

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DARJA ŽVIKART

**VLOGA LIPOKALINA, POVEZANEGA Z NEVTROFILNO GELATINAZO, PRI  
PREPOZNAVNI AKUTNE OKVARE LEDVIC PO OPERACIJAH NA SRCU**

**THE ROLE OF NEUTROPHIL GELATINASE-ASSOCIATED LIPOCALIN FOR  
IDENTIFICATION OF ACUTE KIDNEY INJURY AFTER CARDIAC SURGERY**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani, v Laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih označevalcev pod mentorstvom izr. prof. dr. Milana Skitka, spec. med. biokemije in somentorstvom doc. dr. Aleša Jerina, spec. med. biokemije. Meritve koncentracij kreatinina v serumu je opravilo osebje na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo v Kliničnem centru v Ljubljani.

### **Zahvala**

Zahvaljujem se prof. dr. Milanu Skitku in doc. dr. Alešu Jerinu, ker sta mi omogočila izvedbo magistrske naloge ter za pomoč pri pisanju.

Posebna zahvala staršem in vsem mojim bližnjim, ki so me podpirali pri izdelavi naloge in me vzpodbujali.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Milana Skitka, spec. med. biokemije in somentorja doc. dr. Aleša Jerina, spec. med. biokemije.

Darja Žvikart

## **VSEBINA**

|                                                                                                   |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. UVOD .....</b>                                                                              | <b>1</b>  |
| 1.1. AKUTNA OKVARA LEDVIC .....                                                                   | 1         |
| 1.1.1. ETIOLOGIJA AOL.....                                                                        | 4         |
| 1.1.2. PATOFIZIOLOGIJA AOL .....                                                                  | 6         |
| 1.1.3. EPIDEMIOLOGIJA AOL.....                                                                    | 9         |
| <b>2. NAMEN DELA IN HIPOTEZE.....</b>                                                             | <b>18</b> |
| <b>3. MATERIALI IN METODE .....</b>                                                               | <b>19</b> |
| 3.1. MATERIALI .....                                                                              | 19        |
| 3.1.1. PREISKOVANCI.....                                                                          | 19        |
| 3.1.2. VZORCI .....                                                                               | 19        |
| 3.1.3. KOMPLET REAGENTOV ZA DOLOČANJE KONCENTRACIJE NGAL-A<br>V SERUMU.....                       | 19        |
| 3.2. METODE.....                                                                                  | 21        |
| 3.2.1. DOLOČANJE KREATININA V SERUMU S KINETIČNO JAFFEJEVO<br>REAKCIJO BREZ DEPROTEINIZACIJE..... | 21        |
| 3.2.2. DOKAZ NGAL-A V SERUMU S SENDVIČ ELISA METODO .....                                         | 21        |
| 3.2.3. PRIPRAVA VZORCEV IN REAGENTOV .....                                                        | 23        |
| 3.2.4. POSTOPEK SENDVIČ ELISA TESTA.....                                                          | 24        |
| <b>4. REZULTATI.....</b>                                                                          | <b>27</b> |
| 4.1. DELEŽ PACIENTOV Z AKUTNO OKVARO LEDVIC PO OPERACIJI SRCA<br>(PAOL) .....                     | 27        |
| 4.2. KREATININ V SERUMU .....                                                                     | 27        |
| 4.3. NGAL V SERUMU .....                                                                          | 33        |
| <b>5. RAZPRAVA.....</b>                                                                           | <b>40</b> |
| <b>6. SKLEP .....</b>                                                                             | <b>45</b> |
| <b>7. LITERATURA .....</b>                                                                        | <b>47</b> |

## POVZETEK

Akutna okvara ledvic (AOL) je resno stanje, ki pogosto nastane po operaciji srca z zunajtelesnim krvnim obtokom (ZTO). AOL se trenutno diagnosticira s funkcionalnimi označevalci, kot je merjenje koncentracije serumskega kreatinina. Kreatinin je nezanesljiv kazalec AOL, saj se poviša dokaj pozno v kliničnem poteku AOL. Najbolj obetajoč novejši zgodnji biooznačevalec je NGAL, ki kot odziv na ledvično tubulno okvaro hitro naraste v serumu. Namen naše naloge je bil dokazati, da koncentracija NGAL-a v serumu naraste prej v razvoju AOL kot koncentracija kreatinina. V raziskavo so bili vključeni bolniki z ishemično boleznijo srca s pridruženo stenozo aortne zaklopke ali brez. Bolnike smo po operaciji glede na porast koncentracije kreatinina v serumu in KDIGO kriterije razdelili v dve skupini: bolniki s PAOL in brez-PAOL. Rezultate obeh skupin smo med seboj primerjali in jih ocenili kot statistično značilne pri  $p < 0,05$ . Od 43 bolnikov jih je 20 (ali 46,5 %) po operaciji razvilo akutno okvaro ledvic. Statistično značilno razliko v koncentraciji kreatinina v serumu med skupinama brez-PAOL in s-PAOL smo ugotovili prvi dan po operaciji ( $p = 0,035$ ). Ta razlika se je še povečala drugi in tretji dan po operaciji ( $p < 0,0001$ ). Koncentracija kreatinina v serumu se torej poviša dokaj pozno v poteku razvoja AOL. Povprečna vrednost koncentracije NGAL-a dve uri po operaciji se je statistično značilno razlikovala od predoperativne povprečne koncentracije v skupini brez-PAOL ( $< 0,0001$ ) in s-PAOL ( $< 0,0001$ ). Dve uri po končanju operacije se je vrednost NGAL-a glede na predoperativno vrednost povečala za 2,3 krat v skupini s-PAOL in za 1,9 krat v skupini brez-PAOL. Povprečna vrednost zaporedne številke odvzema z najvišjo vrednostjo NGAL-a v serumu v skupini s PAOL je bila 3.3 (SD = 0,97) in za kreatinin 4,6 (SD = 0,5). Tako smo potrdili našo hipotezo, da koncentracija NGAL-a naraste prej v razvoju AOL kot koncentracija kreatinina v serumu. Dve uri po operaciji je povprečna koncentracija NGAL-a višja v skupini s-PAOL kot v skupini brez-PAOL, čeprav se statistično ni značilno razlikovala ( $p = 0,870$ ). Naše hipoteze, da je NGAL dober diagnostični kazalec zgodnje okvare ledvic ne moremo zagotovo potrditi ali ovreči, saj statistična primerjava rezultatov med skupinama s-PAOL in brez-PAOL ni pokazala statistično značilne razlike.

## ABSTRACT

Acute kidney injury (AKI) is a serious condition that frequently occurs after heart surgery using cardiopulmonary bypass. AKI is currently diagnosed by functional biomarkers, like serum creatinine measurements. Unfortunately, creatinine increase is a delayed and unreliable indicator of AKI. The most promising early novel biomarker is NGAL, which in response to renal tubular damage quickly rises in serum. The aim of our work was to demonstrate, that the concentration of NGAL levels rise earlier in the development of AKI in comparison to serum creatinine. The study included patients with ischemic heart disease with associated stenosis of the aortic valve or without. After surgery patients have been classified into two groups according to the KDIGO criteria: with AKI patients and without AKI patients. The results of the two groups were compared to each other and are evaluated as statistically significant at  $p < 0,05$ . After the operation, 20 patients out of 43 (or 46,5 %) developed acute kidney injury. Statistically significant difference in the concentration of creatinine in the serum between the groups with AKI and without AKI was found on the first day after surgery ( $p = 0,035$ ). This difference was further increased the second and the third day after surgery ( $p < 0,0001$ ). Serum creatinine concentration is increased relatively late in the course of the development of AKI. The average value of the concentration of NGAL two hours after the operation was significantly different from the pre-operational average concentrations in a group with AKI ( $< 0,0001$ ) and without AKI group ( $< 0,0001$ ). Two hours after the operation, the value of NGAL to the preoperative value has increased by 2,3 times in the group with AKI and 1,9 times in a group without AKI. The average value with the highest value of NGAL in the serum in the group with AKI was 3.3 (SD = 0,97) and creatinine 4.6 (SD = 0,5). We confirmed our hypothesis that the concentration of NGAL rise earlier in the development of AKI as a serum creatinine concentration. Two hours after surgery, the average concentration of NGAL was higher in the group with - AKI patients than in the group without - AKI patients, although not with statistically significant difference ( $p = 0,870$ ). Our hypothesis that NGAL is a good diagnostic indicator of early kidney damage cannot be definitely confirmed or disproved, since statistical comparison of results between the groups with and without AKI did not show statistically significant differences.

## SEZNAM OKRAJŠAV

AOL - akutna okvara ledvic

ATN - akutna tubulna nekroza

PAOL - pooperativna akutna okvara ledvic

ZTO - zunajtelesni krvni obtok

RIFLE - (angl. Risk, Injury, Failure, Loss, End stage kidney disease), klasifikacija AOL

AKIN - (angl. Acute Kidney Injury Network), klasifikacija AOL

KDIGO – (angl. Kidney Disease Improving Global Outcomes), klasifikacija AOL

AT II - angiotenzin II

ATP - adenzin trifosfat

CABG - (angl. coronary artery bypass graft), operacija premostitve venčnih arterij

AVR - (angl. aortic valve replacement), operacija menjave aortne zaklopke

T reg - regulatorne ali supresorske T celice

CD4 - glikoprotein, ki ga na svoji površini izražajo celice pomagalke, monociti, makrofagi in dendritične celice

CD25 -  $\alpha$  veriga IL-2 receptorja na dendritičnih celicah

TNF- $\alpha$  - (angl. tumor necrosis factor), dejavnik tumorske nekroze  $\alpha$

IL (interlevkini) - citokini

TGF- $\beta$  - (angl. transforming growth factor beta), transformirajoči rastni faktor  $\beta$

MCP-1 - ( angl. monocyte chemotactic protein-1), monocitni kemotaktični protein-1

ENA-7 – (angl. epithelial neutrophil activating peptide), epitelijski nevtrofilce aktivirajoči peptid

ICAM-1- (angl. intercellular adhesion molecule 1), celični površinski glikoprotein endotelijskih celic in celic imunskega sistema

PAF - (angl. platelet activated factor), s trombociti aktiviran faktor

RBF - (angl. renal blood flow), pretok krvi v ledvicah

ROS – (angl. reactive oxygen species), reaktivne kisikove spojine

NGAL - (angl. Neutrophil gelatinase associated lipocalin), lipokalin povezan z nevtrofilno gelatinazo

MMP-9 – (angl. matrix metalloproteinase 9), matriksna metaloproteinaza 9

NF- $\kappa$ B - (angl. nuklear faktor kappa light chain enhancer of activated B-cells), jedrni faktor, ki ima osrednjo vlogo pri uravnavanju tvorbe citokinov

CKD - (angl. Chronic Kidney Disease), kronična ledvična bolezen

CSA-NGAL - (angl. cardiac surgery associated NGAL score), rezultat NGAL-a po srčni operaciji

AUC - (angl. area under the curve)- površina pod krivuljo

ELISA - (angl. Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), encimsko imunski test

HRP - (angl. Horse-Radish Peroxidase enzyme), encim hrenova peroksidaza

# 1. UVOD

## 1.1. AKUTNA OKVARA LEDVIC

Vsako leto se na svetu opravi več kot dva milijona srčnih operacij. Pooperativna akutna okvara ledvic (PAOL) je pogost in resen zaplet po srčni operaciji in drugi najpogostejši vzrok akutne okvare ledvic (AOL) v enotah intenzivne terapije (3). AOL je sindrom hitrega zmanjševanja ledvičnega delovanja zaradi zmanjševanja glomerulne filtracije, ki se kaže s povečevanjem serumske koncentracije kreatinina in sečnine ter zmanjšano urno diurezo (1-3).

Eden od pomembnejših vzrokov za pojav PAOL je uporaba ZTO (zunajtelesni krvni obtok), (1-3). ZTO omogoča operacije na mirujočem, brezkrvnem srcu. Uporablja se pri operacijah srčnih zaklopk, arterijskih in ventrikularnih defektih septuma, večini prirojenih srčnih napak, presaditvah srca in operacijah na prsni aorti zaradi anevrizem ali poškodb (11). ZTO med operacijo omogoča, da kri obide zaustavljeno srce in pljuča, in zaradi težnosti odteka iz osrednjih ven skozi umetna pljuča (osigenator) in črpalko, ki usmeri oksigenirano kri v eno izmed velikih arterij ali aorto (12). Po prehodu skozi osigenator kri prehaja skozi toplotni izmenjevalec, kjer se po potrebi greje ali hladi. Zaradi stika krvi z nefiziološkimi površinami cevi in oksigenatorja se sproži nespecifični vnetni odziv organizma z aktiviranjem komplementnega sistema, kinin- kalikreinske poti in sproščanjem vnetnih posrednikov. Aktivira se fibrinoliza in koagulacijska pot, zato se aktivirajo trombociti. Trombociti se začnejo združevati, kar zmanjšuje njihovo število in oslabi funkcijo (11). Pri ZTO ima kri slabši pretok zaradi nepulzativnega pretoka. Kanulacija in navzkrižno pretisnjenje aorte poveča pretok ateroembolov do ledvic, ki poslabšajo ishemijo in povzročijo vnetje. Z ZTO se aktivira simpatični živčni sistem, ki vpliva na povečano sproščanje kateholaminov in indukcijo renin-angiotenzin-aldosteronskega sistema, kar lahko poslabša ledvično oksigenacijo med operacijo (6). Pri ZTO pride do hemolize in poškodbe eritrocitov ter povišanja prostega hemoglobina v plazmi. Prosti hemoglobin, ki je podvržen reakciji z vodikovim peroksidom ali superoksidnim radikalom, lahko sprošča prosto železo v cirkulacijo, ki nato sodeluje v biokemičnih reakcijah, pri čemer nastane hidroksilni radikal, ki poškoduje ledvično tkivo.

Prosti hemoglobin in prosto železo povečata produkcijo reaktivnih kisikovih spojin (4,6). Na pogostost nastanka zapletov vplivajo starost bolnika, njegovo splošno stanje in dolžina trajanja ZTO (11).

Akutno okvaro ledvic delimo v tri skupine:

- **prerenalna AOL** - nastane zaradi ledvične hipoperfuzije in predstavlja 55 do 60% bolnišničnih AOL
- **intrinzična AOL** - za njo je značilna poškodba ledvičnega parenhima in zajema približno 35 do 40% bolnišničnih AOL in obsega: akutno tubulno nekrozo (ATN), ki je posledica akutne okvare tubulov zaradi ledvične ishemije ali delovanja nefrotoksičnih snovi. ATN zajema v skupini intrinzične AOL v 90%:
  - bolezni majhnih ledvičnih žil (vaskulitisi) in/ali glomerulov (glomerulonefritisi)
  - bolezni velikih ledvičnih žil (npr. tromboza ledvične arterije ali vene)
  - akutne procese v tubulointersticiju
- **porenalna AOL** - se pojavi pri akutni obstrukciji votlega sistema sečil in predstavlja manj kot 5% AOL

Količina seča je pogosto manjša kot 400 ml/dan (oligurična AOL), lahko pa je normalna, več kot 400 ml/dan. V anuričnih primerih je diureza manjša kot 100 ml/dan (1,2).

Od leta 2004 se za AOL uporablja RIFLE klasifikacija:

- »**Risk**«, tveganje za okvaro, ki jo označuje povečanje serumske koncentracije kreatinina za 1,5 krat ali znižanje GF za > 25%, z diurezo < 0,5 ml/kg/h v 6 urah
- »**Injury**«, okvara, ki jo označuje povečanje serumske koncentracije kreatinina za 2 krat ali znižanje GF za > 50%, z diurezo < 0,5 ml/kg/h v 12 urah
- »**Failure**«, okvara, ki jo označuje povečanje serumske koncentracije kreatinina za 3 krat oz. znižanje GF za > 75% ali serumska koncentracija kreatinina  $\geq 350$   $\mu\text{mol/l}$  oz. porast serumske koncentracije kreatinina za > 44  $\mu\text{mol/dan}$ , z diurezo < 0,3 ml/kg/h v 24 urah ali anurijo, ki traja 12 ur
- »**Loss**«, izguba ledvične funkcije, ki traja več kot 4 tedne
- »**ESKD**« (angl.: end stage kidney disease), končna odpoved ledvic, ki traja več kot 3 mesece

RIFLE klasifikacija omogoča odkrivanje zgodnejših faz AOL in primerljivost kliničnih rezultatov. Za opredelitev AOL je pomemben čas nastopa spremembe serumskega kreatinina in/ali spremembe urne diureze. Poslabšanje ledvične funkcije mora biti nenadno (1-7 dni) in trajno (> 24 ur), (1,2,9).

RIFLE klasifikacija je bila leta 2007 spremenjena s strani AKIN, ki je predlagal razvrstitev AOL, ki temelji na RIFLE klasifikaciji. Obe definiciji se razlikujeta v več vidikih in ni še jasno določeno, katera ima boljšo klinično natančnost (19). Akin je visoko občutljiv razvrstitveni sistem, ki temelji na najnovejših podatkih, da majhne spremembe v serumskemu kreatininu vplivajo na klinični izid obolenja. Za določitev razreda AOL je potrebno izpolniti samo en kriterij (S-kreatinin ali urna diureza). Posamezniki, ki so na dializnem zdravljenju, so razvrščeni v razred 3, ne glede na razred v katerem so v času dializnega zdravljenja (18).

Preglednica I: Razredi AKIN klasifikacije AOL (17)

| RAZRED | Razvrstitev AOL glede na koncentracijo kreatinina v serumu                                                                                                                                                      | Razvrstitev AOL glede na urno diurezo           |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| 1.     | Povečanje S-kreatinina za $\geq 0.3$ mg/dl ( $\geq 26.4$ $\mu\text{mol/L}$ ) ali povečanje S-kreatinina $\geq 150\text{-}200\%$ (1,5-2 krat) od začetne vrednosti                                               | $< 0.5$ ml/kg/h več kot 6 ur                    |
| 2.     | Povečanje S-kreatinina $> 200\text{-}300\%$ ( $> 2\text{-}3$ krat) od začetne vrednosti                                                                                                                         | $< 0.5$ ml/kg/h več kot 12 ur                   |
| 3.     | Povečanje S-kreatinina $> 300\%$ ( $> 3$ krat) od začetne vrednosti ali S-kreatinin $\geq 4.0$ mg/dl ( $\geq 354$ $\mu\text{mol/L}$ ) z akutnim povečanjem kreatinina najmanj 0.5 mg/dl (44 $\mu\text{mol/L}$ ) | $< 0.3$ ml/kg/h več kot 24 ur ali anurija 12 ur |

Akin diagnostični kriteriji AOL temeljijo na nenadnem zmanjšanju v ledvični funkciji znotraj 48 ur, ki je trenutno definirana kot absolutno povišanje v serumskemu kreatininu za več kot ali enako 0.3 mg/dl ( $\geq 26.4$   $\mu\text{mol/L}$ ), procentualno povišanje v serumskemu kreatininu več kot ali enako 50% (1,5 krat od začetne vrednosti) ali zmanjšanje v urni diurezi (oligurija manj kot 0.5 ml/kg/h več kot 6 ur). Navedena merila vključujejo tako absolutno kot odstotno spremembo v kreatininu, zaradi vpliva variacij starosti, spola in telesne mase ter zaradi zmanjšanja potrebe po začetnem kreatininu, vendar zahtevajo vsaj dve vrednosti kreatinina znotraj 48 ur. Kriterij urne diureze je bil vključen na osnovi

njegove napovedne vrednosti. Diagnoza, ki sloni samo na osnovi kriterija urne diureze, bo morala izključiti obstrukcijo urinarnega trakta in druge reverzibilne vzroke, ki zmanjšajo izločanje urina. Navedena merila je potrebno uporabljati skupaj s klinično sliko in upoštevati vpliv nadomeščanja tekočin (17). KDIGO je leta 2012 v smernicah klinične prakse definiral in stopenjsko uvrstil AOL osnovano na kombinaciji RIFLE in AKIN kriterijev. AOL je bila opredeljena kot katerakoli izmed naslednjih predpostavk:

- povišanje v serumskem kreatininu  $\geq 0,3$  mg/dl ( $\geq 26,5$   $\mu$ mol/l) znotraj 48 ur ali
- povišanje v serumskem kreatininu za  $\geq 1,5$  krat od osnovne vrednosti, za katero je znano, da je nastalo v preteklih 7 dneh ali
- zmanjšanje volumna urina  $< 0,5$  ml/kg/h v 6 urah (19,20,21)

KDIGO razdeli AOL v razrede glede na resnost po naslednjih kriterijih:

Preglednica II: Razredi KDIGO klasifikacije AOL (19,20,21)

| Razred | Koncentracija kreatinina v serumu                                                                                                                                                                                               | Urna diureza                                                 |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| 1.     | Povečanje S-kreatinina za 1,5-1,9 krat od začetne vrednosti ali<br>$\geq 0,3$ mg/dl ( $\geq 26,5$ $\mu$ mol/l)                                                                                                                  | $< 0,5$ ml/kg/h v 6-12 urah                                  |
| 2.     | Povečanje S-kreatinina za 2,0-2,9 krat od začetne vrednosti                                                                                                                                                                     | $< 0,5$ ml/kg/h v $\geq 12$ urah                             |
| 3.     | Povečanje S-kreatinina za 3,0 krat od začetne vrednosti ali povečanje v S-kreatininu $\geq 4,0$ mg/dl ( $\geq 353,6$ $\mu$ mol/l) ali začetek dialize ali pacienti $< 18$ let, zmanjšanje OGF $< 35$ ml/min/1.73 m <sup>2</sup> | $< 0,3$ ml/kg/h v $\geq 24$ urah<br>ali anurija $\geq 12$ ur |

### 1.1.1. ETIOLOGIJA AOL

Za vzdrževanje normalne glomerulne filtracije je potrebna normalna prekrvavitev ledvic. Ledvica sprejmejo do 25% minutnega volumna srca. Kakršnakoli okvara cirkulacije krvi ali izolirana okvara znotrajledvične cirkulacije ima lahko velik vpliv na prekrvavitev ledvic (4). PAOL, ki nastane po operaciji srca z ZTO, je kombinacija prerrenalne in renalne AOL (1,2,4).

#### **1.1.1.1. PRERENALNA AKUTNA OKVARA LEDVIC**

Prerenalna AOL nastane zaradi zmanjšane prekrvavitve (hipoperfuzije) ledvic in je najbolj pogosta oblika AOL. Ledvični parenhim je neprizadet. Ko se odstrani vzrok za hipoperfuzijo, se normalizira glomerulni ultrafiltracijski pritisk in glomerulna filtracija. Zaradi hipovolemije se zniža srednji sistemski arterijski tlak. Posledično se stimulirajo arterijski in srčni baroreceptorji, ki sprožijo nevrogene in humoralne odgovore, kot je stimulacija simpatičnega živčnega sistema, renin-angiotenzin-aldosteronskega sistema in izločanje antidiuretičnega hormona. Z vazokonstrikcijo v vitalno manj pomembnih tkivih ali organih (koža, sluznice in prebavila), noradrenalin, angiotenzin II in antidiuretični hormon zagotovijo zadostno prekrvavitev srca in možganov. Zmanjša se izguba vode in soli skozi ledvica in z znojenjem (1). Normalen odziv ledvic na prerenalno AOL je maksimalna koncentracija urina in absorpcija natrija, da bi se povišal intravaskularni volumen in normalizirala ledvična prekrvavitev (4). Kompenzacijski mehanizmi med blago hipoperfuzijo ledvic ohranjajo glomerulni filtracijski tlak in glomerulno filtracijo. Ob znižani perfuziji in s tem znižanem krvnem tlaku receptorji za napetost v arterioli aferens povzročijo vazodilatacijo aferentne arteriole (avtoregulacija), vazodilatorni prostaglandini, kalikrein, kinini in dušikov oksid, ki se sintetizirajo v ledvicah, pa ta učinek še ojačajo. Angiotenzin II povzroči konstrikcijo eferentne arteriole. Tako se ohrani intraglomerulni kapilarni tlak in glomerulna filtracija. Pacienti s srčnimi operacijami so izpostavljeni nefrotoksičnim zdravilom. Najbolj razširjeni so nesteroidni antirevmatiki (NSAR) in zaviralci angiotenzinske konvertaze (ACEI), ki zmanjšajo glomerulno filtracijo. Nesteroidni antirevmatiki inhibirajo sintezo prostaglandinov, zaviralci angiotenzinske konvertaze in antagonisti angiotenzina II, pa povzročijo inhibicijo eferentne vazokonstrikcije.

Nekatere vazoaktivne snovi (inhalacijski anestetiki) in diagnostična sredstva (rentgenska kontrastna sredstva) manj kot 48 ur pred operativnim posegom povzročijo hudo vazokonstrikcijo s posledično hipoperfuzijo (1,4).

#### **1.1.1.2. AKUTNA TUBULNA NEKROZA**

ATN je posledica hude in dolgotrajno zmanjšane prekrvavitve ledvic ali vpliva različnih nefrotoksičnih zdravil. Kljub popolni odpovedi funkcije ledvic, se le-ta lahko popolnoma obnovi. Sestavljena je iz treh faz:

- **inicialna faza** - nastane zaradi ledvične ishemije ali nefrotoksina, zato je pretok krvi skozi ledvica zmanjšan na raven, da povzroči močan padec celičnega ATP in povzroči poškodbo tubulnih epitelnih celic. Poruši se struktura aktinskega citoskeleta tubulnih celic. Zaradi tubulnih in endotelijskih celičnih sprememb pride do sproščanja različnih citokinov in kemokinov, ki so odgovorni za začetek vnetnega procesa.
- **vzdrževalna faza** - nadaljevanje začetne ishemije, sproščanje citokinov in kemokinov ter vnetnega procesa. Oba procesa sta izrazitejša v stičišču skorje in sredice in zunanji sredici ledvic. Značilen je močno zmanjšan pretok krvi, zastoji krvi in kopičenje eritrocitov in levkocitov. Celice so podvržene poškodbi ter celični smrti z apoptozo in nekrozo. Najbolj prizadet je ravni deli proksimalnih tubulov in zadebeljeni ascedentni del Henleyeve pentlje, ki ležita v zunanji sredici ledvic. Vidna je izguba resic na površini tubulnih celic in različne stopnje njihove okvare (od apoptoze do nekroze), na posameznih mestih je prekinjena bazalna membrana. V tubulnem lumnu so cilindri odluščenih celic in celični drobir. Nasprotno so celice proksimalnega tubula v zunanji skorji, kjer je pretok krvi skoraj že normalen, podvržene popravljalnemu mehanizmu. V tej fazi, ki traja 1-2 tedna je že prisotna okvara parenhima.
- **faza regeneracije okvarjenega parenhima in obnovitev ledvične funkcije** - celice so podvržene popravljalnemu mehanizmu, apoptozi, migraciji in proliferaciji, da bi se ponovno vzpostavila celična integriteta. Počasi se izboljša celična funkcija in pretok krvi. Nadaljuje se celična diferenciacija, ponovno vzpostavi polarnost epiteljske celične membrane in vrne normalna funkcija celic in ledvic. Obnova ledvičnega parenhima in delovanja ledvic je odvisna od trajanja oligurije. Končna ledvična odpoved je redka (1,4).

### **1.1.2. PATOFIZIOLOGIJA AOL**

Glavni vzrok AOL po operaciji srca z ZTO so hemodinamske spremembe zaradi hipoperfuzije ledvic in sistemski vnetni odziv.

#### **1.1.2.1. HEMODINAMSKE SPREMEMBE**

Pretok krvi skozi ledvice je določen z ravnotežjem med dejavniki, ki vzpodbujajo vazokonstrikcijo ali vazodilatacijo. Glavni vzrok AOL je zmanjševanje v GFR, ki nastane

zaradi oslabitve v hemodinamični regulaciji. Posledica tega je trajno povišan ledvični žilni upor.

a) **tubuloglomerulna povratna zveza in adenzin**- zaradi poškodbe tubulov je nezadostna reabsorpcija natrijevih ionov v proksimalnih tubulih, kar povzroči aktivacijo tubuloglomerulne povratne zveze in konstrikcijo aferentne arteriole ter sočasno zmanjšanje GFR. Adenzin je vazokonstriktor, ki izhaja iz katabolizma adeninskih nukleotidov in povzroči tubuloglomerulno povratno zvezo z aktivacijo A1 receptorjev.

b) **simpatični živčni sistem in angiotenzin II (AT II)**- zaradi hipotenzije zmanjšan volumen cirkulirajoče plazme vodi do povišane aktivnosti simpatičnega živčnega sistema, ki stimulira izločanje renina. Renin poveča tvorbo AT II, ki zmanjša pretok krvi med AOL. Pacienti z AOL imajo povišano aktivnost plazemskega renina in hipertrofijo celic jukstaglomerulnega aparata.

c) **endotelin**- se izloča iz poškodovanih endotelijskih celic, je močan vazokonstriktor in močno zmanjša GFR.

d) **prostaglandini**- med ledvično hipoperfuzijo znotrajledvična generacija prostagladinov pripomore k vzdrževanju ledvičnega pretoka.

e) **PAF** (z trombociti aktiviran faktor)- producirana je tudi z ledvičnimi celicami. Vpliva na konstrikcijo aferentne arteriole in zmanjša glomerulno filtracijo. Povzroči žilno obstrukcijo.

f) **spremembe v žilni funkciji zaradi ledvične okvare**- poleg indukcije vazoaktivnih dejavnikov, lahko ledvična poškodba direktno poškoduje ledvično žilje. Vpliva na žilno odzivnost, koagulacijske kaskade in vnetne procese. Ker ni avtoregulacije pretoka krvi, zaradi zmanjšane pretoka krvi nastopi vazokonstrikcija. Značilna je endotelijska poškodba celic.

g) **dušikov oksid**- je producirana v veliki meri v ledvični sredici in ohranja pretok krvi v odziv na vazokonstriktorje (AT II).

h) **ROS** (reaktivne kisikove spojine) - superoksidni radikal vzpodbuja vazokonstrikcijo in povečuje reaktivnost AT II v ledvični skorji in sredici. Superoksidni radikal pretvori NO v peroksinitrit in blokira normalni homeostatski mehanizem vzdrževanja pretoka v sredici.

i) **edemi**- pri pomanjkanju celičnega ATP se poveča privzem natrija v celice, posledično se zveča volumen celic in nastanejo edemi. Nastane ekstravaskularni pritisk na peritubulne kapilare, ki omeji pretok.

j) **I/R (ishemija/reperfuzija)**- pride do porušenja tesnih stikov celic peritubulnih kapilar, kar dokazuje zatekanje tekočine z visokomolekularnimi dekstrani v intersticijski prostor. Zaradi zatekanja tekočine v intersticij se poveča edem, poveča se hemokoncentracija in tvorijo se skupki eritrocitov. Endotelijske poškodbe lahko vodijo do nastanka tromboz in kopičenja fibrinskih skupkov. Poveča se izražanje tkivnega faktorja (receptor za koagulacijski sistem) na endotelijskih celicah peritubulnih kapilar.

k) **infiltracija levkocitov, primarno nevtrofilcev**- se pojavi hitro po I/R poškodbi. Adhezija levkocitov na aktivirane endotelijske celice in nastanek eritrocitnih skupkov, ki povzročijo zastoje v kapilarnem pretoku ter poslabšajo hipoksijo v sredici ledvic. Levkociti prispevajo k parenhimski poškodbi celic, zaradi česar se poviša pritisk v tubulnem lumnu in zmanjša glomerulna filtracija (4,6).

#### 1.1.2.2. VNETNI PROCESI AOL

Do vnetne reakcije pride zaradi stika krvi z umetno površino ZTO cirkulirajoče naprave. Aktivirajo se nevtrofilci, trombociti, endotelijske celice, faktor XII (Hageman-ov faktor), kar vodi k produkciji prostih radikalov, citokinov, kemokinov, proteaz, povišani trombocitni adheziji, aktivaciji intrinzičnega koagulacijskega sistema, kalikrein sistema in fibrinolize (4).

Vnetje je posredovano z adhezijo levkocitov na poškodovane endotelijske celice. Zgodnji vidni znak je infiltracija vnetnih celic v kapilarah zunanje sredice. Povečana je ekspresija površinskih levkocitnih adhezijskih molekul ICAM-1 ter P in E selektinov na endotelijskih celicah. Študije so usmerjene k preprečitvi nevtrofilne infiltracije z oviranjem P-selektinov, ICAM in CD18 poti v I/R okvari ledvic. **T-celice** so prisotne v sredici ledvic. CD4<sup>+</sup> T celični INF $\gamma$  ima vlogo pri vzdrževanju AOL. Nasprotno **Treg, CD4 in CD25** (limfociti z imunosupresivnimi lastnostmi) ublažijo AOL. Blokada CD18a/ICAM patološke poti preprečuje tudi infiltracijo s T-celicami. **Komplementni sistem** je drugi vnetni sistem, ki lahko vpliva na AOL. Alternativna pot komplementa sodeluje pri vzpostavljanju AOL povzročene z I/R. Endotelij je lahko vir kemoatraktivnih faktorjev, ki pripomorejo k infiltraciji **makrofagov**. Infiltrirani makrofagi lahko še poslabšajo AOL s produkcijo visoke ravni citokinov IL-1a, IL-6, IL-12 IN TNF- $\alpha$ . V zadnjih letih so ugotovili, da so makrofagi najbolj zastopani med fazo popravila AOL. Določena populacija makrofagov izloča protivnetne spojine, kot je IL-10 in TGF- $\beta$ , ki so udeležene v popravilu tkiva z izločanjem rastnih in angiogenih faktorjev. **Vnetni mediatorji** so sintetizirani in sproščeni

s pomočjo tubulnih epitelijskih celic in aktiviranih levkocitov. Tubulne epitelijske celice producirajo TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, TGF- $\beta$ , MCP-1 in ENA-7, medtem, ko levkociti producirajo IL-1, IL-8, MCP-1 in reaktivne kisikove spojine. Ti dejavniki delujejo usklajeno, s tem da spodbujajo vnetje s pozitivno povratno zanko. Ledvična poškodba in posledično okrnjena glomerulna filtracija zmanjšata zmožnost telesa, da odstrani vnetne označevalce (4).

### **1.1.3. EPIDEMIOLOGIJA AOL**

Pogostost PAOL po operacijah na srcu znaša od 17-49 % in je odvisna od tipa operacije in stanja pacienta. Približno 2-6 % pacientov po operaciji srca potrebuje dializno zdravljenje, ki je povezano z visoko pooperativno smrtnostjo, in sicer 30-80%. Ostale klinične posledice PAOL so povečano število bolnišničnih dni, možnost razvoja CKD in povečana možnost nastopa smrti v petih letih po operaciji (3,5,7,8).

### **1.1.4. DIAGNOSTIKA AKUTNE OKVARE LEDVIC**

Trenutna definicija, ki je v uporabi za diagnosticiranje AOL, vključuje meritve serumskega kreatinina in urno diurezo (22). Kreatinin in ostali kazalci ledvične okvare zaznajo zmanjšano delovanje ledvic dokaj pozno v kliničnem poteku. Vodilni laboratorijski izziv je še vedno pomanjkanje specifičnega in primerne biooznačevalca, ki bi omogočil natančno ocenitev tveganja in pravočasno postavitev diagnoze AOL (16).

#### **1.1.4.1. KREATININ**

Kreatinin je ciklični anhidrid kreatina, ki nastane kot končni produkt razgradnje fosfokreatina. Serumski kreatinin se uporablja kot merilo za oceno glomerulne filtracije (23).

##### **1.1.4.1.1. BIOKEMIJA IN FIZIOLOGIJA**

Kreatin je sintetiziran v ledvicah, jetrih in trebušni slinavki z dvema encimsko posredovanima reakcijama. V prvi reakciji transaminidacija arginina in glicina tvori gvanidinoocetno kislino. V drugi reakciji poteka metilacija gvanidinoocetne kisline z adenzilmetioninom, ki je metilni donor. Kreatin je nato transportiran v kri do ostalih organov, kot so mišice in možgani, kjer se fosforilira do fosfokreatina, ki je visokoenergijska molekula. Pretvorba fosfokreatina in kreatina je funkcija metaboličnega

procesa mišične kontrakcije. Delež prostega kreatina v mišicah se spontano in ireverzibilno pretvori v lastni anhidrid, ki je odpadni produkt, to je kreatinin (1-2 % na dan). Količina kreatinina, ki nastaja dnevno je konstantna in je odvisna od mišične mase. Kreatinin je prisoten v vseh telesnih tekočinah in izločkih, v glomerulih se prosto filtrira in se v tubulih ne reabsorbira. Že pri normalnem ledvičnem delovanju se v manjši meri izloča tudi s tubulno sekrecijo (23). Kreatinin je v odsotnosti značilnega zmanjšanja hitrosti glomerulne filtracije neobčutljiv in nezanesljiv v diagnozi akutne tubulne poškodbe ledvic. V serumu naraste šele po tem, ko je polovica ledvične funkcije že izgubljene, kar lahko traja nekaj dni po nastopu ledvične poškodbe (4,26,27).

#### 1.1.4.1.2. LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA

V laboratorijih trenutno prevladuje določanje kreatinina s kinetično Jaffejevo metodo (brez deproteinizacije). V tej reakciji kreatinin reagira s pikratnim ionom v alkalnem mediju in tvori oranžnordeč produkt. Intenziteta barve je sorazmerna s koncentracijo kreatinina v vzorcu in se meri spektrofotometrično. Ta reakcija ni specifična za kreatinin. Z alkalnim pikratom reagirajo tudi proteini, glukoza, askorbinska kislina, ketonska telesa, piruvat, gvanidin, krvni nadomestki in številna zdravila. Veliko motečih snovi lahko delno zmanjšamo s spreminjanjem pogojev reakcije (modifikacije Jaffejeve metode): temperatura in pH reakcije, valovna dolžina meritve, časovni interval in čas meritve, odstranjevanje in zmanjševanje vpliva substanc, ki interferirajo v metodi (kromogeni in psevdoreaktanti).

Prve metode so temeljile na deproteinizaciji krvi. Metode na sodobnih analizatorjih temeljijo na poznavanju kinetike reakcije kreatinina s pikrinsko kislino (pikratom) v močno alkalnem mediju. Potek reakcije lahko razdelimo v tri obdobja. V prvem obdobju (približno 20-30 sekund) reagirajo predvsem hitri nekreatininski kromogeni (npr. acetoacetat), v drugem (30-80 sekund) reagira kreatinin, v tretjem (80-100 sekund) pa reagirajo počasni nekreatininski kromogeni (proteini). Tako lahko natančno izberemo čas in specifičnost meritve. Kinetična metoda (brez deproteinizacije), ki trenutno prevladuje v laboratorijih, je zaradi nizke cene, dostopnosti in uporabnosti zelo primerna za aplikacijo na modernih biokemičnih analizatorjih (14,23). Kinetična Jaffejeva metoda v primerjavi z encimsko metodo ali HPLC daje višje vrednosti za koncentracijo kreatinina. Zaradi odličnega ujemanja rezultatov encimske metode z referenčno metodo sledljivo do IDMS, so pri proizvajalcu Roche Diagnostic primerjali tudi rezultate z Jaffejevo kinetično metodo. Pri tem so ugotovili konstantno odstopanje kreatinina (26  $\mu\text{mol/L}$ ) po skoraj vsem

analitičnem območju. V nastavitvene parametre analizatorjev so zato vključili avtomatični popravek za izračun, oziroma kompenzacijo metode, kar predstavlja razliko med njihovo Jaffejevo in encimsko metodo. S takim popravkom postane metoda sledljiva tudi do IDMS (14).

#### **1.1.4.2. LIPOKALIN POVEZAN Z NEVTROFILNO GELATINAZO (NGAL)**

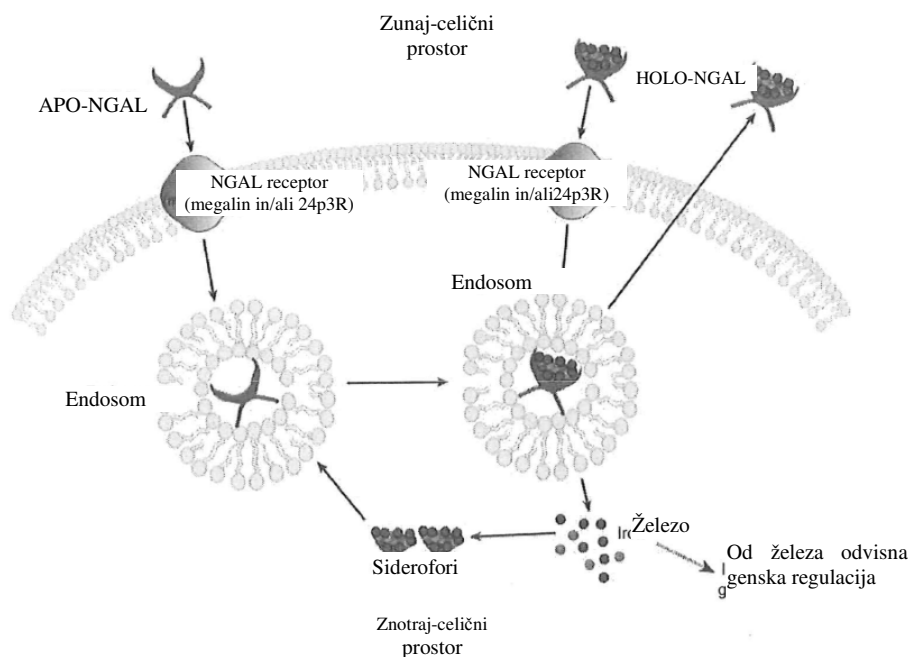
##### **1.1.4.2.1. STRUKTURA IN IZRAŽANJE**

NGAL oz. lipokalin povezan z nevtrofilno gelatinazo je protein, prvotno izoliran iz sekundarnih granul nevtrofilnih granulocitov. Pripada družini lipokalinov, ki jo predstavlja nad 20 majhnih sekrecijskih proteinov. Molekularna struktura lipokalinov zajema 8- $\beta$  podenot organiziranih v strukturo  $\beta$ -sodčka, ki tvori zaprto čašo s pridruženo obliko peclja, ki lahko veže in transportira nizkomolekularne ligande, ki opredeljujejo biološko aktivnost vsakega lipokalina (13,15,27). Humani NGAL je sestavljen iz enojne polipeptidne verige iz 178 aminokislin, z molekulsko maso 22 kDa, vendar glikozilacija poveča njegovo maso na 25 kDa (15). V serumu in urinu se pojavlja v 3 glavnih oblikah, kot 25 kDa velik monomer, 45 kDa disulfid vezujoči homodimer ali 135 kDa velik heterodimer, kjer je protein kovalentno vezan z 92 kDa MMP-9. Monomer se pretežno sprošča iz tubulnih celic, medtem ko je homodimer sintetiziran v nevtrofilcih (16). Nevtrofilci, monociti/makrofagi in adipociti so celice z obilnim izražanjem NGAL-a. NGAL je sintetiziran v zgodnji stopnji mielocita med formacijo sekundarnih granul. NGAL mRNA se normalno izraža v različnih tkivih odraslih ljudi (kostni mozeg, maternica, prostata, žleze slinavke, želodec, črevesje, sapnik, pljuča, jetra in ledvice), ki lahko konstantno izražajo NGAL protein v nizkih koncentracijah. Promotorska regija NGAL gena vsebuje vezavna mesta za številne transkripcijske faktorje, vključujoč NF- $\kappa$ B (15).

##### **1.1.4.2.2. BIOLOŠKA VLOGA**

Glavni ligandi NGAL-a so poleg MMP-9 siderofori, ki so male Fe vezujoče molekule. Interakcija NGAL-a z Fe vezujočimi siderofori vpliva na večino njegovih bioloških vlog. Biološka aktivnost NGAL-a je v tvorbi vezi s specifičnimi površinskimi receptorji, vključujoč 24p3R in megalin kompleks, ki se nahaja večinoma na meji resaste površine ledvičnih tubulnih celic. Po interakciji z receptorji se NGAL prenese v notranjost celice kot sam protein (Apo-NGAL) ali kot kompleks z Fe-vezujočimi siderofori (Holo-NGAL). V

citoplazmi se Holo-NGAL nahaja v endosomalnih mehurčkih, s pomočjo katerih pride do mesta, kjer se lahko sprosti kompleks siderofora z Fe in aktivira od Fe odvisne procese. Obratno lahko Apo-NGAL po vstopu v celico veže Fe in ga prenese v ekstracelularni prostor. Zmanjša se zaloga Fe v celici, kar lahko v določenih okoliščinah vodi v apoptozo (13).



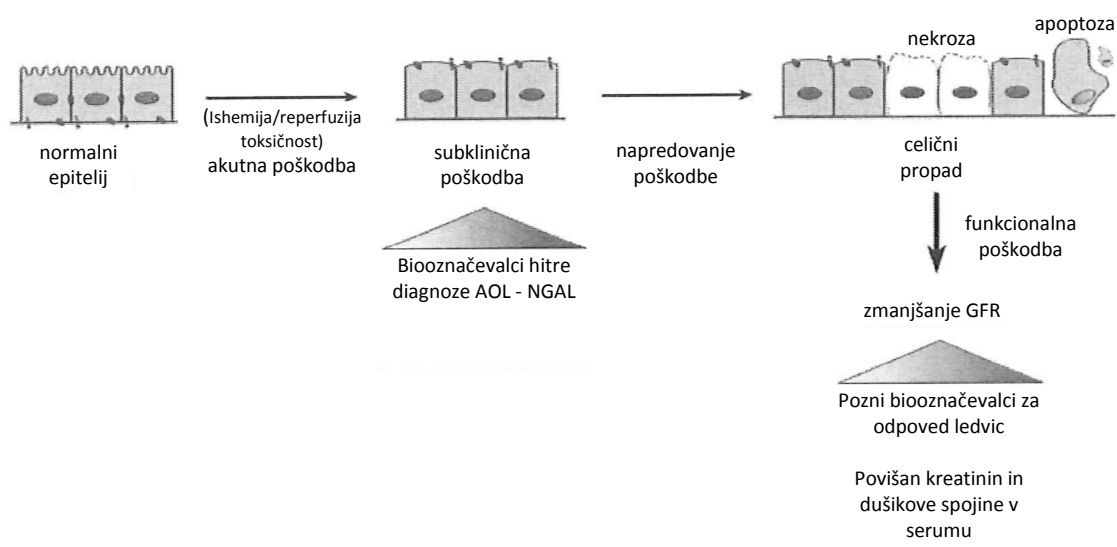
Slika 1. Prikaz mehanizma delovanja NGAL-a (13)

#### 1.1.4.2.3. NGAL IN EMBRIOGENEZA

Prenos železa z NGAL-om je pomemben za celične odzive, kot je proliferacija in diferenciacija. Med razvojem ledvic NGAL zagotavlja epitelijsko diferenciacijo mezenhimskih predhodnikov in s tem tvorbo glomerulov, proksimalnega tubula, Henleyeve zanke in distalnega tubula. Pri poškodbi zrelega organa (npr. ledvice) je biološka vloga indukcije NGAL-a ohraniti funkcijo ledvic, slabljenje apoptoze in povečanje proliferativnega odziva. Ta zaščitni učinek je odvisen od vezave toksičnega Fe iz ekstracelularnega okolja in regulirana dostava siderofora z Fe v intracelularna mesta (15).

#### 1.1.4.2.4. FIZIOLOŠKA VLOGA NGAL-A PRI AOL

Kot odziv na ledvično tubulno okvaro NGAL hitro naraste v serumu in urinu, zato je uporaben kot zgodnji kazalec ledvične okvare. NGAL ima zaščitno vlogo ledvic pri ishemični AOL. V post ishemičnih zrelih ledvicah se NGAL značilno masivno poviša v distalnem delu nefrona. Med endocitozo NGAL-a v proksimalnem tubulu lahko NGAL prenese Fe v žive celice in tako stimulira regeneracijo ledvičnih epitelijskih celic po ishemični poškodbi. Alternativna hipoteza je, da NGAL služi kot rezervoar za Fe sproščeno iz tubulnih celic po nefrotoksični poškodbi. Z odvzemom Fe kot reaktivne molekule iz mesta tkivne poškodbe, se zavira poškodba posredovana z Fe (15,25,27). NGAL je eden od najbolj izraženih genov in induciranih proteinov v poškodovanih tubulnih celicah. NGAL je neinvaziven, zgodnji diagnostični biooznačevalec AOL. V plazmi se prosto filtrira v glomerulih in reabsorbira v proksimalnih tubulih z učinkovito od megalina odvisno endocitozo. Sekretija NGAL-a v urin se pojavi samo, kadar je sočasno prisotna poškodba proksimalnega ledvičnega tubula. Ledvice niso glavni vir plazemskega NGAL-a. Ekspresija NGAL mRNA po AOL je povečana v oddaljenih organih, posebej v jetrih in pljučih. Kot rezultat je prekomerno izražen protein NGAL sproščen v cirkulacijo in pomeni samostojni sistemski pool. NGAL je dejansko reaktant akutne faze in je lahko sproščen v cirkulacijo iz nevtrofilcev, makrofagov in drugih imunskih celic po poškodbi ledvic. Po zmanjšanju glomerulne filtracije zaradi AOL, se pričakuje tudi zmanjšanje v ledvičnem očistku NGAL-a, z naknadnim kopičenjem v sistemski cirkulaciji(13,27).



Slika 2. Klinična uporabnost biooznačevalcev pri zgodnji akutni ledvični okvari (13)

#### 1.1.4.2.5. CSA-NGAL REZULTAT - POMOČ PRI OCENI AKUTNE TUBULNE POŠKODBE

Pri zdravih posameznikih imajo ledvica značilno presežno kapaciteto, zaradi česar je lahko 50% funkcionalne ledvične mase poškodovane brez padca v glomerulni filtraciji, ki je odvisna od koncentracije serumskega kreatinina. Zaradi tega poraste kreatinin v serumu dokaj pozno po začetku nastanka poškodb (24-48 ur). K zaostanku v povišanju koncentracije serumskega kreatinina dodatno prispeva hemodilucija. S strani ADQI (deseti sestanek delovne skupine) je predlagana detekcija subklinične AKI (akutna tubulna poškodba v odsotnosti funkcionalne AOL), ki pomeni povišan biooznačevalec NGAL brez povišanja v koncentraciji serumskega kreatinina. Na ta način bi se omogočila primerljivost prihodnjih študij. Pri pacientih po srčni operaciji so bile s strani ADQI predlagane mejne vrednosti NGAL-a v serumu in urinu. Mejna vrednost za ledvično tubulno poškodbo po srčni operaciji je 200 ng/L za NGAL v plazmi in 150 ng/L za NGAL v urinu. Te mejne vrednosti so povezane z možnostjo nastanka nove AOL, napredovanja AOL, slabo obnovitvijo ledvične funkcije, povečano potrebo po začetku dialize in razvoju CKD, končnim stanjem ledvične bolezni in navsezadnje napredovanjem v smrt (3, 28).

#### 1.1.4.2.6. DOLOČITEV NGAL-A S SENDVIČ STREPTAVIDIN-BIOTIN ELISA METODO

Encimskoimunski test ali ELISA je heterogena encimsko imunska tehnika, ki se pogosto uporablja v kliničnih analizah za določevanje antigenov, protiteles, zdravil, hormonov, tumorskih označevalcev in izoencimov. Temelji na specifični interakciji antigen - protitelo. Pri ELISA testu je ena od reakcijskih komponent nespecifično adsorbirana ali kovalentno vezana na površino trde faze, kot je npr. mikrotitrna ploščica, magnetični delček ali polistirenska kroglica. Ta vezava omogoča ločitev vezanega in prostega označenega reaktanta. Pri najbolj pogostem načinu ELISA tehnike se antigen v alikvotu vzorca ali kalibratorja, katerega koncentracijo določamo, veže s protitelesom vezanim na trdi podlagi (lovilno protitelo). Po spiranju se doda z encimom označeno protitelo (detekcijsko protitelo) in tvori »sendvič kompleks« z antigenom vezanim na protitelesu trde faze. Presežek protitelesa (nevezano protitelo) se spere in doda encimski substrat. Encim katalitično pretvori substrat v produkt. Količina produkta je proporcionalna količini antigena v vzorcu. Encimski imunski test uporablja katalitične lastnosti encimov za detekcijo in kvantitativno določitev imunološke reakcije. Meritev padca koncentracije

substrata ali v našem primeru naraščanje koncentracije produkta, se uporabi za detekcijo ali kvantitativno določitev antigen-protitelo reakcije. Sekundarni označevalec biotin se uporablja za ojačanje signala in s tem večje občutljivosti encimsko imunskega testa. Biotin (vodotopni vitamin H) je majhna molekula, ki je vezana na primarno (detekcijsko) protitelo. Označevanje protitelesa z biotinom je enostavno in učinkovito. Ohrani se biološka funkcija protitelesa. Biotin se veže s streptavidinom, ki je konjugiran z encimom. Vezava biotina s streptavidinom predstavlja eno najmočnejših nekovalentnih bioloških interakcij med proteinom in ligandom. Vezavno razmerje biotina s streptavidinom je 4:1. Veliko število encimskih molekul v končnem kompleksu zagotovi visoko naraščanje encimske aktivnosti, kljub majhni količini antigena, ki ga določamo. Tako je encimsko imunski test bolj občutljiv (23).

#### 1.1.4.2.7. SPEKTROFOTOMETRIČNA KVANTITATIVNA DOLOČITEV NGAL PRODUKTA

Spektrofotometrija je absorpcijska molekulska metoda, pri kateri koncentracijo analita v vzorcu ugotovimo z merjenjem absorpcije monokromatske svetlobe pri prehodu skozi raztopino vzorca. Za vzbujanje uporabimo monokromatsko svetlobo v vidnem področju (350-800 nm). Absorpcijo elektromagnetnega valovanja (svetlobe) podaja Beer-Lambertov zakon; po njem je absorbanca (A) premo sorazmerna koncentraciji,

$$A = \log \frac{I_0}{I} = a b c,$$

$I_0$  - intenziteta vpadne svetlobe,  $I$  - intenziteta izhodne svetlobe,  $a$  - absorptivnost ( $\text{Lcm}^{-1}\text{g}^{-1}$ ),  $b$  - dolžina svetlobne poti (cm),  $c$  - koncentracija (g/L)

Del intenzitete vpadnega svetlobnega žarka se lahko na površini kivete odbije, absorbira ga stena kivete ali topilo v kivetu. Te vplive odstranimo z uporabo referenčne kivete, ki je identična vzorčni kivetu ter z uporabo istega topila v vzorčni in referenčni kivetu. Glede na referenčno kiveto se aparat umeri na skalo sto procentne transmitance. Tako se lahko izmeri odstotek prepuščene svetlobe za vzorec. Pri absorpcijskih metodah potrebujemo za vzbujanje stabilen monokromatski vir valovanja. Intenziteta monokromatske svetlobe pri potovanju skozi raztopino eksponentno pojema z razdaljo, absorbanca pa je linearno sorazmerna dolžini poti svetlobe skozi raztopino. Absorptivnost je karakteristika snovi in je odvisna od valovne dolžine. Beer-Lambertov zakon velja le za vzorce z nizko

koncentracijo ( $c \leq 1 \times 10^{-3} \text{ M}$ ). Pri visokih koncentracijah zveza ni več linearna zaradi medmolekulskih interakcij in spremembe lomnega količnika (30,31).

#### 1.1.4.2.8. AVTOMATSKI ANALIZATOR Personal LAB

Personal LAB je avtomatski analizator, ki uporablja operacijski sistem Windows, s pomočjo katerega lahko na aparatu izvajamo različne encimsko imunske teste za mikrotitrne ploščice. Aparat avtomatsko izvede vse korake in vitro diagnostičnega encimsko imunskega testa. Osnovni koraki, ki jih aparat izvede so:

- prepoznavanje vzorcev glede na določeno mesto na mikrotitrski ploščici (lahko tudi z uporabo čitalca črtnih kod na epruveti)
- redčenje vzorcev, kontrol in standardov (v epruveti in mikrotitrski vdolbinici)
- dodajanje reagentov
- inkubacija vzorcev, kontrol in standardov
- izpiranje vdolbinic mikrotitrne ploščice
- merjenje absorbance s spektrofotometrom
- obdelava rezultatov meritev absorbanc
- izpis rezultatov s tiskalnikom

Aparat je opremljen z elektronskim spektrofotometrom, ki uporablja območje vidne svetlobe (400-700 nm) in je osnovni instrument za avtomatsko odčitavanje rezultatov in oceno kontrole. Merjenje je dvožarkovno, kjer istočasno merimo primerjalno raztopino in vzorec pri 450 nm ter oba signala odštevamo. S tem se izboljša občutljivost in točnost merjenja. Referenčna valovna dolžina je 620 nm.

Spektrofotometer sestavljajo naslednje komponente:

- vir svetlobe: halogenska žarnica, ki med fazo merjenja producira svetlobo z visoko intenziteto in širokim spektrom. Uporablja se za merjenje raztopin, pri katerih variirajo spremembe absorbance značilno z majhnimi spremembami v koncentraciji. Ne producira pa dovolj energije za meritve pod 320 nm.
- monokromator je sistem za izolacijo svetlobne energije željene valovne dolžine, ki izključi vse ostale valovne dolžine. Je prizma ali mreža, ki prepušča ozek del svetlobe in tako lahko merimo pri valovni dolžini maksimalne absorbcije.
- detektor: fotocelica, ki meri jakost prepuščene svetlobe in pretvori svetlobni signal v električnega.

Dvožarkovni »in time« spektrofotometer uporablja prekinjevalec svetlobnega žarka vstavljen za izstopnim žarkom. Sistem ogledal usmeri svetlobo reflektirano iz prekinjevalca alternativno skozi vzorčno in referenčno kiveto na skupni detektor. Sistem skupnega prekinjenega žarka in enega detektorja kompenzira spremembe v izvoru svetlobe in občutljivosti detektorja (31,32).

## **2. NAMEN DELA IN HIPOTEZE**

Pri operacijah na srcu z ZTO se lahko zaradi prekinjenega krvotoka in ishemije pogosto pojavi akutna okvara ledvic. Kot kazalec ledvične poškodbe se danes uporablja kreatinin v serumu, ki je v osnovi označevalec glomerulne filtracije in ne ledvične poškodbe. NGAL je novejši biooznačevalec, ki zazna ledvično oz. tubulno poškodbo.

Namen naše naloge bo s pomočjo novejšega kazalca NGAL prepoznati ledvično okvaro zgodaj po operaciji, preden nastanejo nepovratne ledvične poškodbe. Z zgodnjo prepoznavo AOL in pravilnim zdravljenjem bi se lahko izboljšala prognostična napoved poškodbe ledvic, zmanjšala bi se potreba po dializi, razvoj CKD, končna ledvična odpoved in navsezadnje smrtnost po srčnih operacijah. Izhodiščna meritev NGAL-a bi lahko bila v pomoč pri predoperativni oceni tveganja operacije. Pri pojavu ledvične poškodbe bi želeli primerjati učinkovitost novejšega kazalca NGAL s klasičnim kazalcem kreatininom.

Hipoteze:

1. Koncentracija NGAL-a v serumu naraste prej v razvoju AOL kot koncentracija kreatinina v serumu.
2. NGAL v serumu je dober diagnostični kazalec zgodnje okvare ledvic.

### **3. MATERIALI IN METODE**

#### **3.1. MATERIALI**

##### **3.1.1. PREISKOVANCI**

Raziskava je bila opazovalnega tipa, prospektivne narave. Potekala je v letu 2011/12. V raziskavo so bili vključeni bolniki z ishemično boleznijo srca s stenozo aortne zaklopke ali brez. Bolniki so bili na kardiološkem konziliju predstavljeni za operacijo premostitve venčnih arterij (CABG) z ali brez menjave aortne zaklopke (AVR) z uporabo ZTO in so prostovoljno pristali na sodelovanje v raziskavi. Vsi bolniki so bili operirani v UKC Ljubljana (10). Število preiskovancev vključenih v raziskavo je bilo 43 (n=43), od tega 27 moških in 16 žensk. Preiskovanci so bili stari od 52 do 86 let, od tega je 26 preiskovancev imelo CABG, 7 CABG z AVR in 10 AVR.

##### **3.1.2. VZORCI**

Meritve vrednosti kreatinina v serumu je opravilo osebje na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo v Kliničnem centru v Ljubljani iz rednih rutinskih meritev. Za določanje koncentracije kreatinina v serumu so vsakemu preiskovancu odvzeli vzorec krvi pred operacijo, 2 uri po končanju ZTO ter prvi, drugi in tretji dan po operaciji.

Koncentracijo NGAL-a v serumu smo določali iz zamrznjenih vzorcev seruma (-20 °C) v Laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih označevalcev Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Za določanje koncentracije NGAL-a v serumu so vsakemu preiskovancu odvzeli vzorec krvi pred operacijo, takoj po končanju ZTO, dve uri po končanju ZTO ter prvi dan po operaciji.

##### **3.1.3. KOMPLET REAGENTOV ZA DOLOČANJE KONCENTRACIJE NGAL-A V SERUMU**

Za določanje koncentracije NGAL-a v serumu smo uporabili NGAL ELISA komercialni komplet reagentov (NGAL ELISA Kit 036, BioPorto Diagnostics A/S, Gentofte, Danska), (33), ki vsebuje:

1. mikrotitrna ploščica z vdolbinicami (12 x 8 = 96 vdolbinic) in okvir. Na stenah vdolbinic so vezana specifična protitelesa proti NGAL antigenu.

2. 5x koncentrat vzorčnega diluenta (60 mL)
3. NGAL kalibratorji: 0, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ng/L (8x 1mL)
4. 25x koncentrat izpiralne raztopine ( 1x 30 mL)
5. biotinilirano NGAL protitelo (1x 12 mL)
6. streptavidin konjugiran s hrenovo peroksidazo (HRP), (1x 12 mL)
7. TMB substrat- raztopina stabiliziranega vodikovega peroksida v TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin), (1x 12 mL)
8. stop reagent: raztopina 0.5 M žveplove kisline (1x 16mL)

Dodatno zahtevan material, ki ga ni v kompletu:

1. nastavljive mikropipete z nastavki za enkratno uporabo v območju 1-1000  $\mu$ L
2. polipropilenske epruvete z volumnom do 1000  $\mu$ L
3. stojala za epruvete
4. nastavljive mikropipete z območjem 50-250  $\mu$ L
5. 1000 mL in 500 mL merilni valj
6. destilirana voda
7. pokrovček za mikrotitrsko ploščico
8. čaša za razredčeno izpiralno tekočino
9. aparat za polnjenje vdolbinic med izpiralnim postopkom
10. posodica za odlaganje že uporabljenih nastavkov za pipetiranje
11. signalna ura (z območjem do 60 min)
12. kalibriran čitalec ELISA ploščice pri 450 nm z referenčno valovno dolžino pri 620 nm
13. Na-hipoklorit (varikina) redčen 1:10 z destilirano vodo, za dekontaminacijo vzorcev, reagentov in ostalega materiala
14. električno mešalo Vorteks EV 102 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
15. centrifuga Eppendorf 5400 (Eppendorf, Netheler, Hinz GmbH, Hamburg, Nemčija)

## **3.2. METODE**

### **3.2.1. DOLOČANJE KREATININA V SERUMU S KINETIČNO JAFFEJEVO REAKCIJO BREZ DEPROTEINIZACIJE**

Princip metode temelji na reakciji kreatinina in pikratnega iona v alkalnem mediju, pri čemer nastane rdečeoranžni kompleks. Intenziteta barve je sorazmerna s koncentracijo kreatinina v vzorcu in se meri spektrofotometrično pri 505 nm.

Kinetična Jaffejeva metoda (brez deproteinizacije), ki se izvaja na biokemičnem analizatorju, daje v primerjavi z encimsko ali HPLC metodo nekoliko višje vrednosti za koncentracijo kreatinina. Zaradi odličnega ujemanja rezultatov njihove encimske metode z referenčno metodo, sledljivo do IDMS, so pri proizvajalcu Roche Diagnostics primerjali tudi rezultate z Jaffejevo kinetično metodo. Pri tem so ugotovili konstantno odstopanje kreatinina (26  $\mu\text{mol/L}$ ) po skoraj vsem analitičnem območju. Zato je proizvajalec Roche Diagnostic v nastavitvene parametre analizatorjev vključil avtomatični popravek za izračun, oziroma kompenzacijo metode, kar predstavlja razliko med njihovo Jaffejevo in encimsko metodo (14).

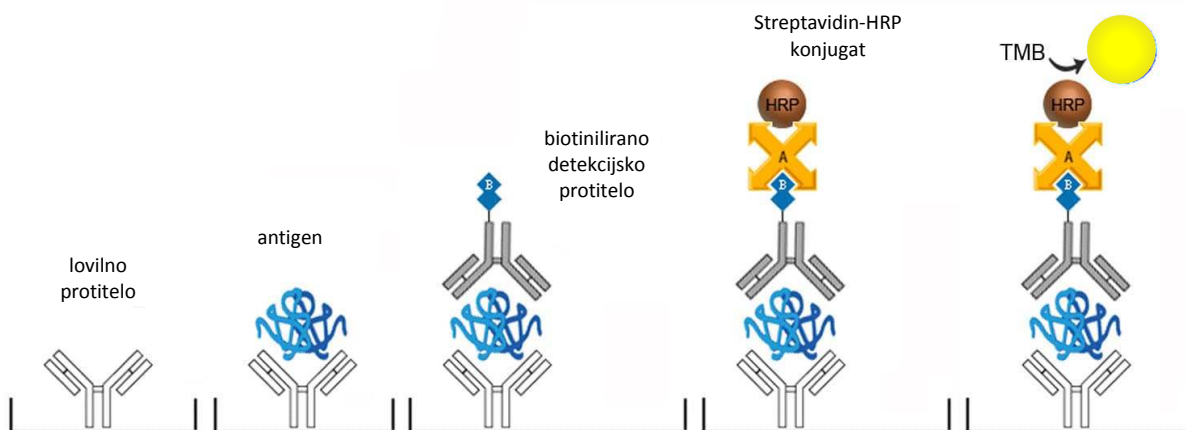
### **3.2.2. DOKAZ NGAL-A V SERUMU S SENDVIČ ELISA METODO**

Dokaz NGAL antigena v vzorcu smo izvedli s pomočjo komercialnega kompleta reagentov (proizvajalec je naveden v poglavju 5.1.3.), (33), ki temelji na barvni detekciji imunskega kompleksa. Stene vdolbinic mikrotitrne ploščice so prekrte z lovilnim monoklonskim protitelesom, ki veže antigen humani NGAL. Na NGAL se veže drugo detekcijsko monoklonsko protitelo, ki je označeno biotinom. Na biotin se veže streptavidin, konjugiran s HRP (hrenova peroksidaza), ki ob dodatku TMB substrata (vodikov peroksid), le - tega razgradi v obarvan produkt. Večja kot je intenziteta barve raztopine, več je razgrajenega substrata, s tem pa več vezanega encima, kar pomeni večjo količino vezanega NGAL antigena. Količino vezanega NGAL antigena določimo tako, da s spektrofotometrom izmerimo absorbanco vseh vdolbinic pri 450 nm.

Princip ELISA testa poteka v 4 korakih:

1. Inkubacija alikvotov kalibratorjev in razredčenih vzorcev v vdolbinicah mikrotitrne ploščice, katerih stene so prekrte z monoklonskim lovilnim

- protitelesom. NGAL antigen prisoten v raztopinah, se veže na lovilna protitelesa, medtem, ko se nevezan material spere z izpiralno raztopino.
2. V vsako testno vdolbinico se doda biotinilirano detekcijsko protitelo, sledi inkubacija. Detekcijsko protitelo se veže na vezan NGAL, nevezano protitelo se spere z izpiralno raztopino.
  3. V vsako testno vdolbinico je dodan konjugat streptavidina s HRP, ki tvori imunski kompleks z vezanim biotiniliranim protitelesom. Nevezan konjugat je odstranjen z izpiranjem.
  4. Dodatek peroksidaznega substrata, ki vsebuje TMB, v vsako testno vdolbinico. Vezan konjugat HRP-streptavidin reagira s substratom in tvori barvno reakcijo. Encimska reakcija se prekine kemično in intenziteta barvne reakcije se odčita spektrofotometrično pri 450 nm. Intenziteta barvne reakcije (absorbanca) je odvisna od koncentracije NGAL-a v vsaki testni vdolbinici. Koncentracija NGAL-a v vzorcih se določi s pomočjo kalibracijske krivulje, ki je določena iz absorbanc kalibratorjev, ki ustrezajo točno določenim koncentracijam NGAL-a.



Slika 3. Sendvič ELISA, dokaz NGAL antigena (34)

### 3.2.3. PRIPRAVA VZORCEV IN REAGENTOV

Vzorci in reagente smo za sendvič ELISA test pripravili po navodilih proizvajalca komercialnega kompleta reagentov (proizvajalec je naveden v poglavju 5.1.3.), (33).

- vse vzorce in reagente prenesemo na sobno temperaturo (20-25 °C). Mikrotitrsko ploščico postavimo za nekaj časa na sobno temperaturo zaprto v plastični foliji z absorberjem, ki prepreči tvorbo kondenzata na stenah vdolbinic ter na mikrotitrski ploščici. Vzorce dobro premešamo z rahlim obračanjem in jih, če je potrebno centrifugiramo pri nižjih obratih. Iz vrečke vzamemo toliko vrstic mikrotitrsko ploščice (1 vrstica ima 8 vdolbinic), kolikor jih potrebujemo za izvedbo testa in jih postavimo na ustrezno mesto v okvir. Mesta vdolbinic na mikrotitrski ploščici so točno določena s črkami in številkami. Ostale vrstice mikrotitrsko ploščice vrnemo v vrečko z absorberjem in jo hranimo pri temperaturi 2-8 °C.
- izpiralna raztopina: vsebino izpiralnega koncentrata (30 mL) prelijemo v merilni valj z volumnom 1000 mL in dopolnimo do 750 mL z destilirano vodo (25 x redčenje), dobro premešamo in hranimo na 2-8 °C. Tako pripravljena izpiralna tekočina je obstojna 4 tedne na 2-8 °C.
- vzorčni diluent: vsebino koncentrata vzorčnega diluenta (60 mL) prelijemo v 500 mL merilni valj in dopolnimo z destilirano vodo do 300 mL (5 x redčenje), dobro premešamo in hranimo na 2-8 °C. Razredčen vzorčni diluent je obstojen 24 ur pri temperaturi 2-8 °C, zato ga pripravimo toliko, kolikor ga porabimo za en delovni proces.
- NGAL kalibratorji: koncentracije kalibratorjev so navedene na nalepki stekleničke. Kalibratorjev ne redčimo.
- Biotinilirano NGAL protitelo: pripravljeno za uporabo in se ne redči.
- HRP-streptavidin konjugat: pripravljen za uporabo in se ne redči.
- TMB substrat: pripravljen za uporabo in se ne redči. Je občutljiv na svetlobo, zato ga hranimo zaščitene pred svetlobo.
- Stop raztopina (0,5 M žveplena kislina): pripravljena za uporabo in se ne redči.
- Vzorci: vzorce seruma redčimo s pripravljenim vzorčnim diluentom v razmerju 1:500. Za eno vdolbinico mikrotitrsko ploščice moramo zagotoviti 100 µL vzorca. Redčenje naredimo v dveh korakih: najprej razredčimo 10 µL seruma v 190 µL vzorčnega diluenta (redčitev 1:20). Nato razredčimo 10 µL 1:20 razredčenega vzorca z 240 µL vzorčnega diluenta, da dobimo končno redčitev 1:500.

Razredčene vzorce zmerno premešamo s pomočjo električnega mešala Vorteks. Ponovna redčitev vzorca z rezultatom izven mej določitve pri nižji ali višji redčitvi, je redko potrebna. Redčitve nižje od 1:10 se ne smejo uporabljati.

#### **3.2.4. POSTOPEK SENDVIČ ELISA TESTA**

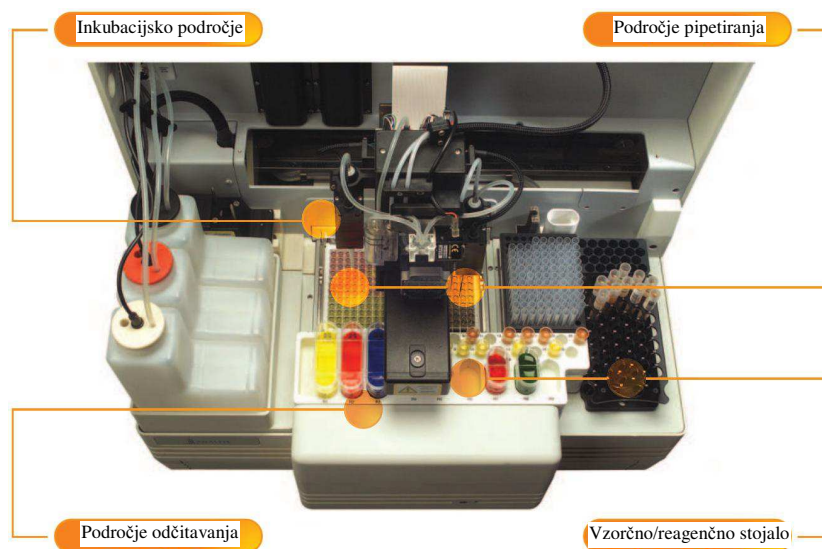
Sendvič ELISA test smo izvedli po navodilih proizvajalca komercialnega kompleta reagentov (proizvajalec je naveden v poglavju 5.1.3.), (33).

1. Določimo (s črko in številko) si mesta na mikrotitrski ploščici, kamor bomo pipetirali kalibratorje in razredčene vzorce. Kalibratorje pipetiramo v dvojniku, vzorce v enojniku. Avtomatski analizator Personal LAB ima referenčno valovno dolžino pri 620 nm. V primeru, da ELISA čitalec ne bi imel referenčne valovne dolžine, lahko izberemo mesto za vzorec z reagenčno slepo. To je mesto z vzorčnim diluentom, ki ima enak postopek ELISA testa kot redčen vzorec.
2. Na točno določena mesta mikrotitrške ploščice pipetiramo 100  $\mu$ L vsakega od kalibratorjev v dvojniku in 100  $\mu$ L vsakega od redčenih vzorcev v enojniku. Delo nadaljujemo na avtomatskem analizatorju Personal LAB, ki ga osebje laboratorija pred tem pripravi za delo. Preveriti morajo nivo tekočine v posodi z destilirano vodo ter v posodah z raztopino pufru 1 in 2, ki se uporabljajo za spiranje analizatorja in čiščenje igle in jih po potrebi dopolniti. Posodo z raztopino za pufer 1 odstranijo in na njeno mesto postavijo posodo z izpiralno raztopino. Vklapijo računalnik in tiskalnik ter zaženejo program za delo z analizatorjem. Na začetku se v programu določijo značilnosti NGAL ELISA testa po navodilih proizvajalca komercialnega kompleta reagentov (proizvajalec je naveden v poglavju 5.1.3.), (33). Nato vklopijo analizator ter odprejo program za delo. Na stresalnik analizatorja prenesemo mikrotitrsko ploščico s kalibratorji in vzorci. Le ti se inkubirajo na stresalni plošči analizatorja z 200/min, 60 minut na sobni temperaturi.
3. Po inkubaciji aparat najprej aspirira vsebino vdolbinic mikrotitrške ploščice in jih spere 3x z izpiralno raztopino. Priporočljiv je čas 1 minute mirovanja izpiralne tekočine v vdolbinicah pred izpraznitvijo vdolbinic, vsaj v zadnjem ciklu izpiranja.
4. Dodatek 100  $\mu$ L biotiniliranega NGAL protitelesa v vsako vdolbinico ter inkubacija na stresalni plošči analizatorja z 200/min, 60 minut na sobni temperaturi.
5. Izpiranje z izpiralno tekočino kot v koraku 3.

6. Dodatek 100  $\mu\text{L}$  HRP- streptavidin konjugata v vsako vdolbinico mikrotitrne ploščice ter inkubacija na stresalni plošči analizatorja z 200/min, 60 minut na sobni temperaturi.
7. Izpiranje z izpiralno tekočino kot v koraku 3.
8. Dodatek 100  $\mu\text{L}$  TMB substrata v vsako vdolbinico mikrotitrne ploščice ter inkubacija točno 10 minut na sobni temperaturi v temi. Meritev časa se začne, ko napolni aparat prvo vdolbinico.
9. Dodatek 100  $\mu\text{L}$  stop raztopine v vsako vdolbinico in mešanje vsebine vdolbinic 20 sekund z rahlim stresanjem mikrotitrne ploščice. Absorbanca vdolbinic mikrotitrne ploščice se mora določiti znotraj 30 minut.
10. Določanje absorbance vdolbinic pri 450 nm z referenčno valovno dolžino pri 620 nm. Če referenčna valovna dolžina ni na voljo, se lahko uporabi vrednost reagenčno slepe, ki se odšteje od vseh ostalih vrednosti, preden se naredijo izračuni.



Slika 4. Avtomatski analizator Personal LAB (35)



Slika 5. Notranjost avtomatskega analizatorja Personal LAB (35)

## 4. REZULTATI

### 4.1. DELEŽ PACIENTOV Z AKUTNO OKVARO LEDVIC PO OPERACIJI SRCA (PAOL)

V raziskavo je bilo vključenih 43 bolnikov. Od teh jih je 20 ( ali 46,5 %) po operaciji razvilo akutno okvaro ledvic.

### 4.2. KREATININ V SERUMU

V skupini s-PAOL in brez-PAOL smo ob različnih časih odvzema določili povprečno vrednost koncentracije kreatinina v serumu (S-kreatinin) s standardno deviacijo. Med skupinama smo ugotavljali statistično značilno razliko v povprečni koncentraciji kreatinina dve uri po operaciji, prvi, drugi in tretji dan po operaciji. Najprej smo s Kolmogorov - Smirnov testom preverili ali se povprečne vrednosti kreatinina v skupini s PAOL in brez PAOL ob različnih časih odvzema porazdeljujejo normalno.

Preglednica III: Prikaz testa normalnosti za vrednosti kreatinina v serumu

| Čas odvzema<br>vzorca(S-kreatinin) | Kolmogorov - Smirnov test |               |
|------------------------------------|---------------------------|---------------|
|                                    | brez-PAOL (n=23)          | s-PAOL (n=20) |
|                                    | P                         | P             |
| Pred operacijo                     | 0,383                     | 0,940         |
| 2 uri po končanju<br>operacije     | 0,954                     | 0,510         |
| 1.dan po operaciji                 | 0,323                     | 0,606         |
| 2.dan po operaciji                 | 0,481                     | 0,684         |
| 3.dan po operaciji                 | 0,878                     | 0,656         |

**P**= verjetnost normalne porazdelitve

Ker je verjetnost normalne porazdelitve večja od stopnje tveganja ( $> 0,05$ ), smo zavrgli alternativne hipoteze in privzeli vse ničelne hipoteze, da se podatki porazdeljujejo normalno (preglednica III).

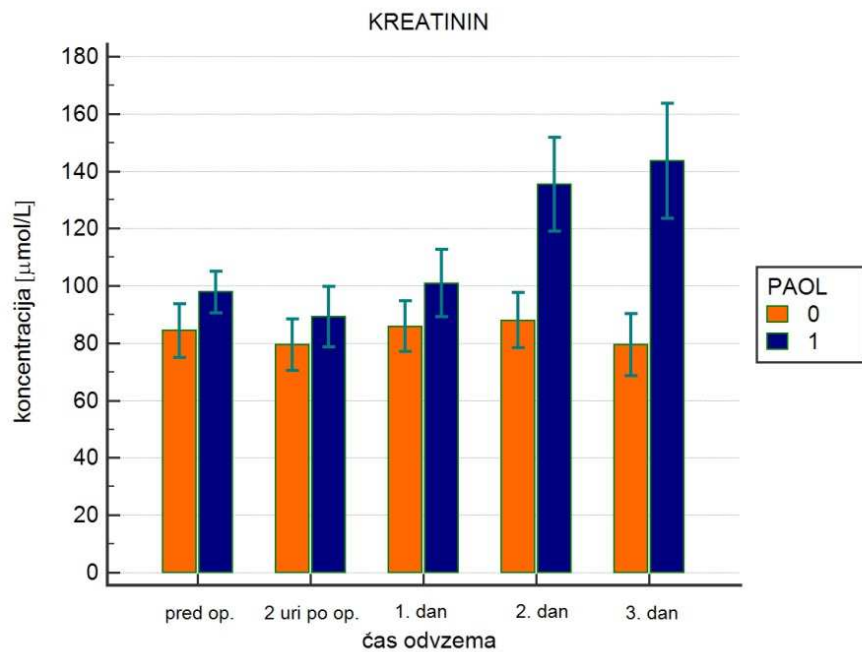
Ker se podatki pri vseh odvzemih porazdeljujejo normalno, smo za statistično analizo le-teh uporabili **enosmerno analizo variance za ponovljene meritve**.

Preglednica IV: Povprečna koncentracija kreatinina (s standardno deviacijo) v serumu in prikaz enosmerne analize variance za ponovljene meritve

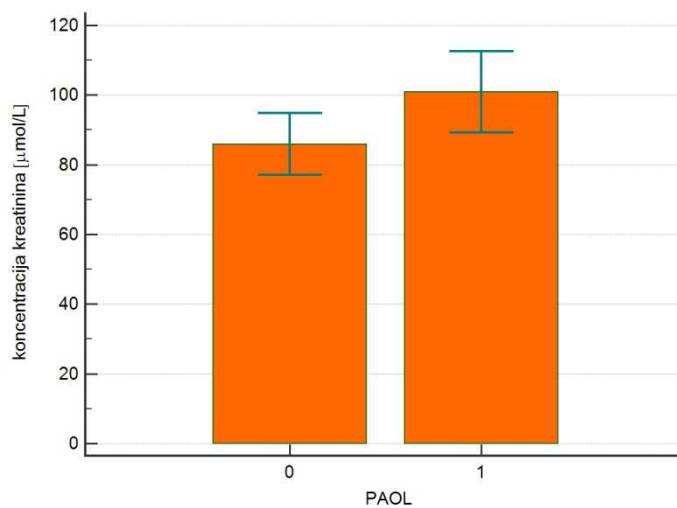
|                                   | brez-PAOL<br>(n=23)                                       | s-PAOL<br>(n=20) |        |            |            |         |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------|------------------|--------|------------|------------|---------|
| Čas odvzema<br>vzorca             | Povprečna koncentracija<br>kreatinina [ $\mu$ mol/L] (SD) |                  | F      | df-<br>BGV | df-<br>WGV | p       |
| Pred operacijo                    | 84,3 (4,5)                                                | 97,8 (3,5)       | 5,315  | 1          | 41         | 0,026   |
| 2 uri po<br>končanju<br>operacije | 79,5 (4,4)                                                | 89,3 (5,0)       | 2,177  | 1          | 41         | 0,148   |
| 1.dan po<br>operaciji             | 85,9 (4,3)                                                | 100,9 (5,6)      | 4,748  | 1          | 41         | 0,035   |
| 2.dan po<br>operaciji             | 88,0 (4,7)                                                | 135,5 (7,8)      | 28,964 | 1          | 41         | <0,0001 |
| 3.dan<br>po operaciji             | 79,4 (5,3)                                                | 143,6 (9,6)      | 36,794 | 1          | 41         | <0,0001 |

**SD**- standardna deviacija; **t**- testna statistika; **F**-porazdelitev razmerja varianc; **df**-stopinje prostosti; **BGV**- varianca med skupinami; **WGV**- varianca znotraj skupin; **p<0,05**- statistično značilna razlika; **0,05>p<0,1**- mejno statistično značilna razlika

Statistično značilno razliko v koncentraciji kreatinina v serumu med skupinama brez-PAOL in s-PAOL smo ugotovili prvi dan po operaciji ( $p=0,035$ ). Ta razlika se je še povečala drugi in tretji dan po operaciji ( $p<0,0001$ ), (preglednica IV, slika 6 in 7).



Slika 6. Povprečna vrednost koncentracije S-kreatinina v skupini brez- PAOL in s- PAOL glede na čas odvzema vzorca



Slika 7. Povprečna vrednost koncentracije S-kreatinina 1.dan po operaciji v skupini brez-PAOL in s-PAOL

Prvi dan po operaciji ima S-kreatinin v skupini s PAOL značilno višjo povprečno koncentracijo kot v skupini brez PAOL (slika 7).

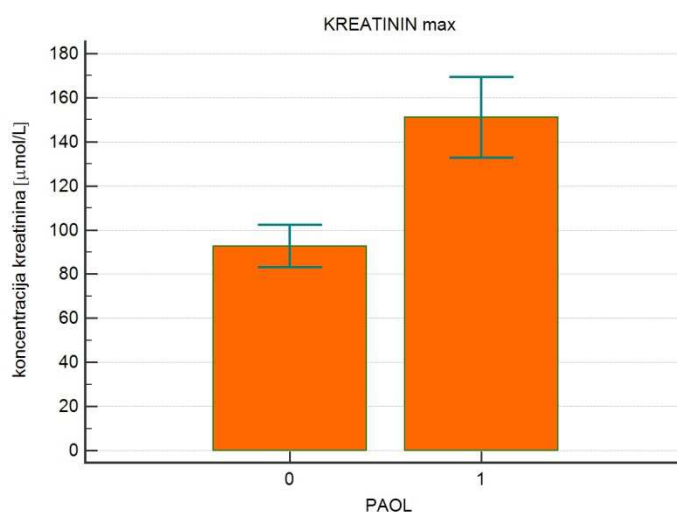
Med skupinama brez-PAOL in s-PAOL smo primerjali povprečje doseženih najvišjih vrednosti koncentracije kreatinina v serumu (kreatinin max) po operaciji, ne glede na čas odvzema vzorca. Za izračun statistično značilne razlike smo uporabili **enosmerno analizo variance**.

Preglednica V: Povprečna koncentracija kreatinin max v serumu po operaciji in prikaz enosmerne analize variance

| Povprečna koncentracija kreatinin max<br>[μmol/L] (SD) |             |              | df-<br>WGV | df-<br>BGV | F      | p      |
|--------------------------------------------------------|-------------|--------------|------------|------------|--------|--------|
|                                                        | brez-PAOL   | s-PAOL       |            |            |        |        |
| Po operaciji                                           | 92,7 (22,2) | 151,1 (39,2) | 41         | 1          | 37,425 | <0,001 |

**SD**-standardna deviacija; **df**-stopinje prostosti; **F**-porazdelitev razmerja varianc; **BGV**-varianca med skupinami; **WGV**- varianca znotraj skupin; **p<0,05**-statistično značilna razlika; **0,05>p<0,1**-mejno statistično značilna razlika

Povprečje doseženih najvišjih vrednosti koncentracije kreatinina v serumu po operaciji, ne glede na čas odvzema vzorca, se je med skupinama s-PAOL in brez-PAOL statistično značilno razlikovalo ( $p<0,001$ ), (preglednica V, slika 8).



Slika 8. Povprečje najvišjih vrednosti koncentracije kreatinina v skupini brez-PAOL in s- PAOL

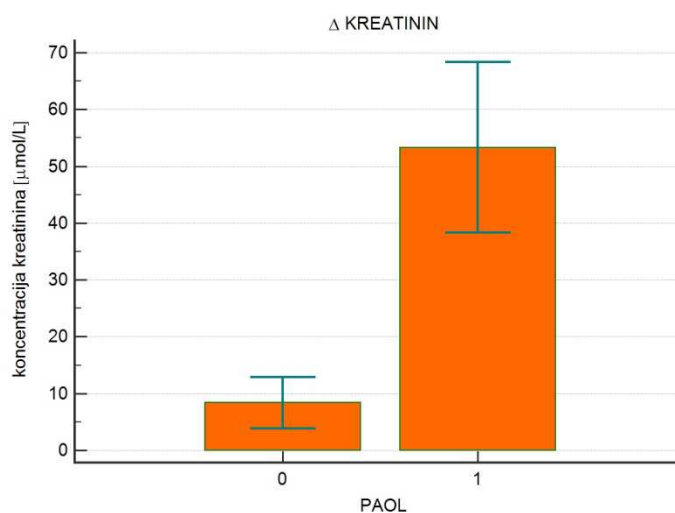
Primerjali smo povprečno vrednost največje spremembe koncentracije kreatinina ( $\Delta$  kreatinin max) po operaciji glede na predoperativno vrednost v skupini brez-PAOL in s-PAOL. Za izračun statistično značilne razlike smo uporabili **enosmerno analizo variance**.

Preglednica VI: Povprečna vrednost  $\Delta$  kreatinin max v serumu in prikaz enosmerne analize variance

| Povprečna vrednost $\Delta$ kreatinin max<br>[ $\mu\text{mol/L}$ ] (SD) |            |             | df-<br>WGV | df-<br>BGV | F      | p      |
|-------------------------------------------------------------------------|------------|-------------|------------|------------|--------|--------|
|                                                                         | brez-PAOL  | s-PAOL      |            |            |        |        |
| Po operaciji                                                            | 8,4 (10,4) | 53,3 (32,1) | 1          | 41         | 40,263 | <0,001 |

**SD**-standardna deviacija; **df**-stopinje prostosti; **F**-porazdelitev razmerja varianc; **BGV**-varianca med skupinami; **WGV**-varianca znotraj skupin; **p<0,05**-statistično značilna razlika; **0,05>p<0,1**-mejno statistično značilna razlika

Povprečna vrednost največje spremembe koncentracije kreatinina ( $\Delta$  kreatinin max) po operaciji glede na predoperativno vrednost se je v skupini brez-PAOL in s-PAOL statistično značilno razlikovala ( $p<0,001$ ), (preglednica VI, slika 9).



Slika 9. Povprečna vrednost največje spremembe koncentracije kreatinina glede na predoperativno vrednost v skupini brez-PAOL in s-PAOL

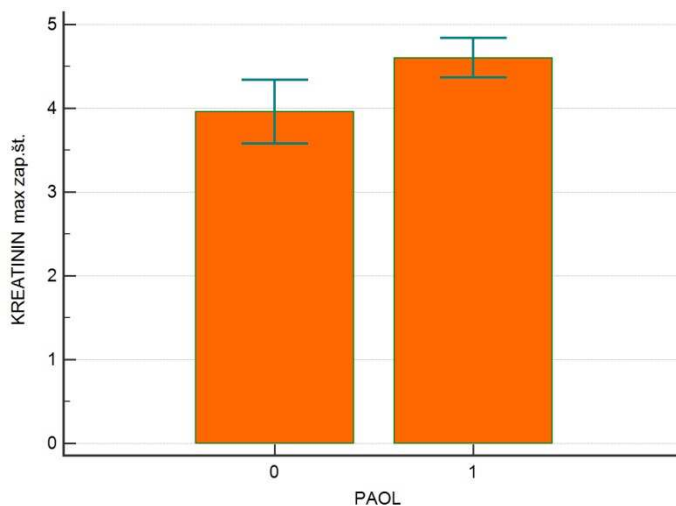
Med skupinama brez-PAOL in s-PAOL smo primerjali povprečno zaporedno številko odvzema z najvišjo vrednostjo S-kreatinina ne glede na čas odvzema vzorca. Za izračun statistično značilne razlike smo uporabili **enosmerno analizo variance**.

Preglednica VII: Povprečna vrednost zaporedne številke odvzema z najvišjo vrednostjo S-kreatinina in prikaz enosmerne analize variance

| Povprečna najvišja zap. št. odvzema S-Kreatinina (SD) |           |           | df-WGV | df-BGV | F     | p     |
|-------------------------------------------------------|-----------|-----------|--------|--------|-------|-------|
|                                                       | brez-PAOL | s-PAOL    |        |        |       |       |
| Po operaciji                                          | 3,9 (0,9) | 4,6 (0,5) | 41     | 1      | 8,347 | 0,006 |

**SD**-standardna deviacija; **df**-stopinje prostosti; **F**-porazdelitev razmerja varianc; **BGV**-varianca med skupinami; **WGV**-varianca znotraj skupin; **p<0,05**-statistično značilna razlika; **0,05>p>0,1**-mejno statistično značilna razlika

Povprečna vrednost zaporedne številke odvzema z najvišjo vrednostjo S-kreatinina po operaciji ne glede na čas odvzema vzorca se je v skupini brez-PAOL in s-PAOL statistično značilno razlikovala ( $p = 0,006$ ), (preglednica VII, slika 10).



Slika 10. Povprečna vrednost zaporedne številke odvzema z najvišjo vrednostjo S-kreatinina po operaciji v skupini brez-PAOL in s-PAOL

### 4.3. NGAL V SERUMU

Določili smo povprečno vrednost koncentracije NGAL-a v serumu (S-NGAL) (s standardno deviacijo) v skupini s-PAOL in brez-PAOL ob različnih časih odvzema. Med skupinama smo ugotavljali statistično značilno razliko v povprečni koncentraciji NGAL-a takoj po operaciji, dve uri po končanju ZTO ter prvi dan po operaciji. Najprej smo s Kolmogorov - Smirnov testom preverili ali se povprečne vrednosti S-NGAL-a ob različnih časih odvzema v skupini s-PAOL in brez- PAOL porazdeljujejo normalno.

Preglednica VIII: Prikaz testa normalnosti za vrednosti S-NGAL-a

| Čas odvzema<br>vzorca (S-NGAL) | Kolmogorov - Smirnov test |               |
|--------------------------------|---------------------------|---------------|
|                                | brez-PAOL (n=23)          | s-PAOL (n=20) |
|                                | P                         | P             |
| pred operacijo                 | 0,844                     | 0,909         |
| takoj po končanju<br>ZTO       | 0,839                     | 0,909         |
| 2 uri po končanju<br>ZTO       | 0,821                     | 0,635         |
| 1.dan po operaciji             | 0,911                     | 0,689         |

**P**= verjetnost normalne porazdelitve

Ker je verjetnost normalne porazdelitve večja od stopnje tveganja ( $> 0,05$ ), smo zavrgli alternativne hipoteze in privzeli vse ničelne hipoteze, da se podatki porazdeljujejo normalno (preglednica VIII).

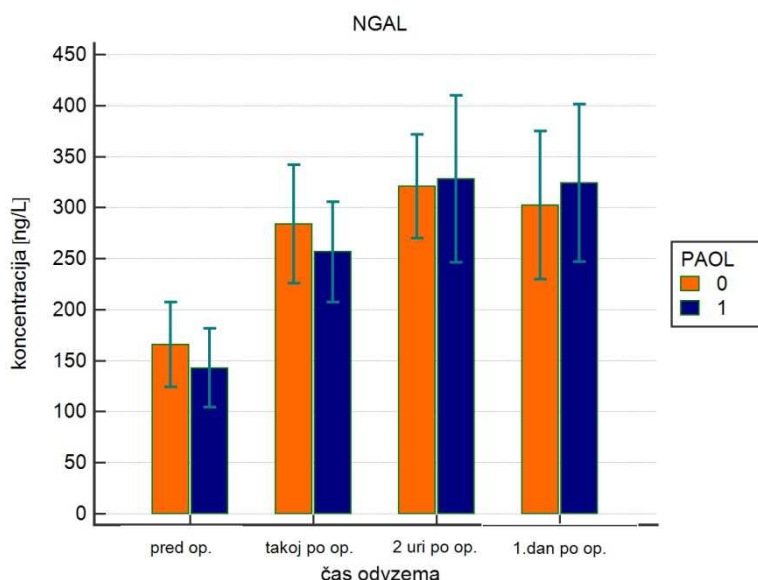
Ker se podatki pri vseh odvzemih porazdeljujejo normalno, smo za statistično analizo le-teh uporabili **metodo enosmerne analize variance za ponovljene meritve**.

Preglednica IX: Povprečna koncentracija NGAL-a (s standardno deviacijo) v serumu in prikaz enosmerne analize variance za ponovljene meritve

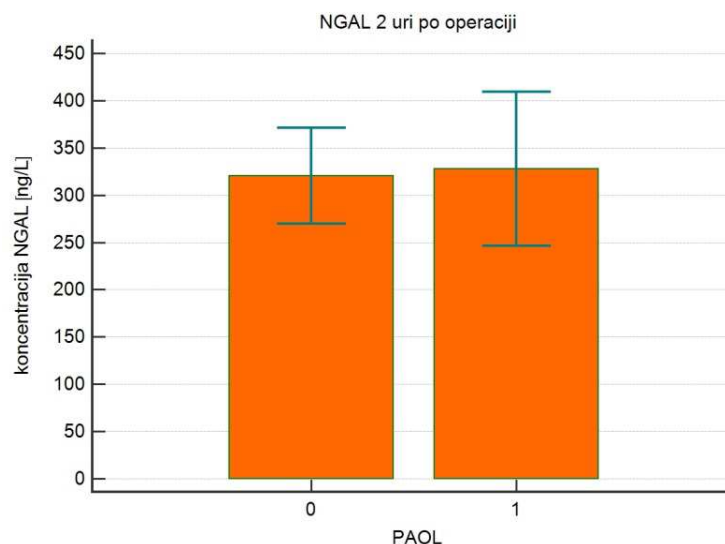
|                             | brez-PAOL (n=23)                             | s-PAOL (n=20) |       |        |        |       |
|-----------------------------|----------------------------------------------|---------------|-------|--------|--------|-------|
| Čas odvzema vzorca          | Povprečna koncentracija S-NGAL-a [ng/L] (SD) |               | F     | df-BGV | df-WGV | p     |
| Pred operacijo              | 165,6 (20,1)                                 | 142,8 (18,3)  | 0,991 | 1      | 41     | 0,325 |
| takoj po končanju operacije | 283,6 (28,0)                                 | 256,5 (23,4)  | 0,650 | 1      | 41     | 0,425 |
| 2 uri po končanju operacije | 320,5 (24,5)                                 | 327,9 (38,9)  | 0,027 | 1      | 41     | 0,870 |
| 1.dan po operaciji          | 302,3 (34,9)                                 | 324,0 (36,9)  | 0,087 | 1      | 41     | 0,769 |

**SD**-standardna deviacija; **F**-porazdelitev razmerja varianc; **df**-stopinje prostosti; **BGV**-varianca med skupinami; **WGV**-varianca znotraj skupin; **p<0,05**-statistično značilna razlika; **0,05>p<0,1**-mejno statistično značilna razlika

Povprečna vrednost NGAL-a v serumu dve uri po končanju operacije se med skupinama brez-PAOL in s-PAOL statistično ni značilno razlikovala ( $p=0,870$ ), (preglednica IX, slika 11 in 12).



Slika 11. Povprečna koncentracija NGAL-a v skupini brez- PAOL in s- PAOL glede na čas odvzema vzorca



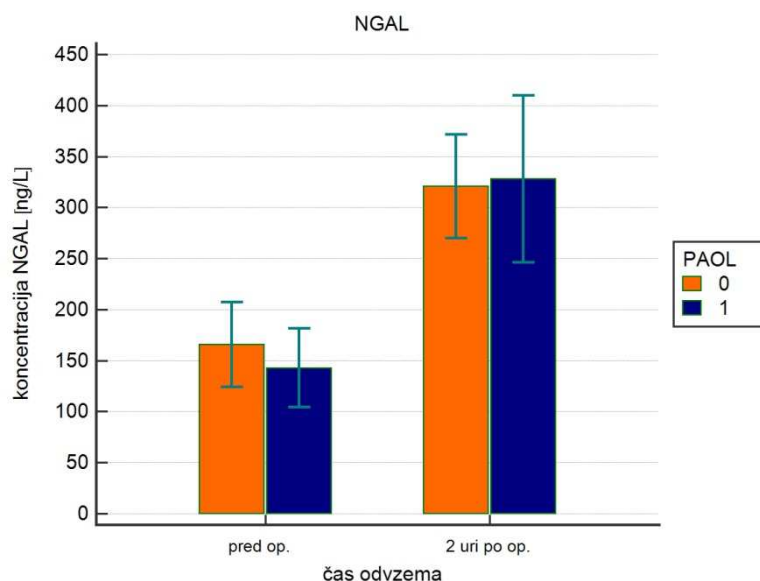
Slika 12. Povprečna vrednost koncentracije NGAL-a 2 uri po operaciji v skupini brez-PAOL in s-PAOL

V skupini brez-PAOL in s-PAOL smo z **metodo analize variance za ponovljene meritve** primerjali povprečno vrednost koncentracije NGAL-a dve uri po operaciji s predoperativno povprečno vrednostjo. Povprečna vrednost koncentracije NGAL-a dve uri po operaciji se je statistično značilno razlikovala od predoperativne povprečne koncentracije v skupini brez-PAOL in s-PAOL (preglednica X). Dve uri po končanju operacije se je vrednost NGAL-a glede na predoperativno vrednost povečala za 2,3 krat v skupini s- PAOL in za 1,9 krat v skupini brez- PAOL (preglednica X, slika 13).

Preglednica X: Primerjava povprečne vrednosti koncentracije NGAL-a pred operacijo in dve uri po operaciji v skupini brez-PAOL in s-PAOL in prikaz analize variance za ponovljene meritve

| Koncentracija S-NGAL-a (SD) |              |              | t     | df | p       |
|-----------------------------|--------------|--------------|-------|----|---------|
|                             | pred op.     | 2 uri po op. |       |    |         |
| Brez-PAOL                   | 165,6 (20,1) | 320,5 (24,5) | 7,33  | 22 | <0,0001 |
| s-PAOL                      | 142,8 (18,3) | 327,9 (38,9) | 6,244 | 18 | <0,0001 |

**SD**-standardna deviacija; **df**-stopinje prostosti; **t**- linearen trend analize; **p<0,05**-statistično značilna razlika; **0,05>p<0,1**-mejno statistično značilna razlika



Slika 13. Primerjava povprečne vrednosti koncentracije NGAL-a pred operacijo in dve uri po operaciji v skupini brez- PAOL in s- PAOL

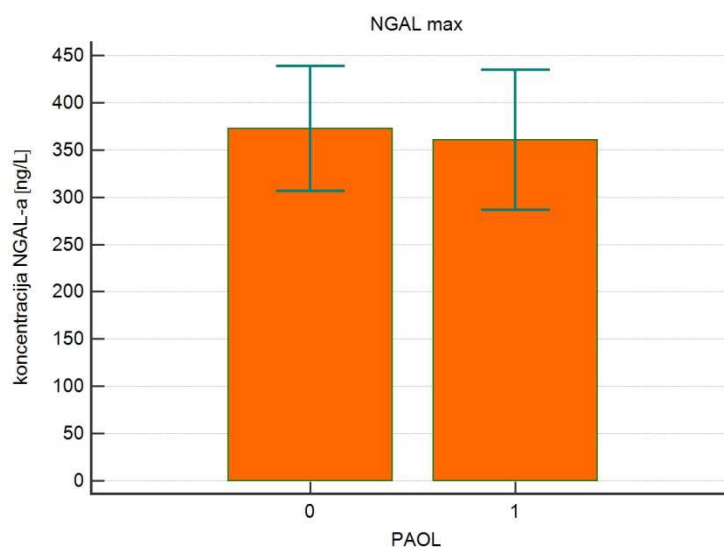
Med skupinama brez-PAOL in s-PAOL smo z **metodo enosmerne analize variance** primerjali povprečje doseženih najvišjih vrednosti koncentracije NGAL-a v serumu (NGALmax) po operaciji, ne glede na čas odvzema vzorca.

Preglednica XI: Povprečna koncentracija NGALmax v serumu po operaciji in prikaz enosmerne analize variance

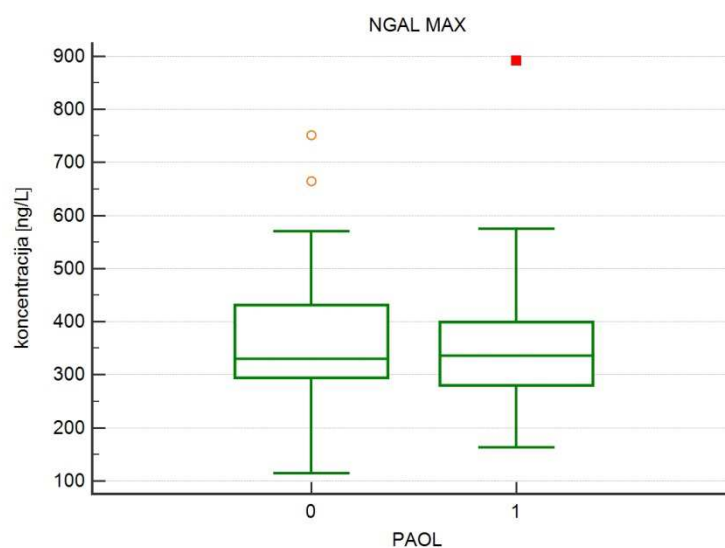
| Povprečna koncentracija NGALmax [ng/L]<br>(SD) |                  |                  | df-<br>WGV | df-<br>BGV | F     | p     |
|------------------------------------------------|------------------|------------------|------------|------------|-------|-------|
|                                                | brez-PAOL        | s-PAOL           |            |            |       |       |
| Po operaciji                                   | 372,5<br>(153,4) | 360,3<br>(158,3) | 41         | 1          | 0,065 | 0,800 |

**SD**-standardna deviacija; **df**-stopinje prostosti; **F**-porazdelitev razmerja varianc; **BGV**-varianca med skupinami; **WGV**- varianca znotraj skupin; **p<0,05**-statistično značilna razlika; **0,05>p<0,1**-mejno statistično značilna razlika

Povprečje doseženih najvišjih vrednosti koncentracije NGAL-a v serumu po operaciji, ne glede na čas odvzema vzorca, se med skupinama s-PAOL in brez-PAOL statistično ni značilno razlikovalo ( $p = 0,800$ ). V skupini s-PAOL je bilo povprečje proti pričakovanju nižje kot v skupini brez-PAOL (preglednica XI, slika 14,15).



Slika 14. Povprečna koncentracija NGALmax v serumu po operaciji v skupini brez-PAOL in s-PAOL (stolpčni diagram)



Slika 15. Povprečna koncentracija NGALmax v serumu po operaciji v skupini brez-PAOL in s-PAOL (kvantilni diagram)

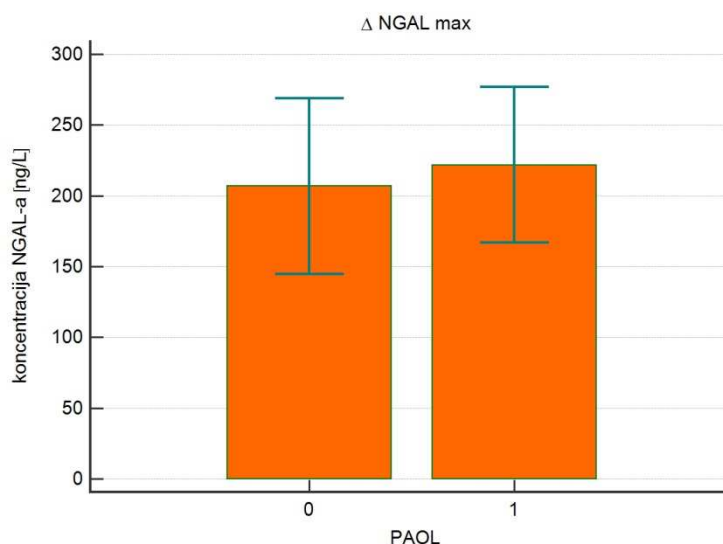
Z **metodo enosmerne analize variance** smo primerjali povprečno vrednost največje spremembe koncentracije NGAL-a ( $\Delta$ NGALmax) po operaciji glede na predoperativno vrednost v skupini brez-PAOL in s-PAOL.

Preglednica XII: Povprečna vrednost  $\Delta$ NGALmax v serumu in prikaz enosmerne analize variance

| Povprečna vrednost $\Delta$ NGALmax [ng/L]<br>(SD) |                  |                  | df-<br>WGV | df-<br>BGV | F     | p     |
|----------------------------------------------------|------------------|------------------|------------|------------|-------|-------|
|                                                    | brez-PAOL        | s-PAOL           |            |            |       |       |
| Po operaciji                                       | 206,9<br>(143,5) | 221,8<br>(117,6) | 1          | 41         | 0,136 | 0,714 |

**SD**-standardna deviacija; **df**-stopinje prostosti; **F**-porazdelitev razmerja varianc; **BGV**-varianca med skupinami; **WGV**-varianca znotraj skupin; **p<0,05**-statistično značilna razlika; **0,05>p<0,1**-mejno statistično značilna razlika

Povprečna vrednost največje spremembe koncentracije NGAL-a ( $\Delta$ NGALmax) po operaciji glede na predoperativno vrednost se v skupini brez-PAOL in s-PAOL statistično ni značilno razlikovala ( $p=0,714$ ), (preglednica XII, slika 16).



Slika 16. Povprečna vrednost največje spremembe koncentracije NGAL-a po operaciji glede na predoperativno vrednost v skupini brez-PAOL in s-PAOL

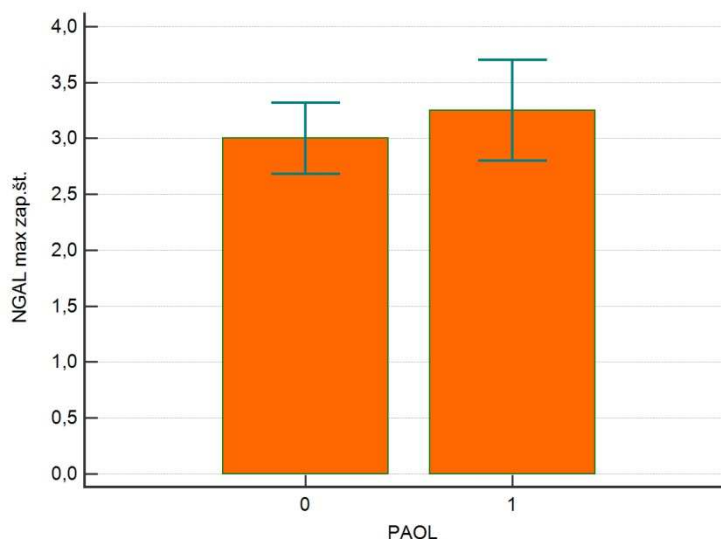
Med skupinama brez-PAOL in s-PAOL smo z **metodo enosmerne analize variance** primerjali povprečno zaporedno številko odvzema z najvišjo vrednostjo NGAL-a v serumu (S-NGAL) ne glede na čas odvzema vzorca.

Preglednica XIII: Povprečna vrednost zaporedne številke odvzema z najvišjo vrednostjo NGAL-a v serumu in prikaz enosmerne analize variance

| Povprečna najvišja zap. št. odvzema S-NGAL (SD) |            |            | df-WGV | df-BGV | F     | p     |
|-------------------------------------------------|------------|------------|--------|--------|-------|-------|
|                                                 | brez-PAOL  | s-PAOL     |        |        |       |       |
| Po operaciji                                    | 3,0 (0,74) | 3,3 (0,97) | 41     | 1      | 0,921 | 0,343 |

**SD**-standardna deviacija; ; **df**-stopinje prostosti; **F**-porazdelitev razmerja varianc; **BGV**-varianca med skupinami; **WGV**-varianca znotraj skupin; **p<0,05**-statistično značilna razlika; **0,05>p<0,1**-mejno statistično značilna razlika

Povprečna vrednost zaporedne številke odvzema z najvišjo vrednostjo NGAL-a v serumu po operaciji ne glede na čas odvzema vzorca se v skupini brez-PAOL in s-PAOL statistično ni značilno razlikovala. Skupina s-PAOL je imela povprečno vrednost zaporedne številke odvzema proti pričakovanju višjo kot skupina brez-PAOL (preglednica XIII, slika 17).



Slika 17. Povprečna vrednost zaporedne številke odvzema z najvišjo vrednostjo NGAL-a v serumu v skupini brez-PAOL in s-PAOL

## 5. RAZPRAVA

Po operacijah na srcu z uporabo zunajtelesnega krvnega obtoka (ZTO) se pogosto pojavi akutna okvara ledvic (AOL), (3-7). Trenutno je v kliničnih smernicah AOL opredeljena na osnovi KDIGO kriterijev (19-21). V naši skupini preiskovancev je glede na KDIGO kriterije pooperativno akutno okvaro ledvic (PAOL) razvilo 46,5 % bolnikov. To se ujema s podatki navedenimi v literaturi, kjer je pogostost pojava AOL po operacijah na srcu od 17-49% (3,5,7,8). V literaturi je PAOL lahko opredeljena tudi na osnovi RIFLE ali AKIN diagnostičnih kriterijev. Velik vpliv na PAOL ima uporaba ZTO.

AOL po srčni operaciji pogosto spremlja oligurija, ki se značilno pojavi pred povišanjem koncentracije kreatinina v serumu, vendar je pogosto neustrezen odziv na intravaskularno hipovolemijo. Zaradi tega razloga in ker je urna diureza zbiranja urina velikokrat nenatančna in pod vplivom terapetskih vzrokov (diuretiki, vazopresorji), je AOL najpogosteje diagnosticirana z uporabo meritev koncentracije serumskega kreatinina (6). Kreatinin producirajo skeletne mišice, zato je koncentracija kreatinina v serumu v stacionarnem stanju proporcionalna mišični masi. Vrednosti kreatinina v serumu so odvisne od mišične mase, starosti, spola, rase, prehrane, terapije z določenimi zdravili, stanja hidracije in fizičnega statusa (16,26). Nivo serumskega kreatinina je tudi pod vplivom tubulne sekrecije kreatinina in uporabljene metode določevanje koncentracije. Kreatinin je primarno označevalec glomerulne filtracije in se ne more uporabljati kot idealni biooznačevalec za oceno ledvične poškodbe, ker je neobčutljiv in nezanesljiv v diagnozi ledvične tubulne poškodbe v odsotnosti zmanjšanja glomerulne filtracije. Kreatinin je slabo specifičen v prisotnosti prerenalne azotemije in močno pod vplivom hemodialize (13,26). Kljub temu ostaja mejna vrednost porasta koncentracije kreatinina v serumu  $\geq 26,5 \mu\text{mol/l}$  glede na začetno vrednost znotraj 48 ur, saj je močno povezana s slabimi izidi PAOL (6).

Takoj po operaciji z ZTO je zaradi zmanjšane krvnega pretoka koncentracija kreatinina pogosto manjša od predoperativne vrednosti (6). Ta pojav smo opazili tudi pri pregledu naših rezultatov, saj je povprečna koncentracija kreatinina v serumu 2 uri po operaciji nižja od predoperativne vrednosti, kar je posledica hemodilucije, zaradi hiperhidracije po uporabi ZTO. Koncentracija kreatinina v serumu naraste šele, ko je polovica ledvične funkcije že izgubljena, kar ponavadi traja 2 do 3 dni po nastopu ledvične poškodbe (13). Vzrok porasta koncentracije kreatinina v serumu je lahko poleg ishemične poškodbe

tubulov ledvic tudi poškodba mišic po operaciji (16). Tudi v naši raziskavi smo statistično značilno razliko v koncentraciji kreatinina v serumu med skupinama brez-PAOL in s-PAOL ugotovili prvi dan po operaciji. Ta razlika se je še povečala drugi in tretji dan po operaciji, kar se ujema s podatki objavljenimi v literaturi (13,15,16). Primerjali smo tudi povprečno vrednost največje spremembe koncentracije kreatinina po operaciji glede na predoperativno vrednost, ki se je v skupini brez-PAOL in s-PAOL statistično značilno razlikovala. Tudi povprečna vrednost zaporedne številke odvzema z najvišjo vrednostjo S-kreatinina po operaciji ne glede na čas odvzema vzorca se je v skupini brez-PAOL in s-PAOL statistično značilno razlikovala.

Čeprav je glomerulna filtracija desetletja predstavljala temelj za postavitev diagnoze AOL, je vodilni laboratorijski izziv še vedno pomanjkanje specifičnega biooznačevalca za določanje akutne tubulne poškodbe, ki bi omogočal natančno oceno tveganja in pravočasno postavljeno diagnozo. Neugodni izidi AOL se lahko preprečijo le s pravočasno diagnozo in terapijo (16).

Zaradi tega so bili proučevani mnogi biooznačevalci, ki lahko odražajo tubulno poškodbo ledvic. Najbolj raziskan in obetajoč zgodnji biooznačevalec je NGAL, ki ni produciran le z enim tipom celic in obstaja v več kot eni molekularni obliki (13,15,16). V naši raziskavi se povprečna predoperativna vrednost NGAL-a v serumu med skupinama brez-PAOL in s-PAOL statistično ni razlikovala. V skupini brez PAOL je bila koncentracija NGAL-a celo višja kot v skupini s PAOL. Vzrok za začetno razliko je lahko zato, ker se NGAL izraža in izloča z imunskimi celicami, hepatociti, ledvičnimi tubulnimi celicami in v raznolikih patoloških stanjih (15). Koncentracija proteina je lahko pod vplivom starosti, vnetnih dejavnikov, jetrne funkcije, srčnega popuščanja, glukoze, železovega metabolizma in števila levkocitov, kar vse lahko vpliva na povišane vrednosti NGAL-a v stacionarnem stanju (16). Vplivu protivnetnih citokinov in nevtrofilnih granulocitov se lahko izognemo z določanjem samo monomerne oblike NGAL-a, ki se tvori le z ledvičnimi celicami (28). Celice proksimalnega ledvičnega tubula so zaradi AOL izpostavljene kompleksnemu časovnemu zaporedju dogodkov. Razumevanje zgodnje celične poškodbe in popravljalnih mehanizmov je ključnega pomena za aplikacijo učinkovite terapije, ki preprečuje smrt tubulnih celic in poveča obnovitveno fazo. NGAL ima zaščitno vlogo pri ishemični AOL. Takoj po AOL je masivno povišan v distalnem delu nefrona, to je v debelem ascedentnem delu Henley-eve zanke, distalnem tubulu in zbirnem vodu. S poškodbo tubula je izražen, da inducira ponovno epitelizacijo. V pomoč tej hipotezi je vloga NGAL-a kot železo

prenašalnega proteina med nefrogenezo. Alternativna hipoteza je, da lahko NGAL služi kot rezervoar za železo, sproščeno iz tubulnih celic, ki so poškodovane z nefrotoksično poškodbo. S tem odvzemom železa kot reaktivne molekule iz mesta tkivne poškodbe se zavira z železom posredovana poškodba. AOL ima značilen vpliv na oddaljene organe v telesu, kot so jetra in pljuča, ki lahko povečajo plazemski in urinski nivo NGAL-a. Preveč izražen protein je sproščen v cirkulacijo in predstavlja svoj prispevek koncentracije NGAL-a v sistemske cirkulaciji. Dodatni prispevek sistemske cirkulirajoči koncentraciji NGAL-a pri AOL izhaja iz dejstva, da je NGAL reaktant akutne faze in je lahko sproščen iz nevtrofilcev, makrofagov in ostalih imunskih celic. Zaradi zmanjšanja hitrosti glomerulne filtracije pri AOL, se pričakuje tudi zmanjšanje v očistku ledvičnega NGAL-a, s posledično akumulacijo v sistemske cirkulaciji (15,25).

Pri AOL se koncentracija NGAL-a v serumu značilno poviša dve uri po operaciji (26).

Povprečna vrednost koncentracije NGAL-a dve uri po operaciji se je statistično značilno razlikovala od predoperativne povprečne koncentracije v skupini brez-PAOL in s-PAOL. Dve uri po končanju operacije se je vrednost NGAL-a glede na predoperativno vrednost povečala za 2,3 krat v skupini s-PAOL in za 1,9 krat v skupini brez-PAOL. Torej se koncentracija NGAL-a v serumu poviša v kliničnem poteku PAOL značilno prej kot koncentracija kreatinina v serumu.

Povprečna vrednost NGAL-a v serumu dve uri po končanju operacije se med skupinama brez-PAOL in s-PAOL statistično ni razlikovala, kar je lahko posledica majhnega števila vzorca in velike raztresenosti rezultatov. Primerjali smo tudi povprečje doseženih najvišjih vrednosti koncentracije NGAL-a v serumu po operaciji, ne glede na čas odvzema vzorca, ki se med skupinama s-PAOL in brez-PAOL statistično ni značilno razlikovalo. V skupini s-PAOL je bilo povprečje proti pričakovanju nižje kot v skupini brez-PAOL. To si lahko razložimo s tem, da je koncentracija NGAL proteina lahko pod vplivom starosti, spola, vnetnih dejavnikov, jetrne funkcije, srčnega popuščanja, glukoze, železovega metabolizma in števila levkocitov, kar lahko vse vpliva na povišanje koncentracije NGAL-a med samim ZTO procesom. Povprečna vrednost največje spremembe koncentracije NGAL-a po operaciji glede na predoperativno vrednost se v skupini brez-PAOL in s-PAOL statistično ni značilno razlikovala. Prav tako se v skupini brez-PAOL in s-PAOL statistično ni razlikovala povprečna vrednost zaporedne številke odvzema z najvišjo vrednostjo NGAL-a v serumu po operaciji, ne glede na čas odvzema vzorca. To je lahko posledica majhnega števila vzorca in velike raztresenosti rezultatov. Kljub temu se koncentracija NGAL-a v

serumu poviša v kliničnem poteku AOL značilno prej kot koncentracija kreatinina v serumu. Torej je NGAL časovno hitrejši diagnostični biooznačevalec ledvične tubulne poškodbe kot kreatinin in ostali klasični kazalci AOL. Prvi dan po operaciji se je povprečna koncentracija NGAL-a v obeh skupinah brez- in s-PAOL znižala, kar navajajo tudi drugi avtorji raziskav (24).

NGAL je močan biooznačevalec za napoved in izid AOL, vendar je bolj občutljiv in specifičen v homogeni populaciji pacientov. Starost ima velik vpliv na NGAL kot biooznačevalec AOL. NGAL ima večjo napovedno zmožnost pri otrocih (povprečna AUC je 0.93) kot pri odraslih (povprečna AUC je 0.71), (24). Merjenje NGAL-a v serumu ali plazmi je lahko pod vplivom številnih spremljajočih dejavnikov kot je CKD, kronična hipertenzija, sistemske infekcije, vnetna stanja, anemija, hipoksija, malignomi, aterosklerotični plaki in abdominalna aortna anevrizma. Omejitev predstavlja tudi definicija AOL, ki je osnovana v veliki meri na povišanemu serumskemu kreatininu, ki ni najboljša spremenljivka za analizo uspešnosti novega testa. Katerikoli test, ki bo osnovan na osnovi določitve tubulnega biooznačevalca kot je NGAL, bo v primerjavi s serumskim kreatininom pokazal nepravilnosti zaradi lažno pozitivnih (resnična tubulna poškodba, vendar neznačilna sprememba v serumskem kreatininu) ali lažno negativnih rezultatov (odsotnost resnične tubulne poškodbe, vendar povišan serumski kreatinin zaradi prerenalnih vzrokov ali zaradi zavajajočih spremenljivk, ki vplivajo na to meritev). V bodočih študijah bo ključnega pomena razumeti klinične izide pri osebah, ki so nagnjene k AOL in so NGAL pozitivne in kreatinin negativne, saj bo to odločilo ali je biooznačevalec odkrito občutljiv. V nedavni študiji (Hasse et al.) so testirali hipotezo ali lahko brez diagnostičnih sprememb v serumskem kreatininu povišane NGAL vrednosti identificirajo paciente s subklinično AKI in s tem slabšo prognozo. Analizirali so podatke 2322 kritično bolnih pacientov s predhodnim kardioresrenalnim sindromom in ugotovili, da v odsotnosti diagnostičnega povišanja v serumskem kreatininu NGAL zazna paciente z možno subklinično AOL, ki imajo večjo možnost slabega izida. Ker se zlati standard za resnično AOL še nekaj časa ne bo pojavil, je pomembno, da so prihodnje študije dovolj velike za predstavitev povezave med biooznačevalci in slabimi kliničnimi izidi kot je dializa, kardiovaskularni dogodki in smrt (15,27).

S strani ADQI (deseti sestanek delovne skupine) je predlagana detekcija subklinične AOL, ki pomeni povišan biooznačevalec NGAL brez povišanja v koncentraciji serumskega kreatinina. Predlagana je vključitev CSA-NGAL ocene (rezultat NGAL-a po srčni

operaciji) v prospektivnih študijah pri odraslih po operaciji srca kot dodatek k funkcionalni oceni AOL (RIFLE, AKIN, KDIGO). Pri določeni skupini bolnikov z visokim tveganjem za funkcionalno AOL, ki je posledica srčne operacije, se akutna poškodba tubulov pojavi, preden postane oslajljeno delovanje ledvic očitno. Akutna tubulna poškodba brez funkcionalne AOL (subklinična AOL) ima lahko vpliv na zelo slab izid AOL. NGAL pripomore k prepoznavi pacientov s subklinično AOL (28). Njena prepoznavna ter pravočasno zdravljenje je ključnega pomena za preprečevanje nadaljnjih poškodb in/ali napredovanja v funkcionalno AOL (3). Neugodni izidi AOL se lahko preprečijo le z zgodnjo prepoznavo in pravočasnim zdravljenjem.

## 6. SKLEP

Od 43 bolnikov, ki so bili vključeni v raziskavo, jih je glede na KDIGO kriterije 20 ali 46,5 % po operaciji razvilo akutno okvaro ledvic. Akutna okvara ledvic je torej pogost pojav po srčnih operacijah z uporabo zunajtelesnega krvnega obtoka (ZTO).

Statistično značilno razliko v koncentraciji kreatinina v serumu med skupinama brez-PAOL in s-PAOL smo ugotovili šele prvi dan po operaciji ( $p=0,035$ ). Ta razlika se je še povečala drugi in tretji dan po operaciji ( $p<0,0001$ ). Povprečje doseženih najvišjih vrednosti koncentracije kreatinina v serumu po operaciji, ne glede na čas odvzema vzorca, se je med skupinama s-PAOL in brez-PAOL statistično značilno razlikovalo ( $p<0,001$ ), prav tako se je med skupinama statistično značilno razlikovala povprečna vrednost največje spremembe koncentracije kreatinina po operaciji glede na predoperativno vrednost ( $p<0,001$ ) ter povprečna vrednost zaporedne številke odvzema z najvišjo vrednostjo S-kreatinina po operaciji ne glede na čas odvzema vzorca ( $p = 0,006$ ). Iz statistične primerjave rezultatov za kreatinin v serumu lahko razberemo, da je kreatinin pozen, vendar zanesljiv pokazatelj AOL.

Povprečna vrednost koncentracije NGAL-a dve uri po operaciji se je statistično značilno razlikovala od predoperativne povprečne koncentracije v skupini s-PAOL ( $<0,0001$ ) in brez PAOL ( $<0,0001$ ). Dve uri po končanju operacije se je vrednost NGAL-a glede na predoperativno vrednost povečala za 2,3 krat v skupini s-PAOL in za 1,9 krat v skupini brez-PAOL. Dve uri po operaciji je povprečna koncentracija NGAL-a višja v skupini s-PAOL kot v skupini brez-PAOL, čeprav se statistično ni značilno razlikovala ( $p=0,870$ ). To je lahko posledica majhnega števila vzorca in velike raztresenosti rezultatov (PAOL=0, SD=24,5 / PAOL=1, SD=38,9). Tudi povprečna vrednost največje spremembe koncentracije NGAL-a ( $\Delta\text{NGAL}_{\text{max}}$ ) po operaciji glede na predoperativno vrednost se med skupinama statistično ni značilno razlikovala ( $p=0,714$ ), (PAOL=0, SD=143,5 / PAOL=1, SD=221,8). Naše hipoteze, da je NGAL dober diagnostični kazalec zgodnje okvare ledvic ne moremo zagotovo potrditi niti ovreči, saj statistična primerjava rezultatov med skupinama s-PAOL in brez-PAOL ni pokazala statistične značilnosti. Za večjo statistično značilnost rezultatov bi bilo v prihodnosti potrebno ponoviti raziskavo na večjem številu vzorca.

Povprečna vrednost zaporedne številke odvzema z najvišjo vrednostjo NGAL-a v serumu v skupini s PAOL je bila 3,3 (SD= 0,97) in za kreatinin 4,6 (SD= 0,5). Prvi je dosegel najvišjo vrednost NGAL, kar potrjuje našo hipotezo, da koncentracija NGAL-a naraste prej v razvoju AOL kot koncentracija kreatinina v serumu.

## 7. LITERATURA

1. Kovač D, Lindič J, Malovrh M, Pajek J: Bolezni ledvic, druga izdaja, Klinični oddelek za nefrologijo, Univerzitetni klinični center, Ljubljana, 2009: 17-9, 205-183.
2. Lindič J, Kveder R: Nefrologija, Interna medicina, četrta izdaja, Ljubljana, 2011: 10: 1022-1009, 1110-1102.
3. Hilde R H, de Geus, Ronco C, Haase M, Jacob L, Lewington A, Vincent JL: The cardiac surgery-associated neutrophil gelatinase-associated lipocalin (CSA-NGAL) score: A potential tool to monitor acute tubular damage. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 2016;151(6): 1481-1476.
4. Basile DP, Anderson MD, Sutton TA: Pathophysiology of Acute Kidney Injury. US National Library of Medicine, National Institutes of Health, Compr Physiol 2012; 2(2): 1353-1303.
5. Thiele RH, Isbell JM, Rosner MH: AKI Associated with Cardiac Surgery. Clin J Am Soc Nephrol 2015; 10(3): 514-500.
6. O'Neal JB, Shaw AD, Billings FT: Acute kidney injury following cardiac surgery: current understanding and future directions. Critical Care 2016; 20: 187.
7. Arora RC, Rigato C, Singal RK: NGAL to predict cardiac surgery- associated acute kidney injury, a holy grail, or just another fancy cup?. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 2016; 151(6): 1483-1482.
8. Xiangcheng X, Xin W, Xiaobing J, Xin C, Jian L, Wen C, Changchun C: Reassessment of Acute Kidney Injury after Cardiac Surgery. Internal Medicine 2017; 56 (3): 282-275.
9. Lopes JA, Jorge S: The RIFLE and AKIN classifications for acute kidney injury: a critical and comprehensive review. Clinical Kidney Journal 2013; 6(1): 14-8.
10. Skitek M, Šter M, Jerin A, Kališnik JM, Hrastovec A, Geršak B: Uporaba novejših bio-označevalcev v laboratorijski biomedicini, 3. seminar, Zbornik predavanj, Društvo za laboratorijsko medicino, Ljubljana, 2011: 57-38.

11. Lipovec R: Zunajtelesni krvni obtok, Kirurgija srca in ožilja, Kirurgija, Celje, 2014: 16: 828-826.
12. Kocbek-Belinger B: Operacije na odprtem srcu in zunajtelesni krvni obtok (ZTO) pri odraslih: podiplomsko izobraževanje iz anesteziologije, drugi tečaj, Slovensko zdravniško društvo, Sekcija za anesteziologijo in intenzivno medicino, Portorož, 1994: 155-139.
13. Clerico A, Galli C, Fortunato A, Ronco C: Neutrophil gelatinase - associated lipocalin (NGAL) as a biomarker of acute kidney injury: a review of the laboratory characteristics and clinical evidences. Clin Chem Lab Med 2012; 50(9): 1517-1505.
14. Gorenjak M: Določitev kreatinina in ocena glomerulne filtracije, Slovensko združenje za klinično kemijo, Ljubljana, 2009: 10-8.
15. Makris K, Rizos D, Kafkas N, Haliassos A: Neutrophil gelatinase - associated lipocalin as a new biomarker in laboratory medicine. Clin Chem Lab Med 2012; 50(9): 1532-1519.
16. Lippi G, Plebani M: Neutrophil gelatinase - associated lipocalin (NGAL) - the laboratory perspective. Clin Chem Lab Med 2012; 50(9): 1487-1483.
17. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, Levinin A: Acute kidney Injury Network: report of initiative to improve outcomes in acute kidney injury. Critical Care 2007; 11(2): R31.
18. Englberger L, Suri RM, Li Z, Casey ET: Clinical accuracy of RIFLE and AKIN criteria for AKI in patient undergoing cardiac surgery. Critical Care 2011; 15: R16.
19. KDOQI Work Group: KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury, Kidney international supplements. Official Journal of the International society of nephrology 2012; 2(1): 138-1.
20. Khwaja A: KDIGO Clinical Practice Guidelines for Acute Kidney Injury, Sheffield Kidney Institute, Northern General Hospital, Sheffield UK. Nephron Clin Pract 2012; 120: c184-c179.
21. Fliser D, Laville M, Covic A, Fouque D, Vanholder R, Juillard L, Biesen WV. A: European Renal Best Practise (ERBP) position statement on the Kidney Disease Improving Global Outcome (KDIGO), Clinical Practice Guidelines on Acute Kidney Injury, Part 1,

definitions, conservative management and contrast induced nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27 (12): 4272-4263.

22. Makris K, Spanou L. Acute Kidney Injury: Diagnostic Approaches and controversies. *Clin Biochem Rev* 2016; 37(4): 175-153.

23. Tietz NW, Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Fourth Edition, Elsevier Saunders, 2006: 24: 801-797.

24. Antić P,A, Ivanišević I, Vulićević I, Kotur-Stevuljević J, Ilić S, Ivanišević J, Miljković M, Kocev N. Biomarkers of acute kidney injury in pediatric cardiac surgery. *Clinical Biochemistry* 2013; 46 (13-14): 1251-44.

25. Charlton JR, Portilla D, Okusa MD. A basic science view of acute kidney injury biomarkers. *Nephrol Dial Transplant* 2014; 29(7): 1311-1301.

26. Wyckoff T, Augoustides JGT. Advances in Acute Kidney Injury Associated with Cardiac Surgery: The Unfolding Revolution in Early Detection. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2012; 6(2): 345-340.

27. Singer E, Markó L, Paragas N, Barasch J, Dragun D, Müller DN, Budde K, Schmidt - Ott KM, Neutrophil gelatinase associated lipocalin - pathophysiology and clinical applications. *Acta Physiol* 2013; 207(4): 672-63.

28. Angeletti S et al, Role of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in the Diagnosis and Early Treatment of Acute Kidney Injury in a Case Series of Patients with Acute Decompensated Heart Failure: A Case Series. Hindawi Publishing Corporation, *Cardiology Research and Practice* 2016; ID3708210.

29. Tietz NW, Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Fourth Edition, Elsevier Saunders, 2006: 9: 236-234.

30. Pihlar B: *Osnove analizne kemije*, Katedra za analizno kemijo, Oddelek za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, 1994: 221-213.

31. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Fourth Edition, Elsevier Saunders, 2006: 3, 72-61.

32. Personal LAB : User`s Manual, V.3.1, (MVPL2340V3.1 Rev.N). Adaltis Italia S.p.A.

33. NGAL ELISA Kit 036. BioPorto Diagnostics A/S, Gentofte, Danska.
34. <https://www.lsbio.com/elisakits/human-lcn2-lipocalin-2-ngal-elisa-kit-sandwich-elisa-ls-f709/709>.
35. Promocijski material podjetja ADALTIS S.r.l. [18.5.2017].