

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



TANJA KOROŠEC

**PRIMERJAVA KONCENTRACIJ RENINA V PLAZMI Z RADIOIMUNOLOŠKO IN
KEMILUMINISCENČNO METODO**

**COMPARISONS OF PLASMA RENIN CONCENTRATION WITH
RADIOIOIMMUNOASSAY AND CHEMILUMINESCENT IMMUNOASSAY**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana 2009

Diplomsko delo sem opravljala pod vodstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem., na Inštitutu za klinično kemijo in biokemijo, v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani. Meritve so bile opravljene v Laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih markerjev, na Inštitutu za klinično kemijo in biokemijo.

ZAHVALA:

Zahvaljujem se vsem, ki so kakorkoli pripomogli k nastanku moje diplomske naloge.

Zahvalo namenjam najprej mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju, za strokovno vodstvo, nasvete in razumevanje pri nastajanju moje diplomske naloge.

Posebna zahvala gre tudi vsem domačim in fantu, za izkazano podporo in vso pomoč, ki so mi jo nudili tekom študija in zlasti pri pisanju diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem

Ljubljana, December 2009

Predsednik komisije:izr. prof. dr.Vojko Kmetec, mag. farm.

Članica diplomske komisije: doc. dr. Barbara Ostanek, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO SLIK	VI
POVZETEK.....	VII
ABSTRACT	VII
SEZNAM OKRJAŠAV	IX
1. UVOD	1
1.1. Ledvica.....	1
1.2. Renin.....	2
1.2.1. Splošno o encimih	2
1.2.2. Sestava renina.....	3
1.3. Presnova renina	5
1.4. Patološka stanja v zvezi z motnjami presnove renina.....	7
1.4.1. Hipertenzija	7
1.4.1.1. Zdravljenje hipertenzije.....	8
1.4.1.2. Maligna hipertenzija.....	8
1.4.2. Hiperaldosteronizem.....	9
1.4.2.1. Primarni hiperaldosteronizem.....	9
1.4.2.2. Sekundarni hiperaldosteronizem	10
1.4.3. Srčno popuščanje.....	10
1.4.4. Barterjev sindrom	11
1.4.5. Kongenitalna adrenalna hiperplazija	12
1.5. Tehnike, ki se uporabljajo za dokazovanje renina.....	13
1.5.1. Določanje renina z encimsko metodo.....	13
1.5.2. Določanje renina z imunokemijskimi metodami.....	13
1.5.2.1. Imunoradiometrična metoda (IRMA).....	14
1.5.2.2. Encimskoimunska metoda (ELISA).....	14
1.5.2.3. Imunofluorometrična metoda (IFMA)	15
1.5.3. Validacija metod.....	15
2. NAMEN DELA	18
3. EKSPERIMENTALNI DEL	19

3.1.	Kontrolni material.....	19
3.2.	Radioimunološka metoda RIA	19
3.2.1.	Princip metode.....	20
3.2.2.	Priprava reagentov	21
3.2.3.	Postopek	22
3.2.4.	Kontrola kakovosti	22
3.2.4.1.	Interference.....	22
3.2.4.2.	Občutljivost metode.....	22
3.2.4.3.	Natančnost metode (preciznost)	23
3.2.4.4.	Pravilnost metode	23
3.2.4.5.	Referenčne vrednosti	24
3.3.	Kemiluminiscenčna metoda CLIA.....	24
3.3.1.	Princip metode.....	24
3.3.2.	Priprava reagentov	26
3.3.3.	Postopek	26
4.	REZULTATI.....	28
4.1.	Validacija metode CLIA	28
4.1.1.	Interference.....	28
4.1.2.	Natančnost metode (preciznost)	28
4.1.3.	Linearnost metode	30
4.1.4.	Pravilnost metode	32
4.1.5.	Referenčne vrednosti	33
4.2.	Primerjalna analiza kontrolnega materiala	33
5.	RAZPRAVA.....	38
6.	SKLEP	41
7.	LITERATURA	42
8.	LITERATURA SLIK.....	44

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Vsebina epruвет.....	22
Preglednica II: Ponovljivost oziroma meritve znotraj serije	23
Preglednica III: Ponovljivost med serijami.....	23
Preglednica IV: Razredčitveni test- imeli smo dva vzorca plazme z visoko koncentracijo angiotenzina I, ki sta bila testirana, ko smo jih serijsko razredčili z ničelnim kalibratorjem	23
Preglednica V: Test točnosti- imeli smo dva plazemska vzorca z nizko koncentracijo angiotenzina I, ki so bili testirani pred in po dodatku večje količine angiotenzina I	24
Preglednica VI: Referenčne vrednosti koncentracije plazemskega renina.....	24
Preglednica VII: Postopek metode CLIA.....	27
Preglednica VIII: Ponovljivost oziroma meritve znotraj serije (opravljenih je bilo dvajset meritev v isti seriji)	29
Preglednica IX: Ponovljivost med serijami, ki so bile izvedene na analizatorju 1.....	29
Preglednica X: Ponovljivost med serijami, ki so bile izvedene na analizatorju 2.	30
Preglednica XI: Rezultati, merjeni pri posameznih razredčitvah, z namenom ugotavljanja linearnosti metode.....	31
Preglednica XII: Imamo dva seta vzorcev (vzorca X in Y v setu 1 in vzorca W ter Z v setu 2), nizke (redčenje) in visoke koncentracije renina (dodajali smo renin, po priporočilu proizvajalca), pridobljene iz vzorcev z normalno koncentracijo renina.....	32
Preglednica XIII: Referenčne vrednosti koncentracije plazemskega renina.....	33
Preglednica XIV: Rezultati meritev vzorcev in kontrolnega materiala z metodo RIA in CLIA, ter izračuni primerjave obeh metod.....	33

KAZALO SLIK

Slika 1: Kemijska reakcija razcepa vezi s hidrolazo.....	3
Slika 2: Tridimenzionalna terciarna struktura renina (1).....	4
Slika 3: Sistem renina- angiotenzin: AT- angiotenzin, PGI ₂ - prostaciklin, + pomeni spodbujanje, - pomeni zaviranje.....	6
Slika 4: Hormonska in klinična slika pri kongenitalni adrenalni hiperplaziji (2).....	12
Slika 5: Reakcija med antigenom in protitelesom	14
Slika 6: Shema reakcije, ki poteka pri komeptitivni radioimunološki metodi (1).....	20
Slika 7: Princip kemiluminiscenčne metode CLIA	25
Slika 8: Grafični prikaz s katerim smo pokazali, da so izmerjene vrednosti znotraj pričakovanih vrednosti zato lahko rečemo, da je metoda linearna. Rezultate smo vzeli iz levega dela zgornje tabele.....	31
Slika 9: Grafični prikaz s katerim smo pokazali, da so izmerjene vrednosti znotraj pričakovanih vrednosti zato lahko rečemo, da je metoda pravilna oziroma točna. Rezultate smo vzeli iz levega dela zgornje tabele.	32
Slika 10: Prikaz linearnosti rezultatov pridobljenih z metodo RIA.....	35
Slika 11: Prikaz linearnosti rezultatov pridobljenih z metodo CLIA	35
Slika 12: Razmerje med vrednostmi meritev izmerjenih z metodo RIA in metodo CLIA (n=27)	36

POVZETEK

Renin je encim ter hormon ledvic, ki ga najpogosteje najdemo v celicah jukstaglomerularnega kompleksa. Njegova vloga je, da se sintetiziraza v jukstaglomerularnem aparatu (JGA) v ledvicah in katalizira hidrolitično pretvorbo angiotenzinogena v angiotenzin I. Na nastali angiotenzin I nato deluje encim angiotenzinska konvertaza, ki angiotenzin I pretvori v angiotenzin II.

Koncentracija renina je pri različnih bolezenskih stanjih lahko zvišana ali znižana. Najpogosteje se sprememba v njegovi koncentraciji kaže pri povišanem krvnem tlaku. Ostala bolezenska stanja, ki imajo spremenjeno koncentracijo renina so tudi sekundarni in primarni aldosteronizem, kronična odpoved ledvic, uporaba diuretikov, zdravljenje z anti-diuretskimi hormoni, hipokaliemija, srčno popuščanje, Barterjev sindrom, kongenitalna adrenalna hiperplazija in Addisonova bolezen.

Koncentracijo renina lahko merimo z več različnimi metodami. Mi smo se osredotočili na dve in sicer obstoječo indirektno izotopsko radioimunološko metodo za določanje renina in novejšo direktno neizotopsko kemiluminiscenčno metodo, ki je še v fazi validacije.

Radioimunološka metoda je zamudnejša, ker je večino dela ročnega, čas inkubacije pa je zelo dolg. Pri njej uporabljamo izotope, ki so zdravju škodljivi. Temelji na tekmovanju antigenov (Ag), ki jih določujemo v vzorcu, z antigeni, ki so označeni z izotopom (Ag^*), za vezavo na določeno količino protiteles. Kemiluminiscenčna metoda je primernejša, ker je neizotopna metoda ter je tudi bistveno cenejša. Gre za imunske kemiluminiscenčne "sendvič" metodo, ki jo izvajamo na-LIASON analizatorjih.

Pri kemiluminiscenčni metodi smo opravili meritve, ki so potrebne za validacijo same metode, da nam bo slednja dala ustrezne in zanesljive rezultate. Ker so bili rezultati validacije znotraj mej odstopanja, smo s tem potrdili, da je validacija uspela. Nato smo opravili meritve vzorcev in kontrol z eno in drugo metodo ter rezultate primerjali med seboj. Potrdili smo domnevo, da je metoda CLIA primernejša, saj je cenejša, postopek je enostavnejši, hitrejši, izvedba celotne metode pa je avtomatizirana. Primernejša je tudi, ker z njo dobimo bolj linearne rezultate kot z metodo RIA.

ABSTRACT

Renin is an enzyme and a kidney hormone, which is most commonly found in the cells of the juxtaglomerular complex. Its function is to synthesize in juxtaglomerular apparatus (JGA) in kidneys and catalyse hydrolytic transformation of angiotensinogen into angiotenzin I. The enzyme angiotensin convertase further affects the formed angiotenzin I by changing it into angiotenzin II.

Renin concentration differs with different states of health – it is either slightly elevated or lowered. The most common change of its concentration is connected with increased blood pressure and other diseases, such as secondary and primary aldosteronism, chronic liver failure, usage of diuretics, antidiuretic hormone treatment, hypokalemia, heart failure, Bartter syndrome, congenital adrenal hyperplasia, Addison disease.

Renin concentrations are measured with different methods. In this study we focused on two methods, namely the existing indirect isotopic radioimmunoassay for renin determination and the newer direct non-isotopic chemiluminescent immunoassay (CLIA) which is currently in the process of validation.

The radioimmunoassay is time consuming, because most of the work is made by hand and the incubation time is very long. In this method harmful isotopes are used. It is based on competition between antigens determined in the sample and antigens labeled with isotope (Ag^*), for binding on the defined quantity of antibodies. The chemiluminiscence method is more suitable as it is non-isotopic and is significantly cheaper; it is a chemiluminiscence “sandwich” method, performed on the LIASON analysers.

With chemiluminescent immunoassay we performed measurements necessary for its validation in order to provide suitable and reliable results. All results of validation were within the limits of tolerance. Because of this we were confirmed that the validation was successful. Then we performed measurements of samples and controls with both methods to compare results. We proved our hypothesis that the CLIA is appropriate because it is cheaper, the process is simpler, faster and because the implementation of the method is automated. It is also preferable because it gives more linear results as the RIA method.

SEZNAM OKRJAŠAV

ACE angiotenzinska konvertaza

ACTH adrenokortikotropin

CLIA kemiluminiscenčna metoda

JGA jukstaglomerularni aparat

ELISA encimimunološka metoda

IFMA imunofluorometrična metoda

LOD meja detekcije

PA primarni aldosteronizem

PMSF fenilmetilsulfanil fluorid

RAAS sistem renin- angotenzin- aldosteron

IRMA imunoradiometrična metoda

RIA radioimunološka metoda

1. UVOD

1.1. Ledvica

Ledvici sta paren organ, ki ležita v trebušni votlini pod trebušno prepono zadaj ob hrbtenici. Imata značilno fižolasto obliko, ter sta sploščeni od spredaj nazaj, tako da ločimo sprednjo in zadnjo ploskev ter zgornji in spodnji pol. Desna ledvica leži nekoliko nižje od leve. Zgornjemu polu ledvice se prilega nadledvična žleza, spodnji pol ledvice pa leži na veliki ledveni mišici (psoas major). Sprednjo površino odeva potrebušnica, ki ledvico loči od prebavnih organov v trebušni votlini. Sta temno rjavordeče barve, trdne konsistence in gladke površine. V dolžino merita približno 10 cm. Lateralni rob ledvice je konveksen, medialni pa konkaven. Na medialnem robu je ledvična lina, kjer vstopa v vsako ledvico arterija, izstopa pa vena. Skozi ledvično lino poleg žil vstopajo in izstopajo še živci, mezgovnice in sečevod (1, 9).

Ledvice ovija čvrsta vezivna ovojnica (capsula renis), ki se tesno prilega površini. Obdaja jih tudi maščobno tkivo, ki tvori ložo, v kateri sta ledvici dobro mehansko zavarovani. Vezivna in maščobna ovojnica ledvici ščitita in pripenjata na zadnjo trebušno steno (1, 9).

Na vzdolžno prerezani ledvici že s prostim očesom razlikujemo dve vrsti tkiva, ki se ločita po barvi in strukturi. To sta približno 1cm debela zunanja plast, skorja (cortex renis), ki je svetlejša in zrnata, ter notranja temnejša plast, sredica (medulla renis), ki daje videz vzdolžne progavosti. Podaljški skorje segajo proti sinusu in delijo sredico v 5-14 piramid, ki so z bazo obrnjene proti površini. Ožji del piramide imenujemo ledvična papila (papilla renalis), ki moli v sinus. Ena piramida in pripadajoča skorja tvorita ledvični režanj (lobus renalis) (1, 9).

Ledvice so primarno namenjene izločanju odpadnih snovi, tvorijo pa tudi nekatere hormone, kot so eritropoetin, 1,25-dihidroksiholetkalciferol, prekalikrein in prostaglandine. Proizvajajo pa tudi renin, encim, katerega endogeni substrat je angiotenzinogen, beljakovina v plazmi. Obe snovi skupaj tvorita renin-angiotenzinski sistem, ki vpliva na krvni tlak in volumen krvi ter promet vode in soli (1, 9).

1.2. Renin

Renin je leta 1898 odkril in poimenoval Robert Tigersted, profesor za fiziologijo na Karolinskem Inštitutu v Stockholmu. Je encim, ki spada med hidrolaze in je hormon ledvic. Lociran je pretežno v celicah jukstaglomerularnega kompleksa, poleg tega pa se nahaja še v drugih telesnih tkivih (možgani, srce, nadledvična žleza). Izloča se ob zmanjšanem intrarenalnem arterijskem tlaku ali pa ob zmanjšanem vnosu natrija in klora. Njegov naravni substrat je angiotenzinogen, beljakovina v plazmi (1, 20).

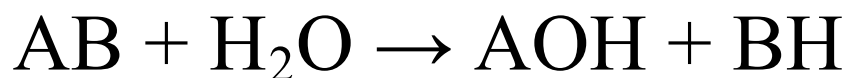
1.2.1. Splošno o encimih

Encimi so beljakovine ali beljakovinski kompleksi, ki v živih organizmih delujejo kot katalizatorji biokemičnih reakcij, kar pomeni, da uravnavajo hitrost in smer teh reakcij, pri čemer se sami ne porabljajo in se trajno ne spremenijo. Izdelujejo jih živi organizmi. Ker so kot katalizatorji specifični, vsak encim deluje le na nekatere substrate (včasih tudi le na enega) ali pospešuje samo eno reakcijo(2, 21) .

Vsak encim ima značilno tridimenzionalno obliko ter specifično površinsko obliko. Slednje encimom omogoča, da med vsemi molekulami najdejo pravi substrat. Večina encimov je zgrajenih iz dveh delov: en del je beljakovinski in ga imenujemo apoencim, drugi del pa nebeljakovinski, ki ga imenujemo kofaktor. Kofaktor je lahko kovinski ion ali kompleksna organska spojina, ki jo imenujemo koencim. Celoten encim se imenuje holoencim. Če je kofaktor odstranjen, encim preneha delovati. Nekateri encimi so zgrajeni samo iz beljakovine (2,21).

Imena encimov imajo običajno končnico -aza, na primer hidrolaza, reduktaza in sintetaza. Glede na tip reakcije, ki jo katalizirajo jih lahko razdelimo v šest skupin. V vsaki od teh skupin so poimenovani po specifičnem tipu reakcij (encimi oksireduktaze na primer sodelujejo pri oksidacijsko redukcijskih reakcijah). Nadaljnja specifična imena se določajo na podlagi tega, kako in na kateri substrat encimi delujejo (na primer encimi, ki katalizirajo oddajo vodika do oksidacije, so dehidrogenaze, če na ta način delujejo na laktate, so laktatdehidrogenaze). Na podlagi tega imajo vsi encimi svojo klasifikacijsko številko. Encime torej razdelimo po tipu reakcij, ki jih katalizirajo, na šest skupin: oksireduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze in ligaze. Renin spada med hidrolaze, ki imajo

klasifikacijsko številko EC3, kemijska reakcija (slika 1), ki jo sprožijo pa je razcep vezi s hidrolazo (2, 21).



Slika 1: Kemijska reakcija razcepa vezi s hidrolazo

1.2.2. Sestava renina

Poznamo štiri različni nivoji sestave renina:

1. Primarna struktura: Tu je poleg renina pomemben tudi prorenin. S cepitvijo prorenina dobimo aktivno obliko renina. Prorenin je sestavljen iz propeptida s 43 aminokislinami. Pri cepitvi vezi Arg- Leu se prorenin pretvori v renin (3, 12).
2. Sekundarna struktura: Propeptid, ki je vezan na renin tvori najprej zanko, ki ji sledijo 3 α -vijačnice in β -nagubana površina (3).

3. Terciarna struktura: Predstavlja 3D obliko verige (slika 2) (3).



Slika 2: Tridimenzionalna terciarna struktura renina (1)

4. Kvartarna struktura: Renin, izoliran iz ledvic, je monomerni glikoprotein. Monomerni pomeni, da je sestavljen iz enostavnih strukturnih enot, ki se ne ponavljajo. Sposoben pa je reagirati tako, da tvori dimer, trimer, polimer, itd. Glikoproteini so sestavljeni iz nebeljakovinskega dela, ki ga predstavljajo eden ali več ogljikovih hidratov kovalentno vezanih na proteinski del glikoproteina (3, 12).

1.3. Presnova renina

Pri presnovi renina je pomemben sistem renin-angiotenzin-aldosteron (RAAS) (slika 3).

Samo ime nam pove, da v tem sistemu sodelujejo tri pomembne komponente:

- renin,
- angiotenzin,
- aldosteron.

Prvi se iz ledvic sprosti renin in spodbudi nastajanje angiotenzina v krvi in tkivih. Nastajanje angiotenzina posledično spodbuja izločanje aldosterona iz skorje nadledvične žleze (3, 20).

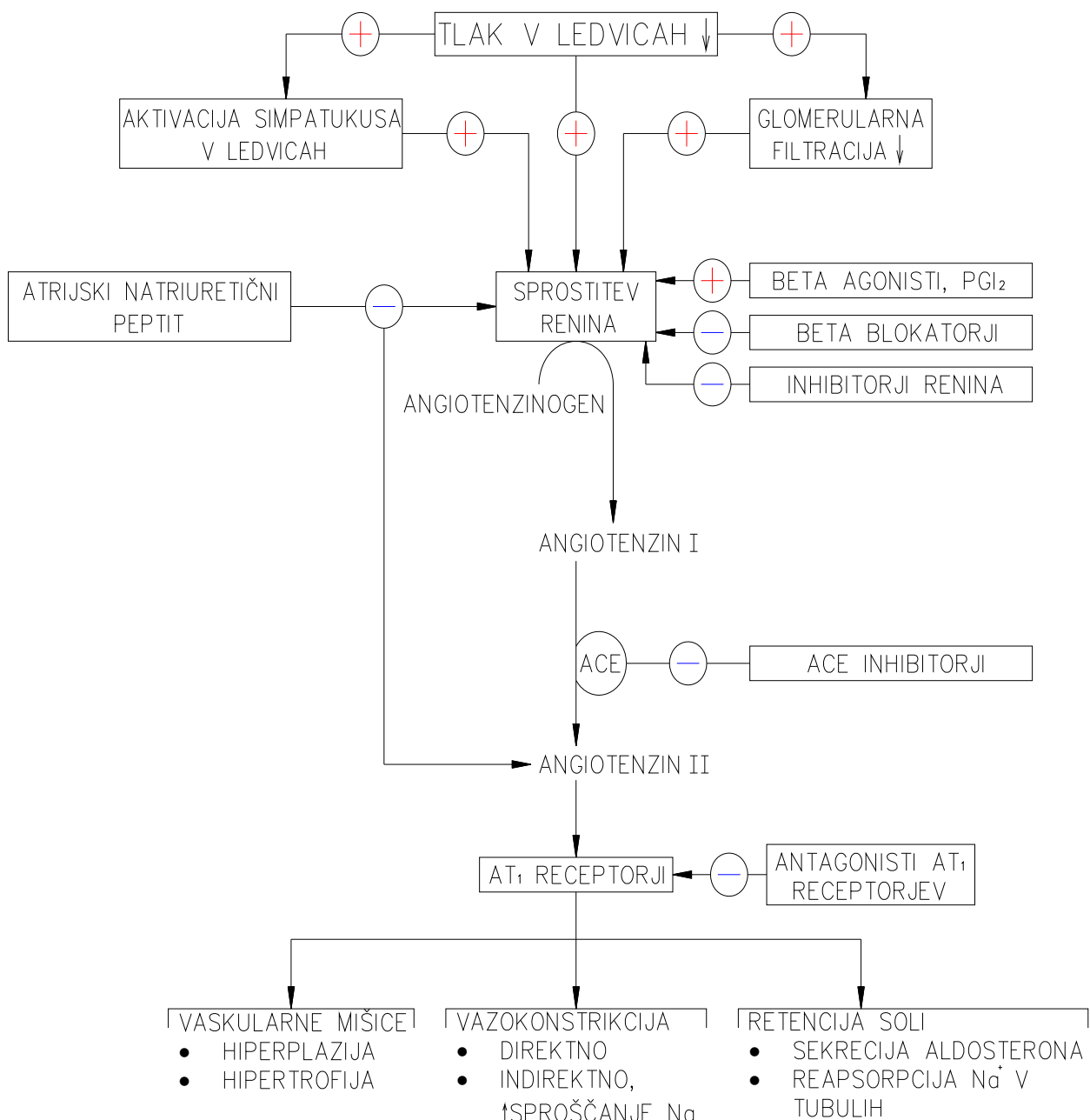
Sekrecijo renina spodbujajo slednji dejavniki:

- aktivacija živca, ki deluje preko β_1 -adrenergičnih receptorjev,
- hipotenzija ledvičnih arterij, ki jo povzroči sistemska hipotenzija ali pa stenoza ledvičnih arterij,
- znižana dostava natrija do distalnih tubulov v ledvicah.

Renin se sintetizira v jukstaglomerularnem aparatu (JGA) v ledvicah in katalizira hidrolitično pretvorbo angiotenzinogena, ta nastaja v jetrih, v angiotenzin I (3, 20).

Plazemski renin z odcepljanjem peptidnih vezi pretvarja angiotenzinogen, plazemski globulin, ki nastaja v jetrih, v angotenzin I. Na nastali dekaeptid deluje še encim angiotenzinska konvertaza (ACE), ki angiotenzin I pretvori v bioaktivno obliko angiotenzin II, ki po mehanizmu negativne povratne zveze zavira sproščanje renina. Angiotenzin II na organizem učinkuje na več načinov, je vazokonstriktor, poveča proliferacijo žilja gladkih mišic, povečuje srčno kontraktilnost, stimulira centralni živčni sistem, sproža občutek žeje in povečuje občutljivost na tubulo-glomerularni odgovor, pospešuje sproščanje aldosterona, ki vpliva na resorpcijo Na^+ in izločanja K^+ skozi ledvične tubule. Angiotenzin II se naprej metabolizira v jetrih in ledvicah. Aminopeptidazi A in N z N-konca oktapeptida zaporedoma odstranita po eno aminokislino in tako nastaneta angiotenzin III in IV. Prvi, angiotenzin III, stimulira sekrecijo aldosterona in preko delovanja na centralni živčni sistem povzroča občutek žeje. Angiotenzin IV naj bi

stimuliral sproščanje inhibitorja plazminogeneskega aktivatorja I iz endotelija, vendar ta funkcija še ni povsem pojasnjena. (3, 4, 20)



Slika 3: Sistem renina- angiotenzin: AT- angiotenzin, PGI₂- prostaciklin, + pomeni spodbujanje, - pomeni zaviranje

1.4. Patološka stanja v zvezi z motnjami presnove renina

Koncentracija renina je pri različnih bolezenskih stanjih povišana ali znižana. V tem delu bomo našteali nekaj teh bolezenskih stanj ter nekatere tudi opisali (16).

Bolezenska stanja s povišano koncentracijo renina:

- Sekundarni aldosteronizem
- Adisonova bolezen
- Prehrana z nizkimi koncentracijami natrija, uporaba diuretikov
- Kronična odpoved ledvic
- Izgubljanje soli zaradi bolezni gastrointestinalnega sistema
- Ledvični tumorji
- Hipertenzija
- Hipokaliemija
- Srčno popuščanje
- Barterjev sindrom

Bolezenska stanja z znižano koncentracijo renina:

- Primarni aldosteronizem
- Stenoza ledvične arterije
- Zdravljenje z antidiuretskimi hormoni
- Kongenitalna adrenalna hiperplazija

1.4.1. Hipertenzija

Prekomerna aktivnost sistema renin-angiotenzin vodi v vazokonstrikcijo (zoženje žil) in zastajanje natrija in vode. Ti učinki pa vodijo do hipertenzije (22).

Hipertenzija je zdravstveno stanje, pri katerem je krvni tlak kronično povišan. Krvni tlak je zvišan takrat kadar je vrednost sistoličnega krvnega tlaka 140 mmHg ali več in/ali vrednost diastoličnega krvnega tlaka 90 mmHg ali več. Hipertenzijo brez znanih vzrokov imenujemo primarna hipertenzija in je najbolj pogosta. Hipertenzijo z opredeljenimi vzroki

pa imenujemo sekundarna hipertenzija in je ponavadi posledica ledvične bolezni. Zvišan krvni tlak je glavni dejavnik tveganja za nastanek bolezni srca in ožilja: za hipertrofijo - zadebelitev levega prekata, koronarno bolezen, miokardni infarkt, odpoved srca, za cerebrovaskularno bolezen, arteriosklerozo, ledvično odpoved in poškodbe očesnega ozadja (9, 22, 23).

Pri približno 20 % oseb s hipertenzijo je povečana koncentracija plazemskega renina, ta pa vpliva na nastanek angiotenzina II, kar sproži vazokonstrikcijo in poveča resorpcijo Na^+ v ledvicah, oboje pa vodi do povišanega arterijskega tlaka in arterijske hipertenzije. Pri ostalih 80 % bolnikov pa je koncentracija plazemskega renina normalna ali celo nižja, vendar je še vseeno visoka glede na koncentracijo Na^+ v telesu in ta razlika je vzrok za njegovo resorpcijo (9, 22, 23).

1.4.1.1. Zdravljenje hipertenzije

Za zdravljenje hipertenzije lahko uporabljamo Aliskiren, ki je prvi direktni peroralni zaviralec renina. Pri uravnavanju krvnega tlaka je eden od pomembnih mehanizmov renin-angiotenzin-aldosteronski (RAAS) sistem. Ta sistem lahko zaviramo z različnimi zdravili, ki vplivajo na sistem RAAS na različnih mestih delovanja in tako znižujejo krvni tlak. Aliskiren zavira delovanje encima renina in s tem zavre delovanje sistema RAAS v točki aktivacije. Reninu prepreči pretvorbo angotenzinogena v angiotenzin I. Aliskiren delovanje renina v plazmi zniža celo za 50 do 80 odstotkov, s čimer se zmanjša tudi tveganje za srčnožilne zaplete, povezano z zvišanim delovanjem renina v plazmi (11, 22).

1.4.1.2. Maligna hipertenzija

Maligna hipertenzija je redka, vendar zelo huda oblika zvišanega krvnega tlaka. Uradno je maligna hipertenzija opredeljena kot huda hipertenzija, ki se pojavi skupaj s krvavitvami in eksudati na očesnem ozadju, lahko pa pride tudi do edema papile vidnega živca. Če teh sprememb ni, potem ne gre za maligno hipertenzijo. Sočasno se pojavi tudi zelo visok sistolični in diastolični krvni tlak, navadno večji od 220mm Hg in 130mm Hg in prekomerno izločanje renina. Maligno hipertenzijo je treba obravnavati hitro, da se prepreči resne poškodbe organov, najpogosteje so to ledvice, oči in možgani in morda tudi smrt. Ledvice so še posebej občutljive na povišanje krvnega tlaka in trajne poškodbe ledvic so pogost zaplet pri nezdravljenih malignih hipertenzijah (12, 22, 24).

Prvi ukrep pri maligni hipertenziji je infuzija 0,9 odstotnega NaCl, ki zmanjša prekomerno izločanje renina, s tem pa dosežemo, da se zmanjša tudi prekomerno povišan krvni tlak. Zdravljenje nato nadaljujemo z različnimi zdravili, ki jih uporabljamo v kombinaciji predvsem z zdravili, ki učinkujejo na renin-angiotenzinski sistem (12, 22, 24).

1.4.2. Hiperaldosteronizem

Hiperaldosteronizem je zdravstveno stanje, kjer nadledvične žleze izločajo prekomerno koncentracijo aldosterona, kar lahko privede do znižanja ravni kalija v krvi (25).

Poznamo primarni in sekundarni hiperaldosteronizem. Pri obeh gre za povečano izločanje aldosterona. Med seboj pa se razlikujeta v tem, da je pri sekundarnem hiperaldosteronizmu povečana tudi plazemska koncentracija renina (25).

1.4.2.1. Primarni hiperaldosteronizem

Pri primarnem aldosteronizmu (PA), znan tudi kot primarni hiperaldosteronizem, gre za preveliko proizvodnjo mineralokortikoidnega hormona aldosterona iz nadledvične žleze. Takšna neustrezna proizvodnja aldosterona je lahko vzrok za poškodbe srca in ožilja, zmanjšano sproščanje renina v plazmi, za povišanje krvnega tlaka in za zadrževanje natrija in izločanje kalija, ki lahko privede tudi do hipokaliemije. PA običajno nastane zaradi adenoma nadledvične žleze z enostransko ali obojestransko hiperplazijo nadledvične žleze (10, 25).

Pri diagnostiki PA merjenje aldosterona samo po sebi ni primerno za diagnozo. Priporočeno je merjenje razmerja aldosteron-renin v plazmi. Ta test je trenutno najbolj zanesljiv ter tudi najbolj dostopen za dokazovanje PA. Tako kot ostale metode oziroma biokemični testi ima tudi slednji lažno pozitivne in lažno negativne rezultate. Zato je potrebno test jemati le kot test za odkrivanje, ki ga je potrebno ponoviti, če prvi rezultati ne zadostujejo ali jih je težko razložiti, za kar so lahko vzroki v različnih zunanjih dejavnikih (10, 25).

1.4.2.2. Sekundarni hiperaldosteronizem

Ta oblika je pogosta in je posledica prekomerne aktivnosti sistema renin- angiotenzin, pri čemer pa prav tako pride do prekomernega izločanja aldosterona. Visoko izločanje renina iz jukstaklomerularnega aparata v ledvicah je lahko posledica ledvične ishemije (stenoza renalne arterije, srčno popuščanje, nefrotični sindrom, prekomerna raba diuretikov, izgube natrija), hiperplazije jukstaklomerulnega aparata (Barterjev sindrom) in renin-secernirajočih tumorjev (25).

1.4.3. Srčno popuščanje

Srčno popuščanje ali srčna insuficienca je bolezen srca, ki nastopi, ko srce ni več sposobno načrpati dovoljšnje količine krvi, da bi z njo oskrbelo celoten organizem. Do srčnega popuščanja lahko privedejo praktično vse bolezni srca, daleč najpogostejša vzroka pa sta zvišan krvni tlak (arterijska hipertenzija) in koronarna bolezen srca (zoženje koronarnih arterij, zaradi katerega srčna mišica ni zadostno prekrvljena). Srce, ki popušča, ne zmore črpati s kisikom obogatene krvi iz pljuč po telesu. Zaradi tega prihaja do zastoja krvi v pljučih in nezadostne prekrvavljenosti preostalih organov. Zaradi zastoja krvi v pljučih bolniki tožijo o težki sapi, ki se lahko pojavlja ob naporu, pri resnejših oblikah srčnega popuščanja pa tudi v mirovanju. Kri zastaja tudi v jetrih in nogah, kar se kaže z otekanjem. Zaradi nezadostne prekrvavljenosti organov pa prihaja do opešanosti in hujšanja, tkiva, ki niso zadostno prekrvljena, pa začnejo sproščati tako imenovane nevrohormone in presnovke, ki dodatno poslabšujejo delovanje organizma.

Poznamo dve vrsti srčnega popuščanja, akutno in kronično popuščanje. Pri akutnem srčnem popuščanju nastanejo simptomi in znaki v nekaj urah ali dneh in so posledica akutne, novo nastale bolezni ali nenadnega in hudega poslabšanja kronične srčne bolezni. Ker se razvije v kratkem času, se organizem nanj le deloma prilagodi. Simptomi in znaki so zato mnogo močnejše izraženi in se pojavijo pri manjši stopnji okvare srca. Bolniki z akutnim srčnim popuščanjem potrebujejo takojšnjo diagnostično obdelavo, ustrezen nadzor in pravilno ter odločno zdravljenje (26, 27).

RAAS oziroma renin ima pomembno vlogo pri kroničnem srčnem popuščanju. Tu se pojavljajo simptomi in znaki postopno. Kronično srčno popuščanje povzroča katerakoli strukturna ali funkcijska okvara srca, ki pripelje do okvare črpalne funkcije. Najpogostejša

vzroka sta ishemična bolezen srca in arterijska hipertenzija, manj pogosti vzroki so kardiomiopatije in bolezn zaklopk. Če je vzrok kroničnega srčnega popuščanja arterijska hipertenzija, vemo, da gre za povečano koncentracijo plazemskega renina, ta pa vpliva na nastanek angiotenzina II. Povečano nastajanje angiotenzina II vodi do povečanega izločanja aldosterona (z retencijo Na^+ in vode). Zato je za zdravljenje kroničnega srčnega popuščanja potrebno uporabljati zaviralce RAAS-a, ki sodijo med temeljna zdravila srčnega popuščanja, saj zmanjšujejo umrljivost in preprečujejo poslabšanja bolezn. Med zaviralce RAAS sodijo tri skupine zdravil: zaviralci angiotenzinske konvertaze (zaviralci ACE), ki predstavljajo zdravljenje prve izbire, zaviralci angiotenzina II (sartani) in zaviralci aldosteronskih sprejemnikov. Ta zdravila so zelo učinkovita, saj zmanjšajo umrljivost tudi do 50 odstotkov (12, 26, 27).

1.4.4. Barterjev sindrom

Barterjev sindrom je sindrom, pri katerem ledvice izločajo prekomerno količino elektrolitov (kalij, natrij, in klorid). Je deden in je posledica recesivnega dedovanja bolezn pri otrocih, kjer imata oba starša okvarjen gen (28).

Pri prizadetih ljudeh, ledvice izločajo prekomerne količine natrija, klorida, in kalija. Izguba natrija in klorida vodi v prekomerno nastajanje urina in posledično blage dehidracije, kar povzroči, da telo začne proizvajati več renina in aldosterona. Povečana koncentracija aldosterona povzroči povečano izločanje kisline in kalija v ledvicah, kar vodi v nizko koncentracijo kalija v krvi (hipokaliemija) in izgube kislin v krvi, to pa povzroči nastanek alkalnega pH krvi (12, 28).

Otroci z Barterjevim sindromom rastejo počasi in izgledajo podhranjeno. So mišično oslabei in imajo probleme s pretirano žejo, kar lahko povzroči nastanek velike količine urina. Izguba natrija in klorida vodi v kronične blage dehidracije. Pojavi se lahko tudi neobičajno nizek krvni tlak (hipotenzija) (12, 28).

Barterjev sindrom pri majhnih otrocih diagnosticiramo s fizičnim pregledom in pregledom značilnih nepravilnosti elektrolitov v krvi in urinu. Povišana koncentracija renina ter tudi aldosterona pri krvnih testih lahko kažeta na prisotnost sindroma. Vendar pa moramo

paziti, saj lahko do podobnih rezultatov pride tudi pri otrocih z nekaterimi prehranjevalnimi motnjami, kot so bulimija nervoza, prisiljeno bruhanje oziroma stanje, ko otroci bruhanje izzovejo sami ter pri zlorabi diuretikov (12, 28).

1.4.5. Kongenitalna adrenalna hiperplazija

Kongenitalna adrenalna hiperplazija je skupina bolezni (slika 4), ki so posledica prirojenih motenj v sintezi kortizola. Gre predvsem za obolenje otroške dobe. Najpogostejša oblika kongenitalne adrenalne hiperplazije, gre za 21-hidroksilaza defekt, se deduje avtosomno recesivno (17).

Na možnost kongenitalne adrenalne hiperplazije posumimo pri:

- Slabo diferenciranem zunanjem spolovilu, tako da je na začetku težko določiti spol,
- zvišanem krvnem tlaku,
- nizki rasti,
- bruhanju, ki lahko vodi do dehidracije in smrti.

Hormonska in klinična slika pri kongenitalni adrenalni hiperplaziji			
Encimska motnja	Hormon, ki ga ni dovolj	Hormon v prebitku	Klinična manifestacija
21-hidroksilaza delna	• kortizol	• androgeni	• nedoločljivo zunanje spolovilo (ž) • makrogenitosomija (m)
21-hidroksilaza popolna	• kortizol • aldosteron	• androgeni	• nedoločljivo zunanje spolovilo (ž) • makrogenitosomija (m) • izguba soli
11-beta hidroksilaza	• kortizol • aldosteron	• 11-dezoksikortizol • androgeni	• nedoločljivo zunanje spolovilo (ž) • makrogenitosomija (m) • hipertenzija
18-hidroksilaza	• aldosteron	• kortikosteron	• izguba soli
18-dehidrogenaza	• aldosteron	• 8-hidroksikortikosteron	• izguba soli
17-alfa hidroksilaza	• spolni hormoni • kortizol • aldosteron	• kortikosteron, DOC	• hipokaliemična alkalozna • spolni infantilizem • nedoločljivo zunanje spolovilo (m) • hipertenzija
3-beta hidroksisteroidna dehidrogenaza	• kortizol • aldosteron	• DHEA	• izguba soli • nedoločljivo zunanje spolovilo (m in ž)
20-22-dezmolaza	• glukokortikoidi • mineralokortikoidi • spolni hormoni		• lipoidna adrenalna hiperplazija • adrenalna insuficienca

Slika 4: Hormonska in klinična slika pri kongenitalni adrenalni hiperplaziji (2)

Kortizol je steroidni hormon nadledvične žleze, ki je potreben za normalno delovanje žlez z notranjim izločanjem. Njegova proizvodnja se začne v drugem mesecu življenja. Slaba proizvodnja kortizola je značilna za večino oblik kongenitalne adrenalne hiperplazije. Neučinkovita proizvodnja kortizola povzroči naraščanje vrednosti adrenokortikotropina (ACTH), kar povzroči prekomerno rast (hiperplazijo) in prekomerno aktivnost steroidnih celic skorje nadledvične žleze (17).

Bolnike zdravimo z zadostnimi odmerki sintetičnih steroidov. Cilj zdravljenja je korekcija glukokortikoidne insuficience in povišanega krvnega tlaka, normalna telesna višina ter normalen razvoj spolnih žlez in plodnost v odrasli dobi (17).

1.5. Tehnike, ki se uporabljajo za dokazovanje renina

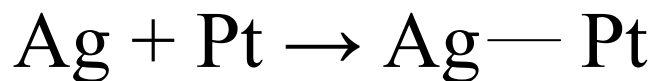
Za določanje renina uporabljamo več vrst različnih metod oziroma tehnik. Izberemo jih na podlagi katalitičnih in imunoloških lastnosti renina.

1.5.1. Določanje renina z encimsko metodo

Encimska metoda je indirektna metoda, ki se uporablja za merjenje renina. Metoda temelji na merjenju angiotenzinogena, slednjega pridobimo in "vitro" iz renina, ki se ga nato določa z biološko metodo. Danes v večini primerov namesto biološke metode uporabljamo radioimunološko metodo (3).

1.5.2. Določanje renina z imunokemijskimi metodami

Imunokemijske metode temeljijo na reakciji (slika 5), ki poteče med antigenom in specifičnim protitelesom. Pri tem nastanejo imunski kompleksi, katerih količino lahko merimo z različnimi imunokemijskimi metodami (5).



Slika 5: Reakcija med antigenom in protitelesom

Med imunokemijske metode za določanje renina spadajo:

- Imunoradiometrična metoda (IRMA)
- Encimskoimunska metoda (ELISA)
- Imunofluorometrična metoda (IFMA)
- Radioimunološka metoda (RIA)

1.5.2.1. Imunoradiometrična metoda (IRMA)

Poznamo dve tehniki izvajanja IRMA metode. Sendvič tehnika je kvantitativna, nekompetitivna metoda za znane antigene. Na trdno fazo imamo z adsorpcijo ali kovalentno vezavo vezana protitelesa (Pt), na katera se veže antigen (Ag) iz vzorca. Prebitek antigena oziroma nevezan material je potrebno sprati s pufrom. Sledi dodajanje novih protiteles, ki so označena z ^{125}I (Pt_2). Označena protitelesa reagirajo z drugimi epitopi na antigenih. Ponovno sledi spiranje s pufrom, nato pa izmerimo radioaktivnost kompleksa Pt-Ag-Pt₂ (3, 8).

Indirektna tehnika je metoda, pri kateri se po vezavi označenega Pt₂ na kompleks Pt-Ag izmeri presežek nevezanih protiteles (Pt₂^{*}). Koncentracija nevezanih označenih protiteles (Pt₂^{*}) je obratno sorazmerna koncentraciji antigenov v vzorcu (3, 8).

1.5.2.2. Encimskoimunska metoda (ELISA)

Je ena izmed najbolj občutljivih in specifičnih imunskih metod za kvantitativno določanje antigenov ali protiteles. Test je nekompetitiven in heterogen (pred meritvijo moramo ločiti vezano oznako od nevezane) (6, 7).

Osnovni koraki:

1. Na trdni nosilec vežemo znano protitelo za antigen, ki ga določamo.
2. Dodamo vzorec, ki vsebuje preiskovan antigen, ta se veže na pritrjeno protitelo.
3. Speremo nosilec, da odstranimo nevezane antigene.

4. Dodamo protitelesa, specifična za vezan antigen, ki so označena z encimom.
5. Speremo ploščo, da odstranimo nevezana protitelesa.
6. Dodamo substrat, ki ob prisotnosti encima razvije barvo.
7. Detektiramo intenzivnost barve.

1.5.2.3. Imunofluorometrična metoda (IFMA)

Pri IFMA metodi se kot označevalce namesto encimskega ali izotopnega označevalca za boljšo vidnost uporablja fluorokrome. Fluorokromi so snovi, ki se aktivirajo pri določeni valovni dolžini svetlobe in oddajajo svetlobo pri drugi valovni dolžini v vidnem delu spektra. Komplekse med antigenom in protitelesi, označenimi s fluorokromi, opazujemo z fluorescenčnim mikroskopom. Tako kot pri IRMA-i se tudi tu uporablja dvostranska imunofluorometrična metoda (6, 8).

1.5.3. Validacija metod

Validacija je dokumentiran postopek preizkuševanja in potrjevanja, da katerikoli material, proces, postopek, aktivnost, sistem, oprema ali mehanizem, ki ga uporabljamo lahko dosega, dosega in bo dosegel predpisane rezultate (13).

Pri uvajanju novih ali nepreverjenih analiznih metod morajo le-te uspešno prestati postopke validacije. Pod pojmom validacija razumemo sistematično preverjanje karakteristike dane metode glede na zahteve analiznega problema (13).

Poznamo dve vrsti validacije:

1. Perspektivna validacija: vključuje vse tiste dejavnosti, ki morajo biti opravljene pred vpeljavo novega izdelka v proizvodnjo oziroma tiste dejavnosti, ki jih narekujejo spremembe v proizvodnem postopku (po okvari in servisiranju, spremembe dobavitelja, itd.), ki lahko spremenijo lastnosti izdelka.
2. Retrospektivna validacija: proces ali izdelek temelji na izbiranju podatkov redne kontrole (inprocesna kontrola, analize za sproščanje izdelkov, tekoča kontrola procesov) oziroma proizvodnje (na primer tekoče kontrole procesov), ki jih pridobivamo z avtomatiziranim oziroma ročnim zbiranjem podatkov (29).

Validacijo izvedemo po sledečem postopku

1. Definiramo sistem, ki ga želimo validirati. Validiramo le stabilne sisteme (na primer proizvodni proces, ki je dokumentiran v proizvodnem poročilu). K definiranju sistema spada definiranje meje sistema, parametrov delovanja sistema ter nivo avtomatizacije, definiranje točnosti in natančnosti meritev in definiranje sprejemljivih kriterijev (29).

2. Izvedba validacijske aktivnosti obsega:
 - razvoj validacijskega protokola
 - izvedba validacije
 - pregled in strokovna analiza podatkov
 - izdelava končnega mnenja

3. Priprava programa redne kontrole
 - Na osnovi rezultatov validacije izberemo kritične elemente, ki jih je potrebno redno kontrolirati za potrditev stabilnosti sistema (npr. kontrola pogojev proizvodnje v čistih prostorih).
 - Glede na kritičnost sistema oziroma na osnovi zakonodaje predpišemo frekvenco periodičnih validacij (29).

4. Kontrola sprememb mora zagotoviti, da sistem vzdržujemo v validiranem stanju. Vzpostavljen mora biti sistem obvladovanja sprememb. To pomeni pregled vpliva sprememb na vseh procesih, opremi in postopkih na kakovosti le-teh in izdelkov. V primeru sprememb moramo strokovno ovrednotiti, ali le te vplivajo na parametre validacije. Če je potrebno se izvedejo revalidacije in rekvalifikacije (29).

Pri validaciji analizne metode, ki se izvaja v času razvoja metode, je potrebno potrditi oziroma testirati osnovne parametre, med katere spadajo:

- Točnost ali pravilnost metode nam pove, kako dober pokazatelj prave vrednosti vzorca je srednja vrednost meritve. Povezana je s sistemskimi napakami. Odvisna je od analitika, uporabljenih standardov, pipet, aparaturo. Točnost lahko izboljšamo s popravo oziroma s spremembo analizne metode. Merilo za točnost sta absolutna in relativna napaka (14).

- Natančnost ali preciznost metode je merilo razlik v razpršenosti rezultatov. Kaže se s ponovljivostjo rezultatov. To je slučajna napaka, ki se jo da odpraviti s povečanjem števila meritev. Najpogosteje jo izražamo s standardno deviacijo, varianco in koeficientom variacije (14).
- Specifičnost metode pomeni zmožnost metode, da lahko nedvoumno loči posamezen analit v prisotnosti drugih komponent. Te tipično predstavljajo nečistote, razpadne produkte in druge spojine, ki se nahajajo vzorcu in jih metoda tudi zazna (29).
- Limita detekcije (LOD) ali meja zaznave podaja najnižjo koncentracijo komponente v vzorcu, ki jo lahko z določeno natančnostjo določimo s postopkom. Pri določanju LOD izhajamo iz tega, da je pri neki (zelo nizki) koncentraciji analita signal kljub vsemu statistično značilno večji od "šuma" (signala slepega vzorca) (14).
- Limita kvantifikacije (LOQ) ali meja določljivosti je najnižja koncentracija analita, ki jo lahko dovolj natančno (ponavadi 10%) določimo z neko metodo (14).
- Delovno območje je koncentracijsko območje, znotraj katerega nam metoda zagotavlja točne in natančne podatke (29).
- Linearnost metode je zmožnost metode, da v določenem območju daje rezultate, ki so linearno odvisni od koncentracije (vsebnosti) iskanega analita v vzorcu (29).
- Robustnost metode je preizkus, kako sprememba različnih parametrov analize vpliva na končne rezultate (14).

2. NAMEN DELA

Renin je encim, ki ima pomembno vlogo pri uravnavanju krvnega pritiska. Koncentracijo renina v plazmi zato najpogostejše določamo v diagnostičnih postopkih obravnave bolnikov s povišanim krvnim tlakom. S to diplomsko nalogo bomo poskušali ovrednotiti kemiluminiscenčno metodo v primerjavi z obstoječo metodo. Do sedaj so v laboratorijih imeli na razpolago samo indirektno metodo za določanje renina, in sicer radioimunološko za določanje reninske aktivnosti. Ker je metoda zamudna, predvsem pa zaradi izotopa zdravju škodljiva, je šel razvoj v smeri iskanja nove, direktne neizotopске metode, ki je v fazi validacije. Analizirali bomo izbrani kontrolni material z obema metodama in ugotovili kakšna je primerljivost rezultatov.

3. EKSPERIMENTALNI DEL

V tem poglavju je opisan kontrolni material, metoda RIA in CLIA. Vsi rezultati in izračuni pri metodi RIA so bili pridobljeni, od proizvajalca.

3.1. Kontrolni material

Kontrolni material je material, ki se uporablja za oceno učinkovitosti analitskega postopka. Uporaba kontrolnega materiala je sestavni del dobre laboratorijske prakse. Kontrolni material, ki smo ga uporabili pri metodah, je kontrolni material proizvajalca BIO-RAD. Namenjen je nadzoru kakovosti, za spremljanje natančnosti laboratorijskih postopkov oziroma testiranj analitov.

Kontrolni material proizvajalca BIO-RAD je pripravljen iz predelane človeške plazme, v katero so dodani sestavina človeškega in živalskega izvora, kemikalije, konzervansi in stabilizatorji. Shranjevati ga moramo neodprtega na 2 do 8°C. Pred uporabo je potrebno v vsako vialo, v kateri se nahaja kontrolni vzorec, s pipeto odmeriti 2,0 ml destilirane ali deionizirane vode, nato jo dobro zapreti in pustiti stati približno 15 minut ter občasno počasi obrniti vialo. Pred vzorčenjem je potrebno kontrolo segreti na sobno temperaturo (18 do 25°C) ter z nežnim vrtenjem zagotoviti homogenost. Po vsaki uporabi kontrole jo je potrebno nemudoma dobro zapreti in jo vrniti na temperaturo shranjevanja, na 2 do 8°C. Vsi analiti naj bi po prvi uporabi ostali stabilni še približno 21 dni.

Paziti moramo, da kontrole ne uporabljamo po izteku roka uporabnosti ter v primeru, ko obstajajo dokazi, da je prišlo do kontaminacije z mikrobi ali če se pojavi prekomerna motnost v ponovno rekonstituiranem izdelku.

3.2. Radioimunološka metoda RIA

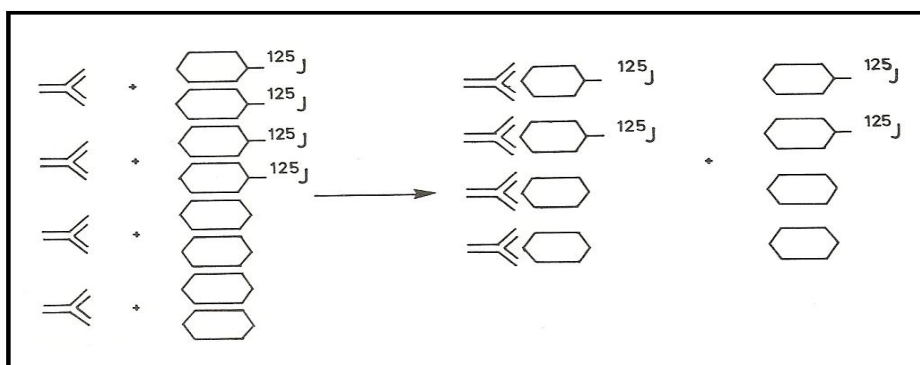
Je ena najbolj vsestranskih, zelo občutljivih in dragih tehnik, ki se uporablja za merjenje antigenov in haptenov. Izmerimo lahko izredno majhne količine, zato je metoda primerna za kvantitativno določanje hormonov, serumskih proteinov, zdravil in vitaminov. Slaba

stran metode je poleg drage posebne opreme tudi uporaba radioaktivnih snovi, zato so za izvedbo metode potrebni posebni varnostni ukrepi (7, 15).

3.2.1. Princip metode

Radioimunološka metoda pri določanju renina temelji na tekmovanju antigenov (Ag), ki jih določujemo v vzorcu, angiotenzin I v vzorcu ali kalibratorju, z antigeni, ki so označeni z izotopom (Ag^*), označeni angotenzin I, za vezavo na določeno količino protiteles (Pt). Če je reakcija zmesi enaka količini označenih antigenov ter antigenov, ki jih določujemo v vzorcu, se polovica Pt poveže z Ag^* , polovica pa z antigenom iz vzorca (slika 6).

Čim večja je koncentracija antigenov oziroma angiotenzina I v vzorcu, več se jih veže s protitelesi. Zato se na protitelesa veže manj označenih antigenov in jih več ostane prostih v raztopini. Torej je intenziteta vezave označenega antigena obratno sorazmerna koncentraciji antigenov v vzorcu.



Slika 6: Shema reakcije, ki poteka pri komeptitivni radioimunološki metodi (1)

Pri merjenju renina z metodo RIA so glavni koraki slednji:

- Reninsko aktivnost merimo preko angiotenzina I, ki nastaja v času inkubacije pri 37°C , v vzorcu plazme, pod pogoji, ki preprečujejo razgradnjo angiotenzina I (prisoten je encimski zaviralec fenilmetilsulfanil fluorid (PMFS)) in so najbolj primerni za aktivnost renina.
- Angiotenzin I, prevlečen v epruveh za radioimunsko metodo, razdelimo na dva enaka dela, enega inkubiramo pri 37°C , drugega pa ne inkubiramo (predstavlja slepi vzorc).

3.2.2. Priprava reagentov

Reagenti, ki se nahajajo v kontrolnem paketu KIT:

- **Prevlečene epruvete:** Notranja površina vsake epruvete je prevlečena z biotiniranim angiotenzinskim I IgG, ki so bila pridobljena iz kuncev.
Pred uporabo je potrebno škatlo z obloženimi epruvetami prinesiti na sobno temperaturo, da preprečimo nastanek kondenzacije zaradi vlage. Epruвет iz različnih škatel ne smemo mešati med seboj.
- **Z ¹²⁵I označene angiotenzin I:** liofiliziran reagent
Vsaka viala vsebuje hormon, označen z ¹²⁵I, BSA, fosfatni puffer, stabilizatorje, konzervanse in interno rdečo barvo. Radioaktivnost vial na dan kalibracije je 81kBq (2,2 µCi) ali manj. V vsako vialo je potrebno dodati 26ml destilirane vode. Raztopino je potrebno shranjevati globoko zamrznjeno na -20°C ali manj.
- **Ileu-5-angiotenzin I kalibratorji:** liofiliziran reagent
Viale vsebujejo večje količine angiotenzina I, BSA, fosfatnega pufra in konzervansov. Vsako vialo rekonstituiramo z dodatkom 1ml destilirane vode. Shranjujemo jih globoko zamrznjene na -20°C ali manj.
- **Kontrolna plazma:** liofiliziran reagent
Viale vsebujejo človeško plazmo in konzervanse, na njih pa se nahajajo referenčne vrednosti. Vialo rekonstituiramo z 2ml ohlajene destilirane vode, temperatura ne sme presegati 4°C. Raztopino je potrebno shranjevati globoko zamrznjeno na -20°C ali manj. Kontrolna plazma se mora obravnavati kot vzorec.
- **Generacijski puffer :** pripravljen za uporabo
Viale vsebujejo 4ml citratnega pufra, stabilizatorje, konzervanse in interno modro barvo.
- **Encimski inhibitor (PMSF):** pripravljen za uporabo
Viala vsebuje 1,0ml 15% etanolna raztopina fenilmetilsulfonil flurida (PMSF). Če pride pri temperaturi 2 do 8°C do kristalizacije, raztopino PMSF segrejemo na 37°C.

3.2.3. Postopek

Metodo izvedemo pri sobni temperaturi (20–25°C) vsaj v dveh paralelkah. Kalibratorje je potrebno testirati neposredno v postopku RIA z epruветami, ne da bi se pred tem generiral angiotenzin I. Tako naredimo pred vsako serijo vzorcev bolnikov. Za kalibrator in za vzorec velja enak postopek in enak čas inkubacije.

V postopku moramo zajeti vse korake v vrstnem redu ter brez kakršnih koli dolgotrajnih časovnih zamud med posameznimi koraki (preglednica I).

Preglednica I: Vsebina epruвет

	Kalibrator 0-5	Vzorec in slepa
kalibrator	50 μL	-
Vzorec	-	50 μL
Označevalca	500 μL	500 μL

V prvo obloženo epruветo z mikropipeto odpipetiramo 50 μL kalibratorja in 500 μL označevalca, v drugo obloženo epruветo pa odpipetiramo 50 μL vzorca in 500 μL označevalca. Vsebino obeh epruвет dobro premešamo na Vortex mešalniku in inkubiramo od 3 do 24 ur na sobni temperaturi. Po končani inkubaciji previdno odpipetiramo vsebino iz epruвет. Paziti moramo da se konica pipete dotika dna prevlečene epruвете, tako da se odstrani vsa tekočina. Če tekočina ni popolnoma odstranjena lahko pride do slabe ponovljivosti metode in lažnih rezultatov. Ko je tekočina odpipetirana, začnemo z merjenjem radioaktivnosti.

3.2.4. Kontrola kakovosti

3.2.4.1. Interference

Študije za nadzorovanje motečih snovi so pokazale, da na samo metodo ne vplivajo nobene interference.

3.2.4.2. Občutljivost metode

Meja detekcije je 0,20 $\mu\text{g/L}$ pri 95% meji zaupanja.

3.2.4.3. Natančnost metode (preciznost)

Rezultati meritve (preglednica II, III) vzorcev z različnimi plazemskimi koncentracijami renina za določitev ponovljivosti (to pomeni znotraj ene serije in med serijama)

Preglednica II: Ponovljivost oziroma meritve znotraj serije

Ponovljivost	A	B	C
Število določitev	10	10	10
Srednja vrednost($\mu\text{g/L/uro}$)	2,3	8,8	13,5
Standardna deviacija	0,17	0,48	1,34
Koeficient variacije (%)	7,5	5,4	9,9

Preglednica III: Ponovljivost med serijami

Ponovljivost	A	B	C
Število določitev	10	10	10
Srednja vrednost($\mu\text{g/L/uro}$)	2,6	8,6	13,0
Standardna deviacija	0,20	0,70	1,50
Koeficient variacije (%)	7,7	8,1	11,5

3.2.4.4. Pravilnost metode

Test za ugotavljanje pravilnosti je bila izveden z razredčitvenim testom in testom za točnost (preglednica IV, V).

Preglednica IV: Razredčitveni test- imeli smo dva vzorca plazme z visoko koncentracijo angiotenzina I, ki sta bila testirana, ko smo jih serijsko razredčili z ničelnim kalibratorjem.

Razredčitev	Pričakovana koncentracija $\mu\text{g/L}$	Izmerjena koncentracija $\mu\text{g/L}$	Točnost %
Brez redčitve	-	17,5	-
1:2	8,75	8,6	98,3
1:4	4,38	4,5	102,9
1:8	2,19	2,3	105,1
1:16	1,09	1,1	100,6
Brez redčitve	-	8,5	-
1:2	4,25	4,4	103,5
1:4	2,13	2,2	103,5
1:8	1,06	1,1	103,5
1:16	0,53	0,5	94,1

Preglednica V: Test točnosti- imeli smo dva plazemska vzorca z nizko koncentracijo angiotenzina I, ki so bili testirani pred in po dodatku večje količine angiotenzina I.

Dodana koncentracija µg/L	Pričakovana koncentracija µg/L	Izmerjena koncentracija µg/L	Točnost %
-	-	11,2	-
1,5	7,1	7,0	98,6
5,0	10,6	10,7	100,9
25,0	30,6	30,0	98,0
-	-	15,6	-
1,5	9,3	9,1	97,8
5,0	12,8	12,2	95,3
25,0	32,8	30,7	93,6

3.2.4.5. Referenčne vrednosti

Slednje referenčne vrednosti so okvirne, vsak laboratorij naj bi vzpostavil svoje referenčne vrednosti (preglednica VI).

Preglednica VI: Referenčne vrednosti koncentracije plazemskega renina

Vrednosti plazemskega renina µg/L/uro	Ležeči položaj	Pokončen položaj
	0,2 - 2,8	1,5 – 5,7

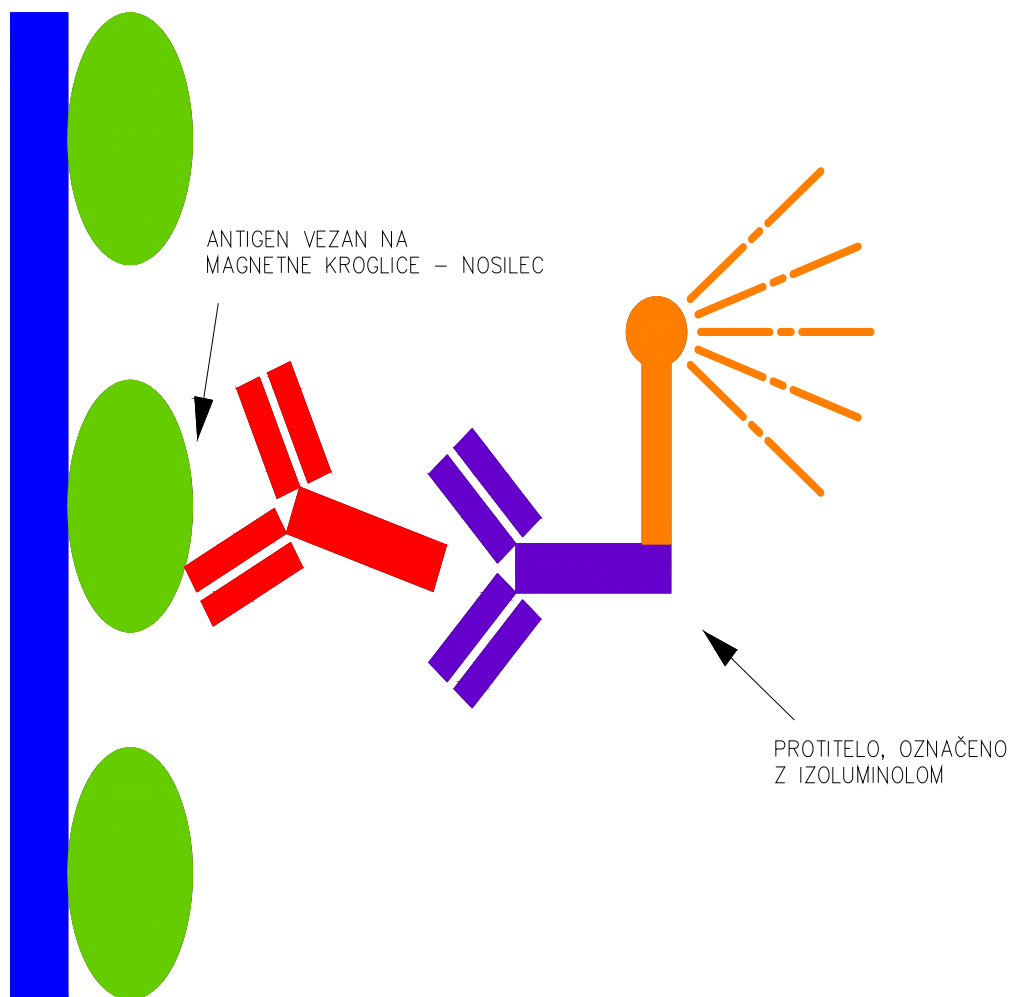
3.3. Kemiluminiscenčna metoda CLIA

Kemiluminiscenčna metoda CLIA, se uporablja za določevanje nizkih koncentracij analitov v kompleksnih vzorcih. Gre za imunsko kemiluminiscenčno "sendvič" metodo. Z njo lahko kvantitativno določamo koncentracijo renina v plazmi, metoda pa se izvaja na LIASON analizatorjih (16).

3.3.1. Princip metode

CLIA je v osnovi podobna encimsko imunskemu testu, le da tu uporabljamo kot trdno fazo magnetne kroglice, ki v tem primeru prepoznavajo tako renin kot prorenin. Protitelesa, ki jih določujemo, se vežejo na antigen, njihovo vezavo pa dokažemo z mišjimi

monoklonskimi protitelesi (specifični so za renin), na katere je konjugiran izoluminolni derivat (slika 7).



Slika 7: Princip kemiluminiscenčne metode CLIA

V času inkubacije renin, ki je prisoten v kontroli, ter renin in prorenin, ki se nahajata v vzorcu, tekmujejo za vezavo na trdno fazo. Nato dodamo konjugat, ki tvori kompleks oziroma reagira z reninom, ki je že vezan na trdno fazo. S tem se oblikuje tako imenovan "sendvič", slednji nastane le v prisotnosti molekul renina, ki predstavljajo most med obema protitelesoma. Po končani inkubaciji s spiranjem odstranimo nevezan material. Temu sledi dodajanje posebnega reagenta, ki sproži kemiluminiscenčno svetlobno reakcijo, pri kateri pride do svetlobnega signala. Aparatura svetlobni signal izmeri kot relativne luminiscenčne enote (RLU), ki so sorazmerne s koncentracijo renina, prisotno v vzorcu, kalibratorju ali kontroli.

3.3.2. Priprava reagentov

Reagenti, ki se nahajajo v kontrolnem paketu LIASON®

- **Magnetni delci:** v obliki suspenzije 2,3ml
Prevlčeni so z anti-renin in prorenin monoklonskimi protitelesi (pridobljena so bila iz miši), govejim serumom, albumini, PBS pufrom in < 0,1% natrijevim azidom.
- **Raztopina konjugata:** 13ml
Vsebuje anti-renin monoklonska protitelesa (pridobljena iz miši), označena z izoluminolom, nespecifična mišja IgG, goveji serum, albumine, PBS pufer ter konzervanse.
- **Kalibrator A:** liofiliziran 4 x 2,0 ml
Vsebuje rekombinantni humani renin, fosfatni pufer, goveji serum, albumin, inertna rumeno barvilo in konzervanse.
- **Kalibrator B:** liofiliziran 4 x 2,0 ml
Vsebuje rekombinantni humani renin, fosfatni pufer, goveji serum, albumin, inertno modro barvilo in konzervanse.
- **Bar-kode:** oznake za kalibratorje A in B

Reagente pripravimo po slednjem postopku:

- V vialo s pipeto odpipetiramo 2,0ml dionizirane ali destilirane vode,
- Vialo pustimo stati 10-15 minut pri 18-25°C, da pride do popolnega raztapljanja,
- Temeljito premešamo vialo z rahlim obračanjem, pazimo, da se vsebina ne začne peniti.

3.3.3. Postopek

Vsi reagenti so označeni s črtnimi kodami, ki jih aparat prepozna in mu omogočajo prepoznavanje vsebine. V kolikor se čitalec pokvari, je možno kodo vnesti ročno (preglednica VII).

Postopek testa v analizatorju je sledeč:

- Redčenje vzorcev in kontrol s pufrom,
- vstavljanje kalibratorjev, kontrol ali vzorcev, katerih količina je 200 µL,

- temu sledi dodajanje 20 μL magnetnih delčkov, ki so prevlečeni z anti-renin in prorenin monoklonskimi protitelesi,
- pustimo 15 minut, da se inkubira (protitelesa iz vzorca ali kontrole se vežejo na trdno fazo),
- po končani inkubaciji speremo z izpiralnim pufrom, da odstranimo nevezane delčke,
- nato dodamo 100 μL konjugata,
- zopet inkubiramo 15 minut (konjugat reagira s protitelesi, vezanimi na trdno fazo),
- speremo z izpiralnim pufrom, da odstranimo nevezane delčke,
- temu sledi merjenje oddane svetlobe.

Preglednica VII: Postopek metode CLIA

količina	sestavina
200 μL	kalibrator, kontrola ali vzorec
20 μL	prevlečeni magnetni delci
100 μL	konjugat
čas	
30 minut	inkubacija, katerima sledi spiranje
3 sekunde	merjenje

4. REZULTATI

V tem poglavju so podane vse meritve in izračuni, ki smo jih izvedla z metodo CLIA pri njeni validaciji. Podane so tudi vse meritve, ki sem jih izvedla pri analizi kontrolnega materiala z obema metodama, RIA in CLIA ter izračuni teh meritev z katerimi sem primerjala metodi.

4.1. Validacija metode CLIA

Za validacijo nove metode je potrebno izvesti vse meritve, ki nam zagotavljajo, da bo metoda, v našem primeru je to metoda CLIA, dala točne in zanesljive rezultate.

4.1.1. Interference

Študije za nadzorovanje motečih snovi so pokazale, da koncentracije bilirubina do 20 g/L, hemoglobina do 500 g/L ali trigliceridov do 3000 g/L ne vplivajo kot interference. Ta del validacije smo izvedli tako, da smo serumu dodali različne količine seruma z višjimi koncentracijami bilirubina in trigliceridov ter različne volumne krvi (kot dodatek hemoglobina).

4.1.2. Natančnost metode (preciznost)

Izvedli smo meritve (preglednica VIII, IX, X) vzorcev z različnimi plazemskimi koncentracijami renina za določitev ponovljivosti metode (to pomeni znotraj ene serije in med serijama). Vzeli smo 4 ali 5 poolov (Lot No 1-4 in znotraj tega različne poole) in 2 kontroli. Meja vrednosti koeficienta variacije, ki je predstavljal, da za metodo lahko rečemo da je še natančna je bila do 15 %. Meje so pri različnih metodah različne in se gibljejo med 5 % do 15 %. Mi smo na začetku pustili večje sipanje rezultatov, pri naslednjih meritvah pa manjše. Po končanih meritvah smo dobili naslednje rezultate.

Preglednica VIII: Ponovljivost oziroma meritve znotraj serije (opravljenih je bilo dvajset meritev v isti seriji).

Ponovljivost	A	B	C	D	Kontrola 1	Kontrola 2
Število določitev	20	20	20	20	20	20
Srednja vrednost (mIU/L)	15,1	33,8	82,2	258,0	27,1	99,0
Standardna deviacija (mIU/L)	0,6	0,9	1,7	3,1	1,5	2,3
Koeficient variacije (%)	3,7	2,8	2,0	1,2	5,6	2,4
Minimalna vrednost (mIU/L)	13,4	32,4	78,5	252,8	24,1	95,3
Maksimalna vrednost (mIU/L)	15,7	35,9	84,6	264,4	29,9	102,5

Pri meritvah med serijami je bilo dvajset meritev izvedenih v različnih dneh z dvema različnima LOT-oma. Meritve smo izvedli v 10 dneh, po dve meritvi na dan za vsak pool in 2 kontroli. Test je bil izveden na dveh različnih analizatorjih, in sicer na analizatorju 1, preglednica IX in na analizatorju 2, preglednica X, v istem laboratoriju. Vzorce smo shranjevali v zamrzovalniku, pred uporabo pa smo jih segreli na sobno temperaturo.

Preglednica IX: Ponovljivost med serijami, ki so bile izvedene na analizatorju 1.

Ponovljivost	E	A	B	C	D	Kontrola 1	Kontrola 2
LOT No. 02							
Število določitev	20	20	20	20	20	20	20
Srednja vrednost (mIU/L)	5,1	13,2	34,1	82,4	260,3	27,2	103,2
Standardna deviacija (mIU/L)	0,5	1,6	1,9	4,3	12,3	1,9	4,4
Koeficient variacije (%)	10,0	12,4	5,7	5,2	4,7	6,9	4,2
Minimalna vrednost (mIU/L)	4,1	11,4	30,8	74,3	241,6	24,3	93,7
Maksimalna vrednost (mIU/L)	5,9	17,2	38,4	88,7	278,8	30,4	111,0
LOT No. 04							
Število določitev	20	20	20	20	20	20	20
Srednja vrednost (mIU/L)	5,3	13,1	34,7	83,5	266,7	27,3	102,9
Standardna deviacija (mIU/L)	0,5	1,7	1,8	2,8	7,8	1,8	3,3
Koeficient variacije (%)	9,5	12,8	5,3	3,4	2,9	6,6	3,2
Minimalna vrednost (mIU/L)	4,4	10,9	31,8	77,4	254,9	24,3	93,9
Maksimalna vrednost (mIU/L)	6,9	17,7	40,3	88,4	282,7	31,7	107,2
Koeficient variacije med različnimi serijami reagentov (%)	2,7	0,6	1,2	0,9	1,7	0,4	0,2

Preglednica X: Ponovljivost med serijami, ki so bile izvedene na analizatorju 2.

Ponovljivost	A	B	C	D	Kontrola 1	Kontrola 2
LOT No. 01						
Število določitev	20	20	20	20	20	20
Srednja vrednost (mIU/L)	18,8	38,4	79,1	228,6	27,5	97,2
Standardna deviacija (mIU/L)	3,1	2,8	5,9	22,4	1,9	9,5
Koeficient variacije (%)	16,5	7,4	7,5	9,8	7,0	9,8
Minimalna vrednost (mIU/L)	15,8	34,2	61,1	188,6	24,2	83,0
Maksimalna vrednost (mIU/L)	26,4	44,1	88,9	270,0	32,0	116,5
LOT No. 03						
Število določitev	20	20	20	20	20	20
Srednja vrednost (mIU/L)	15,8	34,8	85,4	260,8	26,8	103,2
Standardna deviacija (mIU/L)	2,7	2,1	5,2	26,5	2,8	7,5
Koeficient variacije (%)	17,1	6,1	6,1	10,2	10,6	7,3
Minimalna vrednost (mIU/L)	12,9	32,3	75,2	214,5	22,1	91,0
Maksimalna vrednost (mIU/L)	22,7	38,4	93,7	306,2	31,7	116,3
Koeficient variacije med različnimi serijami reagentov (%)	12,2	7,0	5,4	9,3	1,9	4,2

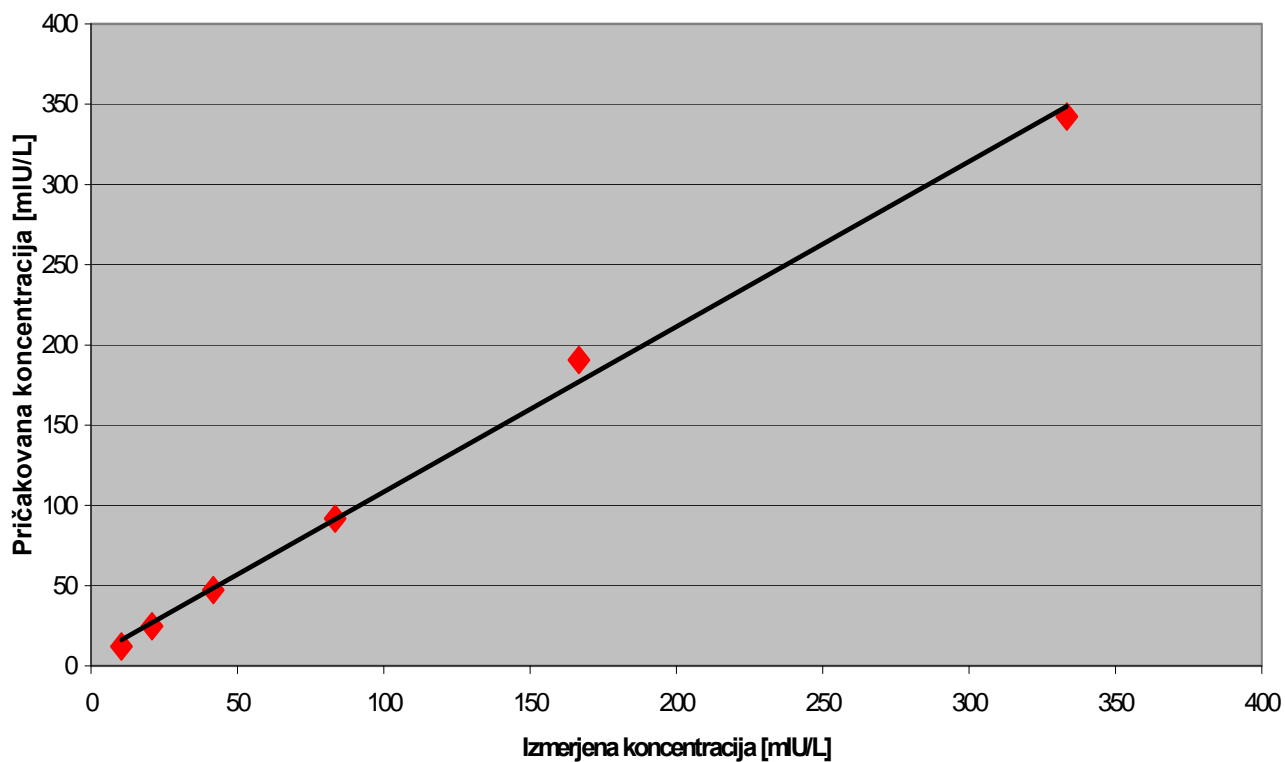
4.1.3. Linearnost metode

Plazemske vzorce, ki vsebujejo visoke koncentracije renina, smo testirali nerazredčene in po razredčitvi. Vzeli smo nativni pool vzorec oziroma standard z znano koncentracijo in ga najprej razredčili v razmerju 1:1, nato 1:2 in tako naprej. V prvo epruveto smo dali 100 μ L standarda, v ostale, ki smo jih označili z 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 pa 50 μ L fiziološke raztopine. Nato smo iz prve epruvete vzeli 50 μ L in prenesli v drugo (označeno z 1:1). Epruveto smo dobro premešali in 50 μ L iz druge epruvete prenesli v tretjo. Tako smo ponavljali do konca.

V prvi fazi validacije postopka smo vzeli kot sprejemljiv rezultat, rezultat v območju $\pm 20\%$ (slika8). V naslednjih serijah so kriterije znižali na $\pm 15\%$. Dobili smo slednje rezultate (preglednica XI).

Preglednica XI: Rezultati, merjeni pri posameznih razredčitvah, z namenom ugotavljanja linearnosti metode.

Redčenje	Pričakovana koncentracija (mIU/L)	Izmerjena koncentracija (mIU/L)	Točnost (%)	Redčenje	Pričakovana koncentracija (mIU/L)	Izmerjena koncentracija (mIU/L)	Točnost (%)
Brez redčitve	333,4	342,3	102,7	Brez redčitve	793,2	>500,0	-
1:2	166,7	190,5	114,3	1:2	396,6	405,1	102,1
1:4	83,4	91,7	110,1	1:4	198,3	200,0	100,9
1:8	41,7	47,3	113,5	1:8	99,1	103,1	104,0
1:16	20,8	24,7	118,6	1:16	49,6	51,3	103,6
1:32	10,4	12,1	116,3	1:32	24,8	26,2	105,8



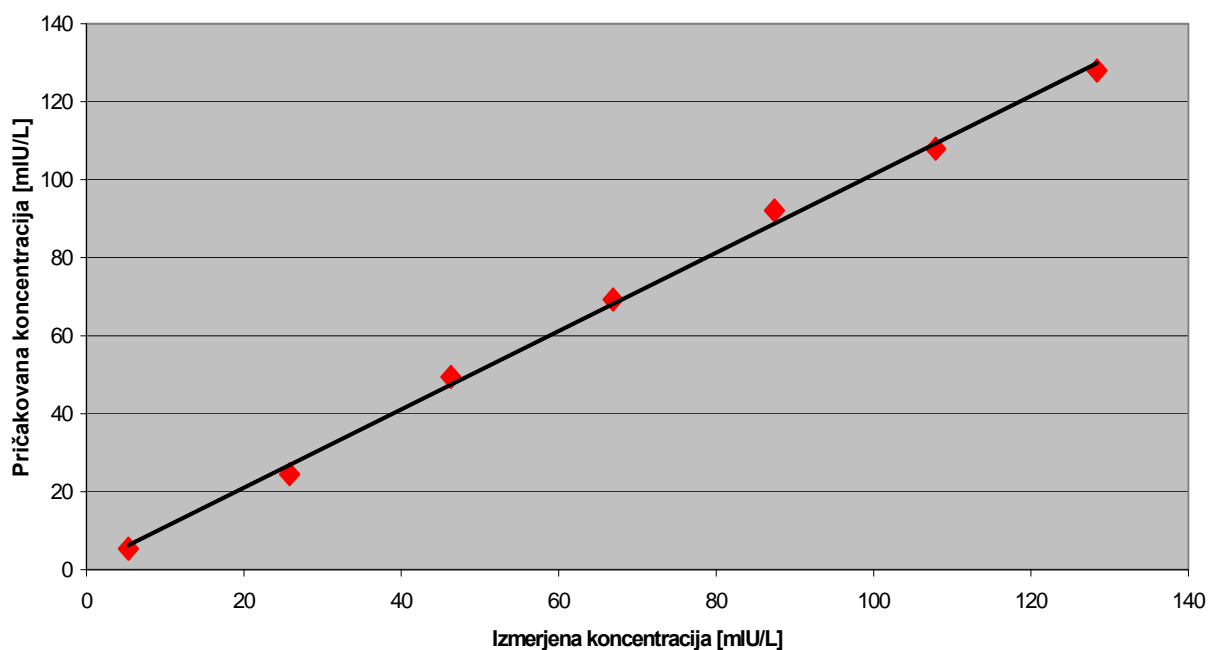
Slika 8: Grafični prikaz s katerim smo pokazali, da so izmerjene vrednosti znotraj pričakovanih vrednosti zato lahko rečemo, da je metoda linearna. Rezultate smo vzeli iz levega dela zgornje tabele.

4.1.4. Pravilnost metode

Test za ugotavljanje pravilnosti smo izvedli z testom za točnost (preglednica XII). Kot sprejemljiv rezultat, smo vzeli rezultat v območju $\pm 20\%$ (slika 9).

Preglednica XII: Imamo dva seta vzorcev (vzorca X in Y v setu 1 in vzorca W ter Z v setu 2), z nizko (redčenje) in visoko koncentracijo renina(dodajali smo renin, po priporočilu proizvajalca), pridobljene iz vzorcev z normalno koncentracijo renina.

Set 1	Pričakovana koncentracija (mIU/L)	Izmerjena koncentracija (mIU/L)	Točnost (%)	Set 2	Pričakovana koncentracija (mIU/L)	Izmerjena koncentracija (mIU/L)	Točnost (%)
X brez redčitve	5,3	5,4	101,9	W brez redčitve	23,9	23,1	96,7
5:1	25,8	24,5	95,0	5:1	65,4	62,3	95,2
2:1	46,3	49,4	106,6	2:1	106,9	103,4	96,7
1:1	66,9	69,3	103,6	1:1	148,4	148,4	100,0
1:2	87,4	92,1	105,4	1:2	189,9	186,6	98,2
1:5	107,9	108,0	110,1	1:5	231,4	230,0	99,4
Y brez redčitve	128,4	128,0	99,7	Z brez redčitve	272,9	272,0	99,7



Slika 9: Grafični prikaz s katerim smo pokazali, da so izmerjene vrednosti znotraj pričakovanih vrednosti zato lahko rečemo, da je metoda pravilna oziroma točna. Rezultate smo vzeli iz levega dela zgornje tabele.

4.1.5. Referenčne vrednosti

Spodaj navedene referenčne vrednosti (preglednica XIII) so predlagane od proizvajalca. Za pridobitev lastnih referenčnih vrednosti, bi morali izbrati ustrezno populacijo in izvesti določanje.

Preglednica XIII: Referenčne vrednosti koncentracije plazemskega renina

	Ležeči položaj	Pokončen položaj
Vrednosti plazemskega renina (mIU/L)	2,8 - 39,9	4,4 – 46,1

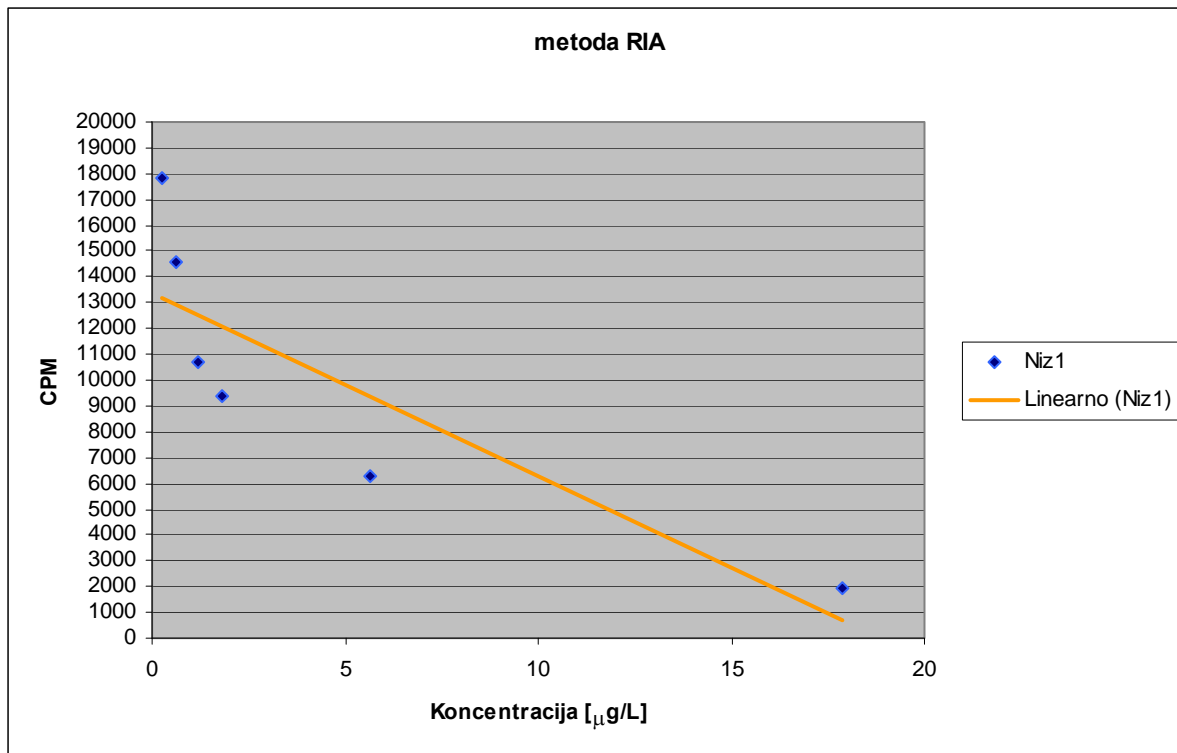
4.2. Primerjalna analiza kontrolnega materiala

Kontrolni material, ki smo ga uporabili pri izvajanju metod, je bil komercialni preparat firme BIO-RAD, ter tudi kontrolni material, ki je priložen reagenčnim setom. Izvedli smo po 27 meritev, s 6 različnimi naključno izbranimi vzorci ter 3 kontrolnimi materiali, z obema metodama in dobili slednje rezultate (preglednica XIV) in izračune (slika 10,11, 12).

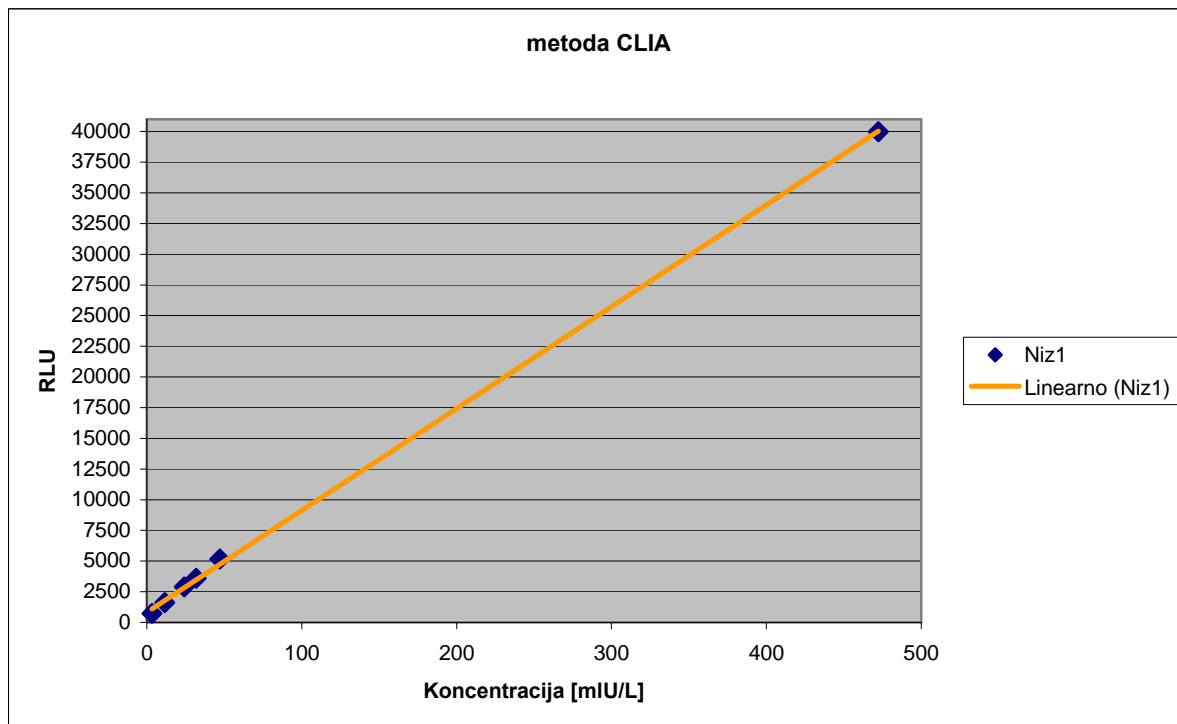
Preglednica XIV: Rezultati meritev vzorcev in kontrolnega materiala z metodo RIA in CLIA, ter izračuni primerjave obeh metod.

	RIA (µg/L)	CLIA (mIU/L)
A	0,306	3,5
	0,212	2,5
	0,303	4,0
Povprečna vrednost A	0,274	3,3
B	0,609	10,6
	0,638	10,5
	0,685	13,9
Povprečna vrednost B	0,644	11,7
C	1,153	25,1
	1,190	22,6
	1,221	24,8
Povprečna vrednost C	1,188	24,2
D	5,202	47,4
	6,585	48,4
	5,139	45,4

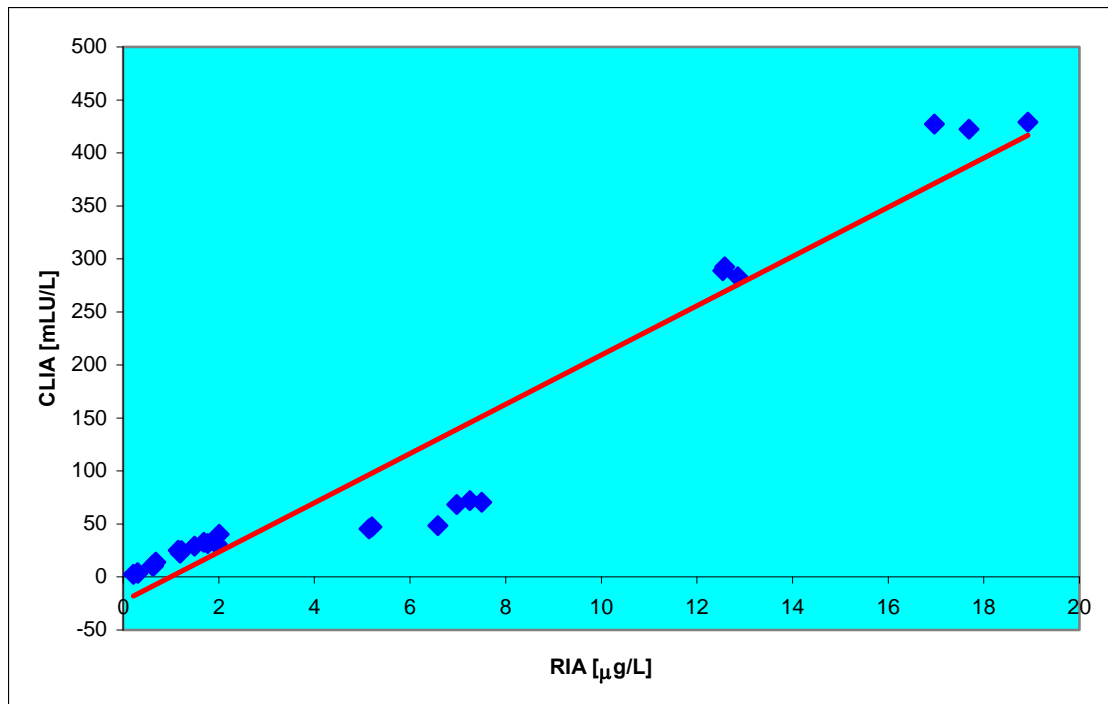
povprečna vrednost D	5,642	47,1
E	17,688 18,923 16,965	422,3 429,1 427,3
Povprečna vrednost E	17,859	426,2
F	1,689 1,769 1,960	32,8 31,5 31,3
Povprečna vrednost F	1,806	31,9
BIORAD 1	2,009 1,493 1,965	40,3 29,2 30,5
povprečna vrednost BIORAD 1	1,822	33,3
BIORAD 2	6,974 7,252 7,502	68,4 72,0 70,4
povprečna vrednost BIORAD 2	7,243	70,3
BIORAD 3	12,578 12,857 12,544	292,6 283,1 288,8
povprečna vrednost BIORAD 3	12,660	288,2
Vsota vseh meritev Σ	147,411	2808,300
Povprečna vrednost vseh meritev	5,460	104,011
Korelacijski koeficient	0,964	



Slika 10: Prikaz linearnosti rezultatov pridobljenih z metodo RIA



Slika 11: Prikaz linearnosti rezultatov pridobljenih z metodo CLIA



Slika 12: Razmerje med vrednostmi meritev izmerjenih z metodo RIA in metodo CLIA (n=27)

Izračuni:

$$\sum_{RIA} = X_1 + X_2 + \dots + X_{27} \dots \text{vsota vseh meritev RIA}$$

$$\sum_{RIA} = 0,306 + 0,212 + \dots + 12,544 = \underline{\underline{147,411}}$$

$$\sum_{CLIA} = X_1 + X_2 + \dots + X_{27} \dots \text{vsota vseh meritev CLIA}$$

$$\sum_{CLIA} = 3,5 + 2,5 + \dots + 288,8 = \underline{\underline{2808,300}}$$

$$\bar{X}_{RIA} = \frac{\sum_{RIA}}{n} \dots \text{povprečna vrednost vseh meritev metode RIA}$$

$$\bar{X}_{RIA} = \frac{147,441}{27} = \underline{\underline{5,460}}$$

$$\bar{X}_{CLIA} = \frac{\sum_{CLIA}}{n} \dots \text{povprečna vrednost vseh meritev metode CLIA}$$

$$\bar{X}_{CLIA} = \frac{2808,300}{27} = \underline{\underline{104,011}}$$

$$r = \frac{n \cdot \sum xy - \sum x \cdot \sum y}{\sqrt{(n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2) \cdot (n \cdot \sum y^2 - (\sum y)^2)}} \dots \text{korelacijski koeficient}$$

$$r = \frac{27 \cdot 12198,952 - 147,411 \cdot 2808,300}{\sqrt{(27 \cdot 1718,130 - (147,411)^2) \cdot (27 \cdot 823894,580 - (2808,300)^2)}} = \underline{\underline{0,964}}$$

$$r^2 = 0,964^2 = 0,930 \Rightarrow 93\% \dots \text{determinacijski koeficient}$$

5. RAZPRAVA

Povišana ali znižana koncentracija renina se pojavlja pri velikem številu bolezni. Eden najpogostejših vzrokov je povišan krvni tlak, spremembe v koncentraciji najdemo tudi pri sekundarnem in primarnem aldosteronizmu, kronični odpovedi ledvic, hipokaliemiji, srčnem popuščanju, Barterjevem sindromu, kongenitalni adrenalni hiperplaziji in še bi lahko naštevali. Zaradi tega je merjenje koncentracije renina zelo pomembno. Pomembno pa je tudi, katera metoda se pri tem uporablja. Zato je bil osnovni cilj diplomske naloge, da smo ugotovili ali je metoda CLIA primernejša od metode RIA, ter s tem prikazali slabosti oziroma pomanjkljivosti obstoječe metode RIA.

Metodo CLIA je bilo najprej potrebno validirati. Določili smo natančnost oziroma preciznost metode znotraj serije in med serijama. Iz meritev smo izračunali koeficient variacije, ki nam je potrdil natančnost metode, saj se je nahajal znotraj vrednostne meje, ki je bila do 15%. Do odstopanja je prišlo le v primeru vzorca A v tabeli X, kar pa lahko zanemarimo, saj so odstopanja minimalna. Tudi z meritvami, ki so bile potrebne za določitev točnosti metode smo potrdili, da je metoda točna, saj so se njene vrednosti nahajajo znotraj $\pm 20\%$ odstopanja, kar je prikazano tudi z grafom. Dokazali smo, da na metodo ne vplivajo nobene interference. Z vsemi temi meritvami, ki so bile potrebne za validacijo metode CLIA smo potrdili, da nam bo slednja pri meritvah dajala zanesljive rezultate, zato smo lahko nadaljevali z meritvami, ki so bile potrebne za primerjavo obeh metod.

Za metodo CLIA še ni narejenih študij v zvezi določanja renina. Zato sem za primerjavo vzela raziskavo, kjer so prav tako validirali metodo CLIA, vendar so nato z izvajali analize za vzorce, ki so vsebovali druge snovi. Metoda je tudi pri določanju teh snoveh dajala dobro natančnost, linearnost, in obnovitev (24).

Pripravili smo 6 poolov vzorcev ter 3 kontrole proizvajalca BIO-RAD za vsako metodo. Vzorci so vsebovali različne koncentracije plazemskega renina. Analizirali smo jih po protokolu posamezne metode ter nato rezultate primerjali med seboj. Večje število vzorcev je bilo potrebno ker smo izvedli tudi postopek validacije, poleg tega pa nam večje število da tudi reprezentativen in zanesljivejši rezultat.

Pridobljene rezultate obeh metod pri naši raziskavi smo primerjali med seboj in prišli do slednjih podatkov in ugotovitev. Vsota rezultatov metode RIA je 147,41, njihova povprečna vrednost je 5,46, vsota rezultatov metode CLIA je 2808,30, povprečna vrednost pa 104,01. Rezultata metode CLIA sta višja kot rezultata metode RIA, to pa zato, ker pri metodi RIA merimo le aktivnost renina v vzorcu, pri metodi CLIA pa direktno koncentracijo renina v vzorcu. Temu primerni so tudi rezultati meritev vzorcev in kontrole, pri RIA metodi so nižji, pri CLIA višji. Ker gre za merjenje različnih parametrov, so različne tudi merske enote, ki so pri metodi RIA $\mu\text{g/L}$, pri metodi CLIA pa mLU/L .

Iz literature smo potrdili podatek da sistem RIA ne določi celotnega renina v plazmi, ampak samo njegovo aktivnost. Do tega spoznanja so prišli Mochida in sodelavci, ko so si prizadevali potrditi, da metoda RIA resnično določa plazemsko koncentracijo renina (23).

Prikazana sta tudi grafa linearnosti posamezne metode, iz katerih je razvidno, da dajejo rezultati metode CLIA večjo linearnost, zato je metoda tudi primernejša.

Poleg razlike v rezultatih obeh metod se razlika kaže tudi v izvajanju postopka. Pri metodi CLIA gre za enostaven, hiter postopek. Vsi reagenti, ki smo jih uporabljali so bili označeni s črtnimi kodami, ki jih je prepoznal aparat. Če se čitalec kod pokvari, pa jih je možno vnesti tudi ročno. Naša naloga je bila, da smo v aparaturo vstavili vzorec in počakali na rezultate meritev, saj je vse avtomatizirano. Poleg tega, da je izvedba metode enostavna, je tudi zelo hitra, inkubacijska doba traja le 30 min, meritve pa približno 3 sekunde.

Pri metodi RIA je bilo potrebno kalibratorje, označevalce in vzorec odpipetirati ročno. Pipetirati je bilo potrebno tudi po končani inkubaciji, ko smo odpipetirali vsebino iz epruvete, pri čemer smo morali paziti, da smo se s konico pipete dotikali dna prevlečene epruvete in s tem odstranili vso tekočino. Zaradi ročnega dela je večja verjetnost, da bo prišlo do napake in s tem do lažnih rezultatov, kot pa pri avtomatizirani metodi. Poleg ročnega dela, ki je zamudno, nam čas izvedbe podaljša tudi inkubacijski čas, ki je trajal 3 do 24 ur. Inkubaciji je sledilo še merjenje z aparaturami. Pri metodi RIA smo morali poleg meritev kontrole in vzorcev izmeriti tudi slepe vzorce in slepo kontrolo, česar nam pri metodi CLIA ni bilo potrebno narediti. Metoda je zaradi uporabe številnega materiala in drage posebne opreme tudi s tega vidika manj primerna kot metoda CLIA.

Velika slabost metode RIA je, da je metoda izotopska, kar pomeni, da gre za uporabo radioaktivnih snovi, in sicer za radioaktivni izotop ^{125}I . Zato je potrebno upoštevati ustrezne varnostne ukrepe pri skladiščenju, rabi ter po končani uporabi. Obvezna je uporaba zaščitne opreme kot so rokavice, zaščitna očala, halja, zaposleni pa morajo imeti tudi osebni dozimeter in redne zdravniške preglede. Paziti moramo, da ne pipetiramo z usti, ne jemo in pijemo v prisotnosti radioaktivnega materiala, steklovino oz drug pribor, ki se je uporabljal za izvedbo metode, je potrebno dobro sprati z vodo, preden jo čistimo. Ves radioaktivni material, ki ostane po končani analizi, shranjujemo pet razpolovnih (razpolovna doba je v tem primeru 5 tednov) dob v svinčeni omari, nato pa je organiziran ustrezen odvoz.

S temi podatki lahko potrdimo domnevo o primernejši uporabi metode CLIA. Z direktnimi določitvami koncentracije renina dobimo zanesljivejše rezultate, ter se izognemo merjenju radioaktivnosti, kjer dobimo aktivnost plazemskega renina.

6. SKLEP

1. Med seboj smo primerjali dve metodi za določanje plazemskega renina. Obstoječo indirektno izotopsko metodo RIA in novo direktno neizotopsko metodo CLIA.
2. Ugotovili smo, da so spremembe v koncentraciji plazemskega renina vedno pogostejši pojav pri različnih boleznih, zato je uporaba enostavne, zdravju neškodljive, cenovno dostopnejše metode vedno bolj potrebna.
3. Meritve, ki so bile izvedene za validacijo nove metode CLIA, so nam zagotovile, da bo metoda dala točne in zanesljive rezultate.
4. Rezultati, pridobljeni s primerjavo obeh metod, so pokazali, da je metoda CLIA primernejša, saj z njo določujemo direktno koncentracijo plazemskega renina, pri metodi RIA pa gre le za dokaz aktivnosti oziroma prisotnosti plazemskega renina v vzorcu.
5. Ugotovili smo tudi, da je metoda RIA zamudnejša, saj se večino dela opravi ročno, zdravju škodljiva, ker vsebuje radioaktivni izotop ^{125}I ter dražja, ker se pri njenem izvajanju uporabi veliko materiala in draga posebna oprema.
6. Menimo, da so ti podatki zadostno dokazilo za nadomestitev metode RIA z metodo CLIA.

7. LITERATURA:

1. Martinčič Š. D, Cör A, Cvetko E, Marš T: Anatomija, histologija in fiziologija, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2007: 85, 143-149
2. Boyer, Rodney F: Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 125-145
3. Južinič S. A: Določanje koncentracije prorenina in renina v plazmi in folikularni tekočini pri indukciji ovulacije, diplomska naloga, 1997: 1-7, 22-28
4. Wolf G: The renin - angiotensin system and progression of renal diseases, University of Hamburg , Germany, 2001: 1-4
5. Marc J: Navodila in dnevnik za vaje iz klinične biokemije II, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2008: 17-21
6. Kotnik V, Šerbec Č. V, Ihan A, Jeras M, Malovrh T, Simčič S, Škoberne M, Wraber B: Imunologija priročnik za vaje, Medicinski razgledi, Ljubljana, 2001: 5, 37-38
7. Vozelj M: Temelji imunologije, DZS, Ljubljana, 2000:111-112
8. Osredkar J: Izbrana poglavja iz klinične kemije, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2008: 315-319
9. Lock S, Smith A: Družinski zdravstveni leksikon, Mladinska knjiga, Ljubljana, 1980: 279
10. W. Funder W. J, Carey M.R, Fardella C, Gomez-Sanchez E. C, Mantero F, Stowasser M, Young Jr F. W, Montori M. V: Case Detection, Diagnosis, and Treatment of Patients with Primary Aldosteronism, Endocrine Society 2008;0104;9-13
11. Duncan J. Campbell: Interpretation of Plasma Renin Concentration in Patients Receiving Aliskirn Therapy, Hypertension 2008;51;15-18
12. Robertson J.I.S, Nicholls M.G: The renin-angiotensin system, Gower Medical Publishing, London, 1993: 4.1-4.17, 64.1- 64.15, 76.1-76.14,
13. Pihlar B: Osneove analize kemije, Zapiski predavanj, 2. del, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 1998: 127
14. Marc J: Navodila in dnevnik za vaje iz klinične biokemije I, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2006: 31-34
15. Štraus B: Medicinska biokemija, Medicinska naklada, Zagreb, 1992: 282-284
16. DiaSorin: LIASON[®] Direct Renin (310470), Saluggia, Italija, 2006

17. Kocjančič A, Mrevlje F, Štajer D: Interna medicina, Littera picta, Ljubljana 2005: 861-863
18. Mochida Y, Tsuchida Y, Hata J, Komura M, Nishiura M: Characterization of a radioimmunoassay to determine plasma total renin, Tumour Biology and Medicine 1991; 12(2):75-81.
19. Singh AK, Jiang Y, White T, Spassova D: Validation of nonradioactive chemiluminescent immunoassay methods for the analysis of thyroxine and cortisol in blood samples obtained from dogs, cats, and horses, Journal of veterinary diagnostic investigation 1997; 9(3):261-8.
20. <http://en.wikipedia.org/wiki/Renin>
21. <http://en.wikipedia.org/wiki/Enzyme>
22. <http://en.wikipedia.org/wiki/Hypertension>
23. <http://www.mf.uni-mb.si/slike/Gradivo/Fiziologija07/Arterijska%20hiper%20in%20hipotenzija.doc>
24. <http://www.medenosrce.net/pogled.asp?ID=537>
25. <http://en.wikipedia.org/wiki/Hyperaldosteronism>
26. http://en.wikipedia.org/wiki/Heart_failure
27. <http://www.medenosrce.net/pogled.asp?ID=1232>
28. http://en.wikipedia.org/wiki/Bartter_syndrome
29. http://www.farma-drustvo.si/gradivo_p/Kakovost%20zdravil/PREDAVANJA/validacije.pdf

8. LITERATURA SLIK:

1. Južinič S. A: Določanje koncentracije prorenina in renina v plazmi in folikularni tekočini pri indukciji ovulacije, diplomska naloga, 1997
2. Kocjančič A, Mrevlje F, Štajer D: Interna medicina, Littera picta, Ljubljana 2005: 863