

SERUM DİGOKSİN KONSANTRASYONLARININ EIA VE RIA METODLARI İLE KARŞILAŞTIRMALI ÖLÇÜMLERİ

Yrd. Doç. Hülya SARIKAHYA*

Kim. Müh. Pınar ULUGÖL**

Doç. Dr. Gültaç ÖZBAY***

Bu çalışmada, konjestif kalp yetmezliği ve bazı aritmilerin tedavisinde kullanılan digoksinin serum konsantrasyon değerleri Enzimimmunoassay (EIA) ve Radyoimmunoassay (RIA) gibi iki farklı metotla ölçülmüş, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesinde 1984-1985 yıllarında yatan ve poliklinikte takip edilen 21 hasta üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu hastaların yaş ortalaması 54 olup, bütün hastaların günlük digoksin dozları 0,25 mg. İki farklı metotla elde edilen ölçüm değerleri bioistatistik yöntemlerle araştırılmıştır, ve sonuçta EIA ve RIA metotları arasında ileri derecede doğru bağıntı saptanmış ve böylece EIA metotunun RIA metodu kadar doğru, güvenilir ve spesifik olduğu ortaya çıkarılmıştır.

SUMMARY

THE COMPARATIVE MEASUREMENTS OF SERUM DIGOXIN CONSANTRATIONS BY EIA AND RIA METHODS

This study was carried out on 21 out patients and inpatients who were treated in Trakya University hospital in 1984 and 1985 years. Serum digoxin consantrations were measured by different methods such as Enzym immunoassay (EIA) and Radioimmunoassay (RIA) in these patients. The mean age of them was 54 years and the daily dose of digoxin was 0,25 mg. Values obtained of digoxin by two different methods were investigated statistically. As a result, a significant positive correlation has been found between EIA and RIA methods. Thus, it has been established that EIA was a correct, spesific and reliable method as much as RIA.

GİRİŞ

Digitalis glikozidleri 200 yıldan beri tanınmakta olup, kalp yetmezliğinin ve bazı aritmilerin tedavisinde geniş ölçüde kullanılan ilaçlardır. Digoksin (digoxin) bunlardan biridir. Bu ilaçların tedavi edici ve toksik etkileri arasındaki sınırın oldukça dar oluşu klinikte sıklıkla beklenmeyen sonuçlarla

* Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biokimya ve İç Hastalıkları Anabilim Dalları—EDİRNE.
Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi—EDİRNE.

karşılaşılmasına yol açmaktadır. Bu sonuçlar, ya beklenen yararlı etkinin elde edilememesi veya beklenmeyen zehirlenme belirtilerinin ortaya çıkması şeklinde kendini göstermektedir. Klinikte bu durumların aydınlanmasında serum (veya plazma) digitalis konsantrasyonlarının, bizim çalışmamızda digoksin konsantrasyonunun, ölçülmesinin büyük ölçüde yararlı olduğu bildirilmektedir.

Günümüzde en çok kullanılan digoksin ölçüm metodları RIA (Radioimmunoassay) ve EIA (Enzimimmunoassay) metodlarıdır. RIA ilk defa 1959 yılında Dr. Yelowe ve Dr. Berson tarafından uygulanmıştır. EIA ve RIA metodundan geliştirilmiştir.

Her iki metod kompetitif protein bağlama temeline dayanan digoksin ölçüm metodlarıdır.

Biz bu çalışmamızda konjestif kalp yetmezliği olan ve tedavilerinde digoksin kullanan hastaların serum digoksin konsantrasyonlarını EIA ve RIA metodlarıyla ölçerek, iki metodu karşılaştırdık.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Klinikte serum digoksin konsantrasyonlarının ölçülmesi büyük önem taşımaktadır. Çünkü digoksinde tedavi edici ve toksik etki arasındaki sınır oldukça dardır ve bu klinikte beklenmeyen sonuçlarla karşılaşılmasına yol açmaktadır. 1969 yılında Smith ve arkadaşları toksik olmayan serum digoksin konsantrasyonlarını 0,8–2,4 ng/ml, olarak belirtmiştir. (29. 45).

Çalışmamızda konjestif kalp yetmezliği olan hastalardan aldığımız serum örneklerindeki digoksin düzeyleri RIA metodu ve EIA metodunun bir türü olan Elisa metodu ile ölçüldü.

ELISA METODU

Test yarışma prensibine dayanır. Birinci inkübasyon kademesinde (immunolojik reaksiyon) serum digoksin ve HRPO enzimiyle işaretli digoksin test tübü duvarına kaplanmış olan belirli sayıdaki digoksine spesifik antikora bağlanmak için yarışır. Antikor–digoksin–HRPO kompleksinin miktarı serumdaki digoksinin bir ölçüsüdür. Inkübasyondan sonra antikora bağlanmayan HRPO enzim işaretli digoksin, işaretsiz digoksin ve ortamdaki serum elemanlarını uzaklaştırmak için katı faz yıkanır. Enzim substrat ilave edilir. Maksimum renk oluşumu için belli bir süre beklenir, sonra her tüpteki renk şiddeti (absorbans) spektrofotometrede okunur.

Serumdaki digoksin konsantrasyonu arttıkça antikora bağlanan digoksin-HRPO kompleksinin miktarı azalır. Böylelikle enzim aktivitesi de azalır. Kit'le birlikte verilen standartların kullanılmasıyla bir kalibrasyon eğrisi hazırlanır ve bu eğri yardımıyla serumdaki bilinmeyen digoksin miktarı hesaplanır.

HESAPLAMA

Bağlama yüzdesinin bulunmasında kullanılan formül şöyledir:

$$\text{Bağlanma yüzdesi} = \frac{\text{NSB Düzeltilmiş Absorbans}}{\text{NSB Düzeltilmiş MB}} \times 100$$

$$\text{NSB Düzeltilmiş Absorbans} = \text{Ortalama Absorbans} - \text{Ortalama NSB Absorbans}$$

RIA METODU

Bu test de yarışma prensibine dayanır. I¹²⁵ le işaretli digoksin poli-propilen tüpün duvarına kaplanmış olan digoksine spesifik antikorla birleşmek için hasta serumundaki işaretli digoksin ile yarışır. İnkübasyondan sonra bağlı olmayan fraksiyonun bulunduğu sıvı faz dökülür. Boş tüpteki radyoaktivite gamma sayıcısında sayılır. Standartlar yardımıyla çizilen kalibrasyon eğrisinden bilinmeyen işaretli digoksin miktarı bulunur.

HESAPLAMA

$$\text{Bağlanma yüzdesi} = \frac{\text{Net Sayım}}{\text{Net MB Sayımı}} \times 100$$

$$\text{Net Sayım} = \text{Ortalama sayım/dak.} - \text{Ortalama NSB sayım/dak.}$$

RIA ve EIA metodlarıyla elde edilen serum digoksin konsantrasyonlarının karşılaştırılması "Student's-t" formülü ile yapılmış, (t) indeksi yardımıyla (P) olasılık değeri bulunmuştur. İki metodun değerleri arasındaki "Bravais-Pearson" doğrusal korelasyon katsayısı r hesaplanmıştır.

BULGULAR

Bu çalışma terapötik dozda digoksin kullanan, hastanede yatan ve poliklinik hastaları üzerinde yapıldı. Hastalardan kan alımı vücütta doygunluk

düzeyine varıldıktan sonra, digoksin preparatının ağızdan alınışından 6-8 saat geçtikten sonra gerçekleştirildi. Bundaki amaç, serum digoksin konsantrasyonunun 6-8 saat sonunda miyokard dokusuyla dengelenerek serum digoksin değerini vermesiydi. Hastalardan alınan kanlar fazla bekletilmeden serumlar ayrıldı ve -20°C de muhafaza edildi. 21 digoksin kullanan ve 10 digoksin kullanmayan toplam 31 olguda EIA ve RIA metodları çalışıldı. Bu hastalar tarafından deneylerin sonuçlarını etkileyebilecek olan kalsiyum antagonistleri, B blokörler, potasyum, diüretikler, antiaritmik ilaçlar ve digoksine spesifik antikora çapraz reaksiyon veren Deslanosid C ile Lanatosid C bileşikleri kullanılmamıştır.

Ayrıca bu hastaların serumunda lipemi, ve hemoliz saptanmamıştır. İhterli olanlar çalışmaya alınmamıştır.

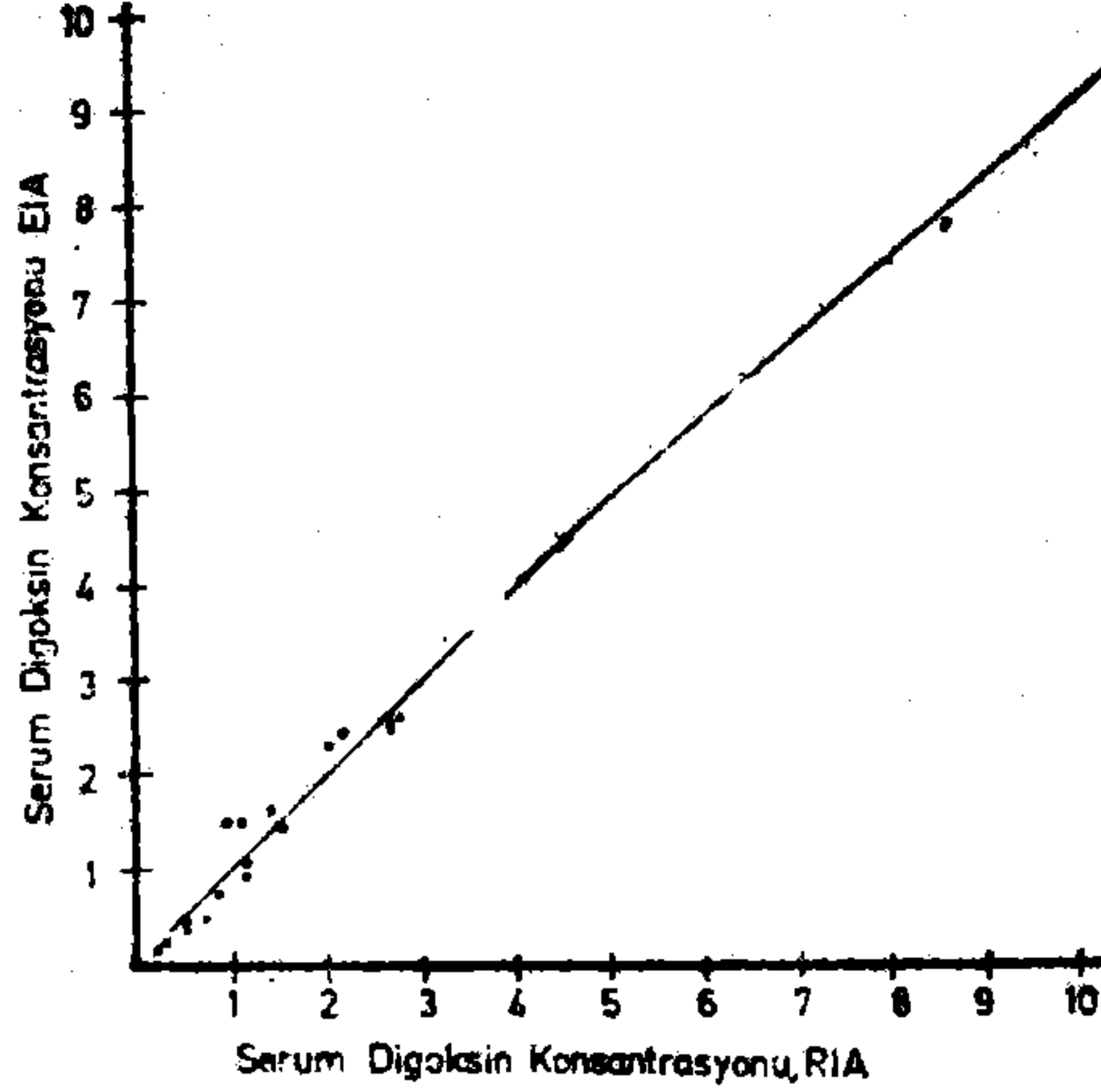
Serum digoksin konsantrasyonlarının RIA ve EIA metotlarıyla ölçülmesi sonucunda bulunan değerlerin birbiriyle karşılaştırılması (Tablo 1) de gösterilmiştir. RIA ve EIA değerlerinin uygunluğunun istatistik olarak ortaya konması için yapılan çalışmalarda $p = 0,001$ ve doğrusal korelasyon katsayısı $r = 0,9964$ olarak bulundu.

Tablo 1. RIA ve EIA Metodlarının Karşılaştırılması.

Hasta Adı	Aldığı Digoksin Miktarı	EIA Serum Digoksin Konsantrasyonları (ng/ ml)	RIA Serum Digoksin Konsantrasyonları (ng/ ml)
MÇ.	0,25 mg/ gün	0,5	0,67
E.Ç.	"	0,65	0,60
M.B.	"	2,60	2,65
E.S.	"	0,95	1,15
İ.G.	"	0,78	0,82
A.Ö.	"	1,50	1,60
Ş.A.	"	1,50	1,50
G.G.	"	1,62	1,40
G.K.	"	1,15	1,10
A.A.	"	0,26	0,26
F.E.	"	0,44	0,50
A.Y.	"	1,50	1,60
E.İ.	"	2,40	2,15
F.Ç.	"	0,50	0,50
Ş.K.	"	0,22	0,22
Z.Y.	"	1,0	1,2
M.M.	"	8,2	8,4
H.G.	"	2,50	2,65
A.Ş.	"	2,30	2,00
A.A.	"	2,50	2,65
H.A.	"	2,60	2,70

Bulunan bu değerlerden iki metod arasında ileri düzeyde doğru bağıntı olduğu anlaşılmıştır.

Şekil (1)'de RIA ve EIA metodlarını karşılaştırmak için çizilen regresyon doğrusu gösterilmiştir.



Şekil 1. RIA ve EIA metodlarının karşılaştırılması.

İRDELEME VE SONUÇ

Bu çalışmada konjestif kalp yetmezliği görülen hastaların tedavisinde kullanılan Digoksinin serum düzeyi RIA ve EIA'nın bir türü olan ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay) metodlarıyla ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlardan EIA metodunun digoksin serum düzeyini ölçmede RIA metodu kadar basit, kesin, doğru ve spesifik olduğunu gördük. Bu bakımdan çalışmamız diğer bazı araştırmacıların bulgularını kanıtlamaktadır. (12, 19, 21, 32, 39).

EIA metodu ile elde ettiğimiz serum digoksin düzeyi ölçüm sonuçlarını RIA metoduyla elde ettiğimiz ölçüm sonuçlarıyla karşılaştırdığımızda korrelasyon katsayısını $r = 0,9964$ olarak bulduk. Bu değer bize iki metod arasında ileri düzeyde doğru bağıntı olduğunu gösterdi.

EIA ve RIA metodlarını karşılaştırmalı olarak ölçen araştırmacılar-
dan P. Harlow ve ark. korrelasyon katsayısını $r = 0,9720$ bulmuşlardır(19).
Başka bir grup Paul Fu ve ark. ise korrelasyon katsayısını $r = 0,930$ ola-
rak bulmuşlardır(12) C. Sockol ve G. Davis ise çalışmalarında korrelasyon
katsayısını $r = 0,950$ olarak bulmuşlardır(39).

EIA metodu spesifiklik ve hassasiyet açısından RIA'yla eşdeğerde olup
kısa dayanma süreli reaktiflerin bulunmayışı, tehlikesiz çalışma ortamı sağ-

lanması ve radyoaktif artıkların yok edilmesi gibi problemlerin olmayışı, çok pahalı araç ve gerece ihtiyaç duyulmaması, insan sağlığına zararlı radyoaktif işaretleyici kullanılmaması bakımından RIA metoduna üstünlük sağlamaktadır. (3, 30)

KAYNAKLAR

1. **Boraker, K.D.:** ELISA: *Current uses and New Application*, Clinical Laboratory Products, 3, 23-25, 1983.
2. **Fu, P.C., Vodian, M., Balga, M., Zie, V., H. den, B.:** *Performance Characteristics of a Competitive Solid Phase Enzyme Immunoassay for Serum digoxin*, Clin. Chem., 30/6, 1012, 1984. (Abstract).
3. **Harlow, P., Whitney, N., England, D., Elverson, R. and Simon, F.:** *Solid Phase Competitive Enzyme Immunoassay (EIA) for Digoxin*, Clin, Chem. 30/6, 1011, 1984. (Abstract).
4. **Kato, K., Hamaguchi, Ly, Okawa, S., Ishikawa, A., Kobayashi, K., Katunuma, N.:** *Enzyme Immunoassay in Rapid Progress*, Lancet, 40, 40, 1977.
5. **Oparil, S.:** *Digitalis Assay and its Clinical Application*, Medical Clin. North. Amer., 60, 193-199, 1976.
6. **Perlmann, P.:** ELISA: *A. Replacament for Radioimmunoassay*. Lancet, 8, 406-407, 1976.
7. **Schuurs, A.H.W.M., Vanweemen, B.K.:** *Enzyme Immunoasay*, Clin. Chem. Acta., 81, 1-35, 1977.
8. **Sockol, C., Davis, G., La France, A., Kurkjian, D.:** *Enzyme Immunoassay for Serum Digoxin*, Clin. Chem. 28/7, 1614, 1982 (Abstract).
9. **Walsh, P.P., Crawford, F. and Hawker, D.C.:** *Measurement of Digoxin by Radioimmunoassay* *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 7, 79-86, 1977.