van de activiteiten van ALAT, ASAT en LD wanneer uitgegaan wordt van het substraat pyruvaat. Bij hoge activiteiten ontstaat er sneller een uitputting van NADH bij 37 °C dan bij 30 °C. Frequenter verdunnen van monsters is daarvan de consequentie. Dergelijke handelingen onderbreken het routineproces, zijn daarom ongewenst en kunnen een bron van fouten zijn. Maar ook bij meetsystemen waarbij extinctietoename gemeten wordt als maat voor de enzymactiviteit kunnen problemen ontstaan. Bij een te grote productie van de te meten indicator kan de lineariteit in de tijd afnemen. Dit is eerder het geval bij fluorescentiedetectie dan bij andere vormen van detectie zoals b.v. UV detectie. Beter bekend is de produktinhibitie, waardoor een zichzelf limiterend systeem gaat ontstaan. Denaturatie van enzymen in afhankelijkheid van de mate van thermolabiliteit zou bij 37 °C sneller optreden dan bij 30 °C. Omdat meetmethoden om dit vast te stellen ontbreken zijn harde bewijzen daarvoor niet geleverd. Processen anders dan de enzymgereguleerde omzettingen verlopen bij 37 °C sneller dan bij 30 °C zoals de spontane oxidatie van -SH groepen. Deze -SH groepen zijn voor sommige enzymen essentieel om activiteit te handhaven.

Toevoegen van mercaptoverbindingen (activatoren) aan het meetmedium kunnen dergelijke oxidaties en daardoor verlies van activiteit voorkomen. Ook een grotere spontane ontleding van substraten bij een hogere temperatuur mag niet uit het oog verloren worden. Te denken valt aan het substraat acetyl- of butyrylthiocholine gebruikt bij het meten van acetyl- of butyrylcholine-esterase.

Veranderen van temperatuur voor enzymmetingen geeft het grootste probleem bij het opnieuw vaststellen van referentiewaarden. Deze waarden zullen bij 37 °C moeten worden gedefinieerd en geïntroduceerd in de kliniek. Het ontbreken van continuïteit bij het monitoren van enzymactiviteiten in lopende studies van ziektebeelden zou grote weerstand hiertegen op kunnen roepen. Om dit in goede banen te kunnen leiden zou het te accepteren zijn gedurende een overgangperiode gebruik te maken van temperatuurconversiefactoren.

Ontwerpen van nieuwe aanbevelingen, gedefinieerd bij 37 °C

Het zal duidelijk zijn dat onderzoek naar de mate waarin bestaande aanbevelingen aangepast zouden moeten worden om deze bruikbaar te maken voor enzymmetingen bij 37 °C de belangrijkste taak zal zijn, die de enzymcommissie het komende jaar zal gaan vervullen. Afstemming daarvan op methoden die reeds in de omringende landen worden gebruikt, zal daarbij van grote importantie zijn omdat dublures in onderzoek hierover vermeden dienen te worden. Hierbij is ervan uitgegaan dat het vervangen van activiteitsmetingen van enzymen in serum door massametingen met behulp van antilichamen voorlopig in de dagelijkse praktijk nog niet aan de orde is.

Literatuur

1. Schmidt E, Gerhardt W, Henkel E, Klauke R, Liese W, Lorentz K, Sonntag O, Stein W, Weidemann G. Proposal of standard methods for the determination of enzyme catalytic concentrations in serum and plasma at 37 °C. *Eur J Clin Chem Biochem*. 1992; 4: 247-256.
2. Klauke R, Schmidt E, Lorentz K. Recommendations for carrying out Standard ECCLS Procedures (1988) for the catalytic concentrations of creatine kinase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and γ -glutamyltransferase at 37 °C. *Eur J Clin Chem Biochem* 1993; 12: 901-909.
3. Lorentz K, Klauke R, Schmidt E. Recommendation for the determination of the catalytic concentration of lactate dehydrogenase at 37 °C. *Eur J Clin Chem Biochem* 1993; 12: 897-899.
4. Heiden C van der, Bootsma J, Cornelissen PJHC, Hafkenscheid JCM, Oosterom R, Smit EM. Aanpassing van de NVKC-aanbevelingen voor het meten van katalytische activiteitsconcentraties van enzymen in serum of plasma. *Tijdschr NVKC* 1987; 12: 231-236.
5. Bais R, Philcox M. Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 8. IFCC method for lactate dehydrogenase. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994; 32: 639-655.
6. Bais R, Philcox M. Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 8. IFCC method for lactate dehydrogenase. *Ann Biol Clin* 1994; 50: 475-492.

7. Heiden C van der, Boerma GJM, Bootsma J, Hafkenscheid JCM, Smit EM, Spijkers JBF. Temperatuurseffecten op enzymactiviteitsmetingen. Mededelingen NVKC 1977; 2: 159-166.
8. Bergmeyer HU. Standardization of the reaction temperature for the determination of enzyme activity. Z Klin Chem Klin Biochem: 1973; 11: 39-45.
9. Bowers Jr GN, Bergmeyer HU, Moss DW. Provisional recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. CCA 1975; 61: F11-F24, J Clin Chem Clin Biochem 1975; 13: 471-478, Clin Chem 1976; 22: 384-391.
10. Bowers Jr, GN, Bergmeyer HU, Horder M, Moss DW. IFCC Methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 1. General considerations concerning the determination of catalytic concentration of an enzyme in blood serum or plasma of man. CCA 1979; 98: 163F-174F; J Clin Chem Clin Biochem 1980; 18: 89-95.
11. Heiden C van der, Boerma GJM, Bootsma J, Hafkenscheid JCM, Smit EM, Spijkers JBF. Aanbevolen methode voor het meten van de activiteit van creatine kinase (CK) in serum. Mededelingen NVKC 1978; 3: 220-226.
12. Heiden C van der, Boerma GJM, Bootsma J, Hafkenscheid JCM, Smit EM, Spijkers JBF. Aanbevolen methoden voor het meten van katalytische activiteitsconcentraties van enzymen in serum. Mededelingen NVKC 1979; 4: 314-320.
13. Heiden van der C, Boerma GJM, Bootsma J, Hafkenscheid JCM, Smit EM, Spijkers JBF. Resultaten van de enquête van standaardisatie van het meten van katalytische activiteitsconcentraties van enzymen in serum. Huidige situatie en toekomstperspectief. Mededelingen NVKC 1979; 4: 302-313.
14. Baadenhuysen H, Benthem van E. Inventarisatie meetomstandigheden enzymactiviteiten in Nederland. Tijdschr NVKC 1993; 18: 260-265.

Summary

Enzymology and temperature: a Siamese twin. Heiden C van der, Bootsma J, Smit EM, Oosterom R, Peters FPAMN, Souverijn JHM, Westerhuis LWJMM. Ned Tijdschr Klin Chem 1995; 20: 203-206.

Historical arguments on a preferred temperature on behalf of the catalytic activity concentration measurements of enzymes in serum are presented. In this respect the difference between reference methods and assays performed in the daily routine practice is emphasized. Pro's and con's of the introduction of the temperature of 37 °C as the temperature of choice to be used in the daily routine practice are discussed.

Key-words: temperature, catalytic activity concentration measurement