

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

METKA AŠIČ

**POMEN DOLOČANJA KOMPONENTE KOMPLEMENTA C5b9 V
URINU PRI NAPREDOVALI LEDVIČNI ODPOVEDI**

**THE IMPORTANCE OF COMPLEMENT COMPLEX C5b9
DETERMINATION IN URINE IN PATIENTS WITH ADVANCED
RENAL FAILURE**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem., višjega svetnika.

Meritve koncentracije serumskega kreatinina in izračun ocene glomerulne filtracije ter meritve aktivnosti komponente komplemента C5b9 je opravilo osebje Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo (KIKKB) Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.

ZAHVALA

Prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm. se iskreno zahvaljujem za mentorstvo ter za vse napotke in strokovne nasvete pri pisanju diplomske naloge.

Hvala za vse in še mnogo več mojima staršema in bratu, predvsem pa mojim trem zlatim fantom - Filipu ter najinima sinčkoma, Juriju in Lukcu.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem., višjega svetnika.

Metka Ašič

Ljubljana, september 2016

Predsednik komisije: prof. dr. Aleš Mrhar, mag. farm.

Mentor: prof. dr. Joško Osredkar, mag. farm., spec. med. biokem., višji svetnik

Član komisije: doc. dr. Tihomir Tomašič, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO SLIK	III
KAZALO PREGLEDNIC	IV
POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1. UVOD	1
1.1 ZGRADBA IN VLOGA LEDVIC	1
1.1.1 Makroskopska zgradba ledvic	1
1.1.2 Mikroskopska zgradba ledvic.....	1
1.1.3 Vloga ledvic	2
1.2 NAPREDOVALA LEDVIČNA ODPOVED	3
1.3 DANAŠNJI PRISTOP K DIAGNOSTIKI LEDVIČNE	6
OKVARE	6
1.3.1 Ocena glomerulne filtracije.....	6
1.3.2 Koncentracija kreatinina v serumu.....	11
1.3.3 Proteinurija	12
1.4 KOMPONENTA KOMPLEMENTA C5b9	13
1.4.1 Sistem komplementa	13
1.4.2 Nastanek komponente komplementa C5b9.....	14
1.4.3 Pomen komponente C5b9 pri ledvičnih boleznih	14
1.4.4 Določanje komponente komplementa C5b9	15
2. NAMEN DELA	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1 OPIS SKUPINE	17
3.2 METODE	17
3.2.1 Jaffejeva metoda.....	17
3.2.2 Enačba MDRD	18

3.2.3 Imunoencimski test na trdni podlagi (ELISA)	18
3.2.4 Statistične metode	24
4. REZULTATI.....	26
4.1 REZULTATI MERITEV	26
4.2 TEST NORMALNE PORAZDELITVE	28
4.2.1 Test normalnosti starostne porazdelitve	28
4.2.2 Test normalnosti porazdelitve bolnikov glede na oGF	31
4.2.3 Test normalnosti porazdelitve meritev aktivnosti C5b9	33
4.3 STATISTIČNA ANALIZA KORELACIJE	37
4.4 ANALIZA VARIANCE	39
4.5 LINEARNA REGRESIJSKA ANALIZA	43
5. RAZPRAVA.....	45
6. SKLEP	49

KAZALO SLIK

Slika 1: Zgradba ledvice, vzdolžni prerez.....	1
Slika 2: Sestavni deli nefrona in zbiralce	2
Slika 3: Shematski prikaz nastanka MAC kompleksa, ki napade membrano	14
Slika 4: Reakcija kreatinina s pikrinsko kislino v alkalnem.....	18
Slika 5: Shematski prikaz neposrednega in posrednega testa ELISA.	19
Slika 6: Shematski prikaz dveh vrst sendvič ELISA testov.	20
Slika 7: Priprava raztopin standarda.....	22
Slika 8: Postopek ELISA testa za določanje aktivnosti C5b9	23
Slika 9: Diagram normalnosti starostne porazdelitve bolnikov	29
Slika 10: Diagram normalnosti porazdelitve bolnikov glede na oGF	31
Slika 11: Diagram porazdelitve meritev aktivnosti C5b9	34
Slika 12: Diagram normalnosti porazdelitve logaritmiranih meritev aktivnosti C5b9....	34
Slika 13: Odvisnost logaritma aktivnosti C5b9 od oGF.	37
Slika 14: Prikaz povprečnih vrednosti (s standardno napako) logaritma aktivnosti C5b9 v odvisnosti od srednje vrednosti treh skupin bolnikov z različnimi oGF.....	39

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Stopnje kronične ledvične bolezni, ki vodijo v končno ledvično odpoved ...	4
Preglednica II: Osnovni podatki o starosti bolnikov, ki so bili vključeni v študijo.....	17
Preglednica III: Podatki o bolnikih in pripadajoče meritve.....	26
Preglednica IV: Frekvenčna distribucija bolnikov po starosti	28
Preglednica V: Testiranje normalnosti starostne porazdelitve bolnikov po Kolmogorov-Smirnov postopku.....	29
Preglednica VI: Frekvenčna distribucija pacientov po oGF.....	31
Preglednica VII: Testiranje normalnosti porazdelitve bolnikov glede na oGF po Kolmogorov-Smirnov postopku.....	32
Preglednica VIII: Porazdelitev bolnikov glede na oGF po združitvi v tri skupine	33
Preglednica IX: Testiranje normalnosti porazdelitve logaritmiranih meritev aktivnosti C5b9 po Kolmogorov-Smirnov postopku.....	35
Preglednica X: Korelacijska študija in t-test Pearsonovega koeficienta	38
Preglednica XI: F-test za statistično primerjavo varianc med skupino bolnikov z oGF do 30 mL/min/1,73 m² in skupino z oGF nad 61 mL/min/1,73 m².....	40
Preglednica XII: Analiza variance med tremi skupinami bolnikov z različnimi oGF.....	41
Preglednica XIII: Studentov t-test za primerjavo povprečnih vrednosti logaritma aktivnosti med dvema skupinama bolnikov.....	42
Preglednica XIV: Linearna regresijska analiza korelacije med logaritmom aktivnosti C5b9 in oGF	43

POVZETEK

Komponenta komplementa C5b9 je protein, ki nastane v zadnji stopnji aktivacije sistema komplementa. Njegov nastanek je povezan s patogenezo ledvičnih bolezni, saj vpliva na povečano prepustnost glomerulne filtracijske membrane in posledični razvoj proteinurije.

Namen diplomske naloge je bilo ugotoviti klinično uporabnost komponente komplementa C5b9 pri napredovali ledvični odpovedi. O napredovali ledvični odpovedi govorimo takrat, kadar je vrednost glomerulne filtracije manj kot $90 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ telesne površine, poleg tega pa so prisotni eritrociturija, proteinurija in morfološke spremembe ledvic. Za opredelitev stopnje ledvične odpovedi uporabljamo dva parametra, in sicer serumsko koncentracijo kreatinina ter iz tega podatka izračunano oceno glomerulne filtracije (oGF). Glede na oGF nato v skladu s smernicami razdelimo napredovanje ledvične odpovedi v pet stopenj. V diplomski nalogi smo hoteli ugotoviti ali bi bil parameter C5b9 lahko dodaten označevalec za oceno zmanjšane delovanja ledvic in ali bi nam lahko pomagal pri opredelitvi stopnje ledvične okvare. Kot kazalec proteinurije bi parameter C5b9 lahko bil zgodnejši kazalec okvare ledvic kot oGF. Parameter oGF namreč ni zgođen pokazatelj napredovanja ledvične bolezni, saj je v začetni fazi zaradi prilagoditve neprizadetih nefronov glomerulna filtracija še normalna ali celo povišana.

S tem namenom smo 46 bolnikom z različno stopnjo okvare ledvične funkcije izmerili koncentracijo kreatinina v serumu in nato s pomočjo enačbe MDRD izračunali oGF. Bolnikom smo izmerili tudi aktivnost komponente C5b9 v urinu z uporabo imunoencimskega testa na trdni podlagi (ELISA). Dobljene rezultate smo statistično ovrednotili. Ugotovili smo, da med oGF in logaritmom aktivnosti komponente komplementa C5b9 obstaja signifikantno pomembna korelacija ($r = -0,36$). S tem smo potrdili, da bi parameter C5b9 lahko bil dodaten označevalec za oceno zmanjšane delovanja ledvic. Potrdili smo tudi, da je aktivnost C5b9 statistično različna med skupino bolnikov z najnižjo stopnjo okvare in skupino bolnikov z najvišjo stopnjo ledvične okvare. Iz tega sklepamo, da bi merjenje aktivnosti C5b9 v urinu lahko uporabili kot dodaten parameter pri opredelitvi stopnje ledvične okvare.

Ključne besede: komponenta komplementa C5b9, napredovala ledvična odpoved, ocena glomerulne filtracije.

ABSTRACT

Complement complex C5b9 is a protein which occurs in the last step of the activation of the complement system. Its formation is associated with the pathogenesis of kidney disease because it affects the increased permeability of the glomerular filtration membrane and the subsequent development of proteinuria.

The purpose of the thesis was to determine the clinical usefulness of complement component C5b9 in advanced renal failure. Advanced renal failure is determined by the value of the glomerular filtration rate is less than 90 mL/min /1.73m² body surface area, in addition, there are present erythrocyturia, proteinuria, and morphological changes in the kidneys. To describe the degree of renal failure we use two parameters, namely, serum creatinine, and from that information calculated assessment of glomerular filtration rate (oGF). According to the oGF then in accordance with the guidelines we divide the progression of renal failure in five stages. In this thesis, we wanted to determine whether the parameter C5b9 may be an additional marker for the assessment of reduced renal function or could help us in defining the degree of renal impairment. As an indicator parameter C5b9 proteinuria would be the earlier indicator of kidney damage as oGF. Parameter oGF is not an early indicator of progression of kidney disease, as it is in the initial stage due to adjustments in unaffected nephrons, glomerular filtration rate is normal or even elevated.

To this end, we studied 46 patients with different stage of advanced renal impairment with measured serum creatinine concentration and then we used the MDRD equation to calculate oGF. We also measured activity C5b9 components in urine using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Results were statistically evaluated. We found that comparing oGF and the logarithm of the activity of complement complex C5b9, there is a statistically significant correlation ($r = -0.36$). It was confirmed that the parameter C5b9 may be an additional marker for assessing the decrease of renal function. We also confirmed that the activity C5b9 is statistically different between the group of patients with the lowest levels of failure and a group of patients with the highest degree of renal impairment. From this we conclude that the measurement of C5b9 in the urine can be used as an additional parameter for determining the degree of renal impairment.

Key words: complement complex C5b9, advanced renal failure, glomerular filtration rate.

SEZNAM OKRAJŠAV

ACE	angiotenzinska konvertaza
ANOVA	analiza variance
BSA	telesna površina (angl. body surface area)
C5, C6, C7...	oznake za sestavine komplekta v neaktivni obliki
C5a, C5b...	oznake za cepitvene delce sestavin komplekta
C5b9	komponenta komplekta, terminalni litični kompleks
CG	Crockcroft-Gault
ELISA	imunoencimski test na trdni podlagi (angl. Enzyme Linked Imunosorbant Assay)
GC	plinska kromatografija (angl. Gas chromatography)
GF	glomerulna filtracija
IDMS	izotopska-dilucijska masna spektrometrija
IgA	imunoglobulin razreda A
IgG	imunoglobulin razreda G
K/DOQI	smernice za opredelitev kronične ledvične bolezni (angl. Kidney Disease Outcome Quality Initiative)
KLB	kronična ledvična bolezen
MAC	terminalni litični kompleks (angl. Membrane attack complex)
MDRD	angl. Modification of Diet in Renal Disease
NAG	<i>N</i> -acetil-beta-D-glukozaminidaza
oGF	ocena glomerulne filtracije
S-kreatinin	koncentracija serumskega kreatinina
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin

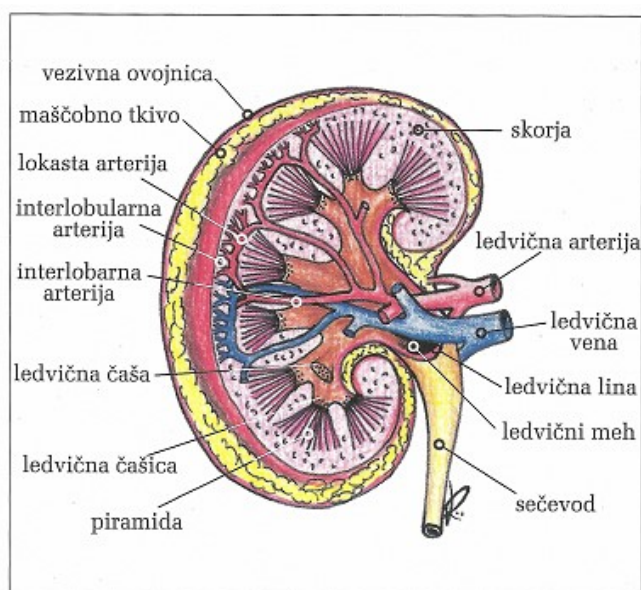
1. UVOD

1.1 ZGRADBA IN VLOGA LEDVIC

1.1.1 Makroskopska zgradba ledvic

Ledvici ležita na levi in desni strani pod trebušno prepono tik ob hrbtenici. Nahajata se med 12. prsnim in 2. ledvenim vretencem (1,3). Obe ledvici sta obdani s čvrsto vezivno ovojnico, ki jo obdaja maščobno tkivo (4).

Na vzdolžnem prerezu ledvice (Slika 1) ločimo ledvično skorjo in ledvično sredico. Sredica je sestavljena iz različnega števila (5-14) ledvičnih piramid (6). Vrhovi piramid se imenujejo ledvične papile in segajo v ledvično čašico. Manjše čašice prehajajo v večje, ki vodijo v ledvični meh. Ledvični meh se nadaljuje v sečevod, od koder seč odteka v sečni mehur. Iz sečnega mehurja izhaja sečnica (3,6).



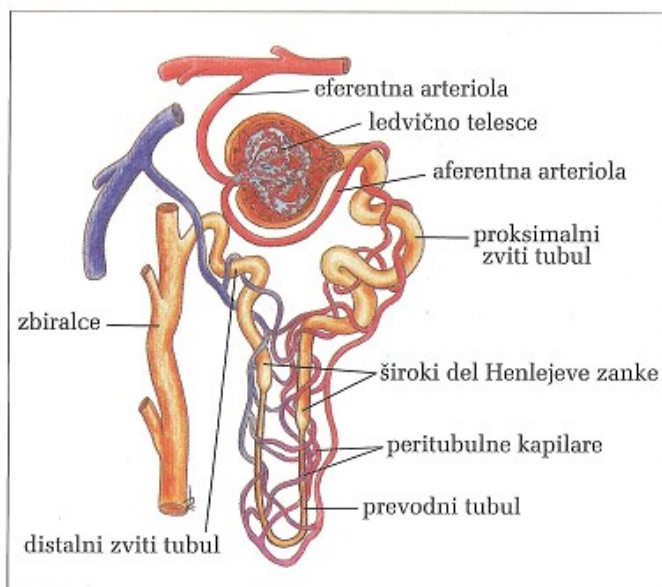
Slika 1: Zgradba ledvice, vzdolžni prerez (1).

1.1.2 Mikroskopska zgradba ledvic

Vsaka ledvica ima več kot milijon nefronov. Nefroni lahko neodvisno izvajajo specifične transportne procese in tako predstavljajo samostojno enoto ledvic. V nekaterih primerih, kot je koncentriranje urina, pa je potrebna funkcionalna povezanost med nefroni. Zato v

primeru propada večjega števila nefronov, ledvice niso več sposobne koncentriranja urina (1,2).

Vsak nefron (Slika 2) je sestavljen iz ledvičnega telesca, proksimalnega zvitega tubula, Henlejeve zanke in distalnega zvitega tubula. Distalni zviti tubul prehaja v zbiralce, ki ni del nefrona (1). Ledvično telesce se nahaja v ledvični skorji, tubuli pa predvsem v ledvični sredici (5). Kapilare v ledvičnem telescu tvorijo pletež, ki se imenuje ledvični glomerul in predstavlja funkcionalni krvni obtok (1,6). Ledvično telesce ima žilni in urinski del. Žilni del je mesto, kjer vstopata in izstopata aferentna in eferentna arteriola. Iz urinskega dela pa poteka proksimalni zviti tubul. Vsako ledvično telesce obdaja Bowmanova ovojnica, ki ima zunanji parietalni list in notranji visceralni list iz podocitov, ki obdajajo ledvični glomerul. Najpomembnejša funkcija ledvičnega telesca je ultrafiltracija primarnega urina oz. glomerulna filtracija. Filtrat se zbira v urinskem (Bowmanovem) prostoru, ki se nahaja med obema listoma Bowmanove ovojnice (1,7). Poleg kapilar in podocitov najdemo v glomerulih tudi mezangijske celice, ki dajejo glomerulu oporo, sintetizirajo prostaglandine in citokine ter fagocitirajo snovi (1).



Slika 2: Sestavni deli nefrona in zbiralce (1).

1.1.3 Vloga ledvic

Ledvice opravljajo v telesu številne naloge, najpomembnejše so:

- Izločanje končnih produktov presnove, ki so nastali v telesu (npr. sečnina, sečna kislina, kreatinin).

- Vzdrževanje homeostaze vode in elektrolitov v telesu.
- Vzdrževanje kislinsko-bazičnega ravnotežja v krvi.
- Endokrine funkcije (tvorba in izločanje renina, eritropoetina, aktivne oblike vitamina D, prostaglandinov itd.).
- Izločanje presnovkov telesu tujih snovi (npr. zdravila, strupi itd.) (3).

Za delovanje ledvic so ključni trije procesi, in sicer glomerulna filtracija, tubulna sekrecija in tubulna reabsorpcija snovi, ki so uporabne za organizem (1). Glomerulna filtracija poteka v glomerulih, kjer se v Bowmanovo kapsulo prefiltrirajo številne snovi, ki tvorijo primarni seč oz. ledvični filtrat. Filtracija je odvisna od velikosti in naboja molekul, njihove koncentracije in od hitrosti glomerulne filtracije. Filtracijsko bariero prosto prehajajo ioni in majhne molekule (voda, glukoza, inulin, urea), medtem ko beljakovine in krvne celice zaradi svoje velikosti filtracijske pregrade ne prehajajo. Stopnja filtriranja v glomerulu in s tem količina primarnega urina ni stalna in je odvisna od krvnega pretoka. Visoka hitrost glomerulne filtracije zahteva visok pretok krvi skozi ledvice, skozi teče okoli 1200 mL krvi/min. Ko pretok naraste, se poveča tudi stopnja filtriranja in s tem količina primarnega urina. Dnevno nastane približno 180 litrov primarnega seča, od katerega se ga 99% reabsorbira s tubulno reabsorpcijo iz nefrona v kri. Reabsorbirajo se za organizem pomembni topljenci, kot so npr. glukoza, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , aminokisliline, bikarbonat. V ledvične čaše in ledvični meh tako steče samo 1% seča, ki ga imenujemo sekundarni seč in ga izločimo približno 1,5 litrov na dan (5,8).

1.2 NAPREDOVALA LEDVIČNA ODPOVED

Ledvična odpoved je bolezensko stanje, ki nastane zaradi zmanjševanja stopnje glomerulne filtracije. Posledica je poslabšanje ledvičnih funkcij, saj pri nezadostni količini filtrata postanejo vse funkcije neučinkovite. Kritična redukcija filtrata se lahko pojavi nenadoma (v nekaj dneh) in govorimo o akutni odpovedi ledvic (12). Lahko pa se razvija postopoma (več mesecev ali let), takrat gre za napredovalo ledvično odpoved, ki jo imenujemo tudi kronična ledvična bolezen (KLB) (9,10).

Kronična ledvična bolezen (KLB) je bolezen, ki nastane zaradi napredujočega propadanja nefronov, ki je ireverzibilen proces. Ledvice tako niso več sposobne opravljati temeljnih ledvičnih funkcij. Zaradi zmanjšane števila delujočih nefronov, ki se ne morejo

regenerirati, se preostali nepoškodovani nefroni prilagodijo povečani obremenitvi s hipertrofijo. To le začasno izboljša delovanje ledvic, vendar kasneje še pospeši razvoj končne odpovedi ledvic (13,14).

Pri bolniku KLB določimo takrat, kadar okvara ledvičnega delovanja traja več kot tri mesece in so prisotni naslednji znaki: zmanjšana glomerulna filtracija ledvic (< 90 mL/min/1,73 m² telesne površine), patološka sestava seča (eritrociturija, proteinurija) in morfološke nenormalnosti ledvic (14,16).

Čprav se GF v posameznem nepoškodovanem nefronu poveča, je celotna GF zmanjšana. Glede na stopnjo zmanjšanja GF delimo napredovanje KLB v 5 stopenj (Preglednica I). Ta opredelitev KLB je v skladu s smernicami K/DOQI (Kidney Disease Outcome Quality Initiative) (14,15).

Preglednica I: Stopnje kronične ledvične bolezni, ki vodijo v končno ledvično odpoved (14,15).

STOPNJA KLB	eGF (mL/min/1,73 m ²)	OPREDELITEV
1	> 90	obdobje normalne ali povečane GF
2	60-89	obdobje zmanjšane funkcijske rezerve ledvic
3	30-59	obdobje kroničnega popuščanja ledvic s srednje močno zmanjšano GF
4	15-29	obdobje kroničnega popuščanja ledvic z močno zmanjšano GF
5	< 15	obdobje dokončne odpovedi ledvic

V prvi stopnji GF še ni zmanjšana, prisotni so drugi znaki (npr. proteinurija, morfološke spremembe ledvic). Plazemska koncentracija topljencev, ki se izločajo pretežno z GFR (sečnina, kreatinin, fosfati, sulfati), je v 1. in 2. stopnji še normalna. V 3. in 4. stopnji KLB se začne obdobje kroničnega popuščanja ledvic, ko propade več kot 75% nefronov. Zaradi zmanjšanja GF se poviša plazemska koncentracija topljencev, ki se izločajo z GF (sečnina,

kreatinin, fosfati, sulfati) ali sekrecijo v tubulih (H^+). Povečana koncentracija teh topljencev povzroči osmozno diurezo in volumen urina se lahko naraste do 3000 mL/dan. Ko propade več kot 90% nefronov, nastopi obdobje dokončne odpovedi ledvic (5. stopnja). Zmanjša se sposobnost koncentracije in dilucije urina, ledvice težje vzdržujejo ničelno bilanco vode in soli. Volumen urina je <500 mL/dan (oligurija). Pojavi se anemija, metabolična acidoza, motnje hemostaze, sekundarni hiperparatiroidizem, hipertenzija. Zaradi močno zmanjšane GF se pojavi uremični sindrom, ki prizadene vse organe, zato je nujna dializa ali transplantacija ledvic (8,14).

Napredovanje KLB je odvisno od številnih dejavnikov, ki jih delimo na nespremenljive (na njih ne moremo vplivati) in spremenljive (nanje lahko vplivamo). Nespremenljivi dejavniki so spol, starost in genetski dejavniki. Pri moških je bolezen pogostejša in hitreje napreduje. S starostjo se GFR zmanjšuje tudi pri zdravem človeku, vendar do motenj ne pride, ker preostali nefroni hipertrofirajo. Zmanjševanje GFR se normalno prične po 40. letu starosti in pri starosti 80-90 let doseže le še polovico začetne vrednosti. V primeru prisotne KLB je to zmanjševanje še veliko hitrejše. Pri spremljanju bolnika je pomembno, da GF ocenimo večkrat v določenem časovnem obdobju. Od genetskih dejavnikov je najpomembnejši polimorfizem gena ACE, ki vpliva na različen potek bolezni. Najpomembnejša spremenljiva dejavnika sta arterijska hipertenzija, ki je lahko vzrok ali posledica KLB ter proteinurija. Do proteinurije pride zaradi okvarjene permeabilnosti glomerulne membrane in povišanega filtracijskega tlaka v glomerulih. Ostali spremenljivi dejavniki so še hiperlipidemija (aktivira mezanglijske celice), anemija (prek oksidativnega stresa vpliva na potek bolezni), metabolična acidoza (prek amonijevega iona vpliva na aktivacijo komplemента), sladkorna bolezen in življenjski slog (debelost, kajenje - oba dejavnika poslabšata proteinurijo) (14,16).

Prvi korak pri zdravljenju KLB je upočasnitev napredovanja bolezni. Glavni namen je upočasnitev razvoja srčno-žilnih zapletov, ki so glavni razlog smrti pri bolnikih. To storimo z zdravljenjem sočasnih obolenj, ki pospešijo razvoj KLB (hipertenzija, sladkorna bolezen, hiperlipidemija). Za zmanjšanje proteinurije je potrebna ustrezna dieta z zmanjšanim vnosom beljakovin. Za nadzor in znižanje povišanega tlaka v ledvičnem žilju so najučinkovitejši zaviralci angiotenzinske konvertaze (ACE inhibitorji) in blokatorji receptorjev za angiotenzin II. Ta zdravila se uporabljajo tako za znižanje tlaka pri arterijski hipertenziji kot tudi za zmanjšanje proteinurije. Metabolično acidozo zdravimo z natrijevim

hidrogenkarbonatom, anemijo z eritropoetinom. V 5. fazi KLB (faza dokončne odpovedi ledvic) je potrebno nadomestno zdravljenje z dializo ali s transplantacijo ledvic (14).

1.3 DANAŠNJI PRISTOP K DIAGNOSTIKI LEDVIČNE OKVARE

Diagnostika kronične ledvične bolezni vključuje oceno glomerulne filtracije (oGF), določitev serumske koncentracije kreatinina in spremljanje proteinurije. Določanje serumske koncentracije kreatinina za oceno velikosti GF je nezanesljivo, še posebej v začetnih fazah razvoja KLB, saj na njegovo serumsko koncentracijo vplivajo številni dejavniki (mišična masa, beljakovinska prehrana...). Bolj zanesljiv je izračun oGF z MDRD enačbo ali Cockcroft-Gaultovo enačbo. Zato vsi laboratoriji poleg podatka o serumski koncentraciji kreatinina navedejo tudi podatek o oGF s pomočjo enačb. Za bolj natančno oGF je potrebno izmeriti očistek kreatinina ali izvesti nuklearnomedicinsko radioizotopsko preiskavo. Zmanjševanje GF najbolj napove velikost proteinurije, ki je pri večini bolnikov s KLB prvi znak napredujoče bolezni. Z dovolj zgodnim odkritjem upada ledvične funkcije lahko zmanjšamo razvoj srčno-žilnih zapletov pri ledvičnih bolnikih. Zato ima spremljanje proteinurije zelo velik pomen pri diagnostiki KLB (16).

1.3.1 Ocena glomerulne filtracije

Za ugotavljanje stopnje ledvične okvare pri bolnikih z ledvično boleznijo uporabljamo meritev ali oceno glomerulne filtracije (oGF), ki je pomemben pokazatelj izločevalne sposobnosti ledvic (15). Z oGF lahko tudi opredelimo hitrost napredovanja ledvične bolezni in stopnjo tveganja za srčno-žilne zaplete. Podatek o velikosti GF nam je tudi v pomoč pri določitvi ustreznega odmerka zdravil, ki se izločajo prek ledvic. Kadar je GF zmanjšana, je potrebno odmerke takšnih zdravil ustrezno zmanjšati (16).

GF določa vsota filtracij v posameznih nefronih, zato je odvisna od števila delujočih glomerulov. Referenčna vrednost za odrasle je okoli 125 mL/min/1,73 m² (za moške 130 mL/min/1,73 m² in za ženske 120 mL/min/1,73 m²) (15). V začetni fazi KLB je GF sprva lahko še normalna ali celo povišana, saj se neprizadeti nefroni prilagodijo s povečano

filtracijo na posamezen nefron (14,15). Ko propadanje nefronov napreduje, pa se zmanjša tudi velikost GF (16).

Meritev GF je potrebno vedno opravljati ob istem času in v podobnih pogojih, saj nanjo vplivajo številni dejavniki. V popoldanskem času je njena vrednost višja za 10% zaradi variabilnosti krvnega pretoka v ledvicah. Vrednost GF je višja tudi pri moških (za 8% višja kot pri ženskah) in v primeru beljakovinske prehrane (16). V nosečnosti je vrednost GF višja za 50%, po porodu se ponovno uravna na normalno vrednost. Nasprotno pa je vrednost GF zmanjšana pri povečanem telesnem naporu, pri vegetarijanski prehrani in pri starejših, saj se po 40. letu starosti zmanjšuje za 0,8-1,0 mL/min na leto (15,16).

1.3.1.1 Očistek

Osnovna metoda za oGF je izračun očistka neke snovi (17). Ledvični očistek snovi ali klirens je volumen plazme, iz katerega ledvice z izločanjem v urin v določeni časovni enoti popolnoma odstranijo določeno snov (11).

Splošna enačba za ledvični klirens ali očistek je (15):

$$C = \frac{U \times V}{P} \quad \text{Enačba 1}$$

C... klirens ali očistek (mL/min)

U... koncentracija snovi v urinu (mg/mL ali mol/L)

V... volumen urina v časovni enoti (mL/min)

P... koncentracija snovi v plazmi (mg/mL ali mol/L)

Za oGF lahko uporabimo očistek endogenih snovi (kreatinin) ali očistke od zunaj v telo vnesenih (eksogenih) substanc (inulin, ioheksol, ⁵¹Cr-EDTA, ¹²⁵I-jotalamat) (15,17).

Določitev GF je natančna le pri snoveh, ki se izločajo iz telesa izključno preko ledvic s filtracijo v glomerulih in se v ledvičnih tubulih ne reabsorbirajo in ne izločajo. Pogoj je tudi, da se takšne snovi v ledvicah ne presnavljajo oz. ne razgrajujejo (11,17). Koncentracija snovi mora biti konstantna ter enostavno in natančno določljiva (15). Vendar zaenkrat še ne poznamo takšne endogene snovi, ki bi ustrezala vsem tem pogojem (17).

Idealni substanci za merjenje GF se je najbolj približal inulin, ki ga pacientu apliciramo parenteralno (16). Inulin je polisaharidna molekula fruktoze, ki se v ledvicah zgolj filtrira in se ne reabsorbira ali secernira v ledvičnih tubulih. Kljub tem prednostim se v klinični

praksi redko uporablja, predvsem zaradi visoke cene in tehnične zahtevnosti postopka. Več se uporablja v raziskovalne namene. Metoda je tudi neprijetna za bolnika, saj je potrebno vstaviti uretralni kateter, saj je potrebno urin zbrati v kratkem času (15-20 minut) (15,16).

Podobne slabosti imajo tudi druge injicirane eksogene snovi, kot so ioheksol in radioizotopi ($^{51}\text{Cr-EDTA}$, $^{125}\text{I-jotalamat}$, $^{99}\text{Tc-dietilentriaminocetnaksolina}$) (15,17). Očistke teh snovi uporabimo kadar želimo izvesti zelo natančno meritev hitrosti GF. Zaradi zahtevnosti, nepraktičnosti in visoke cene pa te snovi za rutinsko diagnostiko niso primerne. Slabost radioizotopskih označevalcev je tudi, da pogosta uporaba pri bolniku ni možna (17).

Delovanje ledvic lahko natančneje določimo iz 24-urnega očistka kreatinina. V primerjavi s serumsko koncentracijo kreatinina, je očistek kreatinina boljši kazalec GF. Njegova slabost je, da je potrebno 24-urno zbiranje urina, kar je manj zanesljivo in težje izvedljivo predvsem pri starejših in otrocih (17).

Očistek kreatinina izračunamo iz serumske koncentracije kreatinina (S-kreatinin) in koncentracije kreatinina v zbranem 24-urnem urinu (16). Slabše, ko je delovanje ledvic, manjši je očistek kreatinina (18). Splošna enačba za izračun očistka kreatinina je naslednja (16):

$$\text{Cl}_{\text{Kr}} [\text{mL}/\text{min}] = \frac{\text{kreatinin v 24-urnem urinu} \left[\frac{\mu\text{mo}}{\text{L}} \right] \times V \text{ urina} [\text{mL}]}{\text{S-kreatinin} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \right] \times 1440 \text{ (čas v minutah)}}$$

Enačba 2

Cl_{Kr} ... očistek kreatinina

BSA ... telesna površina (*body surface area*)

Izračunani očistek zaradi primerljivosti preračunamo na $1,73 \text{ m}^2$ telesne površine:

$$\text{Cl}_{\text{Kr}} [\text{mL}/\text{min}/1,73 \text{ m}^2] = \text{Cl}_{\text{Kr}} [\text{mL}/\text{min}] \times \frac{1,73 \text{ m}^2}{\text{BSA}} \quad \text{Enačba 3}$$

Telesno površino izračunamo po naslednji enačbi (27):

$$\text{BSA} [\text{m}^2] = \text{tel.masa}^{0,425} [\text{kg}] \times \text{tel.višina}^{0,725} [\text{cm}] \times 0,007184 \quad \text{Enačba 4}$$

Normalne vrednosti očistka kreatinina so pri moških 120 ± 25 mL/min/1,73 m² in pri ženskah 95 ± 20 mL/min/1,73 m² (16).

1.3.1.2. Enačbe za izračun ocene glomerulne filtracije

V klinični praksi oGF iz koncentracije serumskega kreatinina olajšajo preizkušene empirične formule. Te poleg serumske koncentracije kreatinina upoštevajo tudi bolnikovo starost, spol in telesno težo (14). Pri odraslih za oGF najpogosteje uporabljamo Cockcroft-Gaultovo (CG) enačbo in MDRD enačbo. Za dojenčke, otroke in mladostnike se večinoma uporablja Schwartzova enačba (17).

Cockcroft-Gaultova enačba:

$$\text{oGF [mL/min]} = \frac{[140 - \text{starost (leta)}] \times \text{telesna teža (kg)}}{0,815 \times \text{S-kreatinini } \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}\right)} \quad (\times 0,85 \text{ za ženske})$$

Enačba 5

Rezultat preračunamo na povprečno telesno površino (1,73 m²):

$$\text{oGF [mL/min/1,73 m}^2\text{]} = \text{oGF [mL/min]} \times \frac{1,73\text{m}^2}{\text{BSA}} \quad \text{Enačba 6}$$

$$\text{BSA [m}^2\text{]} = \text{tel.masa}^{0,425}[\text{kg}] \times \text{tel.višina}^{0,725}[\text{cm}] \times 0,007184$$

Cockcroft-Gaultova enačba (CG) je najstarejša enačba, ki je v uporabi od leta 1973. Poleg serumske koncentracije kreatinina (S-kreatinin) pri izračunu upoštevamo še bolnikov spol, starost in telesno težo. Pri ženskah nastane 15% manj kreatinina kot pri moških, zato rezultat pomnožimo z 0,85 (16).

Slabosti CG enačbe so, da je manj zanesljiva v primeru debelosti, jetrnih bolnikov, prisotnih edemih ali zmanjšani mišični masi (17). Tudi pri preračunavanju na standardno telesno površino lahko pri bolnikih z manjšo ali večjo telesno površino dobimo napačen izračun (16).

MDRD enačba:

$$\text{oGF [mL/min/1,73 m}^2\text{]} = 186^* \times \left(\frac{\text{S-kreatinin } \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}\right]}{88,4} \right)^{-1,154} \times (\text{starost [leta]})^{-0,203} \times$$

$$(0,742 \text{ za ženske}) \times (1,210 \text{ za temnopolte}) \quad \text{Enačba 7}$$

*186: metoda ni sledljiva do metode IDMS

*175: metoda je sledljiva do metode IDMS

MDRD enačba je skrajšana enačba raziskave MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) iz leta 1999. Enačba je sprva vključevala šest spremenljivk (serumski kreatinin, sečnina, albumin, starost, spol in rasa bolnikov), pozneje pa so jo poenostavili na štiri spremenljivke (serumski kreatinin, spol, starost in rasa bolnikov). Prednost MDRD enačbe je, da od laboratorijskih meritev vključuje le koncentracijo serumskega kreatinina, ostale podatke dobimo iz osebnih podatkov pacienta (15). V klinični praksi enačba MDRD vedno bolj nadomešča enačbo CG, saj je v primerjavi z njo natančnejša. Vendar je tako kot pri enačbi CG, tudi pri enačbi MDRD izračun oGF netočen pri bolnikih, pri katerih je nastajanje kreatinina zelo variabilno. Uporabnost enačbe MDRD je zaradi pomanjkanja raziskav omejena tudi pri otrocih, nosečnicah in starejših (16).

Kadar serumsko koncentracijo kreatinina določamo z Jaffejevo kinetično metodo in kalibracija ni sledljiva do referenčne metode IDMS (izotopska-dilucijska masna spektrometrija), uporabimo v enačbi faktor 186. Vendar se danes v laboratorijih za določitev serumskega kreatinina uporabljajo metode, ki so sledljive do referenčne metode, zato uporabljamo v enačbi faktor 175 (15,16).

Schwartzova enačba:

$$\text{oGF [mL/min/1,73 m}^2\text{]} = \frac{\text{telesna višina [cm]} \times \text{koeficient (k)}}{\text{serumski kreatinin } \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}\right]} \quad \text{Enačba 8}$$

k = 0,45 za dojenčke

k = 0,55 za otroke od 1. do 13. leta starosti

k = 0,7 za mladostnike od 13. do 18. leta starosti

Pri otrocih za izračun oGF namesto MDRD enačbe uporabimo Schwartzovo enačbo (16). Glede na starost otroka za koeficient *k* uporabimo različne vrednosti (15).

1.3.2 Koncentracija kreatinina v serumu

Kreatinin v telesu nastaja kot stranski produkt metabolizma skeletnih mišic, in sicer kot presnovni produkt kreatina in fosfokreatina. Tvorba kreatinina je relativno konstantna, vendar na njegovo serumsko koncentracijo vplivajo številni dejavniki (spol, starost, prehrana, telesna aktivnost, mišična masa, zdravila) (15,17).

V urin se kreatinin izloča z GF, v manjši meri pa tudi s tubulno sekrecijo. Pri napredovanju KLB se poveča tubulno izločanje kreatinina, kar lahko vpliva na lažno povišane vrednosti GF (11,17).

Vrednosti koncentracije serumskega kreatinina so osnova za izpeljavo matematičnih formul, s katerimi izračunamo oGF (16). Med serumsko koncentracijo kreatinina in GF obstaja obratno sorazmeren in nelinearen odnos, vendar se koncentracija kreatinina v krvi začne poviševati šele, ko se filtracijska sposobnost ledvic že močno zmanjša. Zato je relativno slab pokazatelj ledvičnega delovanja v zgodnjih stopnjah kronične ledvične odpovedi, ko GF še ni zmanjšana. Tudi pri starejših je določanje vrednosti serumskega kreatinina nezanesljivo, saj so vrednosti nižje zaradi manjše mišične mase in tako izmerimo normalne vrednosti koncentracije serumskega kreatinina kljub že zmanjšani GF (17).

1.3.2.1 Določanje koncentracije kreatinina v serumu

Najstarejša metoda določanja koncentracije kreatinina v serumu je klasična Jaffejeva metoda. Pri tej metodi gre za reakcijo kreatinina s kromogenom, pri čemer nastane oranžno-rdeče obarvanje. Vendar lahko s kromogenom reagirajo in z njim tvorijo obarvan kompleks tudi druge snovi (glukoza, proteini, ketonska telesa, piruvat, zdravila), kar povzroči lažno povišano vrednost serumske koncentracije kreatinina (15,17). To je vodilo v razvoj številnih modifikacij klasične Jaffejeve metode z namenom povečanja specifičnosti metode (16).

Za bolj specifične, vendar precej dražje so se izkazale večstopenjske encimske metode določitve kreatinina, kjer kreatinin določamo z uporabo encimov kreatininaze, kreatinaze in sarkozin oksidaze. Produkt encimske reakcije je kinoniminsko barvilo, katerega absorbanca je sorazmerna koncentraciji kreatinina v serumu (15).

Danes se največ uporablja kompenzirana Jaffejeva reakcija, saj Jaffejeva metoda v primerjavi z encimsko metodo daje višje vrednosti serumskega kreatinina. Kompenzacijo

metode so izvedli z nastavitvijo analizatorjev, da pri izračunu avtomatsko upoštevajo popravek (15).

Referenčna metoda za določitev serumskega kreatinina je plinska kromatografija (GC) z izotopsko-dilucijsko masno spektrometrijo (IDMS), ki jo uporabljajo v treh referenčnih laboratorijih (15).

1.3.3 Proteinurija

Kadar je v 24-urnem urinu prisotnih več kot 150 mg beljakovin, govorimo o patološki proteinuriji. Njen nastanek je povezan s spremenjeno prepustnostjo glomerulnih kapilar. Čim večja je proteinurija, tem hitreje napreduje KLB (16). Je zelo zgoden kazalec slabšanja ledvične funkcije, saj je pri večini bolnikov s progresivno ledvično odpovedjo prvi znak napredovanja bolezni ravno pojav proteinurije. Pojavi se namreč že v času, ko je delovanje ledvic sicer še normalno. Proteinurija je pokazatelj okvare žilnega endotelija, zato je kazalec tveganja za srčno-žilne bolezni, ki so najpogostejši zaplet pri bolnikih s KLB (16).

Pojav proteinurije je najboljši napovedni kazalec zmanjševanja GF in s tem slabšanja ledvične funkcije. Povezavo med velikostjo proteinurije in hitrostjo zmanjševanja GF so potrdili v mnogih raziskavah. Z uporabo zdravil, s katerimi zmanjšamo proteinurijo (zaviralci ACE in antagonisti receptorjev za angiotenzin II), ustrezno dieto ali kombinacijo obojega, upočasnimo zmanjševanje GF in tako upočasnimo napredovanje KLB (16).

1.3.3.1 Določanje proteinurije

Za hitro in enostavno določitev bolezenske proteinurije uporabimo urinski testni listič, vendar nam ta metoda poda le grobo in orientacijsko oceno. Reagent na lističu je zelo občutljiv za anionske beljakovine (albumin), manj pa za beljakovine s pozitivnim nabojem. Velik vpliv na rezultat ima tudi koncentriranost ali razredčenje vzorca seča (11,16).

Drug način za orientacijsko oceno proteinurije je precipitacijska metoda s sulfosalicilno ali trikloroacetno kislino. S to metodo zaznamo tudi beljakovine s pozitivnim nabojem (16).

Kadar z zgornjima dvema metodama ugotovimo albuminurijo ali proteinurijo, določimo razmerje med beljakovinami in kreatininom v drugem jutranjem vzorcu urina in tako proteinurijo kvantitativno ovrednotimo. Proteinurija je prisotna, če je vrednost razmerja

med U-beljakovinami in U-kreatininom nad 20 g/mol (normalno je do 20 g/mol). Za natančnejšo določitev lahko izvedemo še določitev proteinurije v 24-urnem urinu (16).

Ko določimo prisotnost proteinurije, ugotovimo ali je posledica okvare glomerulov ali tubulov. **Glomerulna proteinurija** je posledica spremenjene prepustnosti glomerulne bazalne membrane. Sprva v urinu zaznamo albumine, kasneje se pojavijo tudi imunoglobulini (IgG). Z razmerjem med izločanjem IgG in albuminov opredelimo selektivnost proteinurije, ki je tem manjša, čim večja je okvara glomerulne bazalne membrane (16). **Tubulna proteinurija** je običajno blaga, in sicer od 1 do 2 g beljakovin na dan. Zaradi motene resorpcije nizkomolekularnih beljakovin v okvarjenem proksimalnem delu tubula je albumina manj kot 15%. Pri okvari proksimalnih tubulov se v urinu poveča količina beljakovin z majhno molekulsko maso. Določamo lahko beta-2-mikroglobulin ali alfa-1-mikroglobulin, ki ga določamo pogosteje zaradi večje stabilnosti v urinu. Pri poškodbi tubulov se v urinu poveča količina tubulnih encimov kot je *N*-acetil-beta-D-glukozaminidaza (*NAG*), ki se sicer izloča v zelo majhni količini. Izločanje *NAG* se še dodatno poveča pri glomerulnih boleznih z veliko proteinurijo (11,16).

1.4 KOMPONENTA KOMPLEMENTA C5b9

1.4.1 Sistem komplementa

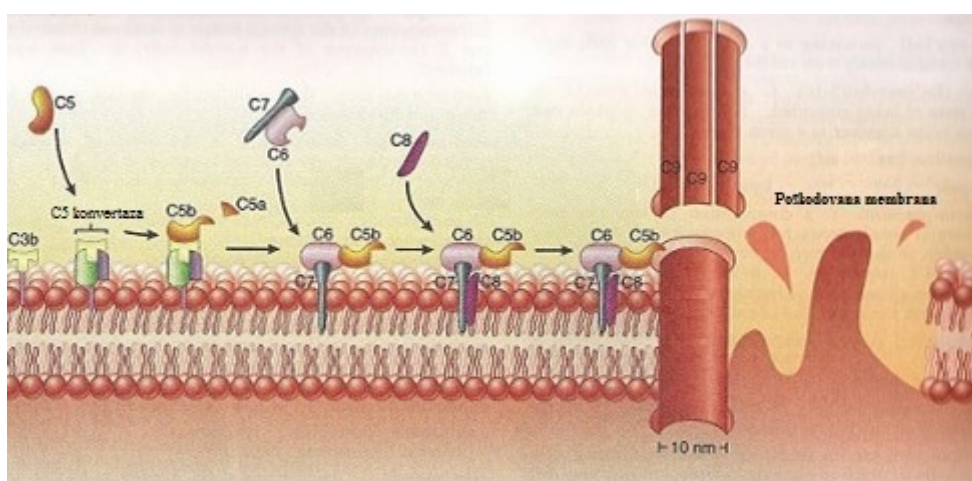
Sistem komplementa sestavlja približno 30 serumskih beljakovin, katerih vloga je odstranjevanje imunskih kompleksov in celic, ki so prekrte s protitelesi (16). Serumske beljakovine se v krvi nahajajo v neaktivni obliki in se aktivirajo s kaskado biokemijskih reakcij, ki poteka po treh poteh: klasični, lektinski in alternativni poti. Pri klasični poti komplement aktivirajo imunski kompleksi. Nekatere bolezni imunskih kompleksov in avtoimunske bolezni (npr. glomerulonefritis) so povezane s pomanjkanjem prvih komponent klasične poti. Lektinska in alternativna pot sta podobni klasični, s to razliko, da ju sproži neposredna prisotnost patogena (19). V zadnji stopnji aktivacije sistema komplementa nastane kompleks C5b9 ali MAC (membrane attack complex) (20).

Sistem komplementa ima pomembno vlogo pri nastanku in razvoju imunsko povzročenih boleznih. Za odkrivanje prirojenih ali pridobljenih pomanjkljivosti komplementa določamo hemolitično aktivnost komplementa, tako da v serumu merimo njegovo zmožnost liziranja s protitelesi prekritih ovčjih eritrocitov. Zmanjšana hemolitična aktivnost je lahko

posledica povečane porabe pri imunskih in avtoimunskih boleznih. Določamo tudi kvantitativne vrednosti posameznih komponent komplekta ter pridobljene in prirojene pomanjkljivosti komplekta (16).

1.4.2 Nastanek komponente komplekta C5b9

V prvi stopnji tvorbe kompleksa C5b9, konvertaza C5 cepi molekulo C5 v C5a in C5b (Slika 3). Molekula C5b se poveže z molekulo C6 v kompleks C5b-6, ki se nato poveže z eno molekulo C7. Pri tem se spremeni konformacija molekul. Na molekuli C7 se izpostavi hidrofobno območje, s katerim se kompleks vgradi v dvojno lipidno plast. Na kompleks C5b-6-7, ki je vezan na membrano, se nato veže molekula C8. To povzroči polimerizacijo 10-16 molekul C9 v kompleks, ki se imenuje MAC kompleks ali kompleks, ki napade membrano (C5b9). Ta kompleks ima obliko obroča. Sestavlja ga hidrofobni zunanji del, s katerim se poveže s celično membrano in hidrofilni notranji kanal, ki omogoča prost prehod vode in v njej topnih snovi skozi dvojno lipidno plast. S tvorbo transmembranskega kanala se celična membrana poškoduje in kompleks povzroči lizo celice (19).



Slika 3: Shematski prikaz nastanka MAC kompleksa, ki napade membrano (24).

1.4.3 Pomen komponente C5b9 pri ledvičnih boleznih

Komponenta komplekta C5b9 ali MAC (membrane attack complex) ima citolitsko delovanje (16). V celični membrani tvori pore in s tem poruši osmotsko ravnovesje kar vodi v lizo celice in nastanek vnetne reakcije v tkivu (19).

V patogenezi ledvičnih bolezni je poleg vnetne reakcije pomemben tudi t.i. sublitnični učinek komplemента. Kompleks C5b9 spremeni nabojno in velikostno selektivnost glomerulne bazalne membrane, kar povezuje z razvojem nekaterih oblik glomerulonefritisa, predvsem membranskega glomerulonefritisa (16,20,22,23). Membranski glomerulonefritis je bolezen, pri kateri se imunski kompleksi antigen-protitelo odlagajo na zunanji strani glomerulne membrane. Protitelo vezano na antigen aktivira kompleks C5b9, ki vpliva na glomerulne celice in jih spodbuja k sintezi prostaglandinov, proteaz, oksidantov in citokinov. Vlogo C5b9 pri sintezi toksičnih presnovkov imenujemo sublitnični učinek komplemента. Posledica je povečana prepustnost glomerulne filtracijske membrane za beljakovine plazme, ki prehajajo v ledvične tubule in okvarijo tubulne celice (16,20). Posledica je razvoj proteinurije in nefrotskega sindroma (20,23).

1.4.4 Določanje komponente komplemента C5b9

Testiranje sistema komplemента naredimo, kadar sumimo na prirojeno okvaro ali na povečane porabe pri okužbah in vnetjih. Količino kompleksa C5b9 določamo v plazmi ali urinu. V primeru vnetnih bolezni (nekaterih oblikah glomerulonefritisa, nefropatiji IgA, revmatoidnem artritisu) je njegova količina povečana. Določanje komponente C5b9 v urinu je pomembno merilo poškodbe glomerulne filtracijske membrane in s tem povezanih ledvičnih bolezni. Zelo visoke koncentracije so posledica sekundarne aktivacije komplemента v ledvičnih tubulih pri dolgotrajni hudi proteinuriji (16,26).

Za določanje komponente C5b9 uporabljamo imunoencimski test na trdni podlagi (ELISA). S to metodo lahko določamo aktivnost komponente v serumu, plazmi in drugih bioloških vzorcih. Na dno mikrotitrne ploščice so vezana lovilna primarna protitelesa, na katera se vežejo prisotni C5b9 kompleksi. S primarnimi protitelesi odkrivamo na novo nastale antigenske determinante molekule C9 v kompleksu C5b9. Dodamo sekundarna protitelesa, ki so usmerjena proti molekuli C5. Vezavo sekundarnih protiteles dokažemo z vezavo terciarnih protiteles, ki so označena s hrenovo peroksidazo. Po dodatku substrata 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), spektrofotometrično določamo stopnjo razgradnje substrata. Iz razgradnje substrata določimo količino kompleksov C5b9 v preiskovanem vzorcu (22,23,26).

2. NAMEN DELA

Stopnjo ledvične odpovedi danes ocenimo z dvema parametroma, in sicer s serumsko koncentracijo kreatinina in iz tega podatka izračunane ocene glomerulne filtracije (oGF). Glede na vrednosti oGF razdelimo napredovanje ledvične odpovedi v pet stopenj (*Preglednica I*). Enačbe za izračun oGF imajo svoje pomanjkljivosti, zato iščemo dodatne označevalce za oceno stopnje ledvične odpovedi.

Namen diplomske naloge je opredelitev novega parametra C5b9 za oceno zmanjšane delovanja ledvic. V raziskavo bomo vključili 46 bolnikov z napredujočo okvaro ledvične funkcije, ki jim bomo določili serumsko koncentracijo kreatinina in na podlagi tega podatka z enačbo MDRD izračunali vrednost oGF. V urinskem vzorcu bolnikov bomo z metodo ELISA določili aktivnost parametra C5b9. Rezultate bomo statistično ovrednotili z namenom ugotoviti, kako vrednost parametra C5b9 korelira s parametrom oGF. Cilj naloge je oceniti diagnostično uporabnost parametra C5b9 za oceno delovanja ledvic.

Namen diplomske naloge je:

- Izbrati vzorec 46 bolnikov s progresivno ledvično odpovedjo, ki so zastopani iz vseh petih skupin napredujoče ledvične odpovedi, kot jo določa standardna klasifikacija glede na parameter oGF.
- Opredeliti spol in povprečno starost bolnikov.
- Bolnikom določiti koncentracijo kreatinina v serumu.
- Z enačbo MDRD izračunati oGF bolnikov na osnovi koncentracije kreatinina v serumu in osebnih podatkov bolnikov (spol, starost, rasa).
- Bolnikom izmeriti aktivnost komponente komplekta C5b9 v urinu.
- Testirati normalnost porazdelitve rezultatov in izvesti ustrezno transformacijo.
- Preveriti, ali obstaja korelacija med oGF in aktivnostjo C5b9.
- Ovrednotiti klinično uporabnost določanja aktivnosti komponente komplekta C5b9 v urinu.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 OPIS SKUPINE

V raziskavi je sodelovalo 46 bolnikov (30 moških in 16 žensk), ki so bili zdravljeni na Kliničnem oddelku za nefrologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani. Bolniki so bili izbrani na način, da so bili zastopani iz vseh petih skupin napredovale ledvične bolezni, kot jo določa standardna klasifikacija glede na parameter oGF. Vsi vzorci so bili pridobljeni v obdobju šestih mesecev. V skupino je bilo vključenih 65,2% moških in 34,8% žensk. Povprečna starost vseh pacientov je bila $53,7 \pm 16,0$ let (od 20 do 86 let), od tega je bila povprečna starost moških $55,6 \pm 15,7$ let (od 20 do 84 let) in povprečna starost žensk $49,9 \pm 16,3$ let (od 28 do 86 let). Razdelitev bolnikov glede na spol in starost je razvidna iz preglednice II.

Preglednica II: Osnovni podatki o starosti bolnikov, ki so bili vključeni v študijo.

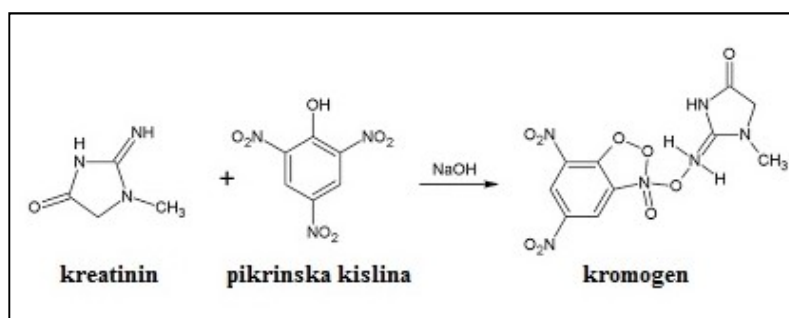
	Število bolnikov	Povprečna starost (leta)	Interval (leta)
Moški	30	$55,6 \pm 15,7$	20 - 84
Ženske	16	$49,9 \pm 16,3$	28 - 86
Skupaj	46	$53,7 \pm 16,0$	20 - 86

3.2 METODE

3.2.1 Jaffejeva metoda

Koncentracijo kreatinina v serumu pacientov smo določili s kinetično Jaffejevo metodo. V alkalnem mediju kreatinin reagira s pikratom, pri tem nastane rdeče-oranžno obarvan kromogen, ki ima absorpcijski maksimum pri okoli 490 nm (*Slika 4*). Kinetična metoda v primerjavi s klasično Jaffejevo metodo ne vključuje deproteinizacije krvi in je veliko bolj

specifična. Klasična metoda je slabo specifična, saj mnoge endogene in eksogene snovi reagirajo s pikratom.



Slika 4: Reakcija kreatinina s pikrinsko kislino v alkalnem.

3.2.2 Enačba MDRD

Oceno glomerulne filtracije smo izračunali z enačbo MDRD, ki poleg koncentracije serumskega kreatinina upošteva še pacientovo starost, spol in raso. Rezultat enačbe je podan na povprečno telesno površino 1,73 m². Uporabili smo revidirano enačbo MDRD s faktorjem 175 namesto 186, saj smo za določanje serumskega kreatinina uporabili metodo, ki je sledljiva do referenčne IDMS metode.

$$\text{oGF [mL/min/1,73 m}^2\text{]} = 175 \times \left(\frac{\text{S-kreatinini } \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \right]}{88,4} \right)^{-1,154} \times (\text{starost [leta]})^{-0,203} \times$$

(0,742 za ženske) × (1,210 za temnopolte) Enačba 7

Referenčna vrednost oGF je 130 mL/min/1,73 m² za moške in 120 mL/min/1,73 m² za ženske.

3.2.3 Imunoencimski test na trdni podlagi (ELISA)

Za določanje aktivnosti komplementa C5b9 v urinskem vzorcu smo uporabili imunoencimski test ali ELISA (angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). To je imunska tehnika, ki se uporablja za detekcijo antigena ali protiteles v biološkem vzorcu ob

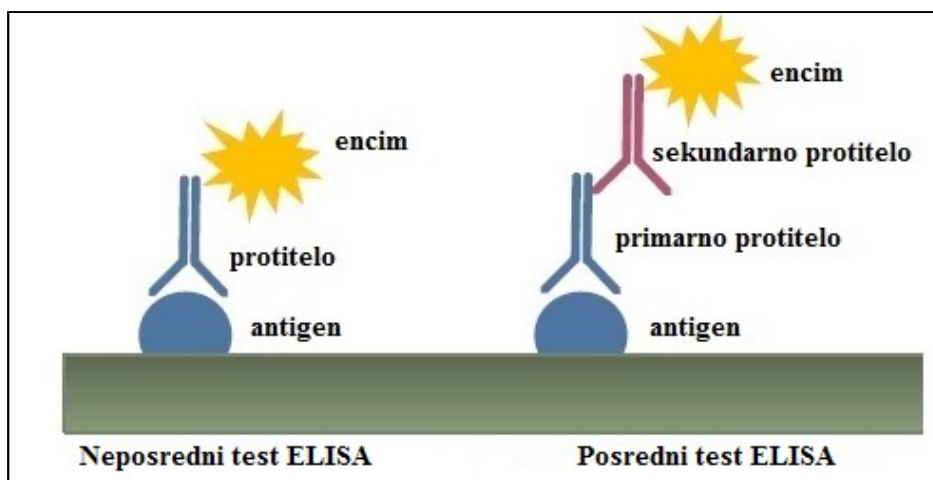
uporabi standarda in umeritvene krivulje. Prednosti metode so visoka občutljivost, specifičnost in enostavnost. Obstaja več vrst izvedbe testa (25):

1. Neposredni test ELISA

Na trdni nosilec (mikrotitrsko ploščico) vežemo znan antigen, ki mu dodamo z encimom označena protitelesa. Dodatek substrata ob prisotnosti encima povzroči nastanek kromogenega produkta, ki ga določamo spektrofotometrično.

2. Posredni test ELISA

Uporabljamo ga za določanje specifičnih monoklonskih protiteles. Površino nosilca prekrijemo z antigenom. Nanesemo vzorec s preiskovanimi primarnimi protitelesi, ki jih nato dokazujemo z dodatkom sekundarnih protiteles, ki so označena z encimom. Po dodatku encimskega substrata nastane produkt, ki ga določamo spektrofotometrično.



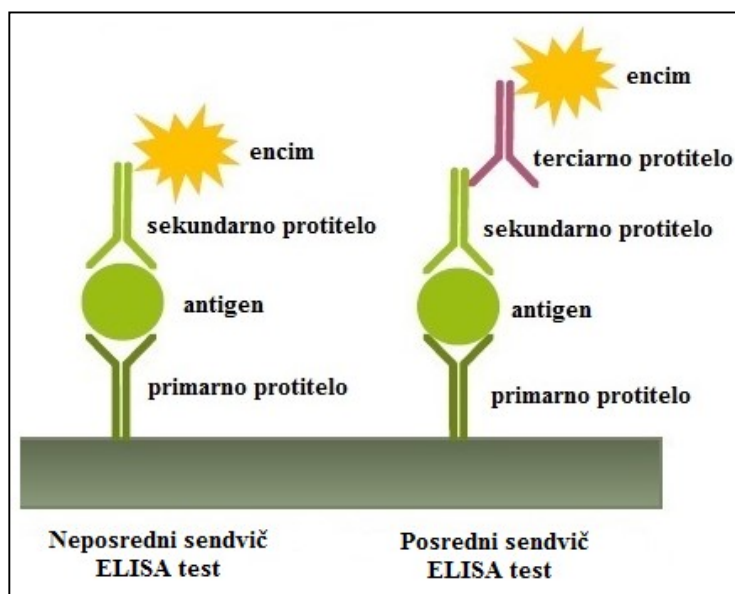
Slika 5: Shematski prikaz neposrednega in posrednega testa ELISA.

3. Sendvič test ELISA

Uporabljamo ga za določitev prisotnosti antigenov v biološkem vzorcu. Uporabimo dve različni protitelesi - primarno ali lovilno in sekundarno ali detekcijsko protitelo. Površino ploščice prekrijemo z visoko specifičnim ali monoklonskim primarnim protitelesom. Dodamo vzorec, ki vsebuje preiskovani antigen. Antigen mora vsebovati dva različna epitopa za vezavo protiteles.

Ločimo dve vrsti testa sendvič ELISA. V primeru, da je detekcijsko protitelo neposredno konjugirano z encimom, gre za **neposredni** sendvič ELISA test. Kadar

pa uporabimo še terciarno encimsko označeno protitelo, ki specifično prepozna detekcijsko protitelo, gre za **posredni** sendvič ELISA test (25).



Slika 6: Shematski prikaz dveh vrst sendvič ELISA testov.

Za določanje aktivnosti komponente C5b9 v urinskem vzorcu smo uporabili analizni komplet s **posrednim sendvič ELISA testom** (24). Aktivnost smo izrazili v enotah AU/L.

Reagenti in materiali:

- liofiliziran standard C5b9
- pufer za spiranje
- pufer za redčenje (negativna kontrola)
- stop reagent: oksalna kislina
- raztopina substrata: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB)
- sekundarna protitelesa: anti-humana C5b9 protitelesa označena z biotinom
- encimski konjugat: streptavidin-hrenova peroksidaza

- trdni nosilec (mikrotitrna ploščica z vdolbinicami)
- kalibrirane mikropipete z nastavki
- destilirana ali deionizirana voda
- inkubator

- folija
- destilirana ali deionizirana voda
- epruvete
- centrifuga
- spiralknik mikrotitrskih ploščic: avtomatski ali ročni
- spektrofotometrični čitalec mikrotitrskih ploščic (za merjenje absorbance pri 450 nm)

Priprava vzorcev:

Kot vzorec smo uporabili urin, ki smo ga centrifugirali 20 minut pri 2000-3000 rpm. Dobljeni supernatant smo zamrznili in do analize shranili pri -80°C.

Pred uporabo vzorce segrejemo na sobno temperaturo (20-25°C). Vzorce redčimo v razmerju 1:10 z raztopino pufru za redčenje. 25 µL vzorca dodamo 225 µL pufru za redčenje.

Priprava reagentov

Vse reagente pred uporabo segrejemo na sobno temperaturo (20-25°C).

Pufer za spiranje: 60 mL koncentriranega pufru za spiranje redčimo z 1140 mL destilirane ali deionizirane vode do končnega volumna 2000 mL oz. 1 del koncentriranega pufru za spiranje redčimo z 19 deli vode.

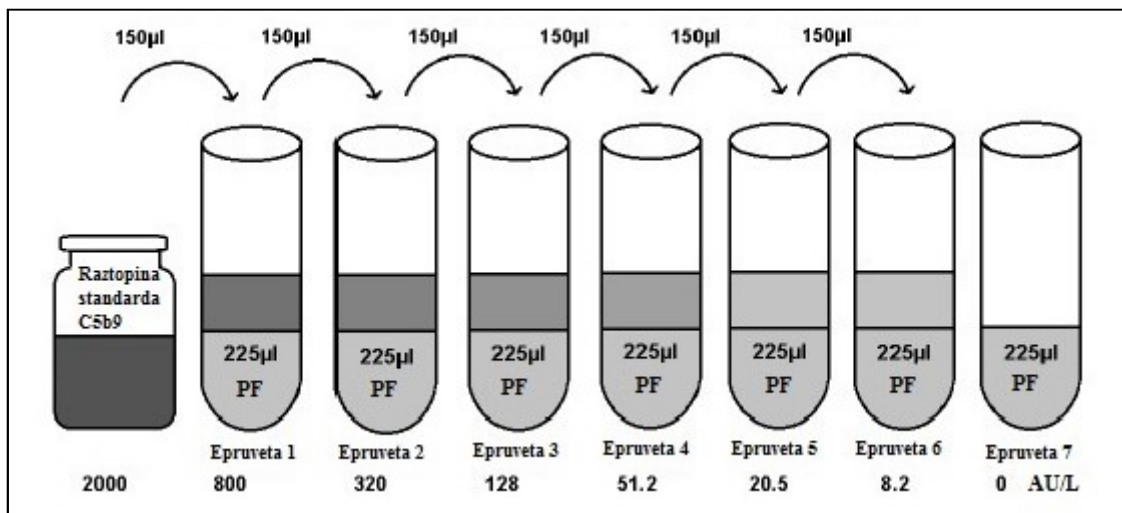
Pufer za redčenje: 7,5 mL koncentriranega pufru za redčenje redčimo z 67,5 mL pufru za spiranje oz. za redčenje 1 dela pufru za redčenje uporabimo 9 delov pufru za spiranje.

Raztopina encimskega konjugata 1: 1 mL raztopine z biotinom označenih antihumanih C5b9 protiteles redčimo z 11 mL pufru za spiranje oz. 1 del protiteles redčimo z 11 deli pufru za spiranje.

Raztopina encimskega konjugata 2: 0,25 mL koncentrirane raztopine streptavidin hrenove peroksidaze redčimo z 24,75 mL pufru za redčenje oz. 1 del raztopine streptavidin hrenove peroksidaze z 99 deli pufru za redčenje.

Raztopina standarda: V stekleničko z liofiliziranim C5b9 standardom (*Slika 7*) dodamo 1 mL pufru za redčenje in raztapljamo ob stresanju. Tako pripravljena raztopina standarda C5b9 ima koncentracijo 2000 AU/L. Pripravimo 7 epruvet in v vsako odpipetiramo 225 µL pufru za redčenje. Nato v prvo epruveto iz stekleničke prenesemo 150 µL pripravljene raztopine standarda s koncentracijo 2000 AU/L. Dobro premešamo in 150 µL te raztopine

prenesemo v drugo epruveto. Postopek ponavljamo do šeste epruvete in tako pripravimo raztopine standarda C5b9 s koncentracijami od 2000 AU/L do 8,2 AU/L. V sedmi epruveti imamo negativno kontrolo, ki jo predstavlja pufer za redčenje.

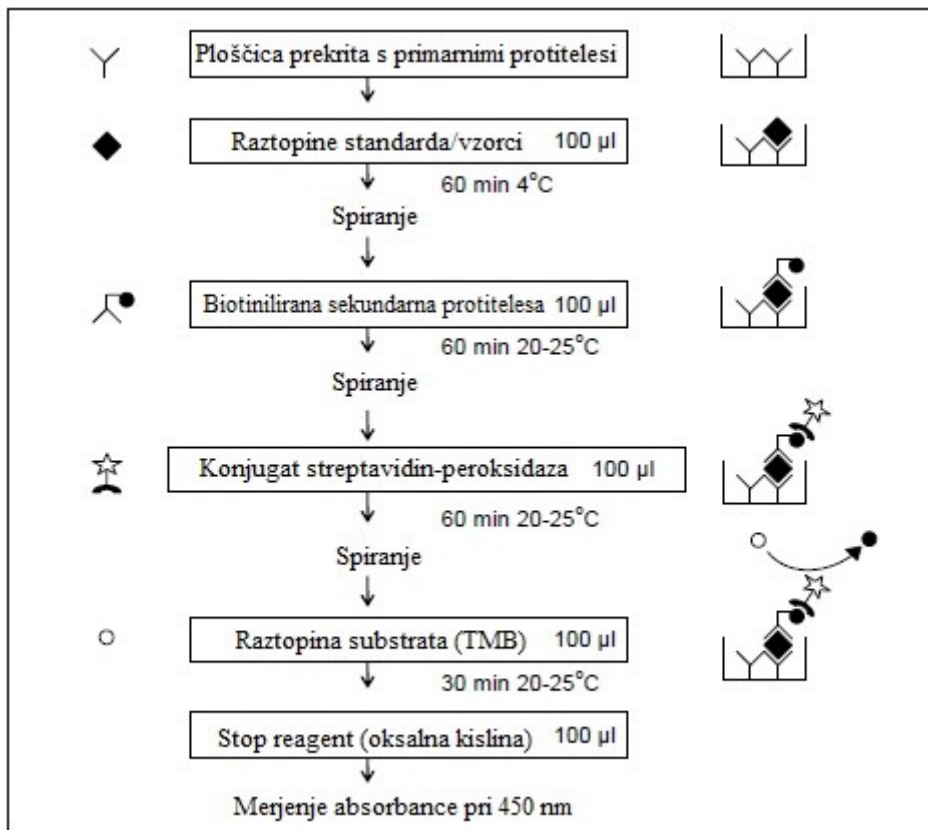


Slika 7: Priprava raztopin standarda. PF je pufer za redčenje (24).

Postopek:

Uporabimo mikrotitrne ploščice z 96 (12×8) vdolbinic, ki so prekrte s primarnimi monoklonskimi protitelesi, ki so usmerjena proti človeškemu C5b9. V vsako vdolbinico nanesemo po 100 µL različnih koncentracij raztopin standarda in vzorce. Vzorce in raztopine standarda nanašamo v dvojniku. Za slepi vzorec uporabimo pufer za redčenje. Ploščico prekrijemo s folijo in inkubiramo 60 minut pri 4°C. Nato ploščico 4-krat speremo s pufrom za spiranje. V vsako vdolbinico odpipetiramo 100 µL pripravljene raztopine sekundarnih protiteles (anti-humana C5b9 protitelesa označena z biotinom), ki se vežejo na prej nastali kompleks primarno protitelo-antigen. Ploščico prekrijemo s folijo in inkubiramo 60 minut pri sobni temperaturi (20-25°C). Po končani inkubaciji vdolbinice 4-krat speremo s spiralnim pufrom. V vdolbinice nato odpipetiramo 100 µL encimskega konjugata (streptavidin in encim hrenova peroksidaza). Streptavidin se veže na biotin. Pokrito ploščico inkubiramo 60 minut pri sobni temperaturi (20-25°C) in 4-krat speremo s pufrom za spiranje. Sledi nanos raztopine substrata TMB, 100 µL v vsako vdolbinico. Pokrijemo s folijo in inkubiramo 30 minut pri sobni temperaturi (20-25°C), zaščiteno pred svetlobo. Substrat TMB reagira z encimom hrenova peroksidaza in povzroči nastanek modrega produkta. Reakcijo ustavimo z dodatkom 100 µL stop reagenta oksalne kisline v

vsako vdolbinico. Pri tem pride do spremembe barve iz modre v rumeno. V času 30 minut po dodatku stop reagenta izmerimo absorbanco s spektrofotometričnim čitalcem mikrotitrskih ploščic pri valovni dolžini 450 nm.



Slika 8: Postopek ELISA testa za določanje aktivnosti C5b9 (24).

Izračun rezultatov:

Koncentracijo komplementa C5b9 določimo s pomočjo umeritvene krivulje. Najprej izračunamo povprečno vrednost absorbanco za vsak duplikat vzorcev in raztopin standarda. Povprečna vrednost absorbanco slepega vzorca mora biti manjša od 0,3. Od vrednosti absorbanco vzorcev in raztopin standarda odštejemo absorbanco slepega vzorca. Izračunamo koeficient variacije med absorbancami duplikatov, ki mora biti manjši od 15%. Če je višji, je potrebno postopek ponoviti. Z računalniškim programom narišemo umeritveno krivuljo. Na abscisno os nanašamo povprečne vrednosti absorbanco raztopin standarda, izmerjene pri valovni dolžini 450 nm. Na ordinatno os nanašamo koncentracije raztopin standarda. S pomočjo dobljene umeritvene krivulje določimo koncentracije komplementa C5b9 v vzorcih, tako da uporabimo vrednosti absorbanco vzorcev, od katerih

smo odšteli absorbanco slepega vzorca. Ker smo vzorce redčili, moramo koncentracije, ki jih dobimo iz umeritvene krivulje, še pomnožiti s faktorjem redčenja. V primeru redčenja 1:10, je faktor redčenja 10.

3.2.4 Statistične metode

Statistično analizo pridobljenih podatkov smo izvedli s programom Microsoft Office Excel 2007.

Test normalne porazdelitve

Preverili smo normalnost:

- starostne porazdelitve bolnikov
- porazdelitve bolnikov glede na oGF
- porazdelitve meritev aktivnosti C5b9

Normalnost porazdelitve smo testirali s statističnim testom Kolmogorov-Smirnov s privzetim 5% tveganjem napake (α). Ničelna hipoteza pri tem postopku predvideva, da je porazdelitev normalna. V primeru nenormalne porazdelitve smo izvedli logaritemsko transformacijo. Izračunali smo tudi povprečne vrednosti in standardno deviacijo. Rezultate smo prikazali z uporabo stolpičastih diagramov.

Statistična analiza korelacije oz. povezanosti

Statistično smo ovrednotili korelacijo med oGF in logaritmom aktivnosti C5b9. Izračunali smo Pearsonov koeficient, ki je merilo za linearno povezanost dveh spremenljivk. Ta rezultat smo statistično ovrednotili še s Studentovim t-testom. Ničelna hipoteza pri tem testu predvideva, da je korelacija enaka 0 oz. da med spremenljivkama ni nikakršne korelacije. Za dvostranski Studentov t-test smo privzeli 5% tveganje napake (α).

Analiza variance

Z analizo variance (ANOVA) smo statistično ovrednotili ali obstajajo razlike med tremi skupinami bolnikov z različnim oGF. Pogoj za izvedbo analize je normalnost distribucije in podobnost varianc med posameznimi skupinami. Za testiranje normalnosti distribucije smo uporabili test Kolmogorov-Smirnov, za potrditev podobnosti varianc med skupinami pa smo uporabili F-test. Pri tem ničelna hipoteza predpostavlja, da sta varianci med vzorcema statistično enaki. Nato smo izvedli analizo variance enega faktorja, kjer smo

predpostavili 5% tveganje (α). Ničelna hipoteza predpostavlja, da so povprečne vrednosti za vse tri skupine bolnikov enake.

Preverili smo tudi ali obstaja signifikantna razlika med skupino najmanj in najbolj bolnih ledvičnih bolnikov. Uporabili smo Studentov t-test s privzetim 5% tveganjem napake.

Linearna regresijska analiza

Izvedli smo linearno regresijsko analizo med logaritmom aktivnosti C5b9 in oGF ob upoštevanju 5% tveganja.

Z metodo linearne regresije najmanjših kvadratov med dvema spremenljivkama smo določili matematično zvezo med oGF in aktivnostjo komponente komplementa C5b9.

4. REZULTATI

4.1 REZULTATI MERITEV

Imeli smo vzorec 46 bolnikov. Bolniki so bili izbrani na način, da so bili zastopani iz vseh petih skupin napredovale ledvične bolezni, kot jo določa standardna klasifikacija glede na parameter oGF. Vsem bolnikom smo določili koncentracijo serumskega kreatinina, nato smo jim s pomočjo enačbe MDRD izračunali oGF (mL/min). Pri tem smo upoštevali vrednosti koncentracije serumskega kreatinina, starost in spol bolnika. Vsem bolnikom smo nato izmerili aktivnost komponente komplekta C5b9 (AU/L) v urinu in tako pridobili 48 meritev (dvema bolnikoma smo izmerili aktivnost C5b9 dvakrat v nekaj mesečnem časovnem razmiku). Vse meritve so bile izvedene v obdobju šestih mesecev. Podatki o pacientih in rezultati meritev so razvidni iz preglednice III.

Preglednica III: Podatki o bolnikih in pripadajoče meritve.

Lab.št. pacienta	Spol	Starost (leta)	oGF (mL/min/1,73 m ²)	Aktivnost C5b9 (AU/L)
94241	m	58	67	219,4
96633	m	70	42	147,1
105721	m	73	51	278,9
108328	m	51	6	2001,0
111874	ž	68	47	63,4
116376	m	61	69	12,7
122403	m	66	18	103,8
127195	m	30	91	58,1
128553	m	51	91	87,1
130557	m	38	84	47,1
132688	m	76	73	80,5
140795	m	43	38	59,9
150891	ž	28	91	41,8
150014	m	33	69	32,1
174828	m	70	56	64,6

177205	ž	44	89	45,9
177255	ž	58	26	340,1
961654	ž	86	17	2001,0
55532	m	54	56	10,0
77450	ž	32	91	594,0
975347	m	69	30	510,5
64163	m	58	17	838,3
164568	ž	32	91	620,8
13687	ž	28	91	567,5
67984	m	57	48	578,9
961756	ž	47	20	581,1
90141	m	54	38	1108,8
974784	ž	37	46	531,8
91196	ž	41	91	359,3
40895	m	81	22	371,6
975382	m	43	31	173,2
185871	m	20	91	242,6
11490	m	41	29	174,5
969959	ž	50	91	193,4
969923	m	73	57	321,4
30442	m	60	38	2001,0
984628	m	44	33	434,2
991750	m	76	51	419,7
79985	ž	64	34	380,5
84904	ž	43	51	586,1
976332	m	52	84	471,2
961607	m	40	60	488,7
984280	ž	59	14	905,3
983011	m	84	55	693,3
70984	m	65	13	49,8
961652	ž	45	84	105,6
67741	ž	69	53	85,8
965837	m	51	91	104,3

4.2 TEST NORMALNE PORAZDELITVE

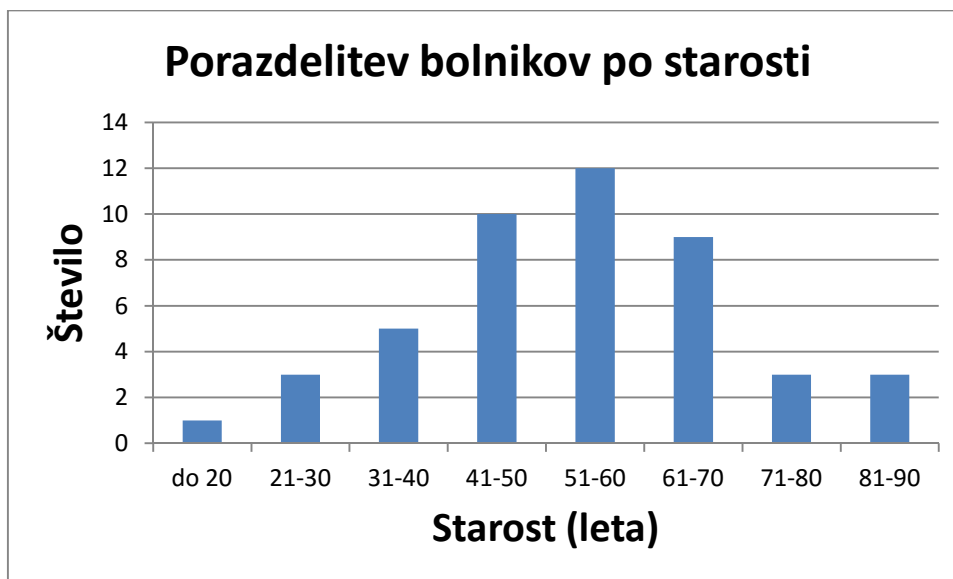
4.2.1 Test normalnosti starostne porazdelitve

Z namenom, da bi lahko rezultate ustrezno statistično ovrednotili, smo najprej preizkusili ali je vzorec pacientov porazdeljen v skladu z normalno distribucijo. V primeru, da je vzorec normalno porazdeljen, lahko uporabimo analizo variance in druge korelacijske študije, saj lahko le v primeru normalne distribucije govorimo o povprečnih vrednostih in standardnih deviacijah. Normalnost distribucije smo testirali s Kolmogorov-Smirnov testom za normalnost distribucije.

Paciente smo po starosti razdelili v 8 starostnih razredov. Frekvenčna distribucija je prikazana v preglednici IV in na sliki 9.

Preglednica IV: Frekvenčna distribucija bolnikov po starosti.

Starost bolnikov (leta)	Število
do 20	1
21-30	3
31-40	5
41-50	10
51-60	12
61-70	9
71-80	3
81-90	3



Slika 9: Diagram normalnosti starostne porazdelitve bolnikov.

Za testiranje normalnosti starostne porazdelitve po postopku Kolmogorov-Smirnov smo sestavili ustrezno preglednico (preglednica V).

Preglednica V: Testiranje normalnosti starostne porazdelitve bolnikov po Kolmogorov-Smirnov postopku.

Starost	Frekvenca	Kumulativa	$S_n(x)$	$F(x)$	Razlika
20	1	1	0,0217	0,0176	0,0041
28	2	3	0,0652	0,0542	0,0110
30	1	4	0,0870	0,0694	0,0175
32	1	5	0,1087	0,0877	0,0209
33	1	6	0,1304	0,0981	0,0323
37	1	7	0,1522	0,1487	0,0034
38	1	8	0,1739	0,1637	0,0102
40	1	9	0,1957	0,1965	0,0008
41	2	11	0,2391	0,2143	0,0248
43	3	14	0,3043	0,2525	0,0518
44	2	16	0,3478	0,2729	0,0749
45	1	17	0,3696	0,2941	0,0754
47	1	18	0,3913	0,3386	0,0527

50	1	19	0,4130	0,4096	0,0034
51	3	22	0,4783	0,4341	0,0442
52	1	23	0,5000	0,4588	0,0412
54	2	25	0,5435	0,5087	0,0348
57	1	26	0,5652	0,5830	0,0177
58	3	29	0,6304	0,6072	0,0232
59	1	30	0,6522	0,6310	0,0211
60	1	31	0,6739	0,6544	0,0195
61	1	32	0,6957	0,6772	0,0185
64	1	33	0,7174	0,7413	0,0239
65	1	34	0,7391	0,7612	0,0220
66	1	35	0,7609	0,7801	0,0192
68	1	36	0,7826	0,8153	0,0327
69	2	38	0,8261	0,8315	0,0055
70	2	40	0,8696	0,8468	0,0227
73	1	41	0,8913	0,8870	0,0043
76	1	42	0,9130	0,9190	0,0059
76	1	43	0,9348	0,9190	0,0158
81	1	44	0,9565	0,9565	0,0000
84	1	45	0,9783	0,9712	0,0071
86	1	46	1,0000	0,9785	0,0215

Povprečna starost: 53,65

Standardna deviacija: 15,98 D_n 0,0754

Število bolnikov: 46 $D_{n,\alpha}$ 0,1978

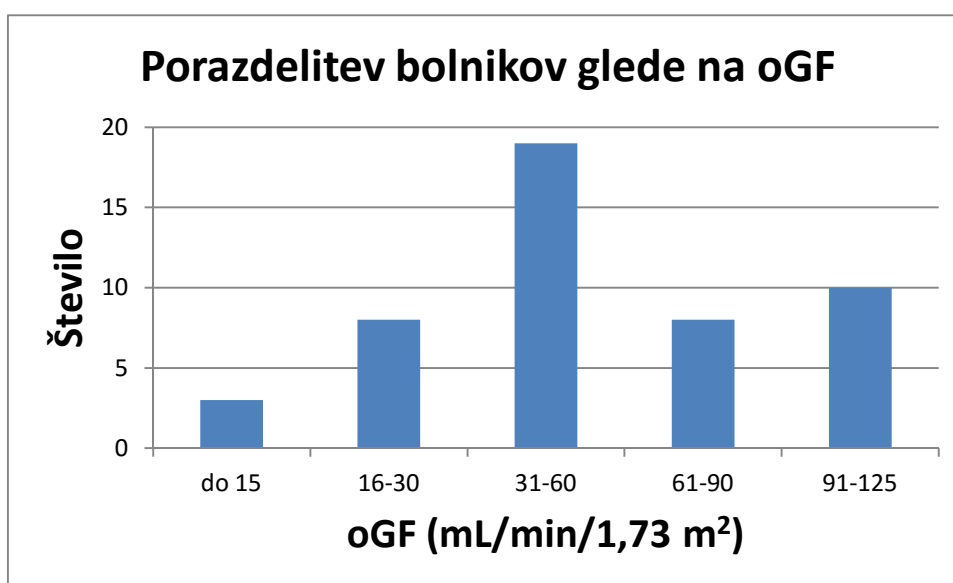
Ničelna hipoteza predvideva, da je starostna porazdelitev bolnikov normalna. Vzorec smo statistično obdelali in pri tem privzeli 5% tveganje napake (α). Iz rezultatov je razvidno, da je izračunani D_n parameter (0,0754) manjši od kritičnega $D_{n,\alpha}$ (0,1978), kar pomeni, da ne moremo zavreči ničelne hipoteze. Dokazali smo, da je porazdelitev bolnikov po starosti normalna.

4.2.2 Test normalnosti porazdelitve bolnikov glede na oGF

Na podoben način smo testirali še porazdelitev pacientov glede na njihovo oGF. Bolnike, ki so sodelovali v raziskavi, smo razdelili v skupine, in sicer glede na stanje bolezni oz. klasifikacijo, ki jo določa oGF parameter. Tako so bili bolniki razporejeni v skupine z oGF do 15 mL/min/1,73 m², 15-30 mL/min/1,73 m², 31-60 mL/min/1,73 m², 61-90 mL/min/1,73 m² in 91-125 mL/min/1,73 m². Podatki so prikazani v preglednici VI in na sliki 10.

Preglednica VI: Frekvenčna distribucija pacientov po oGF.

oGF (mL/min/1,73 m²)	Število bolnikov
do 15	3
16-30	8
31-60	19
61-90	8
91-125	10



Slika 10: Diagram normalnosti porazdelitve bolnikov glede na oGF.

Preverili smo, ali je porazdelitev bolnikov glede na oGF normalna. Izvedli smo Kolmogorov-Smirnov statistični test s privzetim 5% tveganjem napake (α). Podatki in izračuni so podani v preglednici VII.

Preglednica VII: Testiranje normalnosti porazdelitve bolnikov glede na oGF po Kolmogorov-Smirnov postopku.

oGF (mL/min/1,73 m ²)	Frekvenca	Kumulativa	Sn(x)	F(x)	Razlika
6	1	1	0,0208	0,0369	0,0160
13	1	2	0,0417	0,0628	0,0212
14	1	3	0,0625	0,0675	0,0050
17	2	5	0,1042	0,0831	0,0211
18	1	6	0,1250	0,0889	0,0361
20	1	7	0,1458	0,1013	0,0446
22	1	8	0,1667	0,1149	0,0518
26	1	9	0,1875	0,1459	0,0416
29	1	10	0,2083	0,1726	0,0357
30	1	11	0,2292	0,1822	0,0470
31	1	12	0,2500	0,1920	0,0580
33	1	13	0,2708	0,2127	0,0581
34	1	14	0,2917	0,2235	0,0681
38	3	17	0,3542	0,2698	0,0844
42	1	18	0,3750	0,3204	0,0546
46	1	19	0,3958	0,3746	0,0212
47	1	20	0,4167	0,3886	0,0281
48	1	21	0,4375	0,4027	0,0348
51	3	24	0,5000	0,4459	0,0541
53	1	25	0,5208	0,4750	0,0458
55	1	26	0,5417	0,5043	0,0374
56	2	28	0,5833	0,5189	0,0644
57	1	29	0,6042	0,5335	0,0706
60	1	30	0,6250	0,5770	0,0480
67	1	31	0,6458	0,6741	0,0283
69	2	33	0,6875	0,7001	0,0126

73	1	34	0,7083	0,7491	0,0407
84	3	37	0,7708	0,8589	0,0881
89	1	38	0,7917	0,8960	0,1043
91	10	48	1,0000	0,9086	0,0914

Povprečna oGF: 54,71

Standardna deviacija: 27,24

Število bolnikov: 48

D_n 0,1043

$D_{n,\alpha}$ 0,1938

Ničelna hipoteza predvideva, da je porazdelitev bolnikov glede na oGF normalna. Izračunani D_n parameter (0,1043) je manjši od kritičnega $D_{n,\alpha}$ (0,1938), kar pomeni, da ne moremo zavreči ničelne hipoteze. Dokazali smo, da je porazdelitev bolnikov po oGF normalna.

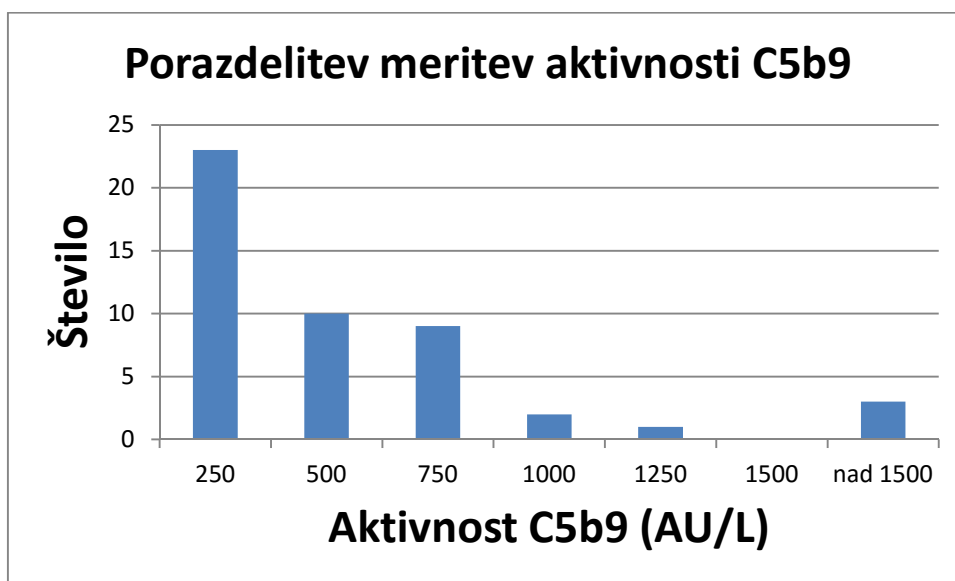
Ker je število meritev za nadaljnjo statistično obdelavo relativno majhno, smo se odločili, da bomo skupine združili in se s tem izognili premajhnemu številu bolnikov v nekaterih skupinah. Izoblikovali smo 3 skupine bolnikov. Prva skupina je združevala bolnike z največjo stopnjo bolezni, sledila je srednja skupina, ki je najbolj številčno zastopana in nato tretja skupina z najmanj izraženo ledvično boleznijo. Razporeditev bolnikov v tri skupine prikazuje preglednica VIII.

Preglednica VIII: Porazdelitev bolnikov glede na oGF po združitvi v tri skupine.

oGF (mL/min/1,73 m ²)	Število bolnikov
do 30	11
31-60	19
nad 61	18

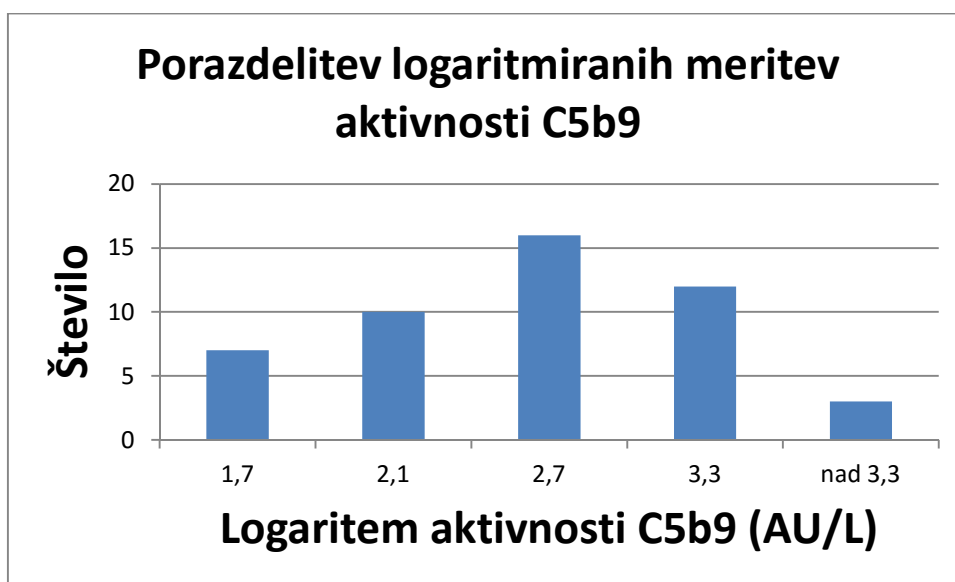
4.2.3 Test normalnosti porazdelitve meritev aktivnosti C5b9

Testirali smo normalnost porazdelitve tudi za izmerjene aktivnosti komponente komplementa C5b9 (AU/L). Grafično je takšna porazdelitev prikazana na sliki 11.



Slika 11: Diagram porazdelitve meritev aktivnosti C5b9.

Sami podatki meritev aktivnosti kompleksa C5b9 se opazno ne porazdeljujejo normalno. Porazdelitev je močno premaknjena v levo. V takšnih primerih je smiselno, da podatke logaritmujemo. Po logaritmiranju smo dobili porazdelitev, ki je grafično prikazana na sliki 12.



Slika 12: Diagram normalnosti porazdelitve logaritmiranih meritev aktivnosti C5b9.

S pomočjo Kolmogorov-Smirnov testa smo preverili ali se rezultati logaritmiranih vrednosti aktivnosti komponente komplementa C5b9 porazdeljujejo normalno. Privzeli smo 5% tveganje napake (α). Podatki in rezultati so podani v preglednici IX.

Preglednica IX: Testiranje normalnosti porazdelitve logaritmiranih meritev aktivnosti C5b9 po Kolmogorov-Smirnov postopku.

Logaritem aktivnosti	Frekvenca	Kumulativa	Sn(x)	F(x)	Razlika
1,00000	1	1	0,0208	0,0073	0,0135
1,10380	1	2	0,0417	0,0121	0,0295
1,50651	1	3	0,0625	0,0642	0,0017
1,62118	1	4	0,0833	0,0948	0,0114
1,66181	1	5	0,1042	0,1078	0,0037
1,67302	1	6	0,1250	0,1117	0,0133
1,69723	1	7	0,1458	0,1203	0,0256
1,76418	1	8	0,1667	0,1464	0,0203
1,77743	1	9	0,1875	0,1520	0,0355
1,80209	1	10	0,2083	0,1628	0,0455
1,81023	1	11	0,2292	0,1665	0,0627
1,90580	1	12	0,2500	0,2135	0,0365
1,93349	1	13	0,2708	0,2284	0,0424
1,94002	1	14	0,2917	0,2320	0,0596
2,01620	1	15	0,3125	0,2764	0,0361
2,01828	1	16	0,3333	0,2776	0,0557
2,02366	1	17	0,3542	0,2809	0,0732
2,16761	1	18	0,3750	0,3751	0,0001
2,23855	1	19	0,3958	0,4249	0,0291
2,24180	1	20	0,4167	0,4272	0,0106
2,28646	1	21	0,4375	0,4593	0,0218
2,34124	1	22	0,4583	0,4990	0,0406
2,38489	1	23	0,4792	0,5306	0,0514
2,44545	1	24	0,5000	0,5741	0,0741
2,50705	1	25	0,5208	0,6175	0,0967
2,53161	1	26	0,5417	0,6344	0,0928

2,55546	1	27	0,5625	0,6506	0,0881
2,57008	1	28	0,5833	0,6604	0,0771
2,58035	1	29	0,6042	0,6672	0,0631
2,62294	1	30	0,6250	0,6949	0,0699
2,63769	1	31	0,6458	0,7042	0,0584
2,67321	1	32	0,6667	0,7261	0,0594
2,68904	1	33	0,6875	0,7356	0,0481
2,70800	1	34	0,7083	0,7468	0,0384
2,72575	1	35	0,7292	0,7570	0,0278
2,75397	1	36	0,7500	0,7728	0,0228
2,76260	1	37	0,7708	0,7775	0,0066
2,76425	1	38	0,7917	0,7784	0,0133
2,76797	1	39	0,8125	0,7804	0,0321
2,77379	1	40	0,8333	0,7835	0,0499
2,79295	1	41	0,8542	0,7936	0,0606
2,84092	1	42	0,8750	0,8176	0,0574
2,92340	1	43	0,8958	0,8545	0,0413
2,95679	1	44	0,9167	0,8680	0,0487
3,04485	1	45	0,9375	0,8992	0,0383
3,30125	1	46	0,9583	0,9593	0,0010
3,30125	1	47	0,9792	0,9593	0,0198
3,30125	1	48	1,0000	0,9593	0,0407

Povprečen log. aktivnosti: 2,34265

Standardna deviacija: 0,54992 D_n 0,0967

Število bolnikov: 48 $D_{n,\alpha}$ 0,1938

Ničelna hipoteza predvideva, da je porazdelitev logaritma meritev normalna. Iz rezultatov je razvidno, da je izračunani D_n parameter (0,0967) manjši od kritičnega $D_{n,\alpha}$ (0,1938), kar pomeni, da ne moremo zavreči ničelne hipoteze. Dokazali smo, da je porazdelitev logaritmiranih meritev aktivnosti komplementa C5b9 (AU/L) normalna.

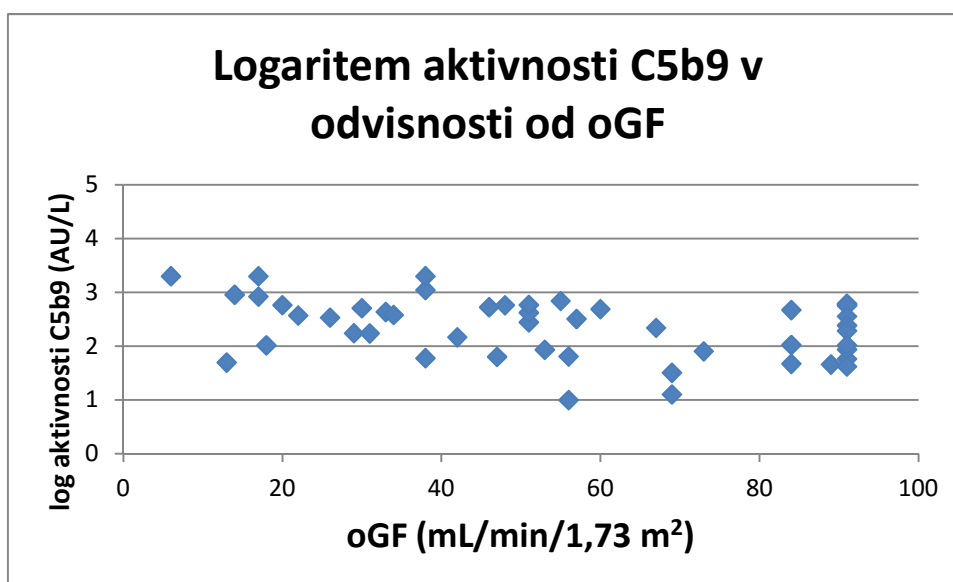
Logaritmiranje meritev aktivnosti komponente komplementa C5b9 je nenormalno porazdelitev spremenilo v normalno. Poleg tega smo z logaritmiranjem rezultatov dosegli

izenačenje varianc med posameznimi razredi bolnikov, kar bo pomembno pri izvajanju korelacijskih in primerjalnih statističnih študij med razredi v nadaljevanju.

4.3 STATISTIČNA ANALIZA KORELACIJE

Statistično smo ocenili korelacijo oz. povezanost med oGF in logaritemsko vrednostjo aktivnosti komponente C5b9 (AU/L). Teoretično je takšna korelacija pričakovana, in sicer pričakujemo negativno korelacijo, saj imajo bolniki z manj izraženo ledvično boleznijo višjo oGF in nižjo aktivnost komponente C5b9.

Grafično je odvisnost med oGF in logaritmom aktivnosti komponente C5b9 prikazana na sliki 13.



Slika 13: Odvisnost logaritma aktivnosti C5b9 od oGF.

Korelacijo med oGF in logaritmom aktivnosti komponente C5b9 smo nato statistično ovrednotili. V ta namen smo izračunali Pearsonov koeficient korelacije (r), ki je indeks korelacije v linearni povezavi dveh spremenljivk. Rezultat je prikazan v preglednici X.

Preglednica X: Korelacijska študija in t-test Pearsonovega koeficienta.

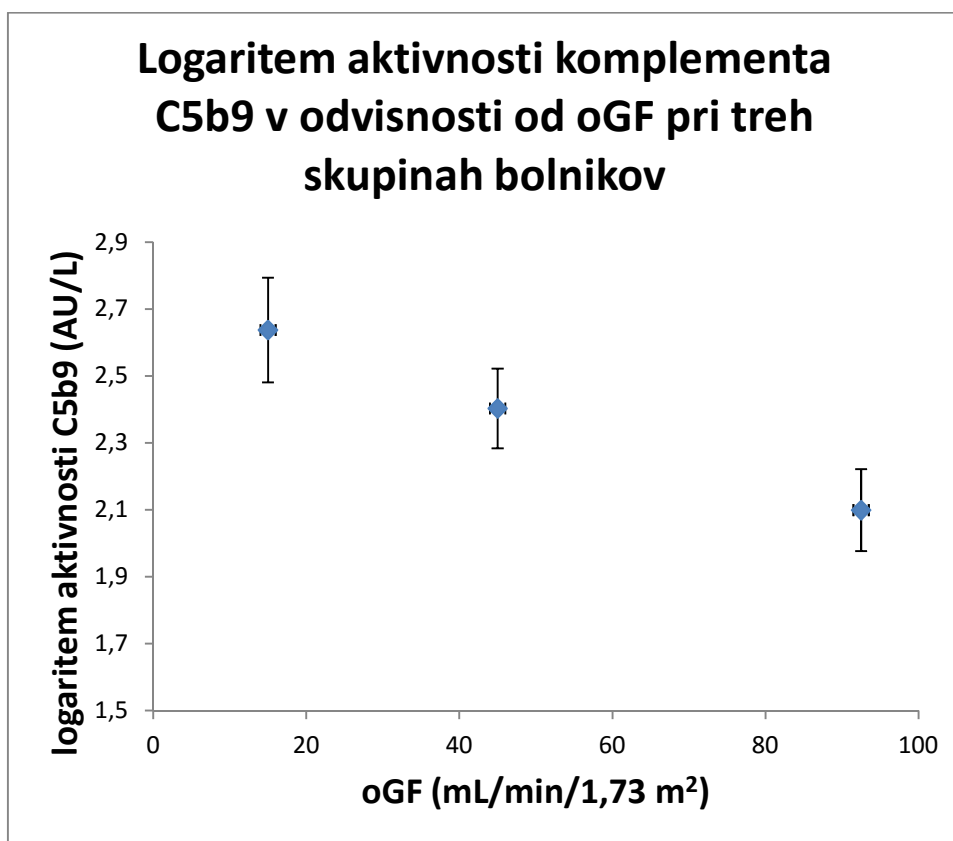
KORELACIJSKA ŠTUDIJA	
Pearsonov koeficient korelacije	-0,36048
Število bolnikov	48

t- TEST PEARSONOVEGA KOEFICIENTA	
α (tveganje)	0,05
Število strani t-testa (dvostranski)	2

Korelacija	-0,36048
Standardna napaka	0,13753
df (prostostne stopnje)	46
t (izračunana)	-2,62116
p vrednost	0,01184
t (tabelarična)	-2,012
Spodnja meja intervala zaupanja	-0,63732
Zgornja meja intervala zaupanja	-0,08365

Izračunani Pearsonov koeficient korelacije je -0,36. Ta rezultat smo statistično ovrednotili še s Studentovim t-testom, kjer ničelna hipoteza predvideva, da je korelacija enaka 0 oz. da med skupinama podatkov ni nikakršne korelacije. Za dvostranski Studentov t-test smo privzeli 5% tveganje napake (α). P vrednost površine je 0,01, kar pomeni, da zavrnamo ničelno hipotezo in sprejmemo alternativno hipotezo, da je korelacija statistično različna od 0 oz. korelacija med oGF in logaritmom aktivnosti komponente C5b9 obstaja. Korelacija sicer ni močna, saj imamo na voljo premalo bolnikov, je pa vseeno statistično značilna. Po pričakovanjih je negativna, saj imajo bolniki z manj izraženo ledvično boleznijo višji oGF in nižjo aktivnost komponenta C5b9.

Za boljši prikaz padajočega trenda smo bolnike razvrstili v tri skupine (Preglednica VIII) in grafično prikazali povprečne vrednosti skupin s pripadajočo standardno napako. To je prikazano na sliki 14.



Slika 14: Prikaz povprečnih vrednosti (s standardno napako) logaritma aktivnosti C5b9 v odvisnosti od srednje vrednosti treh skupin bolnikov z različnimi oGF.

4.4 ANALIZA VARIANCE

Statistično smo hoteli preizkusiti ali obstaja dejansko tudi statistična razlika v aktivnosti komponente komplementa C5b9 med posameznimi tremi skupinami bolnikov (Preglednica VIII).

Najprej smo potrdili razliko med vsemi tremi skupinami skupaj. To smo naredili s statistično analizo variance (ANOVA). Pogoji za izvedbo tega statističnega testa je normalnost distribucije in podobnost varianc med posameznimi skupinami. Normalnost distribucije smo že potrdili s testom Kolmogorov-Smirnov, potrditi pa smo še morali, ali so variance med skupinami statistično enake. To smo storili z F-testom. Preglednica X prikazuje izvedbo F-testa med skupino bolnikov z oGF do 30 mL/min/1,73 m² in skupino bolnikov z oGF nad 61 mL/min/1,73 m².

Preglednica XI: F-test za statistično primerjavo varianc med skupino bolnikov z oGF do 30 mL/min/1,73 m² in skupino z oGF nad 61 mL/min/1,73 m².

F-test varianc za dva vzorca		
Skupina	oGF do 30mL/min/1,73 m²	oGF nad 61mL/min/1,73 m²
Povprečje	2,63744	2,0989
Varianca	0,252831	0,247575
Število bolnikov	11	18
df (prostostne stopnje)	10	17
F (izračunana)	1,02123	
p	0,465806 NS	
F (tabelarična)	2,449916	

Ničelna hipoteza predpostavlja, da sta varianci med vzorcema statistično enaki. Iz preglednice XI je razvidno, da je površina p (0,47) večja od tveganja 5%, kar pomeni, da ne moremo zavrniti ničelne hipoteze. Varianci obeh vzorcev sta statistično enaki. Podoben F test smo izvedli tudi za ostali kombinaciji (torej primerjava med skupino do 30 mL/min/1,73 m² in 31-60 mL/min/1,73 m² ter med skupino 31-60 mL/min/1,73 m² in nad 61 mL/min/1,73 m²). Površini p sta 0,41 oz. 0,35, kar pomeni, da imajo rezultati logaritma aktivnosti C5b9 za vse tri skupine bolnikov statistično enako varianco.

Nato smo lahko izvedli enofaktorsko analizo variance. Rezultat je prikazan v preglednici XII.

Preglednica XII: Analiza variance med tremi skupinami bolnikov z različnimi oGF. SS je vsota kvadratov odklonov, df so prostostne stopnje, MS je količnik SS/df.

ANOVA: en faktor						
OPIS					α (tveganje) = 0,05	
Skupine	Število	Vsota	Povprečje	Varianca	SS	Std Napaka
oGF do 30 mL/min/1,73 m²	11	29,01184	2,6374398	0,252831	2,52830944	0,15646883
oGF 31-60 mL/min/1,73 m²	19	45,65526	2,4029085	0,298986	5,38175022	0,11905493
oGF nad 61 mL/min/1,73 m²	18	37,78021	2,0989004	0,247575	4,20877577	0,12231731

ANOVA						
Viri	SS	df	MS	F (izrač.)	p vrednost	F (tabelarična)
Med skupinami	2,094351	2	1,0471756	3,888402	0,02768931	3,20431729
Znotraj skupin	12,11884	45	0,2693075			
Skupaj	14,21319	47	0,3024082			

Ničelna hipoteza predpostavlja, da so povprečne vrednosti za vse tri skupine bolnikov enake. Iz preglednice XII je razvidno, da ob predpostavki 5% tveganja, lahko zavrnilo ničelno hipotezo ($p=0,027$) in sprejmemo alternativno hipotezo. Povprečne vrednosti logaritma aktivnosti C5b9 so med tremi skupinami bolnikov statistično razlikujejo.

To pomeni, da je aktivnost C5b9 statistično različna med bolniki z različnimi stopnjami bolezni.

Preverili smo tudi ali obstaja signifikantna razlika med skupino bolnikov z najmanj okvarjeno ledvično funkcijo in skupino bolnikov z najbolj okvarjeno ledvično funkcijo. Uporabili smo dvostranski Studentov t-test, pri čemer smo privzeli, da sta varianci statistično enaki, kar smo že predhodno potrdili z F-testom (Preglednica XI). Tveganje (α) je 5%. Rezultati so prikazani v preglednici XIII.

Preglednica XIII: Studentov t-test za primerjavo povprečnih vrednosti logaritma aktivnosti med dvema skupinama bolnikov.

t- test: Dveh neodvisnih vzorcev			
POVZETEK			
Skupina	Število	Povprečje	Varianca
oGF do 30 mL/min/1,73 m²	11	2,63743975	0,2528309
oGF nad 61 mL/min/1,73 m²	18	2,09890041	0,247575
Skupna varianca			0,2495217

t-test: Privzete enake variance					α (tveganje) = 0,05
	std napaka	t (statistična)	df	p vrednost	t (tabelarična)
Enostranski	0,19117035	2,81706514	27	0,00447591	1,70328842
Dvostranski	0,19117035	2,81706514	27	0,00895183	2,05183049

Ničelna hipoteza predvideva, da imata obe skupini enako povprečno vrednost logaritma aktivnosti komplementa C5b9. Iz preglednice XIII je razvidno, da je verjetnost p manjša od tveganja ($0,01 < 0,05$), kar pomeni, da zavrnemo ničelno hipotezo in sprejmemo alternativno hipotezo, da imata skupini najbolj in najmanj bolnih ledvičnih bolnikov različen logaritem aktivnosti komplementa C5b9. S tem smo potrdili ugotovitve, ki smo jih ugotovili že z analizo variance.

4.5 LINEARNA REGRESIJSKA ANALIZA

Nazadnje smo poskusili tudi bolj kvantificirati korelacijo med oGF in logaritmom aktivnosti komponente komplementa C5b9. Z metodo linearne regresije najmanjših kvadratov med dvema spremenljivkama smo določili matematično zvezo med oGF in aktivnostjo komponente komplementa C5b9. Rezultat je podan v preglednici XIV.

Preglednica XIV: Linearna regresijska analiza korelacije med logaritmom aktivnosti C5b9 in oGF. SS je vsota kvadratov odklonov, df so prostostne stopnje, MS je količnik SS/df.

Linearna regresijska analiza	
SKUPNO UJEMANJE	
R	0,360484
R²	0,129949
Standardna napaka	0,518489
Število vzorcev	48

ANOVA							α (tveganje) = 0,05	
	df	SS	MS	F	p vrednost	signifikantnost	Interval zaupanja	
Regresija	1	1,84698908	1,84698908	6,8704626	0,011838178	da		
Rezidual	46	12,3661975	0,26883038					
Skupaj	47	14,2131866						
	koeficient	std napaka	t statistični	p vrednost	spodaj	zgoraj		
Odsek na ordinati	2,740826	0,16934157	16,18519267	1,288E-20	2,399959086	3,08169289		
oGF (naklon)	-0,00728	0,00277668	-2,62115673	0,0118382	-0,01286729	-0,001688948		

Ob upoštevanju 5% tveganja lahko statistično potrdimo ($p < \alpha$) tako odsek na ordinati, kot tudi naklon premice. Statistična analiza poda tudi interval zaupanja, znotraj katerega lahko

s 95% verjetnostjo potrdimo tako vrednost odseka na ordinati, kot tudi naklon premice (Preglednica XIV).

Matematična zveza med oGF in logaritmom aktivnosti komplementa C5b9 je po metodi najmanjših kvadratov določena z:

$$\log(a) = 2,7408 - 0,0073 \times \text{oGF}$$

Enačba 9

a...aktivnost komponente komplementa C5b9 [AU/L]

oGF...ocena glomerulne filtracije [mL/min/1,73 m²]

5. RAZPRAVA

O napredovali ledvični odpovedi govorimo, kadar okvara ledvičnega delovanja traja več kot tri mesece in je prisotna eritrociturija, proteinurija, morfološke spremembe ledvic in zmanjšana glomerulna filtracija ($< 90 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ telesne površine). Napredovanje ledvične odpovedi ocenimo s stopnjo zmanjšanja glomerulne filtracije. Glede na podatek o oGF ločimo pet stopenj bolezni. Vendar pa parameter oGF ni zgođen pokazatelj napredovanja ledvične bolezni, saj je v začetni fazi glomerulna filtracija še normalna ali celo povišana. To je posledica prilagoditve neprizadetih nefronov, ki hipertrofirajo in proizvajajo več filtrata. Poleg tega oGF izračunamo iz enačb, ki poleg bolnikovega spola, starosti in rase, vključujejo še serumsko koncentracijo kreatinina. Serumsko koncentracija kreatinina pa je odvisna od številnih dejavnikov (spol, starost, prehrana, telesna aktivnost, mišična masa, zdravila) in je tudi slab pokazatelj ledvičnega delovanja v zgodnjih stopnjah ledvične odpovedi, ko glomerulna filtracija še ni zmanjšana.

Veliko boljši napovedni kazalec slabšanja ledvične funkcije je pojav proteinurije, ki je veliko bolj zgođen pokazatelj napredovanja bolezni. Pri večini bolnikov s progresivno ledvično odpovedjo je prvi znak bolezni ravno proteinurija. Čim večja je proteinurija, tem hitreje napreduje KLB. Z zmanjšanjem proteinurije lahko upočasnimo zmanjševanje glomerulne filtracije in tako upočasnimo napredovanje bolezni. Zgodnejše odkritje KLB pomeni tudi manjše tveganje za razvoj srčno-žilnih bolezni, ki so glavni vzrok smrti pri bolnikih z napredovalo ledvično boleznijo.

Zaradi teh razlogov je bil cilj diplomskega dela poiskati dodaten označevalec za oceno zmanjšane delovanja ledvic. Obetavna se je pokazala metoda določanja aktivnosti komponente komplemента C5b9 v urinu, saj je le-ta pomembno merilo poškodbe glomerulne filtracijske membrane in s tem povezanih ledvičnih bolezni. Aktivacija komplemента namreč vpliva na povečano prepustnost glomerulne membrane za beljakovine plazme, ki okvarijo tubulne celice, posledica je razvoj proteinurije. Kompleks C5b9 bi bil kot označevalec proteinurije zgođen napovedni kazalec slabšanja ledvične funkcije. Cilj naloge je bilo ugotoviti klinično uporabnost komponente komplemента C5b9 pri napredovali ledvični odpovedi.

V ta namen smo izbrali skupino 46 bolnikov, ki imajo različno stopnjo okvare ledvične funkcije. Osnovni podatki o bolnikih so vključevali spol in starost (*Preglednica II*).

Izračunali smo povprečno starost bolnikov, ki je pri moških $55,6 \pm 15,7$ let (od 20 do 84 let) in pri ženskah $49,9 \pm 16,3$ let (od 28 do 86 let). Povprečna starost vseh bolnikov, vključenih v raziskavo, je $53,7 \pm 16,0$ let (od 20 do 86 let). Opredelili smo še število bolnikov glede na spol. Od 46 bolnikov je 30 moških in 16 žensk. Izvedli smo testiranje normalnosti starostne porazdelitve, ki je pokazalo, da so bolniki glede na starost porazdeljeni normalno. Starostno porazdelitev smo testirali s testom Kolmogorov-Smirnov (*Preglednica V*).

Vsem bolnikom smo določili vrednost serumskega kreatinina in na podlagi tega podatka z enačbo MDRD izračunali vrednost oGF v mL/min/1,73 m² (*Preglednica III*). Dobili smo 48 meritev, saj smo dvema bolnikoma določili serumsko koncentracijo kreatinina in s tem oGF dvakrat, v razmiku nekaj mesecev. S Kolmogorov-Smirnov statističnim testom smo preverili, ali je porazdelitev bolnikov glede na oGF normalna. Test je dokazal normalno porazdelitev (*Preglednica VII*). Bolnike smo nato glede na oGF razdelili v pet skupin, kot jih določa standardna klasifikacija. Tako smo bolnike razporedili v skupine z oGF do 15 mL/min/1,73 m², 16-30 mL/min/1,73 m², 31-60 mL/min/1,73 m², 61-90 mL/min/1,73 m² in 91-125 mL/min/1,73 m² (*Preglednica VI*). Ker pa imamo majhno število meritev, smo se odločili, da bomo skupine združili in se tako izognili premajhnemu številu bolnikov v nekaterih skupinah (npr. v skupini z oGF do 15 mL/min/1,73 m² so bili samo trije bolniki). Zato smo bolnike razporedili v tri skupine (*Preglednica VIII*). V prvi skupini so bolniki z najbolj napredovalo okvaro ledvične funkcije (oGF do 30 mL/min/1,73 m²), v drugi skupini so bolniki z oGF 31-60 mL/min/1,73 m², v tretji skupini pa so bolniki z najmanj izraženo ledvično boleznijo (oGF nad 61 mL/min/1,73 m²).

Bolnikom smo izmerili aktivnost komplementa C5b9 v urinu (AU/L) (*Preglednica III*). Tudi v tem primeru smo pridobili 48 meritev, saj smo dvema pacientoma izmerili aktivnost C5b9 v dveh časovnih obdobjih. S Kolmogorov-Smirnov testom smo preverili normalnost porazdelitve meritev aktivnosti C5b9. Test je pokazal, da se podatki meritev aktivnosti ne porazdeljujejo normalno, zato smo se odločili za logaritemsko transformacijo podatkov. Logaritmiranje meritev aktivnosti C5b9 je nenormalno porazdelitev spremenilo v normalno, kar smo dokazali s Kolmogorov-Smirnov statističnim testom (*Preglednica IX*).

Dokazana normalna porazdelitev parametrov nam je nato omogočila izvajanje korelacijskih in primerjalnih statističnih študij v nadaljevanju. Izvedli smo statistično analizo korelacije med oGF in aktivnostjo C5b9 (*Preglednica X*). Dvostranski Studentov t-

test je pokazal, da korelacija med tema dvema parametroma obstaja ($p < \alpha$). Izračunani Pearsonov koeficient ali indeks korelacije (r) je $-0,36$. Korelacija sicer ni močna, je pa statistično značilna. Slabšo moč korelacije lahko pripišemo tudi temu, da imamo majhno število vzorcev. Z večjo skupino bolnikov bi dosegli večjo reprezentativnost rezultatov. Poleg tega imamo biološke vzorce, pri katerih lahko vrednosti precej nihajo, saj nanje vpliva več parametrov. Po pričakovanjih je korelacija negativna, saj imajo bolniki z manj napredovalo okvaro ledvične funkcije višjo oGF in nižjo aktivnost komponente komplementa C5b9.

Z namenom, da statistično ovrednotimo ali obstajajo razlike v aktivnosti komponente komplementa C5b9 med tremi skupinami bolnikov z različnimi oGF, smo naredili analizo variance (ANOVA test). Najprej smo z uporabo F-testa potrdili podobnost varianc med posameznimi skupinami bolnikov (*Preglednica XI*). Tako smo primerjali variance med skupinama z oGF $30 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ in $31\text{-}60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ ($p > \alpha$), med skupinama z oGF $31\text{-}60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ in nad $61 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ ($p > \alpha$) ter med skupinama z najmanj in najbolj okvarjeno ledvično funkcijo, torej med skupinama z oGF do $30 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ in nad $61 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ ($p > \alpha$). Potrdili smo, da imajo rezultati logaritma aktivnosti C5b9 za vse tri skupine bolnikov statistično enako varianco. Nato smo izvedli analizo variance enega faktorja med tremi skupinami z različnimi oGF (*Preglednica XII*). Test je pokazal, da razlike med povprečnimi vrednosti logaritma aktivnosti C5b9 med tremi skupinami bolnikov niso zgolj slučaj, ampak je statistično dokazana razlika ($p < \alpha$). S tem smo potrdili, da je aktivnost C5b9 statistično različna med bolniki z različnimi stopnjami okvarjene ledvične funkcije.

Z uporabo dvostranskega Studentovega t-testa smo nato preverili ali obstaja signifikantna razlika med skupino bolnikov z najbolj okvarjeno ledvično funkcijo (oGF do $30 \text{ mL/min/1,73 m}^2$) in skupino bolnikov z najmanj okvarjeno ledvično funkcijo (oGF nad $61 \text{ mL/min/1,73 m}^2$) (*Preglednica XIII*). Vrednost p je bila manjša od tveganja (α). S tem testom smo tako še dodatno potrdili ugotovitev iz analize variance, da imata skupini bolnikov s skrajnimi vrednostmi oGF različen logaritem aktivnosti C5b9.

Na koncu smo z metodo linearne regresije najmanjših kvadratov med dvema spremenljivkama določili matematično zvezo med oGF in aktivnostjo komponente komplementa C5b9 (*Preglednica XIV*). Poskusili smo narediti še številne druge regresije (kvadratne, eksponentne, logaritemske, polinomske, tehtane...), vendar nobena ni dala ustreznih oziroma bolj primernih rezultatov. Za obetavno se je sprva izkazala kvadratna

funkcija, saj se kvadratna krivulja nekoliko bolje prilagaja rezultatom kot sama linearna funkcija. Vendar pri kvadratni funkciji nismo mogli dokazati statistične značilnosti kot pri linearni funkciji. Zato smo se odločili podati regresijo zgolj za linearno funkcijo.

6. SKLEP

V diplomskem delu smo želeli ugotoviti pomen določanja komponente komplementa C5b9 v urinu bolnikov z napredovalo ledvično odpovedjo. Stopnjo ledvične okvare določa standardna klasifikacija glede na parameter oGF, naš namen pa je bilo ugotoviti, ali bi bil parameter C5b9 lahko dodaten označevalec za oceno zmanjšane delovanja ledvic in ali bi nam lahko pomagal pri opredelitvi stopnje ledvične okvare.

Po statistični obdelavi dobljenih rezultatov smo ugotovili naslednje:

- Potrdili smo signifikantno pomembno korelacijo med oGF in logaritmom aktivnosti komponente komplementa C5b9 (indeks korelacije je -0,36). Korelacija sicer ni močna, saj imamo premajhen vzorec bolnikov, je pa vseeno statistično značilna. Po pričakovanjih je negativna, saj imajo bolniki z manjšo stopnjo ledvične okvare višji parameter oGF in nižjo aktivnost komponente komplementa C5b9. Ugotovili smo, da nam aktivnost C5b9 v urinu lahko služi kot dodaten označevalec za oceno zmanjšane delovanja ledvic. Smiselno bi bilo korelacijo preveriti še z večjim številom bolnikov.
- Potrdili smo, da je aktivnost komponente komplementa C5b9 statistično različna med skupino bolnikov z najnižjo stopnjo ledvične okvare in skupino bolnikov z najvišjo stopnjo ledvične okvare. Iz tega sklepamo, da bi merjenje aktivnosti C5b9 v urinu lahko uporabili kot dodaten parameter pri opredelitvi stopnje ledvične okvare.

VIRI IN LITERATURA

1. Štiblar Martinčič D: **Anatomija, histologija in fiziologija**, 2. izdaja, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Ljubljana 2008: 151-157.
2. Barovič V: **Patologija, patološka fiziologija in osnove interne medicine**, 1. izdaja, DZS, Ljubljana 1999: 193-212.
3. Hojs R: **Interna medicina**, Bolezni sečil, Visoka zdravstvena šola, Maribor 2000: 179.
4. Pocajt M, Širca A: **Anatomija in fiziologija za medicinske šole**, DZS, Ljubljana 1996: 204-207, 209-210.
5. Berne R, Levy M: **Fiziologija**, treće izdanje, Medicinska naklada, Zagreb 1996: 663-693.
6. Hribernik M: **Anatomija ledvic**, Med Razgl 44, 2005: 223-227.
7. Milutinovič-Živin A, Petrovič D, Zorc-Pleskovič R: **Histologija**, Sečila, Medicinska fakulteta, Inštitut za histologijo in embriologijo, Littera Picta, Ljubljana 2006: 83-84.
8. Bresjanac M, Rupnik M: **Patofiziologija s temelji fiziologije**, Ledvice, 3. izdaja, Inštitut za patološko fiziologijo, Tiskarna Pleško, Ljubljana 2002: 36-38.
9. Guyton AC, Hall JE: **Textbook of Medical Physiology**, 11th Edition, Elsevier Saunders, Philadelphia 2006: 404-408.
10. Ribarič S: **Patološka fiziologija akutnega in kroničnega popuščanja ledvic**, Medicinski Razgledi 44, 2005: 257-263.
11. Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D: **Interna medicina**, 3. izdaja, Littera picta, Ljubljana, 2005: 937-940.
12. Ribarič S: **Seminarji iz patološke fiziologije**, Akutno popuščanje ledvic, 1. izdaja, Littera picta, Ljubljana, 2008: 92.
13. Ponikvar R, Buturovič-Ponikvar J: **Dializno zdravljenje**, Klinični oddelek za nefrologijo, Interna klinika, Klinični center Ljubljana 2004: 13-96, 245-254.
14. Ribarič S: **Temelji patološke fiziologije**, Kronična ledvična bolezen, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Littera Picta, Ljubljana 2009: 193-198.
15. Gorenjak M: **Določitev kreatinina in ocena glomerulne filtracije**, Slovensko združenje za klinično kemijo, Ljubljana, 2009.
16. Kovač D, Lindič J, Malovrh M, Pajek J, Rigler A, Škoberne A: **Bolezni ledvic**, 3. izdaja, Slovensko nefrološko društvo, Klinični oddelek za nefrologijo, UKC Ljubljana, 2014.

17. Bevc S, Ekart R, Hojs R: **Serumski cistatin C – nov označevalec glomerulne filtracije**, Medicinski Razgledi 45, 2006: 293-299.
18. Pavšar H, Pustoslemenšek P: **Ledvice in zdravila**, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2004: 11-12.
19. Vozelj M: **Temelji imunologije**, 1.izdaja, DZS, Ljubljana, 2000: 305-326.
20. Ferluga D, Vizjak A: **Histopatologija in patogeneza glomerulonefritisa**, Medicinski Razgledi 44, 2005, 265-290.
21. Dorland I, Newman WA: **Dorland's illustrated medical dictionary**, 30th edition, Elsevier Saunders, Philadelphia 2003: 397-399.
22. Schulze M, Donadio JV, Pruchno CJ, Baker PJ, Johnson RJ, Stahl R, Watkins S, Martin DC, Wurzner R, Gotze O, Couser WG: **Elevated urinary excretion of C5b9 complex in membranous nephropathy**, Kidney international, Vol. 40, 1991, 533-538.
23. Kon SP, Coupes B, Short CD, Solomon LR, Raftery MJ, Mallick NP, Brenchley PE: **Urinary C5b9 excretion and clinical course in idiopathic human membranous nephropathy**, Kidney international, Vol. 48, 1995, 1953-1958.
24. Hycult biotech: **ELISA KIT Human Terminal Complement Complex (TCC)**, Product information & Manual, www.hycultbiotech.com (HK328-02).
25. Kos J, Štrukelj B: **Biološka zdravila: od gena do učinkovine**, 1. izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, 2007, 178-180.
26. Ihan A, Simčič S, Kopitar A, Kotnik V, Livk J, Plankl M, Stopinšek S, Wraber B: **Opisi, indikacije in interpretacije imunoloških testov**, www.imi.si/diagnostična-dejavnost, 14-19.
27. DuBois and DuBois formula: www-users.med.cornell.edu/~spon/picu/calc/bsacalc.htm.