

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARTINA STRMČNIK

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARTINA STRMČNIK

**POVEZAVA MED OZNAČEVALCI OKVARE TUBULNEGA
DELOVANJA IN OCENO VELIKOSTI GLOMERULNE FILTRACIJE**

**CORRELATION BETWEEN MARKERS OF TUBULAR FUNCTION
AND ESTIMATION OF THE GLOMERULAR FILTRATION RATE**

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Jelke Lindič, dr. med. v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani, na kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo.

Zahvala

Zahvalila bi se prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm. in somentorici doc. dr. Jelki Lindič, dr. med. za vso strokovno pomoč in svetovanje pri nastajanju diplomske naloge.

Prav tako bi se zahvalila družini, fantu in prijateljem za vso podporo in nepozabna ter zabavna študentska leta.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala sama pod mentorstvom prof.dr. Joška Osredkarja in somentorstvom doc. dr.Jelke Lindič, dr.med.

Martina Strmčnik

Vsebina

Povzetek	i
Seznam kratic	1
1 Uvod	2
1.1 Ledvice	2
1.2 Ledvične okvare	3
1.3 Testi za ugotavljanje bolezni ledvic	5
1.4 Proteinurija	9
1.5 Biološki označevalci ledvične funkcije	13
2 Namen naloge	16
3 Materiali in metode	17
3.1 Bolniki	17
3.2 Odvzem vzorcev	17
3.3 Merjenje analitov	17
4 Rezultati	23
4.1 Vrednotenje rezultatov	23
4.2 Raziskava in rezultati	23
4.3 Koleracije med posameznimi parametri kronične ledvične okvare	26
4.4 Primerjava srednjih vrednosti parametrov	29
5 Razprava	42
6 Sklep	49
7 Literatura	50
8. Priloga	53

Povzetek

Kronično ledvično bolezen označuje zmanjšanje hitrosti glomerulne filtracije pod 90ml/min/1,73 m² ali pa stalna eritrociturija ali proteinurija, vendar ti parametri ne morejo popolnoma razložiti in napovedati razvoja ledvične bolezni. V zadnjem času ugotavljajo pomembno vlogo dveh novih ledvičnih markerjev, NGALa (nevtrofilna gelatinaza povezana z lipokalinom) v seču kot markerja toksične tubulne okvare in kolagena IV v seču kot nadomestnega markerja fibroze.

V naši raziskavi smo preučevali 58 bolnikov z diagnosticirano proteinurijo. Za oceno glomerulne in tubulne proteinurije smo analizirali drugi jutranji seč, za dnevno proteinurijo smo zbirali 24-urni seč, za oceno hitrosti glomerulne filtracije pa očistek kreatinina. Določili smo izločanje NGAL/kreatinin in kolagena IV/kreatinin v 24-urnem seču in poiskali povezave z očistkom kreatinina ter z določitvami proteinurije.

Vrednosti NGALa in kolagena IV v seču sta korelirali s koncentracijo serumskega kreatinina, z oGF po MDRD enačbi in z očistkom kreatinina pa sta imeli inverzno korelacijo. Izločanje NGAL v seču je bilo statistično pomembno povezano tudi z izločanjem kolagena IV v seču. Le- ta pa je imel statistično pomembne povezave tudi z alfa-1-mikroglobulini in IgG, kar kaže, da je kolagen IV pomemben marker okvare tubulnega tkiva. Vrednosti ocene dnevne proteinurije niso kolerirale z nobenim od standardnih parametrov za oceno ledvične okvare, prav tako pa tudi ne z NGALom in kolagenom IV. Pri razdelitvi naših bolnikov v dve skupini glede na ledvični očistek smo ugotovili, da so vrednosti NGAL v seču v skupini z zmanjšanim očistkom statistično pomembno večje kot pri tistih z normalnim očistkom kreatinina, ni pa bilo statistično pomembnih razlik pri izločanju kolagena IV. Pri razdelitvi bolnikov v štiri skupine glede na stopnjo KLB je povečano izločanje kolagena IV in NGAL značilno za končna obdobja KLB, kar pomeni, da označujeta kronične in napredovale poškodbe ledvičnega parenhima. Pri razdelitvi bolnikov glede na stopnjo proteinurije in primerjavi vrednosti med različnimi stopnjami smo prišli do spoznanja, da so vrednosti NGAL in kolagena IV v seču pri skupini bolnikov z nefrotsko proteinurijo v primerjavi s skupino z nenefrotsko proteinurijo značilno višje. Izločanje kolagena IV kaže signifikantne razlike že pri primerjavi blage in zmerne proteinurije, kar nakazuje, da je dokaj občutljiv kazalec toksičnosti proteinurije, medtem, ko NGAL tega trenda ne kaže.

Prav tako ni statistično pomembnih razlik v izločanju NGAL in kolagena IV pri primerjavi bolnikov z zmerno in nefrotsko proteinurjo. Sklepamo, da se zgodi največja razlika v izločanju kolagena IV v seč v obdobju prehoda iz blage v zmerno proteinurijo in ne kasneje, zato bi lahko kolagen IV uporabljali kot zgodnji marker pomembne ledvične okvare že v času, ko je ledvična funkcija še ohranjena in KLB s kazalci za oceno glomerulne filtracije še ne moremo odkriti. Rezultati kažejo, da je možno z merjenjem kolagena IV in NGAL v seču pridobiti dodatne informacije o stopnji ledvične okvare.

Seznam kratic

ALO	akutna ledvična odpoved
GFR	hitrost glomerulne filtracije
GF	glomerulna filtracija
IDMS	izotopno dilucijska masna spektrometrija
KDOQI	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
KLB	kronična ledvična bolezen
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
NAG	N-acetil- beta- glukozaaminidaza
NGAL	nevtrofilna gelatinaza povezana z lipokalinom
oDP	ocena dnevne proteinurije
oGF	ocena glomerulne filtracije
S-kreatinin	koncentracija serumskega kreatinina
U- kreatinin	koncentracija kreatinina v urinu
ZM	zunajceličen matriks

1Uvod

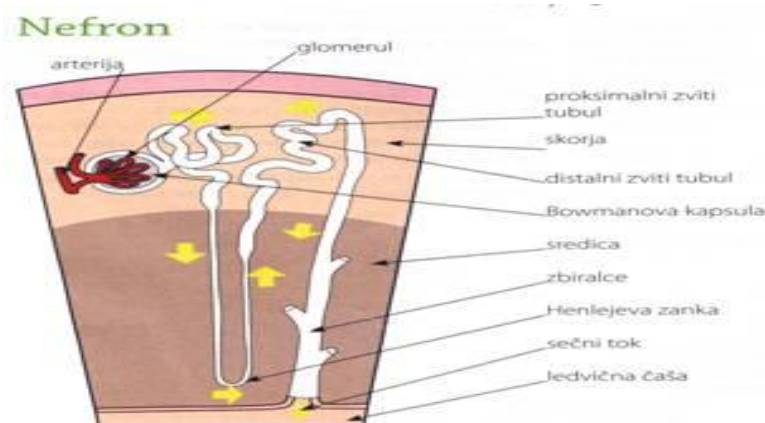
1.1 Ledvice

Ledvice so izločevalni, endokrini in presnovni organ. Opravljajo štiri temeljne fiziološke funkcije, te so: vzdrževanje acidobazičnega ravnovesja, izločanje presnovkov (sečnine, kreatinina, sečne kisline), vzdrževanje ničelne bilance vode ter topljencev in presnovo hormonov (1,25-dihidroksiholekalciferola, renina in eritropoetina) (1).

So paren organ z dovodom in odvodom krvi, oživčene z vegetativnim živčevjem in povezane s sečnimi izvodili. Sestavljena so iz zunanjega področja, imenovanega skorja (cortex) in notranjega, imenovanega sredica (medulla). Skorja in sredica sta sestavljeni iz nefronov, ki so osnovna funkcionalna enota ledvic (slika 1). Sestavljeni so iz več delov. V skorji so Malpighijeva telesca ter ravni in zvijugani proksimalni in distalni tubuli, v sredici pa so Henleyjeve zanke in zbiralca. Nefroni se razlikujejo po dolžini Henleyjeve zanke, v skorji (kortikalni) imajo kratko, v sredici (juktamedularni) pa dolgo. Del proksimalnega tubula, ki sega v Malpighijevo telesce, se imenuje Bowmanova kapsula, le-ta se prilega stenam glomerulnih kapilar in s svojo zgradbo (mikroskopske pore) omogoča filtracijo krvne plazme. V krvi zadrži krvne beljakovine in krvne celice, tekočina, ki vstopi iz kapilare glomerula v kapilarni prostor in priteče v proksimalni tubul pa je ultrafiltrat ali primarni seč in se razlikuje od končnega seča. Ta proces filtracije se imenuje glomerulna filtracija(2). GF poteka skozi glomerulno filtracijsko bariero glede na velikost in naboj molekule. Zlahka prehajajo voda in majhne molekule, prav tako prehajajo nevtralne in kationske molekule, če ne presežejo velikosti por (radij molekul mora biti manjši od 4 nm), negativni naboj endotelija pa odbija večino plazemskih proteinov (3). Na dan nastane v Malpighijevih telescih 180 litrov primarnega seča, le-ta se v obsežnem tubulnem sistemu spremeni po sestavi in količini, tako, da se izloči le okoli 1,5 l seča dnevno. Nastanek seča je tako posledica glomerulne filtracije, tubulne reabsorpcije in tubulne sekrecije (2). V različnih bolezenskih stanjih je lahko ta proces regulacije moten, kar se izraža v nenormalnem izločanju seča.

Pomembna je anatomsko usklajenost nefrona in njegovega žilja. Ledvice lahko avtoregulirajo pretok in GF v območju srednjega arterijskega tlaka (80-200 mmHg). Navadno znaša krvni pretok skozi ledvice 20-25% minutnega volumna srca (prib.1200 ml krvi/min).

Le majhen del krvi, ki prehaja v ledvice preko aferentne arteriole, dospe v ledvično sredico, kjer preko vasa recta obliva Henleyjevo zanko, a vseeno imajo ledvice glede na maso svojega tkiva velik pretok (1).



Slika 1 Sestava nefrona

1.2 Ledvične okvare

Glede na etiologijo ločimo vzroke za nastanek okvare ledvic na preledvične (hipovolemija, izgube v tretji prostor, zmanjšan minutni volumen srca, ledvična vazokonstrikcija), intrinzične ledvične vzroke (akutna tubulna nekroza, bolezni majhnih ledvičnih žil, akutni procesi v tubulointersticiju, bolezni velikih ledvičnih žil) ter poledvične vzroke (benigna hiperplazija prostate, ledvični kamni, obstruiran urinarni kateter) (4).

Normalno ledvično delovanje opredeljuje GF (normalne vrednosti pri moških $120 \pm 25 \text{ ml/min/1,73m}^2$, pri ženskah $95 \pm 20 \text{ ml/1,73m}^2$), koncentracijska sposobnost (sposobnost ledvic spreminjati osmolalnost seča, od 50 do 1200 mOsm/kg) in acidifikacijska sposobnost (sposobnost spreminjanja kislosti seča od pH 4,5 do pH 8) (4).

Delovanje ledvic se lahko slabša hitro ali počasi. Če se hitrost GF zmanjša v nekaj urah ali dneh, govorimo o akutni ledvični okvari (5). ALO diagnosticiramo ob porastu S kreatinina za $44 \mu\text{mol/l}$, 50 % povečanje S-kreatinina nad bazalno vrednostjo ali zmanjšanje GFR za 25 %. Tveganje za ALO se poveča ob sladkorni bolezni, kroničnem ledvičnem popuščanju in starosti (6).

O kronični ledvični bolezni govorimo, če je vsaj 3 mesece prisotna zmanjšana GF (pod 90 ml/min/1,73m² na telesne površine), ima bolnik patološko sestavo seča (eritrociturija, proteinurija, albuminurija) ter dokazane morfološke ali makro in mikropatohistološke spremembe tkiva ledvic (1).

Pri ledvični bolezni propadajo nefroni, sočasno se povečuje GF preostalih, še delujočih nefronov (7). Le-ti se prilagodijo obremenitvi, vendar sčasoma to ne zadošča, da bi lahko povsem nadomestili propadajoče nefrone. GF se zmanjša kljub povečani filtraciji na posamezen nefron. Zmanjšanje GF povzroči najprej naraščanje serumske koncentracije topljencev, ki se izločajo pretežno z GF (sečnine, kreatinina, sečne kisline, fosfatov) (1). Zvišana koncentracija topljencev povzroči osmozno diurezo v zdravih nefronih, to pa zmanjša koncentracijsko sposobnost ledvic. Povečana filtracija na nefron poveča hidrostatski pritisk v glomerulih kapilar in povzroči spremembe v glomerulu, ledvičnih tubulih in intersticiju saj poškoduje celice nefrona, razvije se kronična vnetna reakcija s fibrozo, sklerozo in propadom prizadetih nefronov (7).

Če propade 90 ali več odstotkov nefronov, ledvice ne morejo več vzdrževati ničelne bilance vode in soli. Volumen urina je praviloma manjši kot 500 ml na dan (oligurija), njegova osmolarnost pa je fiksirana (izostenurija)- podobna je osmolalosti plazme (300-320 mOsm/kg). V telesu narašča koncentracija topljencev in elektrolitnih ionov (kreatinina, sečnine, kalija...), ki se izločajo predvsem s sečem (1,7).

Kronična ledvična bolezen je običajno posledica sladkorne bolezni, sledi ji hipertenzija ter primarni in sekundarni glomerulonefritis (7).

Sladkorna bolezen zaradi povišane koncentracije glukoze v krvi poveča glikacijo v bazalni membrani. Poveča se tudi tvorba kolagena, upočasnijo se njegova razgradnja in zmanjša sinteza heparan sulfata. To vpliva na prepustnost bazalne membrane (8). Ker se odvečna glukoza v podocitih pretvarja v sorbitol, le-ta povzroči propad podocitov in poveča osmolarnost celice. S tem je omogočen dostop vode v celico, kar vodi v njen propad. Povečana prepustnost bazalne membrane in glomerulna hiperfiltracija povzročita povečano izločanje beljakovin. Pride do hiperplazije glomerulnih kapilar in s tem do povečanja ledvic (8).

Arterijska hipertenzija je vzrok za prenos zvišanega hidravličnega krvnega tlaka v ledvična telesa, kar povzroči nastanek glomerulne hipertenzije, le ta pa vodi v glomerulosklerozo in propadanje nefronov (9).

Glomerulonefritis je vnetje ledvic, ki se dogaja predvsem v ledvičnem telescu, prizadeti pa so lahko tudi drugi deli nefrona (zunajglomerulne krvne žile, tubuli in intersticij) (10). Nastane kot posledica odlaganja krožečih ali in situ imunskih kompleksov, ki se vežejo na glomerulno membrano ali se odlagajo v tkivu zaradi zmanjšane sposobnosti odstranjevanja. Posledica vnetja je povečana prepustnost glomerulne bazalne membrane, kar se navzven kaže kot proteinurija (11).

1.3 Testi za ugotavljanje bolezni ledvic

1.3.1 Fizikalno- kemijski testi

Z merjenjem ali računanjem GFR pridobimo podatek o stopnji ledvične okvare, na osnovi pregleda seča pa sklepamo o vrsti bolezni, ki je okvaro povzročila.

Za oceno vrste ledvične bolezni so pomembni izgled, barva, vonj in makroskopski pregled seča. S fizikalno-kemijskimi testi lahko ugotovimo stanja, ki jih s pregledom krvi ne moremo. Pri fizikalni analizi seča se oceni količino seča, barvo, bistrost, vonj, relativno gostoto in penjenje. Pri kemični analizi seča določimo pH, prisotnost glukoze, ketonov, hemoglobina, bilirubina, urobilinugena, nitritov. Kvalitativno ovrednotimo prisotnost eritrocitov in levkocitov in semikvalitativno prisotnost beljakovin (12).

GFR ocenimo z očistkom snovi. Najbolj se približa lastnostim idealnega filtracijskega označevalca snov, ki se ne presnavlja in se izloča samo preko ledvic (100% GF, 0% tubulna reabsorbcija, 0% tubulna sekrecija) (6). Takšna snov je inulin, slabši pa so radioizotopski označevalci (⁵¹Cr-etilen- diamin-tetraocetna kislina, ¹²⁵I-Iotalamat), ki se uporabljajo v raziskovalnih namenih. Pri kliničnem delu se največ uporablja očistek kreatinina in v posebnih primerih serumska koncentracija cistaina C (13).

1.3.2 Klinično določanje glomerulne filtracije

GF je glavni pokazatelj delovanja ledvic. Zmanjšanje GF kaže na slabše ledvično delovanje, nadaljnje slabšanje GF pa na napredovanje ledvičnega obolenja (2).

Ocenjuje se iz 24 urnega očistka kreatinina. Kreatinin je odpadni produkt presnove. Nastaja v skeletnih mišicah iz fosfokreatina in kreatina. Večina zaloga kreatina je v mišicah, kjer se z encimom kreatin kinazo fosforilira do fosfokreatina, le-ta služi kot zaloga energije. Pri mišičnem krčenju se iz fosfokreatina odcepita fosfatna skupina in voda, nastane kreatinin, ki je torej ciklični anhidrid kreatina (3). Kreatinin ni vezan na beljakovine, filtrira se v glomerulih in secenira v tubulih (14). Problem je, da se 7-10 % kreatinina izloča v seč s tubulno sekrecijo, zato je kreatininski očistek 10 % višji od inulinskega, razlika pa se poveča ob zmanjšani ledvični funkciji, ko tubulna sekrecija prispeva večji delež kreatinina v seč (3).

Količina filtriranega kreatinina(skozi glomerule vsako minuto)=količina izločenega kreatinina (v urin vsako minuto)

$$GFR \times P_{cr} = U_{cr} \times V$$

Če izpeljemo: $GFR = U_{cr} \times V / P_{cr}$

Pri čemer je P_{cr} plazemska koncentracija kreatinina, U_{cr} je koncentracija kreatinina v urinu, GFR je hitrost glomerulne filtracije in V je pretok urina (15).

Ledvični očistek je teoretični volumen krvne plazme (ml), ki se v določeni časovni enoti (min) popolnoma očisti kreatinina (3). Temelji na dejstvu, da je v ravnovesnem stanju hitrost izločanja snovi iz krvne plazme enaka hitrosti izločanja te snovi v seč.

$$\text{Ledvični očistek} = \frac{\text{koncentracija snovi v seču} \times \text{Volumen seča na časovno enoto}}{\text{Koncentracija snovi v plazmi}}$$

Hitrost nastajanja kreatinina je odvisna od mišične mase in je vsak dan približno konstantna. S-koncentracija kreatinina je odvisna še od spola, starosti, rase, dnevnega nihanja in izločanja iz telesa (3). Na sekrecijo kreatinina vplivajo nekatera zdravila, sploh če je GF že zmanjšana. Ta zvišajo njegovo serumsko koncentracijo (14).

V klinični praksi za oceno GF zaradi zamudnosti izvedbe določanja očistka kreatinina uporabljajo klinične formule, ki olajšajo oceno velikosti GF (13).

Pri izgubi 50% funkcionalnih nefronov se GF zniža za samo 25%. GF se ne zniža za 50%, ker jo preostali nefroni kompenzirajo s filtracijo, naraste pa serumska koncentracija kreatinina (2).

1.3.3 Določanje kreatininskega očistka

Pri načrtovanem pregledu seča zaradi diagnostike ledvične bolezni preiskovanci ne smejo biti fizično aktivni vsaj dva dni pred pregledom in naj ne uživajo rdečega mesa. Bolnik na dan preiskave, ob uri, ko vstane, izprazni mehur in ta seč zavržemo. Nato 24 ur zbira seč do iste ure naslednjega dne. Izmerimo volumen zbranega seča in v 24-urnem seču določimo koncentracijo kreatinina (U). Na dan pričetka zbiranja seča ali zjutraj na dan, ko z zbiranjem konča, bolniku odvzamemo tudi kri za določitev serumske koncentracije kreatinina (S). Iz nomograma odčitamo bolnikovo telesno površino (A) glede na njegovo telesno težo in višino. Določimo tudi čas 24 urnega zbiranja seča (86400s) (3).

Očistek se izračuna po enačbi:

$$C_{cr} (\text{ml} / \text{s} / 1,73\text{m}^2) = \frac{U (\mu\text{mol/L}) \times V (\text{ml}) \times 1,73}{S (\mu\text{mol/L}) \times A (\text{m}^2) \times t (\text{s})}$$

Pri temu načinu določanja je veliko možnih napak pri določanju očistka, saj na rezultat vplivajo nezadostno praznjenje mehurja pri zbiranju seča, vključitev prvega izločenega seča v 24-urni seč, spontano izločanje seča v straniščno školjko med iztrebljanjem blata, povečana telesna dejavnost med zbiranjem seča in premajhna bolnikova hidracija (3, 14).

Zaradi teh težav in neprijetnost 24-urnega zbiranja seča so razvili nomograme in formule za oceno kreatininskega očistka. Te formule upoštevajo še spol, starost, telesno površino in raso. Najpogosteje se uporablja enačba študije Modification of Diet in Renal Disease(MDRD) (3).

1.3.4 Enačba MDRD

Originalna MDRD enačba s šestimi spremenljivkami je produkt retrospektivne analize študije vpliva proteinske diete in natančne kontrole krvnega tlaka na napredovanje kronične ledvične bolezni (Modification of diet in renal disease study ali MDRD) iz leta 1999, ki je bila opravljena na 1070 bolnikih (6). Spremenljivke v enačbi so bile: starost, spol, rasa, serumska koncentracija albumina, S-kreatinin in serumska koncentracije sečnine(15). Validirana je bila glede na iotalamatni očistek. Iotalamat je radioizotop I 125 in je eksogeni filtracijski označevalec. Z njim bolj natančno izmerimo GF kot s kreatininskim, vendar ga v splošni praksi ne uporabljamo, ker je nepraktičen za uporabo (13). Ocene GF po MDRD enačbi so prilagojene glede na povprečno telesno površino (ml/min/1,73m²) (16). Enačbo so poenostavili na štiri spremenljivke (spol, starost, raso in S kreatinin), a enačba ni izgubila na napovedni moči. Tako modificirana enačba ne potrebuje več podatkov za telesno višino ali maso (14).

$$oGF \text{ (ml/min/1,73 m}^2\text{)} = 186 \times (\text{serumska c kreatinina } (\mu\text{mol/L}) / 88,4)^{-1,154} \times (\text{starost (leta)})^{-0,203}$$

Za ženske se izraz pomnoži z 0,742, za črno raso pa z 1,21.

(14)

Serumsko koncentracijo kreatinina so določali s pomočjo encimske reakcije ali s pomočjo modificirane Jaffejeve kinetične reakcije. V praksi se uporablja standardizirana serumska koncentracija kreatinina in revidirana enačba MDRD s faktorjem 175, ki je sledljiv do metode IDMS. Rezultat je podan na 1,73m² telesne površine. Ocena glomerulne filtracije se napiše po sledeči enačbi (14):

$$oGF \text{ (ml/min/1,73m}^2\text{)} = 175 \times (\text{serumska c kreatinina } (\mu\text{mol/L}) / 88,4)^{-1,154} \times (\text{starost (leta)})^{-0,203}$$

Za ženske se izraz pomnoži z 0,742, za črno raso pa z 1,21.

Študija je bila opravljena na bolnikih, ki so le redko presegli glomerulno filtracijo 60 ml/min/1,73m², zato je potrebno očistek pri vrednostih nad 60 ml/min/1,73m², ki so vrednoteni z originalno MDRD enačbo, vrednotiti previdno, saj so lahko rezultati lažno podcenjeni. Pri oceni GF z MDRD enačbo je pomembno, da je ta stabilna, če se prehitro spreminja, se pravo vrednost preceni (14).

Enačbe MDRD ne moremo uporabljati pri podhranjenih ali debelih ljudeh, pri ljudeh z zelo veliko ali majhno telesno površino, vegeterjancih, pri skeletnih obolenjih. Pri starejših od 75 let zaenkrat zaradi možne napačne interpretacije njeno uporabo odsvetujejo, prav tako še ni bila dovolj preizkušena pri nosečnicah. Pri teh skupinah ljudi moramo uporabiti natančnejše metode meritve GF(14).

1.4 Proteinurija

Pri zdravem, odraslem človeku se s sečem izloči največ do 150 mg proteinov na dan. V normalnem seču so prisotne le majhne količine beljakovin. Plazemske beljakovine predstavljajo 60 % v seč izločenih beljakovin (večino predstavlja serumski albumin, prisotni so imunoglobulin ter ostale plazemske beljakovine). Preostalih 40 % predstavljajo Horsfall-ovi glikoproteini, ki se izločajo iz distalnih tubulov (12).

Kot presejalno preiskavo bolezenske proteinurije uporabljamo testne lističe, s katerimi določamo tudi druge kemične lastnosti seča. Reagent na lističu je bromfenol, ki je visoko specifičen predvsem za albumine, manj pa na druge beljakovine (17). Zaznamo lahko proteinurijo v velikosti od 300 do 500 mg/L. Količino oborjenih beljakovin izrazimo glede na standardni vzorec s stopnjami od 0 do 4+. Če je le-ta test pozitiven, test s testnim lističem pa negativen kaže na prisotnost lahkih verig v urinu. Če želimo natančno oceniti proteinurijo, ki je odvisna od cirkaidanega ritma izločanja beljakovin, telesnega napora, prehrane in hidracije, je najnatančnejša ocena mogoča z analizo 24 urnega zbiranja seča (12). Ker je 24-urno zbiranje proteinov v seču težje izvedljivo, se v večini poslužujemo enkratnega drugega jutranjega vzorca seča. Določimo razmerje med beljakovinami (g/l) in kreatininom (mmol/l), ki je premo sorazmerno z dnevnim izločanjem beljakovin v gramih/ 1,73 m² telesne površine. Normalna vrednost količnika je do 20 g/mol.

Izračun dnevne proteinurije temelji na predpostavki, da je dnevno izločanje kreatinina s sečem približno 8,8 mmol na 1,73 m² telesne površine.

$$\text{Ocena dnevne proteinurije/1,73m}^2 = \frac{\text{U-proteini(g/L)} \times 8,8 \text{ mmol/dan/1,73m}^2}{\text{U-kreatinin (mmol/L)}} \quad (12)$$

Napačne izračune dobimo, če je izločanje kreatinina manjše od pričakovanega (proteinurija je precenjena) ali, če je izločanje kreatinina večje zaradi mišične mase bolnika (proteinurija je podcenjena). Primerljivi so samo vzorci, ki so odvzeti ob podobnih urah in podobni telesni aktivnosti, najbolj primerno je jemanje drugega jutranjega vzorca. Normalne vrednosti so pod 150 mg/dan, višje vrednosti kažejo na proteinurijo (14).

Celokupno koncentracijo proteinov lahko izmerimo turbidimetrično, kolorimetrično ali z Brandfordovo metodo. S kvantitativnimi metodami določamo proteine v 24-urni količini seča, a te metode proteinov ne identificirajo. Za identifikacijo uporabljamo elektroforezne metode, kot je na primer gelska elektroforeza na agarozni (17).

O proteinuriji govorimo, ko vrednost proteinov v urinu preseže 150 mg na dan. Izločanje proteinov v urinu variira in lahko v določenih okoliščinah (dehidracija, stres, vročina, vnetja..) doseže ali preseže 150 mg proteinov v seču na dan. A pri tem ne govorimo o proteinuriji povezni z ledvično boleznijo, temveč o prehodni proteinuriji (18).

Proteini, katerih molekulska masa je nižja od 20.000 Daltonov (alfa-1-mikroglobulin, beta-2 mikroglobulini) lahko prečkajo glomerulno filtracijsko bariero in se filtrirajo v glomerulni filtrat, večje molekule pa delno prehajajo skozi glomerulno kapilarno steno. Prehod je odvisen od velikosti por v kapilarni steni. Endotelne celice so prekrte z negativno nabitimi sialoproteini in proteoglikani, tako negativno nabite (anioni) molekule težje prehajajo glomerulno kapilarno steno kot pozitivno nabite (kationi). Albumin ima srednjo molekulska maso (65.000 Daltonov) IgG pa veliko molekulska maso (150.000 Daltonov). V zdravih glomerulih se filtrirajo beljakovine z majhno molekulska maso in majhna količina albumina - okoli 500 do 1500 mg dnevno. Tako filtrirane molekule se skoraj popolnoma reabsorbirajo v proksimalnem tubulu, zato je končno izločanje beljakovin v seču manj kot 150 mg na dan(19).

Proteinurijo lahko ločimo glede na količino izločenih beljakovin v seču na blago (150 mg do 1g beljakovin v 24-urnem seču), zmerno (1 do 3 g beljakovin v 24-urnem seču) ali nefrotsko (več kot 3 g beljakovin v 24-urnem seču ali 3,5 g/dan/1,73m² površine) (20).

Z dodatnimi preiskavami pa jo lahko ovrednotimo kot glomerulno, tubulno ali prelivno (12).

1.4.1 Glomerulna proteinurija

Pri glomerulni proteinuriji gre za povečano permeabilnost glomerulne filtracijske membrane. Čezmerna prepustnost za albumine je znak začetne glomerulne okvare. Pri povečani prepustnosti imunoglobulinov (IgG) pa kaže na znak napredujevalne glomerulne okvare (12).

Z določitvijo razmerja albumin/kreatinin in IgG/ kreatinin v vzorcu seča opredelimo selektivnost proteinurije. Določamo jo z razmerjem med očistkom IgG in albuminov (12).

$$\text{Selektivni indeks} = \frac{(\text{IgG v seču}) \times (\text{albuminov v serumu})}{(\text{IgG v serumu}) \times (\text{albumini v seču})}$$

Če je razmerje manj kot 10% je proteinurija visoko selektivna (izločajo se pretežno albumini), pri vrednostih nad 20% pa je neselektivna (izločajo se albumini in IgG).

Selektivnost glomerulne proteinurije določamo tudi z izračunom razmerja med koncentracijo IgG / kreatinina in albumina /kreatinina v seču. Za koncentracije IgG/kreatinin je referenčna vrednost do 1,13 g/mol, za albumin/kreatinin pa do 2,26 g/mol. Povišane vrednosti albuminov kažejo na začetno glomerulno okvaro, povišane vrednosti IgG pa so znak napredujevalne glomerulne okvare (12,20)

1.4.2 Tubulna proteinurija

Tubulna proteinurija se pojavi pri reabsorpcijski okvari proksimalnih tubulov ali pri tubulointersticijski bolezni ledvic. V primeru resorpcijske okvare proksimalnih tubulov zaradi velike glomerulne proteinurije je reabsorpcija filtriranih proteinov manjša (4). Izločajo se tubulni proteini, kot so beta-2-mikroglobulin in alfa-1-mikroglobulin, ki so bolj stabilni ter RBP (angl. retinol binding protein) (12). Tubulno proteinurijo in s tem okvaro proksimalnih tubulov določimo z razmerjem koncentracije alfa-1-mikroglobulina in kreatinina v drugem jutranjem urinu. Prisotna je, če vrednost preseže 1,58 g/mol. Prav tako jo določamo z merjenjem količine izločenih tubulnih encimov, ki se ob poškodbah tubulov povečano izločajo v seč. Večinoma določamo razmerje NAG/ kreatinin, katerega referenčne vrednosti so 1,45- 9,19 μ kat/mol kreatinina (21). Pridružena ji je lahko tudi blaga albuminurija, saj je v primeru tubulointersticijske ledvične bolezni motena reabsorpcija albuminov v okvarjenih proksimalnih tubulih(12)..

Prelivna proteinurija odraža povečano filtracijo beljakovin z majhno molekulsko maso, ki prekomerno nastajajo. Najbolj značilen primer za to je povečano izločanje lahkih verig imunoglobulinov pri plazmocitomu (19).

Proteinurija je izjemno pomemben dejavnik tveganja za slabšanje ledvičnega delovanja, saj se lahko pojavi že v zgodnjih fazah ledvične bolezni, ko je hitrost glomerulne filtracije še normalna, čeprav so že prisotne ireverzibilne patohistološke spremembe ledvičnega tkiva.

1.4.3 Albuminurija

Je najzgodnejši znak napredovanja ledvične bolezni ali prisotnosti okvare žilnega endotela in s tem srčne bolezni. Definirana je kot povečano izločanje albuminov, čeprav je celokupna količina izločenih proteinov normalna (150 mg/dan) (20). Izraz mikroalbuminurija se ne uporablja več zaradi zavajajočega pomena.

Albumine v seču določamo, ko je proteinurija pri preiskavah kemičnih lastnosti seča s testnim lističem ali drugimi metodami negativna. Testni lističi za zaznavanje albuminurije zaznajo nižje vrednosti albuminov (od 50 do 100 mg dnevno) kot standardni, vendar so izsledki nezanesljivi. Standardna presejalna preiskava je razmerje med kreatininom in albuminom v drugem jutranjem vzorcu seča (g/mol). Spodnja meja albuminurije je v različnih državah različna, odvisna je od analitskih metod, ki so na razpolago. Pri vrednostih albuminurije 2 g/mol ali več je povečano tveganje za diabetično ledvično bolezen (12).

Albuminurija pomeni perzistentno izločanje (dva vzorca urina od treh v obdobju treh do šestih mesecev) albumina v seču, ki je večje od 30 do 300 mg dnevno. Albuminurija kaže na začetno ledvično okvaro pri sladkorni bolezni tipa 1 in 2 (20).

1.5 Biološki označevalci ledvične funkcije

Biološki označevalci so endogene snovi v telesu, katerih nivo v krvi je odvisen od dogajanja v njem. Za določene biomarkerje so s kliničnimi raziskavami ugotovili dobro povezavo med njihovo številčno vrednostjo ter kliničnim dogodkom (24). Urin predstavlja idealen vir biomarkerjev, saj ga lahko pridobimo neinvazivno in kontinuirano. Vsaka napaka v delovanju ledvic pa se kaže v sami sestavi urina.

S- kreatinin in GFR ter količina urina so najbolj pogosto uporabljeni ledvični markerji, vendar niso najbolj natančni. S- kreatinin variira glede na starost, spol, raso, mišično maso in vrsto prehrane (6). S- kreatinin je v stacionarnem stanju obratnosorazmerna z GF. Iz krivulje soodvisnosti GF in kreatinina lahko razberemo, da relativno veliko zmanjšanje GF (tudi do 50 %) povzroči relativno majhno spremembo S-kreatinina. Razlog je v kompenzatornih mehanizmih, ki povečajo izločanje kreatinina, zato je S- kreatinin slab pokazatelj ledvičnega delovanja v zgodnjih stopnjah kronične ledvične bolezni (32).

Novejši biološki označevalci so uporabni pri zgodnejšem odkrivanju ledvičnih bolezni in določevanju stopnje okvare ledvic. Nekateri predhodno že uporabljeni bio označevalci (NAG, beta-1- mikroglobulin in retinol vezavni protein) so vodili k odkritju novih, kot so KIM-1, NGAL, interleukin -18, cistein C, clusterin (26). Prav tako se raziskuje njihova uporaba pri identifikaciji kronične ledvične bolezni.

1.5.1 Kolagen IV

Kolagen IV je vrsta kolagena, ki se primarno nahaja v bazalni lamini (tanka mrežasta struktura, ki celice epitela, mišičnega in živčnega tkiva ločuje od obdajajočega vezivnega tkiva). Z lamini, proteoglikani in nidogeni se povezuje v mrežaste strukture. Skupaj z fibrilnimi materiali tvori bazalno membrano (27). Le-ta daje strukturno oporo in vpliva na rast, funkcijo in preživetje mnogih celic v organskem sistemu. Kolagen je protein, ki je glavni gradnik zunajceličnega matriksa (ZM). Kolagen IV spada med vrste kolagenov, ki ne tvorijo vlaken. Tvori trojno vijačnico, ki ustvarja mrežo kolagena.

Vsebuje večinoma dve alfa 1(IV) verigi in eno alfa 2(IV) verigo ali tri alfa 1(IV) verige. Identificirali so tudi alfa 3 (IV), alfa 4 (IV), alfa 5(IV) in alfa 6(IV) verige (28). Glavni znak ledvičnih sprememb pri diabetični nefropatiji je akumulacija ZM v glomerulih, tubulih in intersticiju. Biokemične analize človeške glomerulne bazalne membrane pri diabetesu so pokazale povišane vrednosti kolagena IV (je glavna komponenta ZM glomerulov, prisotna pa sta tudi tip V in VI) ter znižane vrednosti lamini proteinov (29). Prav tako pa opažajo zvišano izločanje kolagena IV v seč, zato sklepajo, da bi lahko urinsko koncentracijo uporabljali kot učinkovit neinvazivni indikator diabetične nefropatije (30). Kolagen IV tvori ZM proksimalnih tubulov, prisoten je tudi kolagen I. Z uporabo funkcionalnih analiznih interakcij celičnega matriksa je bilo dokazano, da ima kolagen IV ključno vlogo v tubulni funkciji in ledvičnem razvoju. Je pomemben sidriščni substrat za različne celične tipe, predvsem v ledvicah. Regulacija sinteze in degradacije kolagena IV ima pomembno vlogo v celični rasti, funkciji, migraciji in izdelavi organa. Ob prisotnosti ishemije ali akutni kemični izpostavljenosti lahko ledvične tubulne celice odmrejo ali se ločijo od ZM in začnejo razpadati in se luščiti v tubulni lumen. Ugotovili so, da kolagen pomaga pri celični obnovi in regeneraciji, zato se njegova sinteza ob teh stanjih poveča (28). Zato je kolagen IV mediator renalnega tubulnega razvoja in pokazatelj funkcijske sposobnosti tubulov.

Znano je, da napredovanje ledvične bolezni ni odvisno samo od glomerulnih sprememb, temveč je tubulointersticijska fibroza tista, ki napoveduje njen slab izid.

1.5.2 NGAL

NGAL (nevtrofilna gelatinaza povezana z lipokalinom), je protein, ki spada v družino lipokalinov (proteini, ki služijo prenašanju in vezavi snovi) in je kovalentno vezan na nevtrofil-gelatinazo. Njegova molekulska masa znaša 25k Daltonov (31). Nahaja se v številnih tkivih, v ledvicah, pljučih, jetrih (31). Najpomembnejši ligandi NGALa so siderofori, majhne molekule, ki vežejo železo. Iz tega izhaja tudi protektiven učinek NGALa, saj prenaša železo k proksimalnim tubulnim celicam, katerega encim hem oksigenaza 1(encim, ki ščiti tubularne celice) pretvori v aktivno obliko (22). Zato sklepajo, da se ob ledvični poškodbi začne sproščati NGAL, ki zmanjša apoptozo in poveča proliferativni odziv (31). Raziskave na miših so pokazale, da preprečuje okužbe s po Gramu negativnimi bakterijami ter da se ob okužbah njegova vrednost poveša. Prav tako so ugotovili povišane vrednosti NGAL pri nekaterih sistemskih obolenjih, ki niso povezana z infektivnimi procesi. Zaznali so jih pri vnetnih procesih, ki se dogajajo v epiteliju kože, črevesja, nekaterih tipih raka ter pri poškodovanih ledvičnih tubulnih celicah. Pri apliciranju cisplatina (povzroča tubulno nekrozo) mišim, je bilo ugotovljeno povišano sproščanje NGAL iz ledvičnih tubulov. Tudi raziskave na človeških modelih kažejo, da bi lahko bil NGAL eden najpomembnejših markerjev nove generacije za detekcijo akutnega ter kroničnega ledvičnega obolenja (31). Plazemski NGAL se filtrira v glomerulih in reabsorbira v proksimalnih tubulih. Izločanje NGAL v seč je možno le, če ledvična bolezen onemogoči reabsorbcijo NGAL v proksimalnem tubulu in inducira njegovo nastajanje. Znižanje GF vpliva tudi na ledvični očistek NGAL in poveča njegovo plazemsko koncentracijo pri bolnikih s kronično ledvično boleznijo. Plazemski in urinski NGAL dobro korelirata z izmerjeno ali ocenjeno GF. Povišano izločanje NGAL je bilo najprej opaženo pri ledvični biopsiji bolnikov s kroničnimi glomerulnimi ali tubulnimi okvarami (31). Do sedaj so naredili že veliko raziskav, objavljenih v različnih publikacijah, ki kažejo na povišano vrednost NGAL pri kronični ledvični bolezni, ki je lahko posledica membranske nefropatije, primarne fokalne segmentne glomeruloskleroze ali diabetične nefropatije. Pacienti s proteinurijo so imeli povišane vrednosti NGAL v seču, čeprav drugi klinični zanki (znižana GFR, porast serumske koncentracije kreatinina) še niso bili prisotni (31). Kaže, da je NGAL občutljivejši biomarker in ima višjo napovedno vrednost. NGAL bi bil lahko tudi učinkovit biomarker pri zdravljenju kronične ledvične bolezni, saj znižanje njegovih vrednosti v seču kaže na dober odziv na terapijo (31).

2 Namen naloge

Kronično ledvično bolezen označuje zmanjšanje hitrosti glomerulne filtracije pod 90ml/min/1,73 m^2 ali pa stalna eritrociturija ali proteinurija. Proteinurija je izjemno pomemben dejavnik tveganja za slabšanje ledvičnega delovanja in se lahko pojavi že v zgodnjih fazah ledvične bolezni, ko je hitrost glomerulne filtracije še normalna, čeprav so že prisotne ireverzibilne patohistološke spremembe ledvičnega tkiva, kot je na primer glomeruloskleroza ali tubulointersticijska fibroza.

Z namenom izboljšanja detekcije ledvične bolezni in ocene stopnje okvare želimo ugotoviti, kakšna je povezava med stopnjo okvare ledvičnega delovanja in izločanjem NGAL kot markerja toksične tubulne okvare in kolagena IV v seču kot nadomestnega markerja fibroze. Ugotoviti želimo tudi morebitno povezavo med izločanjem kolagena IV in NGAL v seču s celokupno proteinurijo, glomerulno in tubulno proteinurijo. V skupini bolnikov bomo preverili ledvično delovanje s pomočjo uveljavljenih diagnostičnih parametrov. Za oceno glomerulne in tubulne proteinurije bomo analizirali drugi jutranji seč, za dnevno proteinurijo bomo zbirali 24-urni seč, za oceno hitrosti glomerulne filtracije pa očistek kreatinina in oGF po MDRD enačbi. Prav tako bomo določili izločanje NGAL/kreatinin in kolagena IV/kreatinin v 24 urnem seču. S pomočjo statistične analize bomo ugotovili ali obstajajo povezave med izločanjem kolagena IV in NGALa v seč in z vrednostjo oGF po MDRD enačbi in očistkom kreatinina ter z določitvami proteinurije (beljakovine/kreatinin v drugem jutranjem vzorcu seča, 24-urna proteinurija) in vrsto proteinurije (albumin/kreatinin, IgG/kreatinin v seču, alfa 1-mikroglobulin/kreatinin, NAG/kreatinin, razmerje IgG/albumin v seču).

3 Materiali in metode

3.1 Bolniki

Raziskave so bile opravljene v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani, na kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo. Nabor bolnikov s kronično ledvično boleznijo je potekal od 12.10.2012 do 31.5.2013. Kasneje smo preverili še njihovo trenutno klinično stanje na dan njihove zadnje preiskave.

3.2 Odvzem vzorcev

3.2.1 Seč

Drugi jutranji seč smo bolnikom odvzeli 2-4 ure po prvi jutranji mikciji. Bolnikom smo priporočili, da naj večer pred preiskavo po 22 uri popijejo samo 200 ml tekočine.

24-urni seč smo določali tako, da so bolnik prvi dan preiskave spraznili mehur v stranišče, naslednjih 24 ur pa so seč zbirali v posebno posodo, vključno z zadnjim uriniranjem, izvedenim točno ob preteku 24 ur.

3.2.2 Kri

Odvzem krvi je potekal v skladu s priporočenimi postopki za odvzem venske krvi (33).

3.3 Merjenje analitov

3.3.1 Določanje različnih proteinov v seču

Vrednosti proteinov (albumina, alfa-1-mikroglobulina ter IgG) v seču smo določali s pomočjo imunonefelometrije. To je metoda, pri kateri detektiramo imunski kompleks. Merimo svetlobo, ki gre čez vzorec pod določenim kotom. Za analizo je primeren le svež, drugi jutranji seč. Vse vrednosti, ki smo jih dobili, smo preračunali na urinski kreatinin, ki smo ga izmerili v istem vzorcu seča. S tem izničimo vpliv različne razredčenosti seča in naredimo rezultate primerljive z naslednjo meritvijo naključnega vzorca.

Referenčne vrednosti U-albumin/kreatinin: do 2,26 g/mol

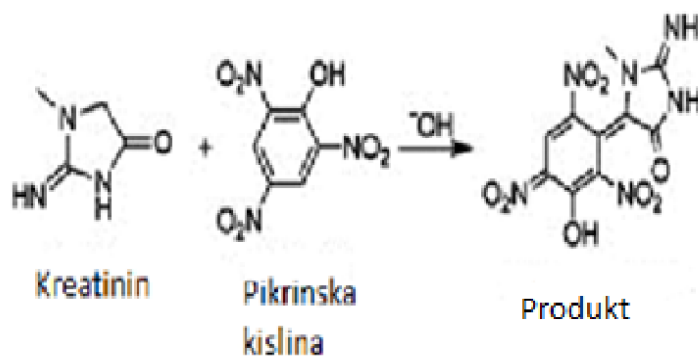
Referenčne vrednosti U- IgG/kreatinin: do 1,13 g/mol

Referenčne vrednosti alfa-1-mikroglobulina/kreatinin: 1,58 g/mol

3.3.2 Določanje S- kreatinina in U- kreatinina

Določanje kreatinina

Kreatinin v serumu in seču določamo s pomočjo Jaffejeve reakcije (slika 2). Pri tej reakciji reagira kreatinin s pikratom v alkalnem. Nastane oranžno obarvan produkt, katerega intenziteta je sorazmerna s koncentracijo kreatinina v vzorcu. Absorbanco kompleksa merimo pri 510-520 nm. Analizo smo izvedli na biokemičnem analizatorju Roche/Hitachi 912 proizvajalca Roche Diagnostics. Uporabili smo kinetično Jaffejevo metodo (slika 2 (23)). Kinetično metodo uporabimo zato, da se izognemo interferenci s t.i. psevdokreatinini (ketonska telesa, glukoza, fruktoza, askorbinska kislina, proteini...). Ti kromogeni zreagirajo že v prvih 20 s (glukoza, askorbat, piruvat) ali po 80 s (proteini, acetoacetat, piruvat, acetone), zato merimo absorbanco v času od 20 s do 80 s in odštejemo 20 s absorbanco.



Slika 2 Jaffejeva reakcija

Referenčne vrednosti za U-kreatinin so 7,5 -12,5 mmol/dan za ženske in 10,0- 18,0 mmol/dan za moške. Različne vrednosti so posledica večje mišične mase pri moških in s tem večjega izločanja kreatinina. Referenčna vrednost za S-kreatinin so 44-97 $\mu\text{mol/l}$.

Določanje očistka kreatinina

Za določitev očistka smo potrebovali serumsko koncentracijo kreatinina, koncentracijo kreatinina v 24-urnem urinu, volumen 24-urina, čas zbiranja 24-urnega urina in bolnikovo telesno površino.

$$C_{cr} (\text{ml/s } /1,73\text{m}^2) = \frac{U (\mu\text{mol/L}) \times V (\text{ml}) \times 1,73}{S (\mu\text{mol/L}) \times A(\text{m}^2) \times t(\text{s})}$$

U-koncentracija kreatinina v seču, V- volumen 24 urnega seča, t- čas zbiranja 24-urnega seča, S- koncentracija serumskega kreatinina, izmerjena ob koncu zbiranja 24-urnega seča, A- bolnikova telesna površina, odčitana iz nomograma, glede na višino in težo.

Referenčne vrednosti so 1,3 – 2,0 ml/s

Ocena glomerulne filtracije

oGf smo določili s pomočjo revidirane enačbe MDRD s faktorjem 175 in uporabili standardizirano serumsko koncentracijo kreatinina, ki je sledljiv do metode IDMS.

$$\text{oGF (ml/min/1,73m}^2) = 175 \times (\text{serumska c kreatinina } (\mu\text{mol/L}) / 88,4)^{-1,154} \times (\text{starost (leta)})^{-0,203}$$

Za ženske se izraz pomnoži z 0,742, za črno raso pa z 1,21.

3.3.3 Ocena dnevne proteinurije

oDP smo kvantitativno ovrednotili z analizo celokupnih beljakovin v drugem jutranjem vzorcu seča, v katerem smo opravili še analizo kreatinina in proteinurijo izračunali po sledeči enačbi:

$$\text{Ocena dnevne proteinurije/1,73m}^2 = \frac{\text{U-proteini(g/L)} \times 8,8 \text{ mmol/dan/1,73m}^2}{\text{U-kreatinin (mmol/L)}}$$

U- proteini- proteini v drugem jutranjem vzorcu seča, U- kreatinin,kreatinin določen v urinu v drugem jutranjem urinu

Referenčne vrednosti so do 0,250 g/dan.

3.3.4 Določanje NAG

NAG smo določali v seču. Celokupni encim NAG je sestavljen iz dveh podenot (A in B), ki jih ločimo s temperaturno denaturacijo na 55⁰C. A oblika se denaturira, ostane B izoenzim, ki je temperaturno stabilnejši. NAG smo določali s kolorimetrično metodo (Roche NAG). NAG hidrolizira Na sol 3-krezolsulfonftalein-N-acetil-β-D-glukozaminida, nastane N-acetilglukozamin in Na sol 3-krezol sulfonftaleina. Spremembo absorbance smo merili pri 580nm.

REAGENTI, KALIBRATORIJI, KONTROLE

Reagent NAG (Roche, 875406)

NAG standard (Roche, 982962)

NAG kontrole (Roche, 1164368)

INSTRUMENTI IN OPREMA: Spektrofotometer OLYMPUS AU 400

PODAJANJE REZULTATOV

Rezultat podamo v obliki indeksa NAG/kreatinin v urinu. Vrednosti so od 1.45 do 9,19 μkat/mmol kreatinina.

3.3.5 Določanje NGAL in Kolagen IV

Določali smo ju s pomočjo encimskoimunskega testa (ELISA). Je biokemijska metoda, ki se uporablja v imunologiji za detekcijo protiteles ali antigenov v vzorcu.

Kolagen IV

Kolagen IV smo določali z The urinary Collagen IV ELISA Kit proizvajalca EKF diagnostics.

Uporabili smo direktno ali sendvič ELISO, ki se uporablja za določanje antigenov, v našem primeru kolagena IV v seču.

Na trdni nosilec smo vezali monoklonsko protitelo za kolagen IV. Dodali smo vzorec, ki je vseboval kolagen IV. Sprali smo nosilec, da smo odstranili nevezane antigene in nato dodali monoklonska protitelesa, ki so bila konjugirana z encimom. Rezultat tega je bil “ ujetost” molekul med trdnim nosilcem in z encimom označenimi protitelesi. Ko smo odstranili nevezana, z encimom konjugirana protitelesa smo dodali substrat, ki je ob prisotnosti encima razvil barvo. Intenziteta barve je proporcionalna količini kolagena IV v vzorcu.

Preiskavi smo izvedli na analizatorju Personal Lab, reagenti so bili:

- raztopina 10% Na hipoklorita
- raztopina 70% izopropilnega alkohola
- redestilirana voda

Rezultate smo podali v obliki U-kolagen IV/ U- kreatinin

Območje linearnosti metode: 0,8 – 50 µg/L

Specifičnost metode: metoda je zelo specifična za kolagen IV, zreagira le 2% kolagena II in manj kot 0,5 % ostalih oblik kolagena.

NGAL

NGAL smo določali s pomočjo NGAL Rapid ELISA Kit CE IVD, proizvajalca BIOPORTO. Tudi tukaj smo uporabili direktno ali sendvič analizo. Pri tem testu je bil nosilec prekrit s primarnimi NGAL protitelesi, dodali smo mu protitelo NGALa konjugirano s HRP. Nato smo dodali kalibratorje in razredčene vzorce NGALa in vse skupaj inkubirali. Po preteku 30 minuti smo dodali TMB substrat in stop raztopino. Rezultate smo dobili z merjenjem absorbance pri 450 nm. Preiskavo smo izvedli na analizatorju Personal Lab.

Rezultate smo podali v obliki U-NGAL/U-kreatinin

Območje linearnosti metode: 0,2- 20 ng/mL

4 Rezultati

4.1 Vrednotenje rezultatov

Rezultate smo vrednotili s pomočjo statističnih programov SPSS 13.0 in Microsoft Office Excel 2003. Raziskavo smo izvedli s sledečima statističnima testoma: t- testom značilnosti Pearsonovih korelacijskih koeficientov ter neparametričnim Mann-Whitneyevim testom dveh neodvisnih vzorcev.

4.2 Raziskava in rezultati

V raziskavi je sodelovalo 58 pacientov. Mnenje etične komisije in soglasje bolnikov smo pridobili pred začetkom raziskave. Moških je bilo 33 (56,9 %) žensk pa 25 (43,1%). Povprečna starost preiskovancev je bila 51,24 +- 14,975 let (od 22 do 77 let). V skupini smo zajeli bolnike, ki so imeli diagnosticirano kronično ledvično bolezen različnih tipov glede na klasifikacijo KDOQI združenja (tabela 1). Pri vseh preiskovancih je bila diagnosticirana proteinurija glede na oDP, le pri enem podatki o oDP niso bili znani.

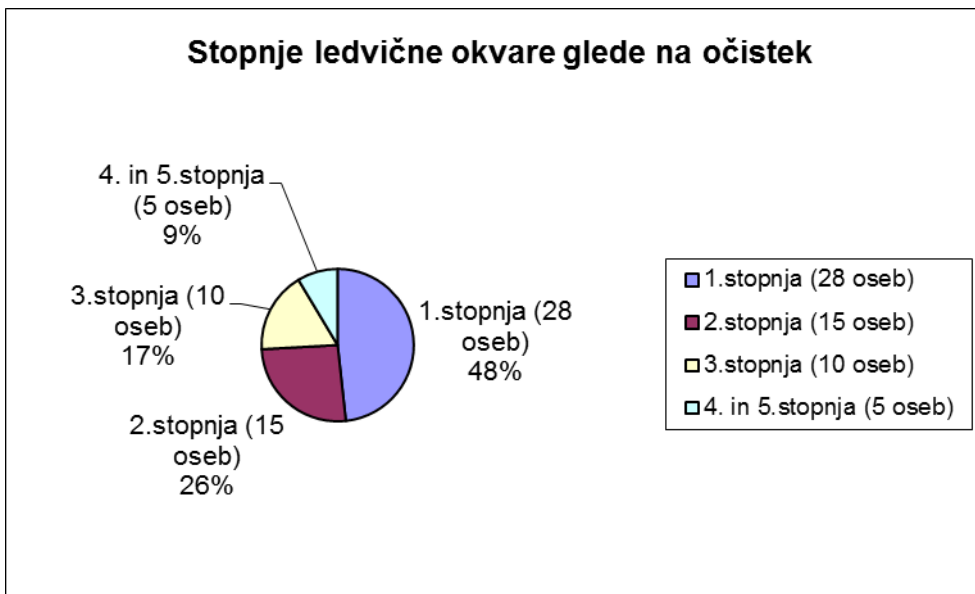
Tabela. 1.... Priporočena klasifikacija kronične ledvične bolezni s strani KDOQI združenja (6)

Stopnja kronične ledvične bolezni	Opis	Ocena GF (ml/min/1,73m ²)
1	Prisotna ledvična okvara	>90
2	Ledvična okvara z blago zmanjšano GF	60-89
3	Zmerno zmanjšanje GF	30-59
4	Izrazito zmanjšanje GF	15-29
5	Ledvična odpoved	<15

GF smo ocenili na dva načina, z uporabo MDRD enačbe in z očistkom kreatinina. Bolnike smo razdelili glede na klasifikacijo KDOQI združenja.

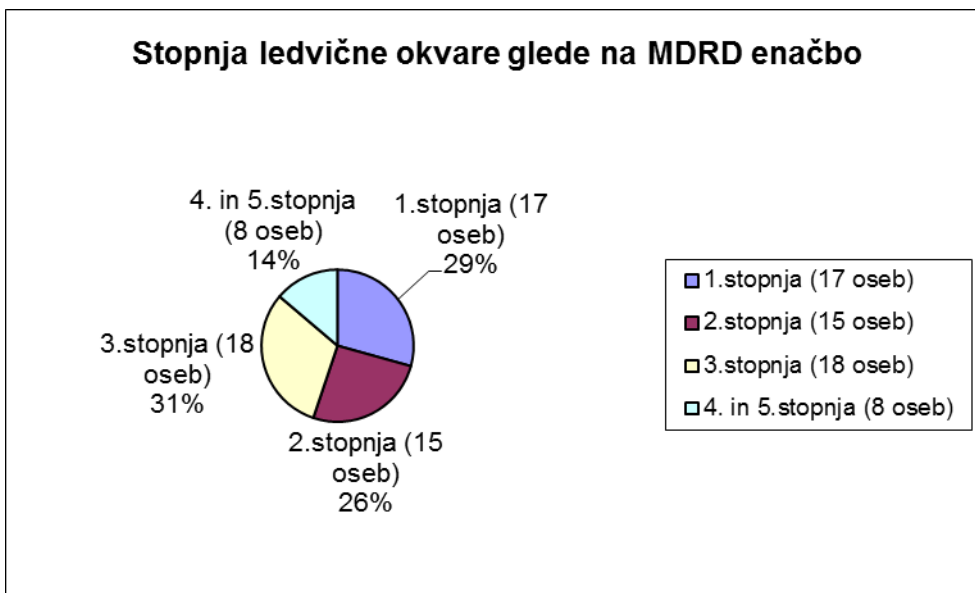
Glede na očistek kreatinina smo bolnikom določili stopnjo KLB (slika 3). Očistek kreatinina smo šteli za referenčno metodo za oceno ledvičnega delovanja, ob tem je bilo izločanje kreatinina na kilogram telesne teže preiskovanca pri vseh bolnikih v referenčnem območju.

Slika 3 Skupine bolnikov z različnimi stopnjami KLB glede na očistek kreatinina



Pri oceni GF s pomočjo MDRD enačbe so bili rezultati drugačni in so prikazani na sliki 4

Slika 4 Skupine bolnikov z različnimi stopnjami glede na oGF po MDRD enačbi



Bolnike smo razvrstili v skupine tudi glede na količino izločenih beljakovin v 24-urnem seču (tabela 2):

- blaga proteinurija: 0,15-1 g beljakovin v 24-urnem seču
- zmerna proteinurija: 1-3 g beljakovin v 24-urnem seču
- huda ali nefrotska proteinurija: več kot 3, beljakovin v 24- urnem seču

Tabela 2 Razvrstitev bolnikov v skupine glede na vrsto proteinurije

Vrsta proteinurije	Število bolnikov	Delež
Blaga	16	28,1
Zmerna	23	40,3
Nefrotska	18	31,6

Vsi bolniki so imeli v seču povišano izločanje albuminov, dva bolnika sta imela izločanje IgG v mejah normale. Štirje bolniki niso imeli povišanih vrednosti alfa-1-mikroglobulinov in NAG v seču, drugi pa so imeli povišanega vsaj enega izmed teh dveh parametrov.

4.3 Koleracije med posameznimi parametri kronične ledvične okvare

Preverili smo odnos med vrednostmi NGALa v seču, kolagena IV v seču, alfa-1-mikroglobulinov v seču, NAG v seču, albuminov v seču, S-kreatinina v serumu, oGF določeno glede na vsebnost kreatinina v serumu, očistkom kreatinina glede na 24-urni seč in oDP v seču. Izračunali smo Pearsonov koleracijski koeficient (r) ter določili p-vrednost (sig) značilnosti povezav med posameznimi parametri (tabela 3 in 4).

Preizkušali smo hipotezo $H_0, p=0$, ki predpostavlja, da je izračunani r le posledica naključnega vzorca, pri katerem koleracija ne obstaja pri stopnji tveganja $\alpha =0,05$. Z veljavnostjo alternativne hipoteze $H_1 \neq p$ smo ugotovili statistično pomembne povezave med kolagenom IV v seču in NGAL v seču, očistkom kreatinina, S-kreatininom, alfa-1-mikroglobulinom v seču ter IgG v seču. Statistično pomembne povezave smo potrdili tudi med NGALom v seču z očistkom kreatinina, oGF, S-kreatininom ter kolagenom IV (tabeli 3 in 4).

Tabela 3 Korelacije med posameznimi parametri ledvičnega obolenja

		S-kreatinin	oGf(MDRD)	Očistek	alfa-1-	NAG
S-kreatinin	Korelacija	1	-0,901	-0,723	-0,109	-0,197
	Sig..(dvostranska)		0,000	0,000	0,429	0,145
oGf(MDRD)	Korelacija	-0,901	1	0,773	-0,123	0,290
	Sig..(dvostranska)	0,000		0,000	0,369	0,030
Očistek kreatinina	Korelacija	-0,723	-0,773	1	-0,110	0,155
	Sig..(dvostranska)	0,000	0,000		0,423	0,254
alfa-1-mikroglobulini	Korelacija	-109	-0,123	-0,110	1	-0,219
	Sig..(dvostranska)	0,429	0,369	0,423		0,116
NAG	Korelacija	-0,197	0,290	0,155	-0,219	1
	Sig..(dvostranska)	0,145	0,300	0,254	0,116	
albumini	Korelacija	-0,110	0,120	0,295	0,108	-0,098
	Sig..(dvostranska)	0,412	0,371	0,024	0,430	0,471
IgG	Korelacija	0,110	-0,138	-0,096	0,667	-0,010
	Sig..(dvostranska)	0,411	0,302	0,475	0,000	0,393
oDP	Korelacija	-0,080	0,083	0,194	0,445	0,233
	Sig..(dvostranska)	0,553	0,537	0,148	0,001	0,087
kolagenIV/kreatinin	Korelacija	0,301	-0,238	-0,274	0,637	-0,084
	Sig..(dvostranska)	0,022	0,073	0,037	0,000	0,536
NGAL/kreatinin	Korelacija	0,412	-0,323	0,178	-0,003	-0,070
	Sig..(dvostranska)	0,001	0,014	0,195	0,983	0,601

Tabela 4 Korelacije med posameznimi parametri ledvičnega obolenja

		albumini	IgG	oDP	kolagen IV	NGAL
S-kreatinin	Korelacija	-0,110	0,110	-0,080	0,301	0,412
	Sig..(dvostranska)	0,411	0,411	0,553	0,022	0,001
oGf(MDRD)	Korelacija	0,120	-0,138	0,083	-0,238	-323
	Sig..(dvostranska)	0,371	0,302	0,537	0,073	0,014
Očistek kreatinina	Korelacija	0,295	-0,096	0,194	-0,274	-0,324
	Sig..(dvostranska)	0,024	0,475	0,148	0,037	0,013
alfa-1-mikroglobulini	Korelacija	0,108	0,667	0,445	0,637	0,178
	Sig..(dvostranska)	0,430	0,000	0,001	0,000	0,195
NAG	Korelacija	-0,098	-0,010	0,233	-0,084	-0,003
	Sig..(dvostranska)	0,471	0,939	0,087	0,536	0,983
albumini	Korelacija	1	0,027	0,098	-0,021	-0,070
	Sig..(dvostranska)		0,840	0,468	0,878	0,601
IgG	Korelacija	0,027	1	0,785	0,637	0,193
	Sig..(dvostranska)	0,840		0,000	0,000	0,147
oDP	Korelacija	0,098	0,785	1	0,131	0,046
	Sig..(dvostranska)	0,468	0,000		0,331	0,734
kolagenIV/kreatinin	Korelacija	-0,021	0,637	0,131	1	0,75
	Sig..(dvostranska)	0,878	0,000	0,331		0,000
NGAL/kreatinin	Korelacija	-0,070	0,193	0,046	0,475	1
	Sig..(dvostranska)	0,601	0,147	0,734	0,000	

4.4 Primerjava srednjih vrednosti parametrov

Bolnike smo razdelili v dve skupini glede na glomerulno filtracijo, ki smo jo opredelili s očistkom kreatinina. V prvi skupini so bili pacienti, ki so imeli glomerulno filtracijo v mejah normale (očistek kreatinina je večji ali enak 1,6 ml/s, kreatinin na kg teže pri pacientu v 24 urnem urinu pa je v referenčnem območju), imeli pa so diagnosticirano proteinurijo. V drugi skupini pa so imeli pacienti nižji očistek kreatinina in s tem posledično višjo stopnjo ledvične okvare. V prvi skupini je bilo 28 pacientov v drugi pa 30. V tabeli 5 prikazujemo mediano in razpon vrednosti spremenljivk pri skupini z normalnim očistkom kreatinina, v tabeli 6 pa pri skupini z zmanjšanim očistkom kreatinina.

Tabela 5 Mediana in razpon vrednosti spremenljivk pri skupini bolnikov z normalnim očistkom kreatinina

	N	Minimum	Maksimum	Mediana
dU-NGAL/dU-kreatinini	28	0E-12	2,54	0,77
dU-Kolagen IV/dU-Kreatinin	28	,01	,80	0,23
U- IgG(g/mol)	28	0	41	10,43
U- Albumini (g/mol)	28	15,80	25707,00	1213,26
U-alfa-1-mikroglobulini (g/mol)	28	0	63	10,06
U-NAG (μkat/mol)	27*	1,18	65,43	15,61
S- Kreatinin (μmol/l)	28	40	127	70,04
oGF(MDRD) (ml/min/1,73m ²)	28	54	90	83,86
Očistek kreatinina (ml/s)	28	1,6	4,9	2,29
oDP(g/dan/1,73m ²)	28	0,22	13,26	3,09

Tabela 6 Mediana in razpon vrednosti spremenljivk pri skupini bolnikov z zmanjšanim očistkom kreatinina

	N	Minimum	Maksimum	Mediana
S- Kreatinin(μmol/l)	30	61	377	161,90
oGF(MDRD) (ml/min/1,73m ²)	30	14	84	43,43
U-alfa-1-mikroglobulini (g/mol)	27*	1,6	73,6	15,54
U-NAG (μkat/mol)	29*	,86	24,00	8,96
U- Albumini (g/mol)	30	10,7	797,4	217,71
U- IgG(g/mol)	30	1,15	88,82	17,95
oDP(g/dan/1,73m ²)	29	,217	14,17	2,58
dU-NGAL/dU-kreatinini	30	0,18	10,13	1,50
dU-Kolagen IV/dU-Kreatinin	30	0E-12	9,63	0,96
Očistek kreatinina (ml/s)	30	0,10	1,50	0,91

*pri nekaterih pacientih ni bilo mogoče izvest vseh preiskav.

Z neparametričnim Mann-Whitneyevim testom dveh neodvisnih vzorcev smo dokazovali hipotezo: razlika med srednjimi vrednostmi parametrov iz prve skupine in druge skupine je enaka 0 ($H_0: \mu = 0$), pri stopnji tveganja $\alpha = 0,05$, rezultate prikazuje tabela 7.

Tabela 7 primerjava srednjih vrednosti parametrov med skupino z normalnim in skupino z znižanim očistkom

	U-alfa-1- mikroglobulini (g/mol)	U-NAG (μ kat/mol)	U- Albumini (g/mol)	U-IgG (g/mol)	dU-NGAL/ dU-kreatinini
Mann-Whitney-U test	245,000	316,000	382,000	295,000	302,000
Wilcoxon-W test	651,000	751,000	847,000	701,000	70k8,000
Z	-2,241	-1,238	-,591	-1,945	-1,836
Signifikantnost (dvostranski inteval zaupanja)	0,024	0,221	0,562	0,052	0,067
Signifikantnost (enostranski inetrval zaupanja)	0,012	0,110	0,281	0,026	0,033

	S- Kreatinin	oGF(MDRD)	oDP(g/dan/1,73m)	dU-Kolagen IV/ dU-Kreatinin
Mann-Whitney-U	45,500	30,500	405,000	366,500
Wilcoxon-W	451,500	495,500	811,000	772,500
Z	-5,828	-6,139	-0,016	-0,833
Signifikantnost(dvostranski)	0,000	0,000	0,994	0,410
Signifikantnost (enostranski)	0,000	0,000	0,497	0,205

Za statistično značilno se je pokazala razlika vrednosti alfa-1-mikroglobulina v seču, S-kreatinina in ocene glomerulne filtracije ob upoštevanju dvostranskega intervala zaupnja, pri enostranskem pa so statistično pomembne razlike tudi pri srednjih vrednostih NGAL in IgG v seču .

Naše bolnike smo razdelil v 4 skupine glede na stopnjo ledvične okvare po klasifikaciji KDOQI združenja glede na očistek kreatinina. Izvedli smo neparametričen Mann-Whitneyev test dveh neodvisnih vzorcev ter dokazovali hipotezo: razlika med srednjimi vrednostmi parametrov iz ene skupine in druge skupine je enaka 0 ($H_0: \mu = 0$), pri stopnji tveganja $\alpha = 0,05$. Mediano z razponom vrednosti pri skupinah bolnikov s KLB 1, 2, 3, in 4-5 prikazujejo tabele 8,9, 10 in 11.

Mediana in razpon vrednosti pri KLB prve stopnje (tabela 8).

Tabela 8 Mediana in razpon vrednosti spremenljivk pri skupini bolnikov s KLB 1. stopnje

	N	Minimum	Maksimum	Mediana
dU-NGAL/dU-kreatinini	28	0E-12	2,54	0,77
dU-Kolagen IV/dU-Kreatinin	28	0,01	0,80	0,23
U- IgG(g/mol)	28	0	41	10,43
U- Albumini (g/mol)	28	15,80	25707,00	1213,26
U-alfa-1-mikroglobulini (g/mol)	28	0	63	10,06
U-NAG (μ kat/mol)	27*	1,18	65,43	15,61
S- Kreatinin(μ mol/l)	28	40	127	70,04
oGF(MDRD) (ml/min/1,73m ²)	28	54	90	83,86
Očistek kreatinina(ml/s)	28	1,6	4,9	2,29
oDP(g/dan/1,73m ²)	28	0,23	13,26	3,09

Mediana in razpon vrednosti KLB druge (tabela 9) in KLB tretje stopnje (tabela 10) ter KLB združene četrte in pete stopnje (tabela 11).

Tabela 9 Mediana in razpon vrednosti spremenljivke pri skupini bolnikov s KLB 2. stopnje

	N	Minimum	Maksimum	Mediana
S- Kreatinin($\mu\text{mol/l}$)	15	61	201	121,87
oGF(MDRD) (ml/min/1,73m ²)	15	28	84	54,07
Očistek kreatinina(ml/s)	15	1	2	1,26
U-alfa-1-mikroglobulini(g/mol)	13*	2	48	9,49
U-NAG ($\mu\text{kat/mol}$)	14*	0,88	19,66	9,30
U- Albumini (g/mol)	15	10,72	426,23	155,82
U- IgG(g/mol)	15	1,15	37,61	10,93
oDP(g/dan/1,73m ²)	15	0,22	5,44	1,86
dU-Kolagen IV/dU-Kreatinin	15	0,01	1,23	0,30
dU-NGAL/dU-kreatinini	15	0,18	3,12	0,85

Tabela10 Mediana in razpon vrednosti spremenljivke pri skupini bolnikov s KLB 3. stopnje

	N	Minimum	Maksimum	Mediana
S- Kreatinin($\mu\text{mol/l}$)	10	90	236	157,10
oGF(MDRD) (ml/min/1,73m ²)	10	25	70	41,00
Očistek kreatinina(ml/s)	10	0,5	0,9	0,70
U-alfa-1-mikroglobulini (g/mol)	9*	2,7	73,6	20,24
U-NAG ($\mu\text{kat/mol}$)	10	0,9	24,0	7,97
U- Albumini (g/mol)	10	31	797	270,00
U- IgG(g/mol)	10	1,8	88,8	25,73
oDP(g/dan/1,73m ²)	9*	0,31	14,17	3,22
dU-Kolagen IV/dU-Kreatinin	10	0	10	1,20
dU-NGAL/dU-kreatinini	10	0,23	3,21	1,38

Tabela 11 Mediana in razpon vrednosti spremenljivke pri KLB 4. in 5. stopnje

	N	Minimum	Maksimum	Mediana
S- Kreatinin($\mu\text{mol/l}$)	5	215	377	291,60
oGF(MDRD) (ml/min/1,73m ²)	5	14	20	16,40
Očistek kreatinina(ml/s)	5	0,1	0,4	0,26
U-alfa-1-mikroglobulini (g/mol)	5	15,13	30,91	22,80
U-NAG ($\mu\text{kat/mol}$)	5	5,18	18,33	9,95
U- Albumini (g/mol)	5	27,55	498,48	298,80
U- IgG(g/mol)	5	9,61	45,46	23,44
oDP(g/dan/1,73m ²)	5	0,73	6,83	3,58
dU-Kolagen IV/dU-Kreatinin	5	1,7	3,3	2,45
dU-NGAL/dU-kreatinini	5	1,33	10,13	3,68

Primerjavo med srednjimi vrednostmi spremenljivk med skupino bolnikov z različno stopnjo KLB prikazujejo tabele 12 -16.

Primerjava med srednjimi vrednostmi parametrov 1. in 2. stopnje ledvične okvare (tabela 12).

Tabela 12 Primerjava med srednjimi vrednostmi parametrov pri 1. in 2. stopnji ledvične okvare

	U-alfa-1- mikroglobulini (g/mol)	UNAG ($\mu\text{kat/mol}$)	U- Albumini (g/mol)	U-IgG (g/mol)	dU-KolagenIV/dU- Kreatinin
Mkann-Whitney-U	151,00	155,00	173,00	180,00	191,50
Wilcoxon-W	557,00	260,00	293,00	586,00	311,50
Z	-0,870	-0,935	-0,943	-0,764	-0,471
Signifikantnost (dvostranski interval zaupanja)	0,384	0,350	0,346	0,445	0,637

	S- Kreatinin	oGF(MDRD)	oDP(g/dan/1,7m)	dU-NGAL/dU- kreatinini
Mann-Whitney-U test	37,000	25,500	192,000	197,00
Wilcoxon-W test	443,000	145,500	312,000	603,00
Z	-4,410	-4,854	-0,459	-0,331
Signifikantnost (dvostranski interval zaupanja)	0,000	0,000	0,646	0,740

V tabeli 12 je prikazano, da obstajajo statistično pomembne razlike med srednjimi vrednostmi parametrov iz ene in druge skupine med S-kreatininom ter oGF po MDRD enačbi. Med ostalimi parametri ni statistično pomembnih razlik.

Primerjava med srednjimi vrednostmi parametrov 2. in 3. stopnje ledvične okvare (tabela 13).

Tabela 13 Primerjava med srednjimi vrednostmi parametrov 2. in 3. stopnje ledvične okvare

	U-alfa-1- mikroglobulini (g/mol)	U-NAG (μ kat/mol)	U- IgG (g/mol)	U- Albumini (g/mol)	dU-Kolagen IV/dU-Kreatinin
Mann-Whitney-U test	29,000	56,000	50,000	63,000	72,000
Wilcoxon-W test	120,000	111,000	170,000	183,000	192,000
Z	-1,970	-,820	-1,387	-,666	-,166
Signifikantnost (dvostranski interval zaupanja)	,049	,412	,166	,506	,868

	S- Kreatinin	oGF(MDRD)	oDP(g/dan/1,73m)	dU-NGAL/dU- kreatinini
Mann-Whitney-U test	37,000	37,000	63,000	51,000
Wilcoxon-W test	157,000	92,000	183,000	171,000
Z	-2,108	-2,109	-,268	-1,332
Signifikantnost (dvostranski interval zaupanja)	,035	,035	,788	,183

Obstaja statistično značilna razlika med srednjima vrednostnima alfa-1-mikroglobulinov iz skupine ljudi s 2. stopnjo kronične ledvične okvare in 3. stopnjo. Prav tako se pojavljajo statistično značilne razlike med S-kreatininom in oGF-jem.

Primerjava med srednjimi vrednostmi parametrov 3. in 4.,5. stopnje ledvične okvare (tabela 14).

Tabela 14 Primerjava med srednjimi vrednostmi parametrov 3. in 4.,5. stopnje ledvične okvare

	U-alfa-1- mikroglobulini (g/mol)	U-NAG (μ kat/mol)	U- IgG(g/mol)	U- Albumini (g/mol)	dU-Kolagen IV/dU- Kreatinin
Mann-Whitney-U test	14,000	17,000	20,000	23,000	5,000
Wilcoxon-W test	59,000	72,000	75,000	78,000	60,000
Z	-1,133	-,980	-,612	-,245	-2,449
Signifikantnost (dvostranski interval zaupanja)	,257	,327	,540	,806	,014

	S- Kreatinin	oGF(MDRD)	oDP(g/dan/1,73 m	dU-NGAL/dU- kreatinini
Mann-Whitney-U	1,000	,000	17,000	10,000
Wilcoxon-W	56,000	15,000	62,000	65,000
Z	-2,939	-3,065	-,733	-1,837
Signifikantnost (dvostranski interval zaupanja)	,003	,002	,463	,066

Obstaja statistično značilna razlika med srednjimi vrednostmi kolagena IV pri obojestranskemu intervalu zaupanja. Prav tako obstaja statistično značilna razlika med srednjimi vrednostmi NGALa, če upoštevamo enostranski interval zaupanja. Statistično značilna razlika je tudi med srednjimi vrednostmi S-kreatinina in oGF pri dvostranskemu intervalu zaupanja.

Primerjava med srednjimi vrednostmi parametrov 1. in 4,5. stopnjo ledvične okvare (tabela 15)

Tabela 15 Primerjava med srednjimi vrednostmi parametrov 1. in 4., 5. stopnje ledvične okvare

	S- Kreatinin	oGF(MDRD)	oDP(g/dan/1,73 m	dU-NGAL/dU-kreatinini
Mann-Whitney-U	,000	,000	53,000	9,000
Wilcoxon-W	406,000	15,000	459,000	415,000
Z	-3,516	-3,783	-,854	-3,063
Signifikantnost (dvostranski interval zaupanja)	,000	,000	,393	,002

	U-alfa-1-mikroglobulini (g/mol)	U-NAG (μkat/mol)	U-IgG(g/mol)	U- Albumini (g/mol)	dU-Kolagen IV/dU-Kreatinin
Mann-Whitney-U test	24,000	64,000	27,000	66,000	,000
Wilcoxon-W test	430,000	79,000	433,000	472,000	406,000
Z	-2,316	-,182	-2,159	-,201	-3,515
Signifikantnost (dvostranski interval zaupanja)	,021	,856	,031	,841	,000

Obstaja statistično pomembna razlika med srednjimi vrednostmi NGALa, kolagena IV, alfa-1-mikroglobulini, IgG-jem, S-kreatininom in oGf-jem.

Primerjava med srednjimi vrednostmi parametrov 2. in 4.5. stopnjo ledvične okvare (tabela 16).

Tabela 16 Primerjava med srednjimi vrednostmi parametrov 2 in 4. , 5. stopnje ledvične okvare

	U-alfa-1- mikroglobulini (g/mol)	U-NAG (μ kat/mol)	U- IgG(g/mol)	U- Albumini (g/mol)	dU-Kolagen IV/dU-Kreatinin
Mann-Whitney-U	8,000	30,000	18,000	20,000	,000
Wilcoxon-W	99,000	135,000	138,000	140,000	120,000
Z	-2,415	-,463	-1,702	-1,528	-3,273
Signifikantnost (dvostranski interval zaupanja)	,016	,643	,089	,127	,001

	S- Kreatinin	oGF(MDRD)	oDP(g/dan/1,73 m	dU-NGAL/dU- kreatinini
Mann-Whitney-U	,000	,000	18,000	3,000
Wilcoxon-W	120,000	15,000	138,000	123,000
Z	-3,274	-3,274	-1,702	-3,013
Signifikantnost (dvostranski interval zaupanja)	,001	,001	,089	,003

Obstajajo statistično pomembne razlike med srednjimi vrednostmi kolagena IV in NGALa med skupino 2 in 4 stopnje KLB. Prav tako so statistično pomembne razlike med srednjimi vrednostmi alfa-1-mikroglobulina, S-kreatinina in oGF-ja. Za IgG pa so statistično pomembne razlike med srednjimi vrednostmi pri upoštevanju enostranskega intervala zaupanja.

Naše bolnike (58 bolnikov) smo razdelili v tri skupine glede na oDP in sicer v skupino z blago proteinurijo (16), zmerno (23) in nefrotsko (18). Pri enem bolniku podatki oDP niso bili znani.

Vrednosti mediane in razpona spremenljivk po skupina prikazujejo tabele 17, 18 in 19.

Izvedli smo neparametričen Mann-Whitneyev test dveh neodvisnih vzorcev ter dokazovali hipotezo: razlika med srednjimi vrednostmi parametrov iz ene skupine in druge skupine je enaka 0 ($H_0: \mu = 0$), pri stopnji tveganja $\alpha = 0,05$, rezultate prikazujejo tabele 20-22.

Tabela 17 Srednje vrednosti pri blagi proteinuriji

	N	Minimum	Maksimum	Mediana
S- Kreatinin($\mu\text{mol/l}$)	16	44	377	120,63
oGF(MDRD) (ml/min/1,73m ²)	16	14	90	65,38
Očistek kreatinina(ml/s)	16	,3	2,5	1,53
U-alfa-1-mikroglobulini (g/mol)	14*	0	63	8,26
U-NAG ($\mu\text{kat/mol}$)	15*	,88	24,21	11,03
U- Albumini (g/mol)	16	10,72	118,95	45,24
U- IgG(g/mol)	16	0	10	3,31
dU-Kolagen IV/dU-Kreatinin	16	0,01	1,80	0,23
dU-NGAL/dU-kreatinini	16	0E-12	1,33	0,64

Tabela 18 Srednje vrednosti pri zmerni proteinuriji

	N	Minimum	Maksimum	Mediana
S- Kreatinin($\mu\text{mol/l}$)	23	48	298	128,43
oGF(MDRD) (ml/min/1,73m ²)	23	15	90	56,78
Očistek kreatinina(ml/s)	23	0,1	2,4	1,28
U-alfa-1-mikroglobulini (g/mol)	22*	0,00	21,50	7,33
U-NAG ($\mu\text{kat/mol}$)	22*	0,86	32,00	9,92
U- Albumini (g/mol)	23	44,35	609,47	189,64
U- IgG(g/mol)	23	1,74	23,85	8,71
dU-Kolagen IV/dU-Kreatinin	23	0,02	3,25	0,49
dU-NGAL/dU-kreatinini	23	0,11	10,13	1,42

Tabela 19 Srednje vrednosti pri nefrotski proteinuriji

	N	Minimum	Maksimum	Mediana
S- Kreatinin($\mu\text{mol/l}$)	18	40	273	102,17
eGF(MDRD) (ml/min/1,73m ²)	18	16	90	68,28
Očistek kreatinina(ml/s)	18	0,3	4,9	2,04
U-alfa-1-mikroglobulini (g/mol)	18	1,92	48,00	19,4944
U-NAG ($\mu\text{kat/mol}$)	18	1,62	65,43	15,8117
U- Albumini (g/mol)	18	221,43	25707,00	1923,3172
U- IgG(g/mol)	18	3,4	68,6	27,137
dU-Kolagen IV/dU-Kreatinin	18	0E-11	2,83	0,60
dU-NGAL/dU-kreatinini	18	0,26	2,54	1,14

Primerjava med srednjimi vrednostmi parametrov blage in zmerne proteinurije (tabela 20).

Tabela 20 Primerjava med blago in zmerno proteinurijo

	U-alfa-1- mikroglobulini (g/mol)	U-NAG ($\mu\text{kat/mol}$)	U- Albumini (g/mol)	U- IgG(g/mol)	dU-Kolagen IV/dU- Kreatinin
Mann-Whitney-U	96,500	146,000	13,000	74,000	118,500
Wilcoxon-W	201,500	399,000	149,000	210,000	254,500
Z	-1,870	-,588	-4,882	-3,141	-1,871
Signifikantnost (dvostranski interval zaupanja)	,061	,557	,000	,002	,061

	S- Kreatinin	eGF(MDRD)	Očistek kreatinina	dU-NGAL/dU- kreatinini
Mann-Whitney-U	149,000	137,500	141,500	147,000
Wilcoxon-W	285,000	413,500	417,500	283,000
Z	-,999	-1,336	-1,215	-1,056
Signifikantnost (dvostranski interval zaupanja)	,318	,182	,224	,291

Statistično značilne razlike se pojavljajo pri IgG in albuminih pri upoštevanju dvostranskega intervala zaupanja. Pri enostranskem intervalu zaupanja pa so statistično pomembne razlike tudi med srednjimi vrednostmi kolagena IV in alfa-1-mikroglobulinov.

Tabela 21 Primerjava med zmerno in nefrotsko proteinurijo

	U-alfa-1- mikroglobulini (g/mol)	U-NAG (μ kat/mol)	U- Albumini (g/mol)	U- IgG(g/mol)	dU-Kolagen IV/dU-Kreatinin
Mann-Whitney-U	86,000	179,000	26,000	71,000	176,500
Wilcoxon-W	339,000	432,000	302,000	347,000	452,500
Z	-3,045	-,517	-4,755	-3,573	-0,801
Signifikantnost (dvostranski interval zaupanja)	0,002	0,605	0,000	0,000	0,423

	S- Kreatinin	oGF(MDRD)	Očistek kreatinina	dU-NGAL/dU- kreatinini
Mann-Whitney-U	137,000	138,500	131,000	164,500
Wilcoxon-W	308,000	414,500	407,000	440,500
Z	-1,839	-1,813	-1,999	-1,117
Signifikantnost (dvostranski interval zaupanja)	0,066	0,070	0,046	0,264

Tabela 21 prikazuje primerjavo srednjih vrednosti parametrov med zmerno in nefrotsko proteinurijo. Statistično pomembne razlike so med srednjimi vrednostmi IgG, albumini, alfa-1-mikroglobulini ter očistkom kreatinina in oGF. S-kreatinin in oGf imata statistično pomembne razlike med srednjimi vrednostmi le ob upoštevanju enostranskega intervala zaupanja.

Tabela 22 Primerjava med blago in nefrotsko proteinurijo

	U-alfa-1- mikroglobulini (g/mol)	U-NAG (μ kat/mol)	U- Albumini (g/mol)	U- IgG(g/mol)	dU-Kolagen IV/dU- Kreatinin
Mann-Whitney-U	42,000	134,000	,000	15,000	90,500
Wilcoxon-W	147,000	305,000	136,000	151,000	226,500
Z	-3,197	-,036	-4,968	-4,451	-1,846
Signifikantnost (dvostranski interval zaupanja)	,001	,971	,000	,000	,065

	S- Kreatinin	oGF(MDRD)	Očistek kreatinina	dU-NGAL/dU- kreatinini
Mann-Whitney-U	127,000	136,500	111,500	75,000
Wilcoxon-W	298,000	272,500	247,500	211,000
Z	-,587	-,271	-1,123	-2,381
Signifikantnost (dvostranski interval zaupanj)	,557	,787	,261	,017

Tabela 22 prikazuje primerjavo srednje vrednosti parametrov med blago in nefrotsko proteinurijo. Obstaja statistično pomembna razlika med srednjimi vrednostmi NGALa pri blagem in nefrotskem obolenju. Prav tako bi bila pomembna razlika pri srednjih vrednostih kolagena IV, če bi uporabili enostranski interval zaupanja. Razlike obstajajo tudi pri vrednostih IgG, albuminov, alfa-1-mikroglobulinov pri dvostranskem intervalu zaupanja.

5 Razprava

Incidenca akutnega in kroničnega ledvičnega obolenja dosega epidemične razsežnosti. V Evropi se je v preteklem desetletju podvojila letna incidenca končne stopnje ledvične odpovedi in obsega približno 135 novih bolnikov na milijon prebivalcev (34). Kronična ledvična bolezen je postala velik zdravstveni problem zaradi naraščajoče incidence, prevalence, umrljivosti in visokih stroškov zdravljenja (6). Z izboljšanjem detekcije in hitrimi intervencijami lahko pomembno izboljšamo prognozo ledvičnega obolenja in preprečimo nadaljnji razvoj bolezni. Zaradi pomanjkljivih kliničnih znakov in simptomov je pogosto ne prepoznajo in ustrezno zdravijo. Zaradi teh vzrokov se je povečala potreba po odkritju novih ledvičnih markerjev, saj tradicionalni, kot je na primer zmanjšana glomerulna filtracija in proteinurija ne zadostujejo več in ne zmorejo popolnoma razložiti in napovedati razvoja ledvične bolezni (32).

Z raziskavo smo želeli ugotoviti, ali je mogoče izboljšati detekcijo ledvične bolezni in stopnjo ledvične okvare s pomočjo izločanja NGAL v seč kot markerja toksične tubulne okvare ter kolagena IV v seču kot nadomestnega markerja fibroze. Prav tako nas je zanimalo kakšna je povezava med izločanjem NGAL in kolagena IV v seču s celokupno proteinurijo ter med posameznimi vrstami protenurije (glomerulno in tubulno).

Različne študije so v preteklih letih poudarile pomembno vlogo, ki jo imajo ledvični tubuli pri razvoju progresivne akutne in kronične ledvične bolezni. NGAL se je izkazal kot dober biomarker pri napovedi prehoda akutnega v kronično obolenje ledvic, saj se pri raznih bolezenskih stanjih iz poškodovanih tubulnih celic takoj po poškodbi povečano izloča v kri in urin, še preden se poviša koncentracija S- kreatinina v serumu (31). Glede na rezultate naše raziskave lahko sklepamo, da NGAL kaže trend poviševanja tudi pri slabšanju KLB ter pri poslabšanju proteinurije.

Za razliko od KLB stopnje 1 je za KLB stopnje 2 in več značilna zmanjšana hitrosti glomerulne filtracije pod $90 \text{ ml/min/1,73 m}^2$, zato smo želeli ugotoviti, ali lahko že na osnovi izločanja NGAL in kolagena IV v seču sklepamo, kako dobro pri bolnikih s proteinurijo delujejo ledvice. Merili smo izločanje NGAL in kolagena IV v seču pri 58 pacientih, ki so imeli vsi razen enega diagnosticirano proteinurijo.

Razdelili smo jih na dve skupini: skupino z normalnim očistkom kreatinina nad $90 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ in skupino z očistkom kreatinina pod $90 \text{ ml/min/1,73 m}^2$. Ugotovili smo, da so vrednosti NGAL v seču v skupini z zmanjšanim očistkom statistično pomembno večje kot pri tistih z normalnim očistkom kreatinina ($p=0,033$, enostranski interval zaupanja), ni pa bilo statistično pomembnih razlik pri izločanju kolagena IV (tabela 7). Skupina z zmanjšanim očistkom kreatinina je imela tudi statistično povečano izločanje alfa-1-mikroglobulina, prav tako pa je bilo statistično povečano izločanje IgG v seču (tabela 7).

Pri nadaljnji analizi smo naše bolnike razdelili v štiri različne skupine glede na stopnjo KLB. Ugotovili smo, da se z napredovanjem KLB pri bolnikih s proteinurijo najprej značilno poveča izločanje alfa-1-mikroglobulina v seču, čemer sledi povečano izločanje NGAL in kolagena IV, nato pa še IgG v seču (tabele 12-16). Iz tega lahko sklepamo, da so vodeči vzrok za napredovanje KLB tubulointersticijske spremembe, ki privedejo do sekundarne glomerulne okvare in še pospešijo tubulointersticijsko fibrozo. Znano je, da obsežnost tubulointersticijske fibroze boljše korelira z ledvičnim delovanjem kot obsežnost glomeruloskleroze, zato je nastanek tubulointersticijskih sprememb zelo pomemben za napredujočo ledvično bolezen (5). To potrjuje tudi statistično značilna neposredna povezanost med izločanjem kolagena IV z izločanjem alfa-1-mikroglobulina, NGAL in IgG v seču s statistično značilno slabšim ledvičnim delovanjem (tabele 12-16). Povečano izločanje kolagena IV in NGAL je značilno za obdobje od KLB stopnje 4 - 5 dalje, kar pomeni, da označuje kronične in napredovale poškodbe ledvičnega parenhima.

Vrednost NGAL v seču je korelirala s koncentracijo S-kreatinina, z oGF po MDRD enačbi in z očistkom kreatinina pa je imela inverzno koleracijo (tabela 3 in 4). Iz teh rezultatov sklepamo, da je izločanje NGAL v seču neposredno povezano z okvaro ledvičnega parenhima. Do istih spoznanj sta prisla tudi Mori in Nakao, ki porast izločanja NGAL pojasnjujeta z gozd - ogenj teorijo (ang. forest fire theory), ki pravi, da je izločanje NGAL pri KLB posledica stalne produkcije iz vnetih, vendar vitalnih tubulov. Povišanje koncentracije S-kreatinina in znižanje GF pa pripisujejo napreduvalni okvari funkcionalnih celic in nefronov (31).

V naši raziskavi je bilo povečano izločanje NGAL v seču statistično pomembno povezano tudi z izločanjem kolagena IV v seču, ki pa je odraz trajnejše okvare tubulov in njihove fibroze. To posredno kaže na pravilnost naših domnev, da bi lahko bil NGAL v seču zgodnejši pokazatelj akutne okvare ledvičnih tubulov, ki lahko napreduje v kronično okvaro.

Izločanje kolagena IV v seču je prav tako koreliralo s S-kreatininom (0,301, enostranski interval zaupanja), inverzno koleracijo pa je imelo z oGF po MDRD enačbi in očistkom kreatinina (tabela 3 in 4). Ti rezultati so pričakovani, saj so tudi v raziskavi, ki jo je izvedel Furumatsu s sodelavci ugotovili inverzno korelacijo kolagena IV v seču z oGF (35). V raziskavi, ki jo je izvedel Cohen s sodelavci pa so dobili podobne korelacije kolagena IV v seču s S kreatininom. Vzrok temu so pripisali povečanemu propadanju glomerulnega zunajceličnega matriksa, ki je sestavni del filtracijskega območja glomerula, s tem se zmanjšuje filtracijska sposobnost ledvic, povečano pa se izloča kolagen IV, ki je sestavni del ZM in marker fibroze intersticija (30). Prav tako ne presenečajo povezave kolagena IV z izločanjem alfa-1-mikroglobulina (0,637) in IgG (0,637) (tabela 3 in 4). Povečano izločanje alfa-1-mikroglobulina je znak okvare tubulov, kolagen IV pa kaže na njihovo ireverzibilno okvaro oziroma fibrozo intersticija. Pri večji okvari glomerulne bazalne membrane, ki se poleg albuminurije kaže s povečanim izločanjem IgG, je bistveno večje tudi tveganje za tubulno okvaro in posledično fibrozo intersticija (32). Povezave kolagena IV z markerji tubulne okvare je v svoji raziskavi opazil tudi Furumatsu, ki je zasledil korelacijo z beta-2-mikroglobulini, ki se prav tako uporabljajo za diagnosticiranje okvare tubulov (35). Vendar so manj stabilni kot alfa-1-mikroglobulini. V njihovi študiji so zaznali tudi korelacijo kolagena IV v seču z NAG, ki je hidrolitičen encim in marker poškodovanih ledvičnih tubulov, v naši študiji pa te korelacije nismo zaznali.

V naši raziskavi smo pričakovano potrdili statistično značilno korelacijo med koncentracijo S- kreatinina in oGF po MDRD enačbi (tabela 3 in 4), saj je znano, da se z nižanjem hitrosti glomerule filtracije viša količina S-kreatinina v plazmi. Skladno s klinično prakso se je izkazalo, da je očistek kreatinina boljši pokazatelj ledvičnega delovanja od S-kreatinina in oGF po MDRD enačbi. Pri tem je potrebno poudariti, da za njegovo določanje potrebujemo 24-urni seč, katerega zbiranje pa je težavno in velikokrat nenatančno. Prav tako na vrednost očistka kreatinina vpliva še prehranjevanje (hrana z manjšim vnosom beljakovin zniža vrednosti očistka, hrana bogata z mesom pa jih zviša), mišična masa preiskovanca (ljudje z nižjo mišično maso imajo nižje vrednosti S- kreatinina) ter nekatera zdravila (cefalosporini, fluzitocini)(3). Zato kot presejalne preiskave za ugotovitev KLB raje uporabljajo prilagojene formule, npr MDRD enačbo. Te formule so slaba izbira pri bolnikih s posebnim režimom prehrane (vegeterjanci, dodajanje kreatina v prehrano), bolnikih z nenormalno mišično maso ter starostnikov, saj dajejo nenatančne rezultate(14). Zato se morebitni bolezenski ali nepričakovan izvid oGF po MDRD enačbi nato preveri z določanjem očistka kreatinina.

Proteinurija je tradicionalno uveljavljen marker za odkritje ledvične bolezni in predstavlja pomemben dejavnik tveganja za napredovanje tako diabetične kot nediabetične ledvične bolezni. V raziskavi, kjer so proučevali bolnike z zmanjšano GFR ter primerjali tiste s proteinurijo nad 1g dnevno in pod 1g dnevno, so ugotovili, da imajo bolniki s proteinurijo nad 1g dnevno bistveno slabše izide, saj končna ledvična odpoved nastane prej, smrtnost zaradi srčno-žilnih zapletov pa je večja (36). Vrednosti proteinurije so neodvisne od hitrosti glomerulne filtracije, so pa dober pokazatelj tveganja za napredovanje ledvične bolezni.

V naši raziskavi vrednosti oDP niso kolerirale z nobenim od standardnih parametrov za oceno glomerulne filtracije ledvične okvare (S-kreatinin, oGF, očistek kreatinina), prav tako pa tudi ne z NGALom in kolagenom IV (tabela 3 in 4), kar potrjuje spoznanja v raziskavah o NGALu in kolagenu IV drugih avtorjev (31,30). Hitrost glomerulne filtracije je namreč v zgodnjih fazah ledvične bolezni lahko normalna, kljub bolezenskim spremembam ledvičnega tkiva, zato so zgolj vrednosti koncentracije S-kreatinina, ocena GF in očistek kreatinina slabi napovedniki razvoja ledvične bolezni.

Pri nekaterih bolnikih s sladkorno boleznijo se kljub spremembam na glomerulih in zmanjšani glomerulni filtraciji ne pojavi bolezenska albuminurija ali proteinurija, čeprav so že prisotne histološke spremembe. Ugotovili so, da so pri teh bolnikih glomerulne spremembe in spremembe v strukturi bazalne membrane povezane s povečanim izločanjem kolagena IV v seču(30). Zato smo želeli preveriti morebitne povezave med izločanjem kolagena IV in NGAL pri bolnikih z različnimi stopnjami proteinurije.

Prišli smo do spoznanja, da so vrednosti NGAL v seču pri skupini bolnikov z nefrotsko proteinurijo v primerjavi s skupino z blago proteinurijo značilno višje ($p=0,017$), enako pa velja tudi za kolagen IV v seču ($p=0,0325$, pri upoštevanju enostranskega intervala zaupanja)(tabela 22). Podobno povezavo med NGAL in nefrotsko proteinurijo so opazili tudi drugi avtorji: » Ugotovljeno je bilo, da lahko imajo pacienti s stalno (nefrotsko) proteinurijo do 500 krat višje izločanje NGALa v seč v primerjavi z zdravimi kontrolami ne glede na preostalo ledvično funkcijo » in kot možen vzrok za to navedli večjo glomerulno okvaro s posledično reabsorpcijsko okvaro tubulov, ki ji sledi povečanje izločanja NGAL (31). Podobno smo ugotovili v naši raziskavi tudi mi, saj je pri bolnikih z nefrotsko proteinurijo statistično pomembno večje izločanje albuminov, in IgG v seču kot označevalcev glomerulne okvare in alfa-1-mikroglobulina kot označevalca tubulne okvare. Prav tako smo ugotovili, da se pri naraščanju proteinurije od blage do zmerne v seču statistično povečuje tako izločanje albuminov in IgG, kot tudi alfa-1-mikroglobulina. Opazen je tudi trend večjega izločanja NAG, značilno se poveča tudi izločanje kolagena IV ($p= 0,0305$, enostranski interval zaupanja, tabela 20). Pri nefrotski proteinuriji se v primerjavi z blago proteinurijo značilno poveča izločanje NGALa, kar je pričakovano, saj velika proteinurija povzroča okvaro proksimalnih tubulov. Pri tem je bil očistek kreatinina pri bolnikih z nefrotsko proteinurijo v primerjavi s tistimi z zmerno proteinurijo značilno višji na račun hiperfiltracije, kar je že poznano dejstvo.

Ugotovili smo, da se z večanjem okvare glomerulov, katere kazalec je večja albuminurija in izločanje IgG v seču, veča tudi izločanje kolagena IV v seču, ob večanju okvare tubulov pa se povečuje izločanje alfa-1-mikroglobulina v seču. Izločanje kolagena IV kaže signifikantne razlike že pri primerjavi blage in zmerne proteinurije ($p=0,030$, pri upoštevanju enostranskega intervala zaupanja, tabela 20), kar kaže na to, da je dokaj občutljiv kazalec toksičnosti proteinurije, med tem, ko NGAL tega trenda ne kaže. Kolagen IV se pospešeno sprošča ob okvari tubulov, kar posledično pospeši tudi okvaro glomerulne bazalne membrane in ponovno poveča tveganje za tubulno okvaro, posledica pa je nastanek skleroze glomerulov in fibroze intersticija. Zanimivo je, da pri primerjavi bolnikov z zmerno in nefrotsko proteinurjo ni statistično pomembnih razlik v izločanju NGAL in kolagena IV, kar kaže na to, da se zgodi največja razlika v izločanju kolagena IV v urin v obdobju prehoda iz blage v zmerno proteinurijo in ne kasneje. S tem bi lahko potrdili, da se lahko kolagen IV uporablja kot zgodnji marker pomembne ledvične okvare že v času, ko je ledvična funkcija še ohranjena in KLB s kazalci za oceno glomerulne filtracije še ne moremo odkriti. Podobno so ugotovili tudi raziskovalci v raziskavi, kjer pravijo, da bi lahko bil kolagen IV uporaben marker ledvičnega obolenja za identifikacijo pri pacientih s sladkorno boleznijo, ki nimajo diagnosticirane proteinurije, pri katerih bi se lahko ledvična bolezen drastično poslabšala (37). Tudi korelacije med kolagenom IV z NGAL in alfa-1-mikroglobulini kažejo na to, da je kolagen IV pomemben marker okvare ledvičnega tkiva.

Veliko oviro pri interpretaciji izmerjenih vrednosti kolagena IV v seču predstavlja dejstvo, da za njegovo določitev ne obstajajo standardno priporočene metode, ki bi bile priporočljive za laboratorijsko uporabo. Zaradi tega prihaja do različnih rezultatov pri študijah, ki niso vedno primerljivi med seboj. V naši študiji smo uporabili ELISA tehniko, ki je sicer zanesljiva in občutljiva metoda, vendar ni standardizirana. Tudi pri določevanju vrednosti NGALa v seču smo uporabili ELISA tehniko, se pa NGAL pričinja aplicirati na biokemične analizatorje, tako da se bo lahko določeval z elektroluminiscenco in turbidimetrijo. Ti dve metodi imata boljšo ponovljivost in pa standard, s katerim lahko metodi umerimo, kar daje bolj točne in natančne rezultate, ki jih lahko med seboj primerjamo.

Rezultati kažejo, da je možno z merjenjem kolagena IV in NGAL v seču pridobiti dodatne informacije o stopnji ledvične okvare. Kadar je prisotna proteinurija in je izločanje kolagena IV ali NGAL majhno, je verjetno regeneracijski potencial ledvičnega tkiva večji, kot pa če je izločanje obeh, kolagena IV in NGAL veliko. Z večjo stopnjo KLB je reverzibilnost morebitne ledvične okvare ob večjem izločanju kolagena IV in NGAL najbrž manjša. Naše izsledke bi bilo potrebno vrednotiti še z izsledki ledvične biopsije. Na ta način bi lahko v prihodnje pridobili pomembne podatke, na osnovi katerih bi se lažje odločili o nadaljnji diagnostiki ledvične bolezni, smiselnosti ledvične biopsije ali pa za uvedbo ustreznega imunološkega ali neimunološkega zdravljenja.

6Sklep

Tradicionalno uveljavljeni ledvični markerji, kot je oGF in proteinurija ne morejo popolnoma razložiti in napovedati razvoja ledvične bolezni. Hitrost GF je namreč v zgodnjih fazah ledvičnega delovanja lahko normalna, kljub bolezenskim spremembam ledvičnega tkiva, zato bi bilo smiselno uvesti nove ledvične markerje, ki bi olajšali diagnostiko ledvične bolezni.

V okviru diplomske naloge smo prišli do sledečih spoznanj:

- S pomočjo NGALa in kolagena IV lahko pridobimo dodatne informacije o stopnji ledvične okvare, saj je povečano izločanje NGALa in kolagena IV v seč značilno za obdobje kronične ledvične stopnje 4. in 5., kar pomeni, da označujeta kronične in napredovale poškodbe parenhima.
- Vodilni vzrok za napredovanje KLB so tubulointersticijske spremembe, ki privedejo do sekundarne glomerulne okvare in še pospešijo tubulointersticijsko fibrozo, saj se z napredovanjem KLB pri bolnikih s proteinurijo najprej značilno poveča izločanje alfa-1-mikroglobulinov v seču kot markerjev tubulne okvare, nato pa se prično izločati IgG v seču kot markerji okvare glomerulov
- Vrednosti Kolagena IV in NGALa seču korelirata med seboj. Prav tako korelirata s tradicionalnimi parametri ledvične funkcije (oGF, S-kreatinin in očistek kreatinina). Kolagen IV kolerira tudi s alfa-1-mikroglobulini in IgG, iz česar lahko na podlagi literaturnih navedb sklepamo, da kolagen IV kaže na ireverzibilno okvaro tubulov, oziroma fibrozo intersticija
- Vrednosti NGALa in kolagena IV v so pri bolnikih z nefrotsko proteinurijo v primerjavi z bolniki z blago značilno višje. Kolagen IV se prične povečano izločati v seč že v času zmerne proteinurije. Zato je kolagen IV dokaj občutljiv kazalec toksičnosti proteinurije. Lahko bi ga uporabljali kot zgodnji marker pomembne ledvične okvare že v času, ko je ledvična funkcija še ohranjena in kronične ledvične bolezni s standardnimi kazalci še ne moremo odkriti.

7 Literatura

1. Kordaš M, Ribarič S: Kronična ledvična bolezen. In Ribarič S. eds: Temelji patološke fiziologije, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana 2009: 193-208
2. Berne MR, Levy MN: Principles of physiology, 3rded., Mosby, St. Lois 2000: 506-508
3. Karas Kuželički N, Ostanek B.: Vaje iz klinične kemije II, Merjenje koncentracije kreatinina v serumu pri oceni ledvične funkcije, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo, Ljubljana 2011:5-13
4. Ponikvar R. Akutna okvara ledvic. In:Kovač D, Lindič J, Malovrh M, Pavlovčič Kaplan S, eds: Bolezni ledvic. Univerzitetni klinični center, Klinični oddelek za nefrologijo, Ljubljana, 2008 : 157-171
5. Lindič J. Kveder R. Bolezni ledvic. In: Kocjančič A, Mrevlje F, Štajer D. eds, Interna medicina, 3. izdaja, Littera picta , Ljubljana, 2005:936-1109
6. Royal College of Physicians (RCP) and Renal Association: Chronic Kidney Disease in Adults: UK Guidelines for Identification, Management and Referral, 2006
7. Ribarič S: Patološka fiziologija akutnega in kroničnega popuščanja ledvic, Med Razgl 2005; 44: 257-263
8. Mrevlje F. Bolezni presnove. In:Kocjančič A, Mrevlje F. eds, Interna medicina, DZS, Ljubljana, 1993: 521-522
9. Kveder R. Sodobne smernice neimunološkega zdravljenja nediabetične ledvične bolezni. In: Kovač D, Lindič J, Malovrh M, Pavlovčič Kaplan S, eds: Bolezni ledvic. Univerzitetni klinični center, Klinični odelek za nefrologijo, Ljubljana, 2008 :181-196
10. Ferluga D, Vizjak A: Histopatologija in patogeneza glomerulonefritisa, MedRaz 2005, 44(3): 265-290
11. Kveder R. Prepoznavanje in zdravljenje akutnega in kroničnega glomerulonefritisa. In: Kovač D, Lindič J, Malovrh M, Pavlovčič Kaplan S, eds: Bolezni ledvic. Univerzitetni klinični center, Klinični oddelek za nefrologijo, Ljubljana, 2008 : 71-93

12. Lindič J. Pregled seča. In: Kovač D, Lindič J, Malovrh M, Pavlovčič Kaplan S, eds: Bolezni ledvic. Univerzitetni klinični center, Klinični oddelek za nefrologijo, Ljubljana, 2008 : 19- 32
13. Vrhovec L:Pomen serumskega cistatina C za ugotavljanje okvare ledvic med kemoterapijo, Med Razgl 2000; 39: 33-50
14. Lindič J. Preiskave ledvičnega delovanja. In: Kovač D, Lindič J, Malovrh M, Pavlovčič Kaplan S, eds: Bolezni ledvic. Univerzitetni klinični center, Klinični oddelek za nefrologijo, Ljubljana, 2008 : 11-13
15. Berne MR, Levy MN: Principles of physiology, 3rded., Mosby, St. Lois 2000: 506-508
16. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D: A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: A new prediction equation, ANN Intern Med, 1999; 130: 461-470
17. <http://en.wikipedia.org/wiki/Proteinuria>, na dan 2.6.2013
18. <http://www.uptodate.com/contents/protein-in-the-urine-proteinuria-beyond-the-basics>
19. Carroll MF, Temte JL:Proteinuria in Adults: A Diagnostic Approach, Am Fam Physician,2000; 62 (6): 1333-1340
20. http://www.hipertenzija.org/pdf/SAH_2007.pdf na dan 1.6.2013
21. http://www2.kclj.si/kikkb/preiskave/tabele_n/nag.htm na 2.6.2013
22. Trof RJ, Di Maggio F, Leemreis J, Groeneveld J: Biomarkers of acute kidney renal injury and renal failure, SHOCK 2006; 3,245-253
23. Sergeeva T.A., Gorbach L.A. eds: Colorimetric test-systems for creatinine detection based on composite molecularly imprinted polymer membranes;Analytica Chimica Acta 2013 (770): 161-168
24. Kopčavar- Guček N., Petek D.:Kakovostna obravnava bolnika v družinski medicini, Družinska medicina 2009, 7 (2):52
25. Bevc S, Ekart R, Hojs R,: Serumski cistatin C- nov označevalec glomerulne filtracije Med razgledi 2006; 45: 293-299
26. Adiyanti SS, Loho T :Acute Kidney injury (AKI) Biomarker; Acta Medica Indonesiana - The Indonesian Journal of Internal Medicine 2012;44(3): 246-255
27. http://en.wikipedia.org/wiki/Type-IV_collagen na dan 2.6.2013

28. Nonyl PA, Nowak G, Schnellmann RG: Collagen IV promotes repair of renal cell physiological functions after toxicant injury, *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 2001; 281:443-453
29. Zhu D, Kim Y, Steffes MW, Groppoli T, Butkowski RJ, Mauer SM: Glomerular distribution of type IV collagen in diabetes by high resolution quantitative immunochemistry, *Kidney International*; 45: 425—433
30. Cohen MP, Lautenslager GT, Sherman CW: Increased Collagen IV Excretion in Diabetes, *Diabetes Care* 2001; 24(5): 914-918
31. Bolignano D, Lacquaniti A, Coppolino G, Donato V, Campo S, Fazio MR, Nicocia G, Buemi M: Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) and Progression of Chronic Kidney Disease, *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4(2): 337–344
32. Devarajan P, The Use of Targeted Biomarkers for Chronic Kidney Disease, *Adv Chronic Kidney Dis.* 2010; 17(6): 469–479
33. Piskar M: Priporočeni postopek za odvzem venske krvi, Slovensko združenje za klinično kemijo, Ljubljana, 1995
34. Myers GL, Miller WG, Coresh J, Fleming J, Greenberg N, Greene T, Hostetter T, Levey AS, Panteghini M, Welch M, Eckfeldt JH: Recommendations for improving serum creatinine measurement: a report from Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program, *Clin Chem* 2006 Jan (1): 5-18
35. Furumatsu Y, Nagasawa Y, Shoji T, Yamamoto R, Ilo K, Matsui I, ...: Urinary type Collagen IV in nondiabetic kidney disease, *Nephron Clin Pract.* 2011; 117(2): 160-166
36. <http://www.endodiab.si/dotAsset/7232.pdf> na dan 8.8.2013
37. Shin-Ichiaraki MD, Masakazu H, Daisukekoya, Keiji Isshiki, Sshinjikume, Toshiro Sugimoto, Hiromichikawai, ...: Association Between Urinary Type IV Collagen and Deterioration of Renal Function in Type 2 Diabetic Patients Without Overt Proteinuria, *Diabetes Care* 2010; 33(8): 1805-1810

8. Priloga

St.	S- Kr	oGF	Očistek	alfa-1- mikro	NAG	Albumini	IgG	oDP	Kolagen IV	NGAL
1	60	90	2,1	0	5,14	53,03	3	0,979	0,06	0,7391
2	44	90	1,7	0	24,2	73,16	3	0,654	0,0137778	0,9615
3	50	90	2,1	1,31	18,2	15,8	1,11	0,66	0,0542466	0,6591
4	85	90	2,2	0,73	21,4	23,83	4,16	0,349	0,0157143	1,0381
5	55	90	2,5	63	4,63	74,26	4,19	0,776	0,5142857	0,2571
6	66	90	2,3	0	5,93	28,05	0,42	0,374	0,2705882	0,1882
7	78	90	1,6	0		21,25	1,55	0,227	0,4210526	1E-06
8	80	89	2,1	0,84	5,75	118,95	2,51	0,814	0,0396774	0,3871
9	80	72	1,7	0	9,41	40,89	2,4	0,509	0,2019231	0,9615
10	137	37	1	21,46	0,88	74,27	3,4	0,837	0,2131148	1,2459
11	377	14	0,3	19,29	5,18	27,55	9,61	0,732	1,8	1,3273
12	197	37	1	1,65	9,86	10,72	1,62	0,217	0,0256757	0,4493
13	89	55	1,4		12,1	24,76	1,15	0,57	0,0123636	0,3137
14	236	25	0,6		24	30,57	6,69	0,312	0,0228	1,0833
15	126	53	1,2	2,74	16,5	48,47	4,56	0,559	0,0181132	0,3846
16	170	34	0,7	4,55	2,3	58,24	3,65	0,355	0,0135294	0,2333
17	48	90	1,9	1,89	12,8	496,72	20,33	1,113	0,0153333	0,9333
18	72	90	1,7	17,55	17,6	97,04	5,09	1,06	0,5178571	1,3929
19	102	72	1,6	0,7	5	105,42	4,21	1,341	0,0452778	0,5079
20	127	54	1,7	10,85	2,01	116,2	3,14	1,097	0,2439024	0,1098
21	65	88	2,2	2,64	32	142,26	1,74	1,882	0,0452778	0,6563
22	94	54	2,4	6,71	1,18	222,38	1,82	2,106	0,2876712	0,3288
23	56	84	2	2,23	20,5	609,47	7,28	1,504	0,2461538	0,9077
24	104	75	1,9	0	15,6	117,04	4,48	1,402	0,4	0,5333
25	295	15	0,2	21,5	18,3	252,5	23,85	2,289	2,7142857	3,5238
26	125	50	1,3	15,42	4,88	177,97	16,95	2,104	0,8529412	0,6029
27	142	43	0,6	10	2,57	259,7	16,12	2,798	0,5454545	0,2424
28	104	65	1,4	11,07	2,62	137,19	10,99	1,571	0,34375	0,75
29	134	49	0,9	16,54	5,1	240,94	14,49	2,786	0,6724138	0,5
30	185	33	0,8	9,43	0,86	142,62	12,13	1,422	0,3	0,8833
31	123	42	1,1	2,56	11,5	164,96	14,02	1,667	0,06	1
32	202	31	0,5	5,04	7,07	44,35	1,83	1,104	0,0396774	1,1282
33	52	90	2,6	1,92	11,8	383,65	4,28	4,191	0,0061111	1,4595
34	57	90	3,6	23,9	6,28	1103,9	31,1	13,26	0,7731092	0,3109
35	95	60	1,7	5,16	26	404,67	12,62	4,295	0,1155	0,8734
36	84	87	1,7	24,12	4,76	691,76	40,71	6,556	0,0408163	0,5918
37	66	83	3,5	21,32	1,62	25707	10,82	3,614	0,143617	0,3138
38	148	43	0,8	36,4	11,2	624	68,6	14,17	0	1,9216
39	113	44	1	48	5,67	426,23	34,43	5,44	1,225	0,75
40	215	20	0,4	30,91	5,68	498,48	28,18	5,895	1,6530612	1,3469
41	90	55	0,8	23,91	3,48	420,87	40,91	4,439	0,6956522	1,4348
42	201	28	1,4	8,48	3,8	278,26	37,61	3,177	1,1142857	1,1
43	95	70	0,8	73,55	12,8	797,37	88,82		9,625	3,2083
44	133	51	1,5	2,95	2,95	122,4	5,81	1,261	0,4155844	0,1753
45	169	27	0,5	2,71	10,4	81,37	4,02	1,617	0,0503704	3,1892
46	82	70	1,4		17,6	132,7	2,89	1,703	0,0254286	0,619

47	52	90	2,4	2,51	64,3	221,43	3,7	4,244	0,0503704	1,1429
48	76	90	2,2	10,04	65,4	807,17	30,13	11,38	0,0605556	0,6104
49	47	90	4,9	17,67	2,63	329,33	34	3,521	0,7959184	1,2041
50	76	90	1,8	32,55	5,31	878,43	23,73	8,199	0,2391304	0,2609
51	40	90	3,7	3,48	29,8	753,97	27,3	7,01	0,1301111	1,5781
52	273	16	0,3	27,16	15	495,74	45,46	6,83	2,8333333	2,0714
53	104	73	1,5	2,68	19,7	260,68	11,54	3,96	0,0542466	0,913
54	298	17	0,1	15,13	5,59	219,74	10,12	2,166	3,25	10,125
55	61	84	1,2	2,59	11,4	242,25	4,85	1,969	0,0157143	3,1212
56	114	64	1,2	1,58		104,96	10,71	1,246	0,02875	0,7349
57	119	58	1,3	2,14	10,9	131,46	3,34	1,646	0,0496552	0,6269
58	50	90	2,4	30,69	2,31	334,14	3,35	3,339	0,7916667	2,5417