

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARINA FRANJO

RAZVOJ METODE MERJENJA KONCENTRACIJE
SINISTRINA ZA DOLOČANJE HITROSTI
GLOMERULNE FILTRACIJE

MAGISTRSKI ŠTUDIJ
LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2016

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



MARINA FRANJO

**RAZVOJ METODE MERJENJA KONCENTRACIJE
SINISTRINA ZA DOLOČANJE HITROSTI GLOMERULNE
FILTRACIJE**

**DEVELOPMENT OF METHOD FOR MEASURING
CONCENTRATION OF SINISTRIN FOR DETERMINATION
GLOMERULAR FILTRATION RATE**

LABORATORY BIOMEDICINE

Ljubljana, 2016

IZJAVA

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo (Katedra za klinično biokemijo) pod mentorstvom prof. dr. Darka Černeta in somentorstvom asist. dr. Irene Prodan Žitnik.

ZAHVALA

Za pomoč, sodelovanje in strokovne nasvete se zahvaljujem mentorju prof. dr. Darku Černetu.

Prav tako bi se želela zahvaliti somentorici asist. dr. Ireni Prodan Žitnik, ki mi je s svojimi izkušnjami in nasveti pomagala pri ustvarjanju magistrskega dela.

Največja zahvala pa gre moji družini, ki me je spodbujala in verjela vame ves čas študija.

VSEBINA

KAZALO PREGLEDNIC	III
KAZALO SLIK	III
KAZALO ENAČB.....	III
POVZETEK.....	IV
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1. UVOD	1
1.1. Pomen določanja glomerulne filtracije	1
1.2. Merjenje glomerulne filtracije	2
1.2.1. Endogeni označevalci merjenja glomerulne filtracije	4
1.3. Eksogeni označevalci.....	7
1.3.1. Radioizotopni označevalci.....	7
1.3.2. Neradioizotopni označevalci	8
2. NAMEN RAZISKAVE	13
3. MATERIALI IN METODE	14
3.1. Priprava bioloških vzorcev	14
3.1.1. Priprava serumskih in urinskih vzorcev.....	14
3.1.2. Priprava standardne raztopine sinistrina	14
3.2. Metoda merjenja koncentracije sinistrina	15
3.3. Uporabljeni reagenti in raztopine	16
3.3.1. Priprava in sestavine hidroliznih reagentov	16
3.3.2. Priprava startnega reagenta	17
3.3.3. Heksokinazni reagent	18
3.4. Uporabljena oprema in drobni material	18
3.5. Princip postopka metode merjenja koncentracije sinistrina	18

3.6 Opis postopka metode merjenja koncentracije sinistrina	19
3.7. Validacija metode	20
3.8. Priporočila in opozorila	21
3.9. Uporabljene statistične metode	21
4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	22
4.1. Razvoj metode določanja koncentracije sinistrina.....	22
4.2. Validacijski parametri razvite metode	22
4.2.1. <i>Linearnost</i>	22
4.2.2. <i>Meji detekcije in kvantifikacije</i>	23
4.2.3. <i>Ponovljivost</i>	25
4.2.4. <i>Točnost</i>	26
4.2.5. <i>Vpliv koncentracije glukoze v vzorcu na izmerjeno koncentracijo sinistrina</i>	27
4.2.5. <i>Stabilnost sinistrina v bioloških vzorcev</i>	28
4.3. Optimizacija metode	29
4.4. Testiranje nestabilnosti standardnih vzorcev	32
5. SKLEP	35
6. LITERATURA	36

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Prednosti in slabosti najpogosteje uporabljenih bioloških označevalcev za določanje hitrosti glomerulne filtracije (6)	3
Preglednica II: Sestavine hidroliznih reagentov	17
Preglednica III: Volumni vzorcev in reagentov	20
Preglednica IV: Meji detekcije in kvantifikacije bioloških vzorcev.....	23
Preglednica V: Medserijska ponovljivost pri serumskih vzorcih	25
Preglednica VI: Medserijska ponovljivost pri urinskih vzorcih	25
Preglednica VII: Točnost merjenja koncentracije sinistrina v serumu	26
Preglednica VIII: Točnost merjenja koncentracije sinistrina v urinu	26
Preglednica IX: Vpliv različnih koncentracij glukoze na določanje koncentracije sinistrina	28
Preglednica X: Stabilnost sinistrina v serumu (1g/L) shranjenem na -80°C	29
Preglednica XI: Stabilnost sinistrina v urinu (1 g/L) shranjenem na -80°C	29
Preglednica XII: Rezultati izmerjenih koncentracij serumskih vzorcev, ki so tekom noči bili shranjeni pod različnimi pogoji	31

KAZALO SLIK

Slika 1: Encimatski postopek določanja koncentracije.....	11
Slika 2: Princip detekcije glukoze s heksokinazno metodo	19
Slika 3: Linearnost metode v koncentracijskem območju sinistrina od 0g/L do 1,6g/L	23
Slika 4: Linearen odnos med koncentracijo sinistrina v standardnih vzorcih in absorbanco	31

KAZALO ENAČB

Enačba 1: Cockroft-Gaultova enačba	6
Enačba 2: enačba MDRD.....	6
Enačba 3: enačba CKD – EPI.....	6

POVZETEK

Hitrost glomerulne filtracije je glavni označevalec za določanje ledvične funkcije. Izgubo ledvične funkcije opazimo pri številnih ledvičnih in neledvičnih boleznih, na primer pri kronični ledvični bolezni, aterosklerozi in sladkorni bolezni. Zelo pomembna je takojšnja prepoznavna bolnikov z namenom čimprejšnjega začetka zdravljenja. Veliko raziskovalcev se ukvarja z iskanjem najprimernejše metode za določitev hitrosti glomerulne funkcije. Na voljo imamo veliko analizičnih metod. Določitev hitrosti glomerulne filtracije temelji na merjenju očistka endogeno ali eksogeno vnesenih označevalcev.

Inulin je najuporabnejši eksogeni označevalec, žal pa je slabo topen v vodi pri sobni temperaturi in zahteva zvišano temperaturo tekom predpriprave in nato hlajenje pred intravensko aplikacijo. Težave lahko nastanejo ker se alergijska reakcija pojavi zaradi neprimerne temperature. V primerjavi z inulinom sta predpriprava in rokovanje s sinistrinom lažja, zaradi boljše topnosti v vodi pri sobni temperaturi.

Naš cilj je bil razviti metodo za določanje koncentracije sinistrina v bioloških vzorcih. Odločili smo se za encimsko metodo s katero bi detektirali in kvantificirali sinistrinske monomerne enote. Razvoj metode je temeljil na predhodnih objavljenih literaturnih virih. Najprej smo zagotovili popolno hidrolizo sinistrina s pomočjo encima inulinaze pri ustreznem času in temperaturi. V nadaljevanju smo fruktozo pretvorili v glukozo s pomočjo encima glukoza-6-fosfat izomeraza. To nam v zadnji stopnji omogoča uporabo heksokinazne metode, s katero določimo koncentracijo glukoze in posredno koncentracijo sinistrina v začetnem vzorcu. Na podlagi rezultatov razvite metode smo ugotovili, da je znotrajserijska ponovljivost metode pri koncentraciji 1,0 g/L pri serumskih vzorcih 2,3 % in urinskih 0,8 %. Medserijska ponovljivost je pri koncentraciji 1,0 g/L pri urinskih vzorcih 7,52 % in serumskih 9,89 %. Linearnost metode smo dosegli v območju od 0 g/L do 1,6 g/L. Točnost metode, izražena kot pridobitek dodatka, je pri koncentraciji 1,40 g/L pri serumskih vzorcih 99,00 % in pri urinskih 79 %. Točnost serumskih vzorcev je pri koncentraciji 1,0 g/L je 104 % in urinskih 114 %. Dokazali smo, da glukoza ne vpliva na določanje koncentracije sinistrina v serumskih vzorcih do koncentracije 20 mmol/L. Biološki in vodni sinistrinski vzorci, shranjeni pri temperaturi -80 °C, so stabilni najmanj 45 dni. Modificirana, validirana in optimizirana metoda je ustrezna za vpeljavo v

vsakdanjo klinično prakso. Razvita metoda nam bi izboljšala diagnostiko in pravočasno odkrivanje ledvičnih bolezni.

Ključne besede: kronična ledvična bolezen, hitrost glomerulne filtracije, označevalci glomerulne filtracije, sinistrin, določanje koncentracije sinistrina

ABSTRACT

Glomerular filtration rate is a main marker of renal function. Loss of renal function is noticeable in various renal and non-renal diseases and is mostly caused by chronic renal disease, diabetes and atherosclerosis. Early identification of the disease is very important for the proper and immediate treatment. There are a growing number of authors, who are searching for the most suitable method capable of glomerular filtration rate determination. For that, there are various analytical methods already in use. Determination of glomerular filtration rate is based on clearance measurement of endogenous or exogenous applicable markers.

Nowadays, inulin clearance is the most applicable exogenous marker. On the other side, inulin is poorly soluble in water and requires elevated temperature during sample pretreatment. Further on, it also needs cooling before intravenous application which can cause allergic reactions. When compared to inulin, pretreatment and handling with sinistrin samples are much easier because sinistrin is water soluble at room temperature. Our goal is to introduce a method to measure and determine sinistrin concentration in biological samples. We have chosen an enzymatic method, which is capable of determination and quantification of sinistrin monomers. Method development was based on previously published articles. The first step was to ensure complete hydrolysis of sinistrin with inulinase. In the following step fructose was isomerized to glucose with phosphoglucose isomerase. The last step was the determination of glucose with hexokinase activity, which indirectly defines the concentration of sinistrin in the initial sample. Results have shown that within-day coefficient of variance (CV) of serum samples was 2,3 % and of urine samples was 0,8 %. Concentration of sinistrin in that case was 1,0 g/L. Between day CV of samples containing 1,0 g/L sinistrin, was 7,52 % in urine samples and 9,89 % in serum samples. Linearity of method was assessed in the range from 0 g/L to 1,6 g/L. Accuracy, which was expressed as recovery, at concentration 1,40 g/L was 99 % in serum and 79 % in urine samples. At concentration 1,0 g/L accuracy was 104 % in serum and 114 % in urine samples. We have proved that there is no relevant impact of glucose in serum samples below the concentration of 20 mmol /L. Biological and water samples are stable over 45 days, when stored at -80°C. The modified, validated and optimized method is ready to be introduced in everyday clinical practice. The developed method would improve diagnostics and timely detection of renal disease.

Keywords: chronic renal disease, glomerular filtration rate, markers of glomerular filtration, sinistrin, determination of sinistrin concentration

SEZNAM OKRAJŠAV

ATP – adenzin trifosfat

FI – fluorescenčno označen inulin

FS – fluorescenčno označen sinistrin

GF – glomerulna filtracija

GPI – glukoza-6-fosfat izomeraza

GFR – hitrost glomerulne filtracije

KLB – kronična ledvična bolezen

KV – koeficient variacije

LOD – angl. *limit of detection*, meja detekcije

LOQ – angl. *limit of quantification*, meja kvantifikacije

NADP – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

SD – standardna deviacija

⁵¹CrEDTA – krom-etilendiamintetraocetna kislina

1. UVOD

Ocena hitrosti glomerulne filtracije je pomemben del obravnave bolnika s katerokoli ledvično boleznijo, in sicer je njena sprememba lahko prvi znak ledvične bolezni. Veliko bolezni je lahko vzrok ali posledica ledvične bolezni npr. sladkorna bolezen, hipertenzija ali jetrne bolezni. Hitrost glomerulne filtracije je odvisna od cirkadialnega ritma, od pretoka krvi skozi ledvice, položaja telesa ter telesne aktivnosti. Nanjo vpliva tudi prehrana, saj se s povečanim vnosom beljakovin glomerulna filtracija poveča tako pri zdravih ljudeh kot pri bolnikih z ledvično okvaro (2).

Referenčne vrednosti hitrosti glomerulne filtracije so različne glede na spol in starost. Merjenje hitrosti glomerulne filtracije velja za najboljšega pokazatelja ledvične funkcije. Metoda temelji na merjenju hitrosti glomerulne filtracije s pomočjo očistka snovi. To je prostornina plazme, ki se v določeni časovni enoti očisti določene snovi z izločanjem v seč, izražen v mL/min/1.73 m² (7). Referenčne vrednosti so za moške okoli 130 ml/min/1.73 m², za ženske okoli 120 ml/min/1.73 m² (26). Hitrost glomerulne filtracije bi lahko natančno določili s pomočjo snovi, ki v telesu nastaja stalno in se izloča iz telesa s filtracijo. Snov se v ledvicah ne sme presnavljati niti sintetizirati, zelo pomembno pa je tudi, da se v ledvičnih tubulih ne izloča in ne reabsorbira. Dejstvo je, da zaenkrat še ni znana snov, ki bi ustrezala vsem naštetim pogojem (3). Nekateri označevalci se tem lastnostim približujejo in jih kljub nekaterim zadržkom lahko uporabljamo za merjenje hitrosti glomerulne filtracije (1).

1.1. Pomen določanja glomerulne filtracije

Značilno znižanje hitrosti glomerulne filtracije, ki se stopnjuje s progresivno ledvično boleznijo, je uporabno pri določanju terapije, spremljanju napredovanja bolezni in učinka nadomestne terapije (3). Glede na stopnjo hitrosti glomerulne filtracije delimo kronično ledvično bolezen (KLB) na pet stopenj, na podlagi katerih se odločimo o terapevtskih in diagnostičnih ukrepih. Potek kronične ledvične bolezni je s pravilnim in pravočasnim zdravljenjem možno ustaviti ali vsaj upočasniti, kar pomeni manj kasnejših zapletov, zdravljenje pa je ob zgodnjem odkritju tudi cenejše. Po drugi strani KLB lahko napreduje do ledvične odpovedi (V. stopnja KLB), vendar bolniki večinoma že prej umrejo zaradi pospešene ateroskleroze in srčno žilnih zapletov, ki so od 10 do 20-krat pogostejši kot pri ljudeh brez KLB (4). Razvita V. stopnja kronične ledvične bolezni s prisotnim uremičnim

sindromom in glomerulno filtracijo $< 15 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ je lahko indikacija za dializo, v končni fazi pa tudi za transplantacijo ledvic (5). Vse naštetu kaže na pomembnost določanja in spremljanja hitrosti glomerulne filtracije, prav tako pa tudi na pomembnost zgodnjega odkrivanja ledvičnih bolezni in uvajanja ustrezne terapije, ki bo močno olajšala bolnikovo zdravljenje in zmanjšala stroške zdravljenja.

1.2. Merjenje glomerulne filtracije

Obstaja več načinov merjenja in spremljanja GFR. Eden od načinov je posredna ocena z meritvijo ledvičnega očistka z ustreznim filtracijskim označevalcem, ki bi se prosto filtriral preko glomerulov in se ne bi reabsorbiral v ledvičnih tubulih (1).

Meritve GFR temeljijo na plazemskem ali urinskem očistku bodisi endogeno ali eksogeno vnesenih bioloških označevalcev. Za zagotovljeno točnost teh meritev morajo biti izpolnjeni naslednji pogoji:

- renalna tubulna sekrecija ali reabsorpcija ne smeta vplivati na izločanje preko ledvic
- vezava plazemskih proteinov na označevalce mora biti zanemarljivo majhna
- ne sme biti prisotna izvenledvična eliminacija vnesenih označevalcev (3)

Na izbiro imamo veliko število označevalcev za določanje GFR. Nekateri od njih, s pripadajočimi prednostmi in pomanjkljivostmi, so ponazorjeni v preglednici I.

Preglednica I: Prednosti in slabosti najpogosteje uporabljenih bioloških označevalcev za določanje GFR (6)

Biološki označevalec hitrosti glomerulne filtracije	Prednosti	Slabosti
Kreatinin	Enostavna meritev	Vpliv renalne sekrecije, bolezni, spol, starost
Cistatin C	Serumska koncentracija dobro korelira in pokaže že manjše spremembe GFR	Potrebna uporaba enačb in korekcijskih faktorjev, včasih težavna interpretacija
Inulin	Najbolj točen in zanesljiv označevalec hitrosti glomerulne filtracije	Slabo topen v vodi pri sobni temperaturi, težavna aplikacija, možne alergijske reakcije
Sinistrin	Dobro topen v vodi pri sobni temperaturi, enostavnejša intravenska aplikacija, netoksičen	Nenatančni podatki o molekulski masi
⁵¹Cr EDTA	Klirens primerljiv s klirensom inulina	Cenovno drag, potencialen vir sevanja

Stalna infuzija ali enkratna bolusna injekcija sta dva načina aplikacije bioloških označevalcev. Pri metodi stalne infuzije pri tešči osebi pospešimo diurezo, in sicer tako da popije 500 ml vode uro pred aplikacijo biološkega označevalca, potem nadaljuje s pitjem 200 ml vode vsake pol ure do konca testiranja. V venski krvi merimo koncentracijo biološkega označevalca po njegovi konstantni intravenski infuziji že vnaprej določenega odmerka (3).

Enkratna bolusna injekcija je nekoliko enostavnejša za izvedbo. Po aplikaciji posameznega odmerka označevalca sledi vzorčenje krvi in spremljanje koncentracije v določenem časovnem intervalu. GFR izračunamo na podlagi znane količine vnesenega označevalca in zmanjševanju serumske koncentracije v odvisnosti od časa. Eliminacijo lahko opišemo z dvoprostorskim neravnotežnim matematičnim modelom, ki predpostavlja, da je

ekstracelularni prostor sestavljen iz centralnega prostora z dobro perfuzijo in perifernega prostora z zmanjšano perfuzijo. Medtem spremljamo kinetiko vnesenega označevalca kot rezultat intravenskega vnosa, transporta med obema prostoroma in odstranjevanja preko ledvic. S pomočjo računalniškega programa lahko izračunamo sistemske parametre, ki opisujejo farmakokinetični model. Sistemski parametri, ki jih spremljamo pri kinetiki vnesenega označevalca, so: količina, koncentracija, prehod sinistrina iz centralnega v periferni prostor ter obratno. Rezultat merjenja sistemskih parametrov je izračunan očistek eksogeno vnesenega biološkega označevalca (1).

1.2.1. Endogeni označevalci merjenja glomerulne filtracije

Očistek in serumska koncentracija kreatinina

Danes se v klinični praksi najpogosteje meri serumska koncentracija kreatinina. Kreatinin se relativno konstantno sprošča iz mišic, cirkardialni ritem niha manj kot 10 %. Kreatinin se prosto filtrira čez glomerule, se ne reabsorbira in ne metabolizira v ledvicah, ampak se delno izloča v proksimalnih tubulih, kar pomeni, da je pri normalnem ledvičnem delovanju očistek kreatinina večji od GFR. Pri ledvičnem popuščanju se kreatinin izloča tudi preko prebavil, zato je očistek kreatinina še večji od GFR (6). Serumska koncentracija kreatinina se ob tem le malo spremeni, zato ni primerna za oceno GFR. Pri napredovanem ledvičnem popuščanju tako najbolje ocenimo stopnjo GFR s kombinacijo očistka kreatinina in sečnine. Razlog je v tem, da očistek kreatinina zaradi sekrecije v proksimalnih tubulih precenjuje GFR, očistek sečnine pa GFR podcenjuje zaradi obsežne pasivne resorpcije v proksimalnih tubulih (6). Določanje kreatinina v serumu sloni na Jaffejevi reakciji, ki se uporablja že od 19. stoletja dalje. Kasneje se je pojavila potreba po uvedbi modifikacij in novih encimskih metod zaradi nizke specifičnosti. Jaffe je metodo predstavil kot reakcijo med pikrinsko kislino in kreatininom, ki v alkalnem okolju daje oranžno obarvan produkt, ki ga merimo z absorpcijsko transmisijsko spektroskopijo. Nespecifičnost metode merjenja kreatinina v serumu izhaja iz dejstva, da so v serumu prisotni nekreatininski kromogeni, kot so: proteini, glukoza, askorbinska kislina, gvanidin, aceton, ki prav tako reagirajo s pikrinsko kislino in ustvarjajo podobno obarvane produkte. Ker zgoraj naštetih snovi ustvarjajo podobno obarvane produkte, onemogočajo natančno merjenje koncentracije

kreatinina v serumu, kar se lahko izkaže kot lažno povečana koncentracija kreatinina. V urinu je manj prisotnih endogenih kromogenov, ki bi lahko motili celoten postopek merjenja (7), hkrati pa je očistek kreatinina boljši pokazatelj GFR kot serumska koncentracija. Ta način zahteva 24-urno zbiranje urina, ki se včasih izkaže kot nezanesljiv in bolnikom težaven postopek. Po drugi strani pa je določanje serumske koncentracije kreatinina z ekonomskega vidika sprejemljiva metoda.

Izračunan očistek kreatinina, ki temelji na serumski koncentraciji, je ustaljena metoda, saj zahteva le en sam odvzem krvnega vzorca. Ker je nastajanje kreatinina odvisno od spola, telesne površine in vnosa beljakovin, so izpeljane številne enačbe za oceno očistka kreatinina. Najbolj uporabljeni za rutinsko določanje GFR sta enačbi Cockcroft-Gault (enačba 1) in MDRD (angl. *Modification of Diet in Renal Disease*) (enačba 2). Pomanjkljivost enačb je nezanesljivost pri nizkih koncentracijah kreatinina (<85 in <60 $\mu\text{mol/L}$). V tem primeru se uporabljajo korekcijski faktorji (8). Cockcroft-Gaultova enačba ni zanesljiva pri bolnikih z obilnimi opeklinami, z jetrnimi boleznimi in pri osebah s prekomerno telesno maso (9). Težave se pojavijo tudi pri višjih vrednostih GFR. Stevens L.A. in sodelavci so ugotovili, da je enačba MDRD bolj točna in zanesljiva pri vrednostih manjših od $60 \text{ ml/min/1,73m}^2$. Razlogi za to so napake pri določanju ocene GFR, vpliv različnih dejavnikov na vrednosti serumskega kreatinina, še posebej tistih, ki jih enačba MDRD ne upošteva (vnos proteinov, masa mišic) (10). Lewey A.S. je s sodelavci ugotovil, da je enačba CKD-EPI (angl. *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*, enačba 3) bolj zanesljiva in točna kot enačba MDRD pri določanju ocene GFR pri višjih vrednostih od $60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ampak z zadržki. Zadržki izvirajo iz omejene natančnosti, enačba ni primerna za starostnike in otroke. Prav tako ni ustrezna za osebe z določenimi boleznimi in stanji, ena izmed teh je sladkorna bolezen, nato pri jemanju zdravil, ki vplivajo na raven serumskega kreatinina. Enačba CKD-EPI je kompleksnejša kot enačba MDRD in zahteva uporabo novih spremenljivk, standardizacijo in računalniško uporabo (11).

Enačba 1: Cockroft-Gaultova enačba

$KLIRENS_{KR} (ml/min) (140 - starost) \times telesna\ teža \times (0.85\ za\ ženske)$

$$72 \times S_{kreatinin} \quad (8)$$

Enačba 2: MDRD

$oGFR (ml/min/1,73m^2) = 175 \times (S_{KR}^* / 88,4)^{-1,154} \times (leta)^{-0,203} \times (0,742\ za\ ženske) \times (1,$

$180\ za\ črno\ raso) \quad (11)$

*serumski kreatinin

oGFR – očistek glomerulne filtracije

Enačba 3: CKD-EPI

$oGFR(ml/min/1,73m^2) = 135 \times \min(S_{KR}^*/\kappa, 1)^\alpha \times \max(S_{KR}/\kappa, 1)^{-0,601} \times \min(S_{cis} / 0,8, 1)^{-0,375}$
 $\times \max(S_{cis}^{**} / 0,8, 1)^{-0,711} \times 0,995^{LETA} [x\ 0,969\ za\ ženske] [x\ 1,08\ za\ črno\ raso] \quad (11)$

*serumski kreatinin, **cistatin v serumu,

κ - 0,7 za ženske, 0,9 za moške

α - -0,248 za ženske, -0,207 za moške

min- minimum S_{CR}/κ ali 1

max- maksimum S_{CR}/κ ali 1

Zelo pomembna in pogosta uporaba Cockroft-Gaultove enačbe za določanje GFR je pri ugotavljanju farmakokinetičnih lastnosti zdravil in pri odmerjanju zdravil pri osebah z okvarjeno funkcijo ledvic (8). Pri posameznikih z določeno okvaro ledvic je zaželeno individualizirano odmerjanje zdravil. Ker je pri osebah z okvarjeno ledvično funkcijo včasih znižana stopnja plazemskega očistka zdravil, moramo spremljati koncentracijo zdravil v krvi in koncentracijo vzdrževati v terapevtskem območju. V nasprotnem primeru

lahko pride do kopičenja zdravilne učinkovine in/ali njenih presnovkov v krvi ter različnih tkivih.

Razen kreatinina se uporablja tudi merjenje cistatina C, ki je bazična nizkoproteinska molekula, spada pa med inhibitorje cisteinskih proteaz (12). V telesu nastaja ves čas v vseh jedrnih celicah. Prosto se filtrira skozi glomerulno membrano in se večinoma katabolizira v proksimalnem tubulu, se ne izloča, niti se ne vrača v krvni obtok. Serumska koncentracija ni odvisna od spola, stanja prehranjenosti (12), akutnih, kroničnih bolezni in verjetno tudi ne od raka (9). Klinična uporabnost merjenja cistatina C je v specifični populaciji veliko uporabnejša (13). LeBricon T. je s sodelavci po transplantaciji ledvic dokazal, da je pri bolnikih večji porast koncentracije cistatina C v krvi občutljivejši in hitrejši kazalec spremembe GFR kot serumska koncentracija kreatinina. Ugotovili so, da je cistatin C občutljivejši kazalec akutnih sprememb v hitrosti glomerulne filtracije (14). V preteklosti se metoda določanja cistatina C ni uporabljala, ker je bila tehnično težavna. Danes uporabljamo imunokemične metode merjenja, ki temeljijo na uporabi trdnih nosilcev in nefelometrični detekciji v reakciji nastalih imunskih kompleksov.

1.3. Eksogeni označevalci

1.3.1. Radioizotopni označevalci

Radiofarmaceutvska označevalca, ki se uporabljata, sta ^{51}Cr – etilendiamintetraocetna kislina (EDTA), $^{99\text{m}}\text{Tc}$ – dietilentriaminpentaocetna kislina (DTPA), ki je po farmakokinetičnih lastnostih najbolj podobna inulinu. Radioizotopni označevalec ^{125}I – iothalamat danes ni uporaben za intravensko aplikacijo, saj lahko povzroči preobčutljivostne reakcije pri ljudeh. Vzrok alergičnih reakcij je jod, ki je sestavina označevalca. Nagnjenost molekule ^{99}Tc -DTPA k disociaciji včasih prinese težave, ker lahko pride do vezave s plazemskimi proteini (15).

Glavna prednost uporabe radiofarmaceutvskih označevalcev je, da odkrivajo motnje ledvične funkcije že v zgodnji fazi (16) oziroma kažejo že na majhne spremembe GFR. To ne velja za merjenje kreatinina, saj se njegova vrednost ne spremeni, dokler GFR ne upade na polovico normalne vrednosti. Druga pomembna prednost določanja GFR z radioizotopi

je dokazovanje glomerulno-tubularnega ravnovesja preko določanja frakcije filtracije. Ta podatek je zelo pomemben pri diferencialni diagnostiki in pri določanju stadija in vrste ledvične bolezni (16).

Radioizotopske metode merjenja so še posebej primerne, ko je zahtevana večja točnost, v primeru ko so prisotne variacije mišične mase (malnutricija, opekline, amputacija). Idealno bi bilo, če bi zlahka merili GFR z eksogenimi označevalci, so pa težave, ki omejujejo uporabo v laboratorijski praksi. Neustrezno praznjenje mehurja lahko vpliva na točnost poteka merjenja GFR. Označevalec ^{99m}Tc – DTPA se lahko poveže s plazemskimi proteini (15). Ascites in edem pri bolnikih lahko otežita potek merjenja, saj lahko pride do težav z vzorčenjem v določenem času. Težava izhaja zaradi povečanega volumna ekstracelularne tekočine, ki ga je treba upoštevati pri izračunu hitrosti glomerulne filtracije. Težava je v nezmožnosti pridobitve pravega stanja koncentracijskega profila vnesenega označevalca ob ustreznem času.

V številnih evropskih državah se kot standardna metoda za merjenje GFR uporablja očistek $^{51}\text{CrEDTA}$. Razpolovni čas $^{51}\text{CrEDTA}$ je en mesec in je primeren za shranjevanje (17). Pomanjkljivosti omenjenega označevalca sta sevanje in višja cena v primerjavi z drugimi označevalci.

1.3.2. Neradioizotopni označevalci

Neradioizotopni označevalci, namenjeni za merjenje GFR, vključujejo inulin, ioheksol in sinistrin. Ioheksol je primeren za merjenje tako plazemskega kot tudi urinskega očistka. Najpogosteje se ga daje v obliki enkratnega bolusnega odmerka. Lahko se ga detektira s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti ali z rentgensko fluorescenco. Sicer je detekcija s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti dražja, je pa hkrati občutljivejša in natančnejša kot rentgenska fluorescenca. Glavna prednost dela s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti je detekcija in kvantifikacija majhnih volumnov vnesenega vzorca oziroma označevalca. Jod je v majhnih količinah stabilen v bioloških tekočinah in ne izzove neželenih učinkov (15).

Inulin je polisaharid, sestavljen iz linearnih 2,1- β -D-fruktofuranozilnih enot (18). Izkazal se je kot zlati standard za merjenje hitrosti glomerulne filtracije, saj se prosto filtrira preko glomerulov in se v ledvičnih tubulih ne reabsorbira. V organizmu se ne sintetizira in ne

razgrajuje, izloča se le preko ledvic in ne vpliva na ledvično funkcijo. Fiziološko in farmakološko je inerten. Obstajajo tudi pomanjkljivosti, in sicer gre za eksogeni označevalec, zaradi česar je postopek časovno zamuden. Predpriprava inulina pred intravensko aplikacijo zahteva določen čas. Ker je slabo topen v vodi pri sobni temperaturi, ga je najprej treba segreti in raztopiti v vodi. Šele ko ga ohladimo do telesne temperature, ga lahko apliciramo preiskovancu. Pomanjkljiva dostopnost laboratorijskih metod za merjenje in spremljanje koncentracije inulina ovira univerzalno uporabo.

Zgodnje metode za merjenje inulina so slonele na hidrolizi inulina s pomočjo koncentrirane žveplove kisline in na nadaljnjem procesu kondenzacije z antronom. Nastane zeleno obarvan produkt, katerega absorbanco merimo pri 620 nm. Novejše metode uporabljajo encim inulinazo, ki pretvarja inulin v fruktozo, to pa potem določamo z encimom sorbitol dehidrogenazo. Količino prisotnega inulina detektiramo z redukcijo nikotinamid-adenin dinukleotid fosfata, kar se izkaže kot rast absorbance pri 340 nm.

Pri encimskih metodah je postopek kisle hidrolize inulina do monomernih enot časovno zamuden. Omejujoča je uporaba korozivnih in zelo koncentriranih reagentov pri postopku deproteinizacije. Težave se kažejo tudi pri kolorimetrični detekciji fruktoze, ki je včasih nespecifična (19).

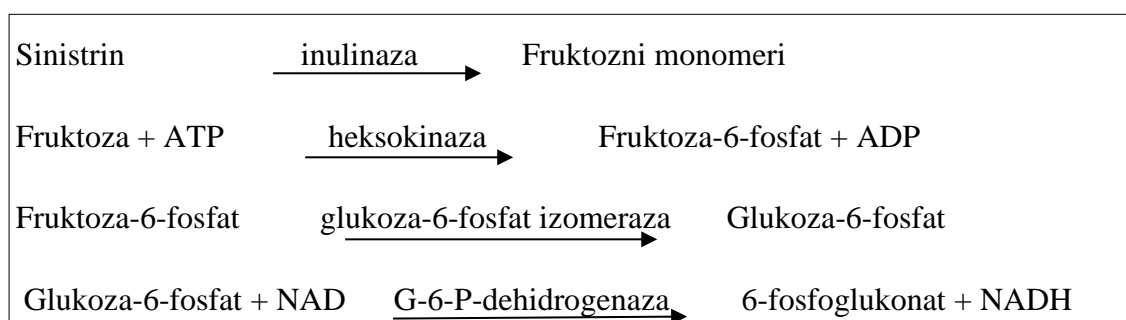
Danes klasična metoda očistka inulina temelji na predpostavki, da se v telesnih prostorih po distribuciji označevalca vzpostavi ravnovesno stanje. Najprej v enkratnem bolusnem odmerku preiskovancu vbrizgamo že vnaprej znano količino označevalca, s čimer dosežemo želeno koncentracijo le-tega v krvi. Pri drugi stopnji sledi konstantna intravenska infuzija označevalca, s katero se v krvi vzdržuje želeno koncentracijska raven, izmerimo koncentracijo označevalca v krvi in v urinu in volumen urina, ki se je izločil v določenem času. Na koncu iz teh podatkov izračunamo očistek, ki je enak GFR (2). Pomanjkljivost te metode je dolgotrajnost izvedbe, saj je potrebnega veliko časa, da se doseže ravnovesno stanje inulina, posledično metoda ne zazna hitrih sprememb hitrosti glomerulne filtracije. Rešitev za inulinsko slabo topnost v vodi temelji na uporabi sinistrina, ki je zaradi večje vodotopnosti pri sobni temperaturi lažje uporaben kot inulin. Nekateri raziskovalci predvidevajo, da je molekularna masa inulina okoli 5000 Da, varira pa lahko od 1000 do 20000 Da (20).

Očistek sinistrina

Sinistrin je polifruktozan in ga lahko ekstrahiramo iz rastline *Urginea maritima L.* Je naravni produkt in je sestavljen iz fruktoznih enot, spetih z glukozo. V preteklosti so gomolj rastline uporabljali v medicinske namene kot diuretično sredstvo. *Urginea maritima L.* se je izkazala uporabna tudi v kombinaciji z digitalisom (*Digitalis sp.*) (21). Poleg stimulirajočih učinkov na ledvice vpliva tudi na srce, zveča moč kontrakcije, upočasni in ojača prevajanje impulzov (21). Natančna razporeditev ogljikohidratne strukture še ni dokončno določena. Molekulska masa sinistrina je v povprečju okrog 3500 Da, lahko pa varira med 2000 in 6000 Da. Natančnejša definiranost molekulske mase je dodatni razlog za uporabo sinistrina v primerjavi z inulinom (20).

Sechaud R. in sodelavci so razvili in validirali občutljivo metodo za določanje sinistrina v bioloških vzorcih. V primerjavi s klasičnim merjenjem klirensa iz urina (metoda zahteva doseženo ravnotežno stanje v serumu, je časovno zamudna in nujno je zbirati urin) so dokazali, da lahko detektiramo in kvantificiramo zelo nizke koncentracije sinistrina v serumu ($< 5 \mu\text{g/ml}$) že po enkratnem bolusnem odmerku sinistrina. Metoda, ki so jo razvili in validirali, je tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z elektrokemično detekcijo. Plazemske in urinske vzorcev so predpripravili s trdno ekstrakcijo z namenom odstraniti proteine in glukozo. Ugotovili so, da je pomembno odstraniti endogeno prisotno glukozo, ker lahko interferira z analitom in posledično zmanjša specifičnost metode. Pri elektrokemični detekciji so uporabljali delovno elektrodo, narejeno iz zlata. Potek oksidoredukcijskih procesov oziroma nastanek njihovih produktov lahko kontaminirata površino delovne elektrode. To zahteva pogosto čiščenje delovne elektrode, še posebej v primeru testiranja več serij vzorcev. Z vzpostavitvijo različnih potencialov tekom detekcije sinistrina in z rednim čiščenjem delovne elektrode je zagotovljen nemoten potek detekcije (22). Oettl K. in sodelavci so s kislno hidrolizo odstranili endogeno glukozo. V nadaljnjih korakih analiznega postopka so uporabili tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti in elektrokemično detekcijo. Dokazali so, da po encimski odstranitvi glukoze dobimo zanesljive in točne rezultate brez dodatka internega standarda in predpriprave vzorcev s trdno ekstrakcijo. Naredili so kislno hidrolizo sinistrina do fruktoznih monomernih enot, primerjali višino fruktoznih in sinistrinskih vrhov v odvisnosti od koncentracije fruktoznih standardov in ugotovili linearni odgovor vzdolž celotnega področja standardnih fruktoznih vzorcev (93 %). Majhno razliko so predpisali naravno prisotni glukozi v strukturi

sinistrina. Oettl K. in sodelavci so modificirali metodo (prvotno namenjeno raziskovalnim laboratorijem, kjer standardna predpriprava vzorca ni potrebna) in dokazali, da nepopolna odstranitev glukoze bistveno ne vpliva na rezultat. Druge prednosti so, da je zadosten že zelo majhen volumen vzorca in da po analizi tisočih vzorcev zmogljivost kolone ni okrnjena (23). Danes obstajajo popolnoma avtomatizirane encimske metode za določanje sinistrina. Najpogosteje se uporabljajo večstopenjski encimski koraki s spektrofotometričnim načinom določanja koncentracije. Zelo pomembno je zagotoviti celotno hidrolizo sinistrina. Inulinaza je zmožna cepitve sinistrinskih polimerov do fruktoznih enot. Po določenih encimskih korakih sledi določanje koncentracije fruktoze npr. s heksokinazo, ki pretvarja fruktozo v fruktoza-6-fosfat (slika 1). Naslednja stopnja je pretvorba fruktoza-6-fosfat v glukoza-6-fosfat s pomočjo aktivnosti glukoza-6-fosfat izomeraze. Nastanek 6-fosfoglukonata oziroma NADH določamo spektrofotometrično s spremljanjem in merjenjem porasta absorbance pri 340 nm.



Slika 1: Encimski postopek določanja koncentracije sinistrina (18)

Le redki avtorji poročajo o pojavu anafilaktične reakcije pri ljudeh pri uporabi sinistrina. Pill J. in sodelavci so se osredotočili na določanje farmakokinetičnega profila in na toksičnost fluorescenčno vezanega sinistrina. Sintetizirali so sinistrin s fluorescenčnim izotiocianatom (FITC) in dobili fluorescenčno vezan sinistrin (FS). Odmerke različnih koncentracij so aplicirali živalskim modelom, spremljali so padec serumske koncentracije in izločanje urina. Hkrati so naredili kontrolno primerjavo z že vpeljano encimsko metodo in opazovali, če obstajajo razlike v primerjavi z apliciranim fluorescenčno označenim inulinom (FI). Za pilotno študijo toksičnosti so spremljali vrednosti klinično biokemičnih parametrov in histomorfološke spremembe (v jetrih, ledvicah, vranici, trebušni slinavki in

pljučih) tekom in po aplikaciji eksogenih označevalcev. Z Bablok-Passingovo regresijo in Bland-Altmanovo analizo so ugotovili, da ni pomembnih razlik med obema metodama. Pri aplikaciji fluorescenčnega inulina so opazili nelagodje pri živalih in zvišane serumske vrednosti sečnine. Proučevali so tudi morebitno nalaganje depozitov fluorescenčnega inulina v fagocitnih celicah jeter, vranice in pljuč in v manjši meri tudi v visceralnem sloju Bowmannove kapsule. Vsega naštetega ni bilo opaziti tekom in po aplikaciji fluorescenčnega sinistrina (20).

2. NAMEN RAZISKAVE

Namen naše raziskave je razviti in vpeljati zanesljivo metodo za določanje koncentracije sinistrina v serumskih in urinskih vzorcih. Odločili smo se za encimsko določanje koncentracije sinistrina oziroma njegovih monomernih enot s pomočjo encima heksokinaze. Izhodišče za razvoj metode bo objavljen članek Uporaba sinitrinskega očistka za oceno ledvične funkcijske rezerve pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 1, avtorji: Černe, D., Lenart, K., Osredkar, J., Zaletel, J. (1).

Sam potek metode temelji na več stopenjskih encimskih reakcijah. Na začetku same reakcije bomo zagotovili popolno hidrolizo sinistrinske molekule do fruktoznih monomerov. V ta namen bomo uporabljali encim inulinazo. Za tem sledi izomerizacija fruktoze v glukozo in na koncu oksidacija glukoze v končni produkt 6-fosfoglukonat. Pri tem nastane tudi NADH, kar spremljamo spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri 340 nm. Metodo bomo ločeno razvijali na serumskih in urinskih vzorcih. Razvita, validirana in optimizirana metoda bo bistvenega pomena za določanje hitrosti glomerulne filtracije.

Validirano, optimizirano in razvito metodo bi želeli vpeljati v vsakdanjo laboratorijsko klinično prakso. Ključno je, da lahko s pomočjo zanesljive metode pravočasno določimo stopnjo ledvične okvare in da bo metoda merjenja koncentracije sinistrina primerljiva in enako uporabna tako v serumskih kot v urinskih vzorcih.

3. MATERIALI IN METODE

Eksperimentalni del naše raziskave je potekal na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo.

3.1. Priprava bioloških vzorcev

Serumske in urinske vzorce smo pridobili od prostovoljcev, zaposlenih na Katedri za klinično biokemijo, Fakultete za farmacijo, oziroma študentov Fakultete za farmacijo. Priprava vzorcev je bila sestavljena iz odtajanja zmrznjenih vzorcev z dodanimi količinami sinistrina, priprave vodnih standardnih vzorcev in umeritvene krivulje.

3.1.1. Priprava serumskih in urinskih vzorcev

Iz različnih serumskih vzorcev smo najprej naredili skupen serum. Po prvem centrifugiranju smo opazili usedlino pri dnu epruvete. Da bi se izognili nastali usedlini, smo odpipetirali supernatant in centrifugiranje še enkrat ponovili. V serumske vzorce smo umetno dodali željeno koncentracijo sinistrina in jih alikvotirali v plastične epruvete po 100 μ L. Po pripravi različnih koncentracij in po alikvotiranju smo prvotno vzorce shranjevali v zamrzovalnik pri -20 °C. Kasneje smo zaradi optimizacije analiznega postopka vzorce shranjevali pri temperaturah -20 °C, -80 °C ter v tekočem dušiku (-196 °C). Pri shranjevanju smo uporabljali plastične epruvete, steklene vialo in epruvete, ki so primerne za shrambo v tekočem dušiku.

Način predpriprave in pogoji shranjevanja urinskih vzorcev so bili enaki kot pri serumskih vzorcih. Tudi potek same analize (dodatek hidroliznih reagentov, čas in temperatura inkubacije, nanos na mikrotitrsko ploščo, dodatek heksokinaznega reagenta) je bil identičen kot pri delu s serumom.

3.1.2. Priprava standardne raztopine sinistrina

Osnovno raztopino smo pripravili z redčenjem raztopine sinistrina, INUTEST 25 %, ki je komercialno dostopna (Fresenius Pharma, Linz, Avstrija).

Koncentracija komercialno dostopne ampule je 5000 mg/20 mL. 480 mL ultračiste vode smo pomešali z 20 mL ampule in na koncu dobili končni volumen, $V = 500$ mL, s

koncentracijo 10 g/L. Standardno raztopino sinistrina smo pripravljali za izdelavo umeritvene krivulje. Pri naslednjih meritvah smo morali optimizirati postopek priprave prvega standardnega vzorca z najvišjo koncentracijo (1,6 g/L). Težavna je bila priprava vzorca najvišje koncentracije, kar se je izkazalo v variabilnosti vrednosti absorbanc med serijami priprave umeritvenih krivulj. Z vsakim novim serijskim redčenjem, in sicer pri nižjih koncentracijah (0,8 g/L, 0,4 g/L, 0,2 g/L...), so te težave izginile in pri grafičnem prikazu vrednosti absorbanc linearno korelirale s koncentracijo. S ciljem zmanjšanja variabilnosti vrednosti absorbance vzorca najvišje koncentracije smo spremenili pogoje shranbe in način same priprave osnovne standardne raztopine 1,6 g/L ki smo jo takoj po pripravi alikvotirali in shranili pri -80°C. Vsakič smo začeli z redčenjem odmrznjenih standardnih vzorcev, ki smo jih pripravljali v duplikatih, eno serijo standardnih vzorcev pa smo pripravljali brez dodatka glukoza-6-fosfat izomeraze. Na ta način smo preprečili pretvorbo fruktoze-6-fosfat v glukozo-6-fosfat in dobljeno vrednost absorbance upoštevali pri izračunu koncentracije sinistrina v vzorcih.

3.2. Metoda merjenja koncentracije sinistrina

Metoda, s pomočjo katere smo določali koncentracijo sinistrina, je bila encimska metoda s spektrofotometrično določitvijo koncentracije sinistrina. Metoda vsebuje več stopenjskih encimskih reakcij. Vzorcem smo dodajali različne encime, ki smo jim zagotovili ustrezno trajanje inkubacije pri optimalni temperaturi. Inulinaza s svojo katalitično aktivnostjo razcepi sinistrinsko molekulo do fruktoznih monomerov. Glukoza oksidaza oksidira endogeno prisotno glukozo v serumskih vzorcih. Glukoza-6-fosfat izomeraza (EC 5.3.1.9.) katalizira fosforilacijo fruktoze-6-fosfat v glukozo-6-fosfat, kar je ključnega pomena pri posrednem določanju koncentracije sinistrina. Pri spektrofotometričnem določanju koncentracije primarno spremljamo porabo oksidiranega substrata NAD, nastanek končnega produkta 6-fosfoglukonata in reducirane oblike substrata NADH. Biološka vzorca, pri katerih smo določali koncentracijo, sta serum in urin. Določen volumen vzorcev smo nanесли na mikrotitrsko ploščo in dodali heksokinazni in startni reagent. Na koncu smo s pomočjo spektrofotometrije odčitali absorbance bioloških, slepih in standardnih vzorcev. Dobljene podatke smo statistično ovrednotili v Microsoft Excelu. Pri izračunu koncentracij bioloških in standardnih vzorcev smo uporabljali osnove statističnega računa (standardna deviacija, povprečje, koeficient variacije).

3.3 Uporabljeni reagenti in raztopine

- 1) Hidrolizni reagent I, sestavljajo:
 - a) citratni pufer
 - b) glukoza oksidaza (Sigma Aldrich, Saint Louis, ZDA)
 - c) inulinaza (Sigma Aldrich, Saint Louis, ZDA)
- 2) Hidrolizni reagent II sestavljajo:
 - a) citratni pufer
 - b) vodikov peroksid (končna koncentracija 3 %)
- 3) Startni reagent sestavljajo:
 - a) fosfatni pufer
 - b) glukoza-6-fosfat izomeraza (Sigma Aldrich, Saint Louis, ZDA)
 - c) fiziološka raztopina
- 4) Heksokinazni kit (Sigma Aldrich, Saint Louis, ZDA)

3.3.1. Priprava in sestavine hidroliznih reagentov

Hidrolizni reagent I

Prvi in hkrati zelo pomemben korak je zagotavljanje ustrezne hidrolize sinistrina do fruktoznih enot. Hidrolizni reagent I je vseboval citratni pufer, glukoza oksidazo in inulinazo. Da bi zagotovili celotno hidrolizo sinistrina, smo uporabljali encimsko mešanico inulinaz. Inulinaza (EC 3.2.1.7.) je encim, ki je sestavljen iz endo- in eksoinulinaz in specifično cepi β -2,1-D-fruktozne vezi znotraj sinistrinske molekule. V hidrolizni reagent I smo vedno dodajali 50 μ L encimske mešanice inulinaz. Raztopino inulinaze smo pripravili tako, da smo 2 mL liofiliziranega prahu raztopili v 2 mL ultračiste destilirane vode. Pripravljeno raztopino smo alikvotirali v 40 plastičnih epruvet in shranjevali v zamrzovalniku (-20 °C).

Citratni pufer (c = 50 mmol/L, pH = 5,2, V = 500 mL) smo uporabljali za pripravo hidroliznih reagentov I in II. Pufer smo pripravili tako, da smo natehtali:

1.92 g citronska kislina monohidrat in

4.67 g natrijev citrat dihidrat.

Zatehto smo raztopili v 500 ml destilirane, ultračiste vode in z natrijevim hidroksidom umerili pH na končno vrednost 5,2.

Raztopina glukoza oksidaze je druga pomembna sestavina hidroliznega reagenta I. Glukoza oksidazo smo pripravili tako, da smo reagent raztopili v 1 mL ultračiste vode. Glukoza oksidaza je komercialno dostopna v obliki liofiliziranega prahu. Raztopino smo potem alikvotirali v 20 plastičnih epruвет in shranili v zamrzovalnik. Vsaka epruveta je vsebovala 50 μL alikvotirane raztopine.

Hidrolizni reagent II

Hidrolizni reagent II je vseboval citratni pufer in 3-odstotni vodikov peroksid, čigar naloga je pospešitev oksidacije endogene glukoze v vzorcu. Volumni sestavin hidroliznih reagentov so podani v preglednici II.

Preglednica II: Sestavine hidroliznih reagentov

HIDROLIZNI REAGENT I (V = 1050 μL)	HIDROLIZNI REAGENT II (V = 1050 μL)
950 μL citratni pufer	900 μL citratni pufer
50 μL glukoza oksidaza	150 μL 3-odstotni H_2O_2
50 μL inulinaza	

3.3.2. Priprava startnega reagenta

Startni reagent je sestavljen iz fosfatnega pufera, fiziološke raztopine in encima glukoza-6-fosfat izomeraze. Za pripravo startnega reagenta smo uporabili 73 μL raztopine glukoza-6-fosfat izomeraze, 250 μL fosfatnega pufera in 1680 μL fiziološke raztopine. Pripravljen startni reagent smo shranili v hladilnik na +4 °C. Fosfatni pufer in fiziološko raztopino smo pripravili sami, glukoza-6-fosfat izomeraza je komercialno dostopna. Startni reagent dodajamo vzorcem na mikrotitrsko ploščo po dodatku heksokinaznega reagenta.

Pri pripravi fosfatnega pufera ($c = 50 \text{ mmol/L}$, $V = 500 \text{ mL}$) smo najprej stehtali 1.7 g kalijevega dihidrogen fosfata in 1.7 g dinatrij hidrogen fosfata in ju raztopili v 500 mL destilirane ultračiste vode.

3.3.3. Heksokinazni reagent

Heksokinazni kit, ki smo ga uporabljali, je komercialno dostopen (Glucose assay (HK), Sigma Aldrich, St. Louis, ZDA) kit. Heksokinazni kit vsebuje heksokinazni reagent v obliki prahu in standardno raztopino glukoze. Pri pripravi heksokinaznega reagenta smo najprej prefiltrirali ultračisto vodo. Prah smo raztopili v 20 mL ultračiste filtrirane vode. Sestavine reagenta so: heksokinaza (1,0 U/mL), adenzin-3-fosfat (1,0 mM), glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (1,0 U/mL) in nikotinamid adenzin dinukleotid (1,5 mM). Ustrezno pripravljen in shranjen v hladilniku je uporaben 4 tedne.

3.4. Uporabljena oprema in drobni material

- Inkubator
- Ultrazvok
- Centrifuga
- Centrifugirke
- Avtoklav
- Zamrzovalnik in hladilnik
- Mikrotitrna plošča
- pH meter
- Filtracijski sistemi
- Spektrofotometer, Magellan Clinical V4,5x, Grödig, Avstria
- Tehnica
- Plastične epruvete, kriogene epruvete, steklene vial
- Pipete
- Nastavki za pipete

3.5. Princip postopka metode merjenja koncentracije sinistrina

Vsakega od hidroliznih reagentov smo dodali biološkim in standardnim vzorcem in inkubirali. Na ta način smo zagotovili ustrezno katalitično aktivnost encima inulinaze. Z dodatkom hidroliznega reagenta I želimo zagotoviti popolno hidrolizo sinistrina do fruktoznih enot in oksidacijo endogeno prisotne glukoze v serumskem vzorcu. Aktivnost glukoza-6-fosfat izomeraze je ključnega pomena pri izomerizaciji fruktoza-6-fosfat v glukoza-6-fosfat. Glukoza-6-fosfat izomeraza je endogeno prisotna v samih vzorcih.

Endogeno aktivnost encima zavremo z inkubacijo pri višji temperaturi po dodatku hidroliznih reagentov. Na ta način preprečimo lažno zvišane vrednosti koncentracije glukoze zaradi vpliva endogeno prisotne glukoza-6-fosfat izomeraze. Naloga glukoza oksidaze, ki je sestavina hidroliznega reagenta II, je oksidacija endogeno prisotne glukoze v serumskih vzorcih. Z dodatkom glukoza oksidaze se izognemo vplivu endogeno prisotne glukoze pri določanju koncentracije sinistrina po pretvorbi fruktoze-6-fosfat v glukoza-6-fosfat. Pretvorba fruktoze v glukozo nam omogoča posredno merjenje koncentracije sinistrina. Heksokinaza je encim, čigar naloga je fosforilacija glukoze v glukoza-6-fosfat s porabo ATP-ja. Po končani fosforilaciji sledi oksidacija glukoza-6-fosfat v 6-fosfoglukonat z hkratno redukcijo NAD do NADH (slika 2). Na koncu spremljamo absorbenco pri valovnih dolžinah 340 nm (delovna) in 620 nm (referenčna). Pri merjenju absorbance smo uporabljali kontinuirano spektrofotometrično merjenje, izrisali umeritveno krivuljo standardnih raztopin sinistrina in izračunali koncentracije sinistrina v bioloških vzorcih. Porast absorbance korelira z redukcijo nikotinamid adenin dinukleotida in z nastalim produktom 6-fosfoglukonom.



Slika 2: Princip detekcije glukoze s heksokinazno metodo

3.6 Opis postopka metode merjenja koncentracije sinistrina

Po odtajanju bioloških in standardnih vzorcev, ki so vsebovali različne dodane koncentracije sinistrina, smo jim dodali najprej hidrolizni reagent I ($V=100 \mu\text{L}$). Volumen biološkega vzorca je bil $100 \mu\text{L}$. Zatem smo dodali $100 \mu\text{L}$ hidroliznega reagenta II. Reakcijsko mešanico smo pripravljali v plastičnih epruvetah ($V=500 \mu\text{L}$). Sledila je 20-minutna inkubacija pri $56 \text{ }^\circ\text{C}$. Po končani inkubaciji smo nanesti $30 \mu\text{L}$ vzorca na mikrotitrsko ploščo, kamor smo že vnaprej odpipetirali $200 \mu\text{L}$ heksokinaznega reagenta.

V zadnji stopnji dodamo še 10 μL startnega reagenta. Mikrotitrsko ploščo smo inkubirali za 15 minut pri 37 °C. Volumni vzorcev in reagentov so podani v preglednici III.

Preglednica III: Volumni vzorcev in reagentov

Reagent, vzorec	Volumen (μL)
Serum, urin, vodni standardni vzorec	100
Hidrolizni reagent I, II	100
Heksokinazni reagent	200
Startni reagent	10

Po inkubaciji smo izmerili absorbanco in spremljali nastanek končnega produkta, 6-fosfoglukonata. Količina reducirane oblike nastalega NADPH je sorazmerna s koncentracijo sinistrina v vzorcu.

3.7. Validacija metode

Pri validaciji metode smo določali naslednje parametre: meja detekcije, meja kvantifikacije, točnost, ponovljivost v seriji, med serijami in vpliv endogene glukoze na določitev koncentracije sinistrina v serumskih vzorcih.

Pri ugotavljanju mej detekcije in kvantifikacije smo pripravili 20 slepih serumskih in urinskih vzorcev z dodanimi reagenti. Preverjanje točnosti smo izvedli pri štirih različnih koncentracijah sinistrina. Za vsako koncentracijo smo pripravili 3 vzorce in en vzorčni slepi vzorec, kjer smo namesto reagentov dodali vodo. Ponovljivost smo preverjali tako, da smo najprej pripravili in analizirali sveže vzorce. Alikvote pri ustreznih volumnih smo shranili v zamrzovalnik (-20 °C, -80 °C) in nadaljevali z analizo po treh in po petih dneh. Po petih dneh smo lahko primerjali ponovljivost med serijami. Vrednost pridobitka dodatka smo dobili računsko, in sicer smo s to vrednostjo dobili vpogled v točnost same metode. S pomočjo pridobitka dodatka dobimo vpogled kakšen je odmik od začetne koncentracije sinistrina. Vpliv endogene glukoze smo preverili tako, da smo serumskim vzorcem (konc. sinistrina 1,0 g/L) dodajali različne koncentracije glukoze in spremljali, pri kateri koncentraciji pride do zvišanja koncentracije sinistrina.

3.8. Priporočila in opozorila

Po pripravi raztopin encimov je treba le-te alikvotirati in shraniti v zamrzovalnik pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ razen startnega reagenta, ki vsebuje glukoza-6-fosfat izomerozo, ki smo ga shranjevali v hladilniku. Pri izbiri vzorcev za skupni serum, smo se izogibali hemolitičnim vzorcem. Pri pripravi bioloških vzorcev (iz skupnega seruma in urina) smo po prvem centrifugiranju (3 min, $2,5 \times g$) večkrat opazili usedlino na dnu epruvete. Da bi se usedlini izognili, smo najprej odpipetirali supernatant in centrifugiranje ponovili. Vzorce z dodanim sinistrinom smo shranjevali na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ali $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kot najbolj optimalna temperatura se je izkazala $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Preden smo vzorce zamrznili, smo jih ultrazvočno obdelali, da bi preprečili morebitno interakcijo sinistrina s prisotnimi proteini v serumu, adsorpcijo na plastiko in zagotovili homogenizacijo vzorcev. Pri nanosu vzorcev in reagentov na mikrotitrsko ploščo se vedno poskušamo izogniti nastanku mehurčkov, ki bi lahko motili potek spektrofotometričnih meritev.

3.9. Uporabljene statistične metode

Pri izdelavi umeritvene krivulje smo uporabljali linearno regresijo in grafični prikaz vrednosti absorbance v odvisnosti od koncentracije. S pomočjo linearne regresije smo dobili enačbo premice, ki nam je bila izhodišče za izračun koncentracije sinistrina v bioloških vzorcih. Pri nadaljnjem postopku smo najprej izračunali povprečno koncentracijo sinistrina. Izračun standardne deviacije smo upoštevali kot mero razpršenosti okrog teoretične koncentracijske vrednosti. Pri izračunu validacijskih parametrov smo uporabljali osnove statističnega računa: aritmetično sredino, koeficient variacije, izračun pridobitka dodatka in linearno regresijo pri izračunu umeritvene krivulje. Za statistično obdelavo podatkov in izračune koncentracij smo uporabili program Microsoft Excel .

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

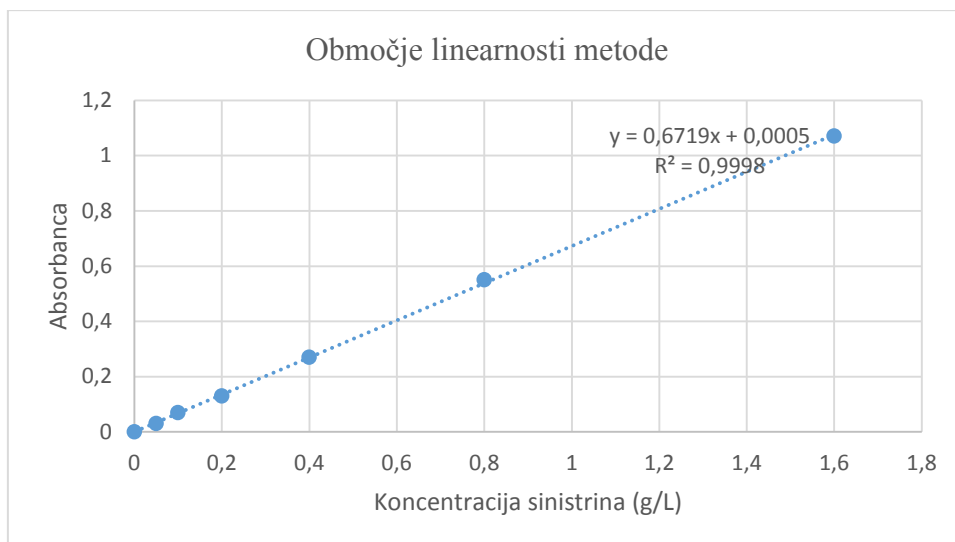
Da bi zagotovili točnost in ponovljivost, moramo metodo validirati. Nujna je podrobna analiza odnosa med koncentracijo analita v vzorcu in odzivnostjo metode. Šele validirana metoda je pripravljena za uporabo v klinični praksi. Validacijski parametri, ki smo jih določali, so bili linearnost, meje detekcije in kvantifikacije, točnost, ponovljivost in vpliv koncentracije glukoze v vzorcu na izmerjene vrednosti sinistrina. Z razvito metodo smo se želeli čim bolj približati pravi koncentraciji sinistrina v bioloških vzorcih. Hkratno smo testirali tudi ponovljivost metode in stabilnost vzorcev, ki so bili shranjeni v zamrzovalniku in v tekočem dušiku.

4.1. Razvoj metode določanja koncentracije sinistrina

4.2. Validacijski parametri razvite metode

4.2.1. Linearnost

Najprej smo preverjali linearnost metode s pomočjo grafičnega prikaza linearne regresije. V ta namen smo uporabili standardne vzorce sinistrina (konc.=10 g/L). Izkazalo se je, da je linearnost metode dosežena med koncentracijskim območjem od 0 g/L do 1,6 g/L (slika 3). Vrednost korelacijskega koeficienta je 0,999, kar ustreza zahtevam za analitični laboratorij.



Slika 3: Linearnost metode v koncentracijskem območju sinistrina od 0 g/L do 1,6 g/L

4.2.2. Meji detekcije in kvantifikacije

Občutljivost metode je bila pri serumu in urinu enaka (preglednica IV). Pripravili smo 20 serumskih oziroma urinskih vzorcev, ki jim nismo dodali sinistrina. Vsebovali so hidrolizne reagente, heksokinazni reagent in startni reagent. Celoten postopek je potekal kot pri delu z vzorci, ki smo jim dodali sinistrin. Mejo detekcije (LOD) in mejo kvantifikacije (LOQ) dobimo, če povprečno vrednost dvajsetih merjenj absorbance slepih vzorcev (\bar{x}_{SL}) uvrstimo v enačbo:

- za določanje meje detekcije: $LOD = \bar{x}_{SL} + 3 \times SD$
- za določanje meje kvantifikacije: $LOQ = \bar{x}_{SL} + 10 \times SD$

Pri ugotavljanju meje kvantifikacije smo želeli ugotoviti minimalno koncentracijo, pri kateri zagotovimo zeleno stopnjo točnosti in natančnosti. Meja detekcije je koncentracija analita, pri kateri že zaznamo minimalni signal

Preglednica IV: Meji detekcije in kvantifikacije bioloških vzorcev

VZOREC	Meja detekcije (g/L)	Meja kvantifikacije (g/L)
Serum	0,44	0,55
Urin	0,37	0,49

Sechaud R. in sodelavci so dosegli mejo kvantifikacije že pri koncentraciji sinistrina 5 $\mu\text{g/L}$ in mejo detekcije pri 0,8 $\mu\text{g/L}$ (22). Pri validaciji metode so uporabljali urinske in plazemske vzorce. Uporabljali so HPLC metodo z elektrokemično detekcijo, zato tako nizke vrednosti LOD in LOQ ne presenečajo.

4.2.3. Ponovljivost

Ponovljivost znotraj serije, izraženo kot koeficient variacije, smo preverjali pri koncentraciji 1,0 g/L. Ponovljivost je bila znotraj serije tako pri serumskih vzorcih (2,3 %), kot pri urinskih vzorcih (0,8 %) zelo zadovoljujoča. Za medserijsko ponovljivosti metode smo vzorce shranili v tekoči dušik. Pred tem smo jih še ultrazvočno obdelali, da bi zagotovili homogenost vzorcev. Za testiranje ponovljivosti smo izbrali koncentracijo 1,0 g/L in v treh serijah vsakič pomerili tri vzorce. Standardne vzorce smo pripravili v dveh ponovitvah. Vrednosti vzorčnih absorbanc brez dodane glukoza-6-fosfat izomeraze smo upoštevali pri končnem izračunu koncentracije. Rezultati ponovljivosti med serijami so prikazani v preglednici V in VI.

Preglednica V: Medserijska ponovljivost pri serumskih vzorcih

1. testiranje, Izmerjena koncentracija, g/L	2. testiranje, Izmerjena koncentracija, g/L	3. testiranje, Izmerjena koncentracija, g/L	Medserijska ponovljivost
0,88	1,00	0,86	$\bar{x}=0,91$ g/L
0,89	1,07	0,83	SD=0,09
0,88	1,03	0,81	KV=9,89%

Teoretična vrednost serumskih vzorcev je 1g/L, SD=standardna deviacija, KV=koeficient variacije

Preglednica VI: Medserijska ponovljivost pri urinskih vzorcih

1. testiranje, izmerjena koncentracija (g/L)	2. testiranje, izmerjena koncentracija, (g/L)	3. testiranje, izmerjena koncentracija, (g/L)	Medserijska ponovljivost
0,94	1,00	0,84	$\bar{x}=0,93$ g/L
0,95	1,03	0,88	SD=0,07
0,95	1,01	0,83	KV=7,52%

Teoretična vrednost urinskih vzorcev je 1g/L, SD=standardna deviacija, KV=koeficient variacije

Literaturni viri navajajo medserijsko vrednost koeficienta variance 0,8 % pri serumski koncentraciji sinistrina 0,403 g/L in 2,2 % pri koncentraciji 0,197 g/L (1). Sechaud R. s sodelavci poroča o koeficientu variance 5,9 % (znotraj serije) in 8,8 % (med serijami) pri

urinskih vzorcih, ki so vsebovali 0,1 g/L sinistrina (22). V primerjavi z omenjenimi literaturnimi viri, natančnost določanja sinistrina naše metode je popolnoma zadovoljujoča in primerljiva z drugimi metodami, opisanimi v literaturi (1), (22).

4.2.4. Točnost

Točnost smo analizirali s pomočjo testa pridobitka dodatka. Najprej smo izbrali vrednosti zelenih koncentracij sinistrina in upoštevali LOQ, ki smo jo predhodno določili. Točnost smo določali pri štirih različnih koncentracijah. Točnost metode je veliko boljša pri serumskih kot pri urinskih vzorcih. Prikazali smo je v odstotkih, v obliki pridobitka dodatka, preglednica VII, VIII.

Preglednica VII: Točnost merjenja koncentracije sinistrina v serumu

Začetna koncentracija serumskih vzorcev (g/L)	Povprečje izmerjenih koncentracij serumskih vzorcev, N = 3 (g/L)	Pridobitek dodatka, (%)
1,40	1,38	99
1,00	1,04	104
0,80	0,91	114
0,60	0,73	117

Preglednica VIII: Točnost merjenja koncentracije sinistrina v urinu

Začetna koncentracija urinskih vzorcev (g/L)	Povprečje izmerjenih koncentracij urinskih vzorcev, N = 3 (g/L)	Pridobitek dodatka, (%)
1,40	1,10	79
1,00	1,14	114
0,8	1,04	131
0,6	0,42	70

4.2.5. Vpliv koncentracije glukoze v vzorcu na izmerjeno koncentracijo sinistrina

Ker v metodi za določanje sinistrina pravzaprav detektiramo glukozo, smo želeli preveriti, kako dodatek glukoze vpliva na izmerjeno koncentracijo sinistrina oziroma če pride do interference z endogeno glukozo. Običajna koncentracija glukoze v človeškem serumu je okoli 6,0 mmol/L. Ugotovili smo, da glukozna v vzorcu ne vpliva na rezultat meritve, dokler ne preseže koncentracije 20 mmol/L (preglednica IX). Pri koncentraciji glukoze 25 mmol/L se izmerjena koncentracija sinistrina navidezno zviša iz 1,0 g/L na 1,35 g/L. Tudi drugi avtorji poročajo o vplivu glukoze na določanje koncentracije sinistrina kar je popolnoma primerljivo z našimi podatki (18), (1). Ruiz in sodelavci so testirali vpliv bilirubina in hemoglobina na koncentracijo sinistrina. Poročajo, da bilirubin (do 342 mmol/L) in hemoglobin (do 5,7 g/L) ne spremenita koncentracije sinistrina v serumu za več kot 3 % (18).

Preglednica IX: Vpliv različnih koncentracij glukoze na določanje koncentracije sinistrina

Dodatek glukoze (mmol/L)	Začetna koncentracija sinistrina (g/L)	Izmerjena koncentracija sinistrina (g/L)
6	1,0	0,97
10	1,0	1,15
12	1,0	0,97
15	1,0	1,02
18	1,0	0,97
20	1,0	1,00
25	1,0	1,35

4.2.5. Stabilnost sinistrina v bioloških vzorcih

Stabilnost sinistrina smo določali pri serumskih in urinskih vzorcih, ki so bili hranjeni pri -80 °C. Pri vsakem testiranju smo določeno število vzorcev odmrznili. Standardne vzorce in del serumskih in urinskih vzorcev smo shranili v tekoči dušik. Za tekoči dušik smo se odločili, da bi preprečili kakršnokoli encimsko aktivnost in hkrati opazovali učinek zamrzovanja/odtajanja na koncentracijo, strukturo in stabilnost molekule sinistrina. Po 45 dneh shrambe serumskih vzorcev se koncentracija ni spremenila, kar je razvidno iz preglednice X. Vrednost KV, ki kaže na odklon od teoretične koncentracije (1,0 g/L) po 45 dneh je bila 2,1 %. Pri urinskih vzorcih je bila vrednost KV po 45 dneh 1,5 % (preglednica XI), kar je v skladu z zahtevami za analitični laboratorij. Oettl K. in sodelavci so za namen stabilnostne študije shranjevali serumske vzorce pri -70 °C, jim dodali sinistrin (30 mg/L in 200 mg/L) in dokazali, da so stabilni več kot 60 dni, če so shranjeni pri -70 °C (23). R. Sechaud in sodelavci so plazemske in urinske vzorce (prava koncentracija sinistrina v vzorcih je bila 20 µg/L, 100 µg/L, 250 µg/L ter 300 µg/L) shranjevali pri -20 °C. Po odtajanju urinskih vzorcev so ugotovili, da ni prišlo do odklona pri koncentraciji sinistrina. Pri plazemskih vzorcih so opazili, da se je po odtajanju koncentracija sinistrina navidezno zvišala. Vzrok je verjetno v procesu zamrzovanja in odtajanja, zato priporočajo takojšnje centrifugiranje in shrambo plazemskih vzorcev na -20 °C (22).

Preglednica X: Stabilnost sinistrina v serumu (1g/L) shranjenem na -80°C

Statistični parameter	Sveže pripravljene vzorci	3 dni na -80°C	20 dni na -80°C	48 dni na -80°C
\bar{x} (g/L)	0,93	0,89	0,97	0,98
SD	0,03	0,02	0,02	0,02
KV (%)	3,0	2,3	2,8	2,1

Preglednica XI: Stabilnost sinistrina v urinu (1 g/L) shranjenem na -80°C

Statistični parameter	Sveže pripravljene vzorci	3 dni na -80°C	20 dni na -80°C	48 dni na -80°C
\bar{x} (g/L)	1,02	0,93	0,96	1,06
SD	0,02	0,007	0,02	0,01
KV (%)	2,0	0,8	2,1	1,5

4.3. Optimizacija metode

Delo z večstopenjskimi encimskimi koraki (uporaba več različnih encimov, ugotavljanje optimalne ionske jakosti pufrov, ustrežna temperatura inkubacij) je lahko vir napak, ki izvirajo iz analiznega postopka. S to problematiko smo se srečali pri našem raziskovalnem delu. Zelo pomembno je ugotoviti potencialne vire napak in preprečiti njihov nastanek.

Po pripravi načrta izvedbe, reagentov, pufrov, standardnih raztopin in ustrezne aparature smo najprej določili koncentracije sinistrina v standardnih vzorcih. Prvi rezultati so pokazali, da ni linearne korelacije med porastom absorbance in porastom koncentracije standardnih raztopin. Z namenom preverjanja ustreznosti heksokinaznega reagenta smo ponovili celoten postopek še na reagenčnem in vzorčnem slepem vzorcu. Reagenčni slepi vzorec smo pripravili tako, da smo raztopini glukoze ($V=30 \mu\text{L}$) dodali $200 \mu\text{L}$ ultračiste vode. Vzorčni slepi vzorec je namesto raztopine glukoze vseboval vodo ($V = 30 \mu\text{L}$) in heksokinazni reagent. Hkrati smo pripravili različne koncentracije standardnih raztopin sinistrina in ugotovili, da je heksokinazni reagent ustrezen. Prav tako smo s tem preverili,

da sami reagenti in sestavine vzorcev ne prispevajo k porastu absorbance. Nato smo preverili aktivnost encima glukoza-6-fosfat izomeraze tako, da smo namesto sinistrina vzorcem dodali fruktozo. Koncentracija izhodne standardne raztopine fruktoze je bila 1,6 g/L. Po serijskem redčenju fruktozne raztopine smo z reakcijo pričeli šele na drugi stopnji brez dodatka hidroliznega reagenta I in II. Ugotovili smo, da je aktivnost glukoza-6-fosfat izomeraze ustrezna.

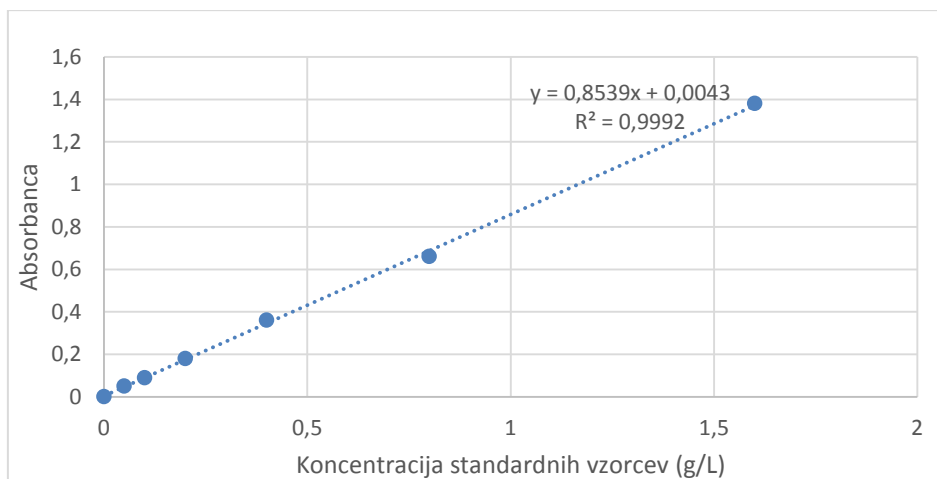
V nadaljnjih optimizacijskih postopkih smo večstopenjsko testirali delovanje inulinaze, najprej pri temperaturnem in časovnem optimumu (20 minut, 56 °C). Spreminjali in preverjali smo različne dejavnike, ki bi lahko bili vzrok za neuspele meritve in sicer:

- a) temperaturo inkubacije
- b) ionsko jakost pufra
- c) aparaturo in
- d) pogoje shranjevanja ter predpripravo vzorcev

Na podlagi poskusov smo uvedli naslednje spremembe postopka meritve sinistrina:

- temperaturo inkubacije vzorcev po dodatku hidroliznih reagentov smo znižali iz 56 °C na 37 °C
- čas inkubacije smo podaljšali iz 20 minut na 40 minut
- ionsko jakost citratnega pufra smo zvišali iz 50 mM na 100 mM

Po uvedenih spremembah smo uspeli dobiti linearen odnos med koncentracijo sinistrina v standardnih vzorcih in izmerjeno absorbanco (slika 4).



Slika 4: Linearen odnos med koncentracijo sinistrina v standardnih vzorcih in absorbanco

Med eksperimentalnim delom smo ugotovili, da je z mikroorganizmi okužen heksokinazni reagent lahko vzrok za neuspele meritve sinistrina. Iz tega razloga je priporočljivo pripravljene heksokinazni reagent shranjevati na +4 °C za dobo največ 4 tednov

Pri preliminarnem testiranju ponovljivosti smo opazili, da se izmerjene vrednosti koncentracije sinistrina spreminjajo s časom. Ker smo vzorce shranjevali pri -20 °C, smo sklepali, da na stabilnost vzorcev vpliva zamrzovanje. Zato smo serumske vzorce z 0,8 g/L sinistrina čez noč shranili na sobni temperaturi, v hladilniku in na -20 °C. Pri tem smo preverili tudi, če sam proces odtajanja vzorcev vpliva na stabilnost sinistrina. Najprej smo analizirali sveže vzorce, zatem smo naslednji dan naredili analizo shranjenih vzorcev. Rezultati so prikazani v preglednici XII.

Preglednica XII: Rezultati izmerjenih koncentracij serumskih vzorcev, ki so tekom noči bili shranjeni pod različnimi pogoji

Sveže pripravljene vzorci	Shramba na sobni temperaturi (+22 °C)	Shramba v hladilniku (+4 °C)	Shramba pri -20 °C
	Izmerjena koncentracija (g/L)		
0,54	0,46	0,51	0,57
0,53	0,44	0,48	0,53
$\bar{x}=0,54$	$\bar{x}=0,45$	$\bar{x}=0,50$	$\bar{x}=0,55$

Iz preglednice je razvidno, da zamrzovanje ni vzrok prenizko izmerjeno koncentracijo sinistrina (za več kot 30%), saj smo enako prenizke koncentracije dobili tudi pri vzorcih, ki smo jih hranili na sobni temperaturi in v hladilniku. Tudi po takojšnjem merjenju vzorcev s teoretično koncentracijo 0,8 g/L sinistrina, je bila izmerjena koncentracija za okrog 30% prenizka. Razlog za nestabilnosti bi lahko bila adsorpcija sinistrinskih molekul na plastično površino. Prav tako bi lahko že same sestavine bioloških vzorcev (matriks vzorca) vplivale na stabilnost sinistrina, npr. aktivnost encimov, prisotnost drugih proteinov, motnost vzorca, prisotnost soli, nastanek mikrokoagulumov in v vodi netopnih kompleksov. Tudi drugi literaturni viri poročajo o nestabilnosti sinistrinskih vzorcev. Sechaud R. in sodelavci so opazili padec koncentracije sinistrina plazemskih in urinskih vzorcev, ki so jih preko noči pustili na sobni temperaturi. Iz tega razloga priporočajo takojšnjo shrambo v zamrzovalniku in odtajanje tik pred analizo (22).

Da bi izključili morebitne vplive matriksa seruma na sinistrin, smo pripravili vodne sinistrinske vzorce različnih koncentracij. Temu so sledili različni pogoji shranjevanja in manjše spremembe v predpripravi samih vzorcev. Preden smo pripravljene vzorce zamrzili, smo jih pretresli z ultrazvokom da bi zagotovili homogenizacijo in preprečili nastanek mikrokoagulumov. Da bi preverili morebitno adsorpcijo na plastiko smo vzorce shranili v kriogenih in plastičnih epruvetah ter steklenih vialah na -80 °C. Testirali smo jih 0. dan, 3. dan in 6. dan in ugotovili, da se sinistrin ne adsorbira na nobenega od testiranih materialov.

4.4. Testiranje nestabilnosti standardnih vzorcev

Ugotovili smo, da se koncentracija bioloških vzorcev ne približa začetni in da njena vrednost pade tekom shranjevanja. Vpliv zamrzovanja, adhezije na plastiko in vpliva matriksa biološkega vzorca na sinistrin smo že izlučili zato smo nadaljevali z iskanjem vzroka za padec koncentracije sinistrina. Pri tem smo opazili, da se vrednost absorbance standardnega vzorca z največjo koncentracijo spreminja. Omenjeno smo opazili že na nivoju dveh zaporednih priprav standarda z najvišjo koncentracijo (1,6 g/L).

Standardne raztopine smo vedno pripravljali iz iste osnovne raztopine 10 g/L sinistrina, ki smo jo shranjevali v hladilniku. Najprej smo pripravili vzorec z najvišjo koncentracijo 1,6 g/L, ga nato serijsko redčili do 0,05 g/L. Na ta način smo z redčenjem z vodo v razmerju

1:1 pripravili koncentracijsko lestvico: 1,6; 0,8; 0,4; 0,2; 0,1 in 0,05 g/L,. Predvidevamo, da priprava standarda z najvišjo koncentracijo 1,6 g/L iz 10 g/L ni ponovljiva, priprava nadaljnih redčitev iz standarda 1,6 g/L pa je ponovljiva. Zato ni ponovljiva priprava umeritvene krivulje med serijami meritev, kljub temu da smo linearnost premice zagotovili. Zaključili smo, da se vrednosti absorbanc umeritvene krivulje med različnimi merjenji razlikujejo zaradi neponovljivosti priprave standarda koncentracije 1,6 g/L iz osnovne raztopine, kar posledično vpliva na izračun koncentracije sinistrina v vzorcih.

Standardni vzorci sinistrina so bili vodne raztopine. Če bi standardne vzorce pripravili iz bioloških vzorcev, bi lahko sklepali na interakcije sinistrina s prisotnimi proteini, vpliv endogenih encimov ali ionske aktivnosti prisotnih soli. Pri delu z vodnimi vzorci nismo izključili možnosti homogenizacije sinistrina v vodi oziroma precipitacije same molekule na dno epruvete. Zato smo vzorce ultrazvočno obdelali. Kljub dvojni ultrazvočni obdelavi (preden ko smo shranili vzorce in po procesu odtajanja) težav nismo uspeli odpraviti. Morda je vzrok nehomogena sestava ali sama sestava molekul sinistrina. Problem smo rešili tako, da smo za vse nadaljnje poskuse pripravili večje količine standarda koncentracije 1,6 g/L iz osnovne raztopine 10 g/L in jih razdelili v epruvete po 200 μ L in shranili na -80°C . Tako smo zagotovili ponovljivo pripravo umeritvene krivulje med serijami.

Pri nadaljnjem delu smo spreminjali meritev slepega vzorca. Prvotno smo pri pripravi standardnih vzorcev za vsako koncentracijo pripravili en vzorec, ki mu nismo dodali startnega reagenta. Izmerjeno absorbanco smo odšteli od izmerjenih absorbanc standardov.

Da bi izboljšali točnost meritev, smo dodatno vpeljali meritev slepih standardnih vzorcev. Med pripravo slepih vzorcev startnemu reagentu nismo dodajali encima glukoza-6-fosfat izomeraze, ampak smo namesto tega mešanici dodali vodo. Na ta način smo preprečili reakcijo pretvorbe fruktoza-6-fosfat v glukoza-6-fosfat. Brez nastanka reakcijskega produkta 6-fosfoglukonata posledično ni prišlo do porasta absorbance, saj je absorbanca premosorazmerna koncentraciji nastalega 6-fosfoglukonata. Od absorbance vsakega standardnega vzorca smo odšteli vrednost absorbance pripadajočega slepega vzorca. Odšteto vrednost smo uporabljali pri izdelavi grafa umeritvene krivulje in pri izračunu koncentracije sinistrina v bioloških vzorcih. Vpeljava meritve slepega vzorca in meritve slepih reagenčnih vzorcev je omogočila izenačitev izmerjenih koncentracij vzorcev z

začetnimi. Enako meritev slepega vzorčnega vzorca smo vpeljali tudi pri meritvah bioloških vzorcev (seruma in urina).

Prednosti encimske metode pred drugimi danes razvitimi in dostopnimi metodami za določanje koncentracije sinistrina so, da ni časovno zamudna, predpriprava vzorcev ni zahtevna, reagenti in materiali pa so cenovno dostopni. Predpriprava vzorcev je dokaj enostavna in hitra, saj ne zahteva redčenja vzorcev, centrifugiranja po inkubaciji, dodajanja agresivnih kemikalij ali obdelave pri visokih temperaturah.. S testiranjem validacijskih parametrov smo dokazali, da je metoda stabilna, ponovljiva in zanesljiva. Pri stabilizacijski študiji smo vzorce shranjevali na različne načine in dokazali, da so stabilni pri temperaturi -80 °C najmanj 45 dni. Za pravilno delovanje metode moramo vedno zagotoviti pogoje za popolno hidrolizo sinistrinske molekule, da endogena glukoza ne bo povzročila lažno zvišanih rezultatov ter da fruktoza-6-fosfat popolnoma izomerizira v glukoza-6-fosfat. Slabost metode je večstopenjsko delo z različnimi encimi. Zagotovitev optimalnih pogojev za delovanje encimov je zaradi inkubacije pri različnih temperaturah včasih tehnično težavno.

5. SKLEP

V magistrski nalogi smo razvili in optimizirali encimsko metodo za določanje koncentracije sinistrina v bioloških vzorcih.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko sklepamo:

- Ponovljivost metode znotraj serije (izražena kot koeficient variacije) je pri serumu 2,3 % in urinu 0,8 %, med serijami pa pri serumskih vzorcih 9,89 %, pri urinskih 7,52 %.
- Linearnost metode je dosežena v koncentracijskem območju od 0 g/L do 1,6 g/L.
- Meja detekcije pri serumskih vzorcih je 0,44 g/L, pri urinskih 0,37 g/L, meja kvantifikacije pri serumskih vzorcih je 0,55 g/L, pri urinskih 0,49 g/L.
- Točnost metode izražena kot pridobitek dodatka je pri serumu pri koncentraciji 1,40 g/L 99,00 %, pri 1,0 g/L 104 %, pri urinu pri koncentraciji 1,40 g/L je točnost 79 %, pri 1,0 g/L 114 %.
- Sinistrin, shranjen pri temperaturi -80 °C, je stabilen najmanj 45 dni.
- Meritev slepega vzorčnega vzorca naredimo tako, da med pripravo slepih vzorcev startnemu reagentu ne dodajamo encima glukoza-6-fosfat izomeraze, ampak samo vodo, izmerjeno absorbanco odštejemo od absorbance pripadajočih standardnih in bioloških vzorcev.
- Za zagotavljanje ponovljive priprave umeritvene krivulje med serijami pripravimo večjo količino standardnega vzorca koncentracije 1,6 g/L in ga alikvotiramo v epruvete in shranimo na -80 °C.
- Glukoza v serumskem vzorcu ne vpliva na rezultat meritve, dokler ne preseže koncentracije 20 mmol/L.

Razvito in validirano metodo bomo vpeljali v analitski laboratorij in v vsakdanjo klinično prakso. S pomočjo encimske metode želimo izboljšati diagnostiko pri odkrivanju in spremljanju ledvičnih bolezni.

6. LITERATURA

1. Černe D, Lenart K, Osredkar J, Zaletel J. Uporaba sinistrinskega očistka za oceno ledvične funkcijske rezerve pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 1. *Farm Vestn*, 2002;53:377-381.
2. Zaletel J. Ledvična funkcijska rezerva pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 1. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Klinični center Ljubljana, 2004.
3. Ashwood ER, Bruns DE, Burtis CA. *Tietz textbook of Clinical chemistry and Molecular Diagnostics*. Elsevier, St. Louis, Missouri 2006:691-698.
4. Lindič J, Purg D, Skamen J. Odkrivanje ledvične bolezni. Ljubljana: Medicinski razgledi, 2011;50:419-432.
5. Kordaš M, Ribarič S. Seminarji iz patološke fiziologije: Kronična ledvična bolezen. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, 2008.
6. Lindič J, Kaplan Pavlovič S, Kovač D, Malovrh M. Bolezni ledvic in arterijska hipertenzija, 2. dopolnjena izdaja. Ljubljana: Klinični oddelek za nefrologijo, Interna klinika, Klinični center Ljubljana, 2003.
7. Brzak M, Soldo F. Kompenzirana metoda za kreatinin i procjena glomerulne filtracije u heterogenoj populaciji bolesnika, Zagreb, KBC Sestre Milosrdnice, 2012.
8. Musuamba FT, Verbeeck RK. Pharmacokinetics and dosage adjustment in patients with renal dysfunction. *Eur J Clin Pharmacol*, 2009;65:757-773.
9. Bevc S. Pomen in vloga serumskega cistatina C in cistatinskih formul za oceno glomerulne filtracije pri bolnikih s kronično ledvično boleznijo, doktorska disertacija, Maribor: Medicinska fakulteta, 2008.
10. Stevens LA, Coresh J, Feldman HI, Greene T, Lash JP, Nelson RG, Rahman M, Deysher AE, Zhang J, Schmid CH, Levey AS. Evaluation of the Modification of the Diet in Renal Disease study equation in a large diverse population., *J Am Soc Nephrol*, 2007;18:2749-2757.

11. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang Y(L), Castro III AF, Feldman HI, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F, Greene T, Coresh J. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*, 2009;150:604-612.
12. Javanamardi M, Azadi NA, Amini S, Abdi M. Diagnostic value of cystatin C for diagnosis of early renal damages in type 2 diabetic mellitus patients: The first experience in Iran. *J. Res Med Sci*, 2015;20:571-576.
13. Tett ES, Gross AS, Kirkpatrick C, McLahlan J. Principles and clinical application of assessing alterations in renal elimination pathways. *Clin Pharmacokinet*, 2003;42:1193-1211.
14. LeBricon T, Thervet E, Benlakehl M, Bousquet B, Erlich D. Changes in plasma cystatin C after renal transplantation and acute rejection in adults. *Clinical Chemistry* 1999;45:2243-2249.
15. Levey AS, Stevens AL. Measured GFR as a confirmatory test for estimated GFR., *J Am Soc Nephrol*, 2009;20:2305-2313.
16. Đelmiš J. Procjena bubrežne funkcije u djece. *P. Croat*, 2002:61-73.
17. Hojs R, Antolinc B, Gorenjak M, Puklavec L. Serum cystatin C - a new marker of glomerular filtration rate. *Zdrav vestn*, 2004;73:171-175.
18. Angeles CM, Milagros S, Escanero FJ, Ruiz R. Automated sinistrin measurement. *Clinical Biochemistry*, 1997;30:501-504.
19. Barron JL, Bending MR, Soper C. An automated enzymatic inulin assay, capable of full sinistrin hydrolysis. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1995;30:497-501.
20. Pill J, Kraenzlin B, Jander J, Deus C. Fluorescin labeled sinistrin as marker of glomerular filtration rate. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2005;40:1056-1061.
21. <http://www.botanical.com/botanical/mgmh/s/squill86.html>., dostopno dne: 07. februar 2015
22. Sechaud R, Decosterd LA, Pechere Bertschi A, Biollaz J. Determination of the polyfructosan sinistrin in biological fluids by HPLC with electrochemical detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1996;14:483-490.

23. Oetl K, Estelberger W, Muller T, Payerl D, Reibnegger G. Quantitative analysis of sinistrin in serum with high performance liquid chromatography for renal function testing. *Analytical Biochemistry*, 2004;331:183-188.
24. Antolinc B, Gorenjak M, Hojs R, Puklavec L. Serumski cistatin C, nov označevalec glomerulne filtracije. *Zdravniški vestnik*, 2004.
25. Fiedler F, Gretz N, Kramer U, Klotzer HM, Pill J. Pharmacological profile and toxicity of fluorescein labelled sinistrin, a novel marker for GFR measurements. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2006;373:204-211.
26. LEVEY AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinint. A new prediction equation. *Annals of Internal Medicine*, 1999;130:461-470.