

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

GORANA BONIFAČIĆ

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

GORANA BONIFAČIĆ

**KLINIČNI POMEN DOLOČANJA SIMETRIČNEGA IN
ASIMETRIČNEGA DIMETILARGININA PRI BOLNIKI S
KRONIČNO LEDVIČNO BOLEZNIJO**

**CLINICAL SIGNIFICANCE OF SYMMETRIC AND ASYMMETRIC
DIMETHYLARGININE IDENTIFICATION ON PATIENTS WITH
CHRONIC KIDNEY DISEASE**

MASTER'S DEGREE IN LABORATORY BIOMEDICINE

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala v laboratoriju na Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo, Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.

Zahvala

Zahvaljujem se vsem, ki so mi pomagali in me spodbujali pri pisanju magistrske naloge.

Posebno se zahvaljujem mentorju, prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., spec. med. biokem. za strokovno svetovanje, potrpežljivost in spodbudo pri nastajanju magistrske naloge.

Izjava

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

Gorana Bonifačić

Ljubljana, december 2014

Predsednik komisije : izr. prof. dr. Iztok Grabnar

Član komisije : doc. dr. Bojan Doljak

K A Z A L O

KAZALO.....	I-II
KLJUČNE BESEDE	III
SEZNAM OKRAJŠAV.....	IV-V
SEZNAM PREGLEDNIC	VI
SEZNAM SLIK	VII
SEZNAM GRAFOV	VII
POVZETEK.....	VIII-IX
ABSTRACT	X-XI

KAZALO

1. UVOD.....	1
1.1. ANATOMIJA IN FIZIOLOGIJA SEČIL	2
1.1.1. LEDVIČNA OKVARA	3
1.2. DIAGNOZA BOLEZNI.....	7
1.3. BIOLOGIJA IN FUNKCIJA SDMA IN ADMA.....	7
1.3.1. BIOLOGIJA IN FUNKCIJA SDMA.....	7
1.3.2. BIOLOGIJA IN FIZIOLOGIJA ADMA	8
2. NAMEN.....	13
3. MATERIALI IN METODE.....	14
3.1. OPIS IZBORA TESTIRANCEV	14
3.2. OPIS PRIDOBIVANJA VZORCEV	14
3.3. OPIS ADMA-ELISA IMUNOLOŠKE METODE	14
3.3.1. PRINCIP METODE.....	14
3.3.2. OPREMA IN REAGENTI.....	16
3.3.3. VSEBINA KOMPLETA.....	16
3.3.4. PRIPRAVA VZORCEV IN REAGENTOV.....	17
3.3.5. POSTOPEK ADMA-ELISA.....	18
3.3.6. POSEBNE LASTNOSTI ADMA-ELISA.....	19
3.4. OPIS SDMA-ELISA IMUNOLOŠKE METODE.....	20
3.4.1. PRINCIP METODE.....	20
3.4.2. OPREMA IN REAGENTI	21
3.4.3. VSEBINA KOMPLETA.....	21
3.4.4. PRIPRAVA VZORCEV IN REAGENTOV.....	22
3.4.5. POSTOPEK SDMA ELISA	23
3.4.6. POSEBNE LASNOSTI SDMA-ELISA.....	24
3.5. MERJENJE KONCENTRACIJE KREATININA	25
3.5.1. NAČELO JAFFEJEVE KINETIČNE METODE	25

3.5.2. REAGENTI ZA JAFFEJEVO KINETIČNO METODO.....	26
3.5.3. POSTOPEK JAFFEJEVE KINETIČNE METODE	27
3.6. DOLOČITEV GLOMERULNE FILTRACIJE.....	28
3.7. STATISTIČNE METODE.....	29
4. REZULTATI.....	30
4.1. SKUPNI REZULTATI ZA SDMA, ADMA, KREATININ IN OGF NA 37 PACIJENTIH.....	30
4.2. ODVISNOST ADMA OD IZRAČUNA OGF	32
4.3. ODVISNOST SDMA OD IZRAČUNA OGF	35
4.4. REZULTATI VSEH PARAMETROV, RAZVRŠČENI V POSAMEZNE SKUPINE GLEDE NA STOPNJO OKVARE	38
4.5. KRIVULJA ROC ZA ADMA,SDMA IN KREATININ	41
5. RAZPRAVA.....	43
6. SKLEP	46
7. REFERENCE.....	47

Ključne besede

Glomerulna filtracija, kreatinin, ADMA, SDMA, ELISA, MDRD

Seznam okrajšav

ACE – angiotenzin konvertirajoči encim

ADMA – asimetrični dimetil-arginin

CAT – kationski transporter

CKDEPI – empirična formula (angl. Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration)

DDAH – dimetil-arginin – dimetil-amino hidrolaza

EDTA – etilendiamintetraoctena kislina

ELISA – imunski test na trdnem nosilcu

GFR – hitrost glomerulne filtracije

HRP – anti – kunčja - peroksidaza

LDL – lipoprotein nizke gostote

MDRD – empirična formula (ang. Modification of Diet in Renal Disease)

NOS – reaktivna dušikova spojina

NMMA – monometilarginin

oDP – ocena dnevne proteinurije

oGF – ocena glomerulne filtracije

PRMT – protein-arginin metil transferaza

ROC – vrsta krivulje (angl. receiver operating characteristic)

SAH – S – adenzil - homocistein

SAM – S – adenzil – metionin

SDMA – simetrični dimetilarginin

TMB – tetrametilbenzidin

Seznam preglednic

Preglednica I. Stopnje kronične ledvične okvare, njihova opredelitev in potrebne preiskave

Preglednica II. Strukturne komponente pri ADMA-ELISA testu

Preglednica III. Rezultati meritev vzorcev z različnimi koncentracijami ADMA za določitev ponovljivosti

Preglednica IV. Strukturne komponente pri SDMA-ELISA testu

Preglednica V. Rezultati meritev vzorcev z različnimi koncentracijami SDMA za določitev ponovljivosti

Preglednica VI. Postopek Jaffejeve kinetične metode

Preglednica VII. Skupni rezultati meritev za ADMA, SDMA, kreatinin in OGF

Preglednica VIII. Koncentracije ADMA glede na OGF

Preglednica IX. Koncentracije SDMA glede na OGF

Preglednica X. Povprečne vrednosti parametrov pri okvari 5. stopnje

Preglednica XI. Povprečne vrednosti parametrov pri okvari 4. stopnje

Preglednica XII. Povprečne vrednosti parametrov pri okvari 3. stopnje

Preglednica XIII. Povprečne vrednosti parametrov pri okvari 2. stopnje

Preglednica XIV. Povprečne vrednosti parametrov pri okvari 1. stopnje

Seznam slik

Slika 1. Biokemična struktura: arginina, L-NMA, ADMA, SDMA

Slika 2. Metabolizem ADMA in L-NMA

Slika 3. Princip ELISA metode

Slika 4. Postopek ELISA metode

Seznam grafov

Graf 1. Histogram in kvantilni diagram za ADMA

Graf 2. Histogram in kvantilni diagram za SDMA

Graf 3. Linijski diagram za ADMA, SDMA in kreatinin

Graf 4. Krivulja ROC za ADMA, SDMA in kreatinin za 3. stopnjo ledvične okvare

Graf 5. Korelacijski diagram za prikaz odnosa ADMA in GFR / SDMA in GFR

Povzetek

V Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana je bila izvedena raziskava določenih ledvičnih prognostičnih parametrov simetričnega dimetil arginina (SDMA), asimetričnega dimetil arginina (ADMA), kreatinina in hitrosti glomerulne filtracije (GFR) pri dializnih bolnikih. Cilj raziskave je bil ugotoviti ali se koncentracija zgoraj omenjenih parametrov spreminja v odvisnosti od stopnje ledvične bolezni in kakšna je napovedna vrednost za spremljanje poteka bolezni in prognozo. Podatki so povzeti iz baze podatkov bolnikov v Kliničnem centru Ljubljana za obdobje pet mesecev.

Koncentracijo endogenega asimetričnega dimetil arginina in simetričnega dimetil arginina smo v periferni krvi izmerili s pomočjo encimsko imunskega testa (ELISA). Serumski kreatinin uporabljamo najpogosteje kot merilo glomerulne filtracije. Metoda ki smo uporabljali, je Jaffe kinetična metoda. Hitrost glomerulne filtracije je najbolj občutljivejši in najbolj specifični znak sprememb skupne ledvične funkcije, vrednosti so pridobljene z razliko od ostalih metod na podlagi matematičnega izračuna. Zaradi širokega referenčnega intervala in nelinearnega razmerja med GFR in koncentracijo kreatinina v serumu, je namreč veliko zmanjšanje glomerulne filtracije izraženo s samo majhnim absolutnim povečanjem koncentracije kreatinina v serumu in zato pri osebah z majhno mišično maso serumski kreatinin ostane znotraj mej referenčnega intervala, kljub znatni ledvični odpovedi.

V skupini naših bolnikov smo določili povprečno koncentracijo ADMA 0,644 $\mu\text{mol/l}$, kar je znotraj referenčnega intervala (referenčna vrednost: 0,4–0,75 $\mu\text{mol/l}$), medtem ko je bila povprečna koncentracija SDMA 0,929 $\mu\text{mol/l}$ (referenčna vrednost: 0,3–0,7 $\mu\text{mol/l}$), kar kaže na povišano vrednost SDMA v naših meritvah. Povprečna koncentracija kreatinina je bila 173,107 $\mu\text{mol/l}$ (referenčna vrednost ; moški: 79–125, ženske: 63–107 $\mu\text{mol/l}$).

Vrednosti SDMA pri normalni GFR in pri blagi do zmerni ledvični okvari rastejo linearno z zmanjševanjem GFR. Simetrični dimetil arginin je v primerjavi z njegovim strukturnim izomerom asimetričnim dimetil argininom občutljivejši označevalec blagega zmanjšanja vrednosti glomerulne filtracije. Na podlagi statističnih analiz (histogram, kvantilni diagram, Kolmogorov–Smirnov test in ROC krivulje) lahko opazimo diagnostično pomembnost simetričnega dimetil arginina.

V naši nalogi smo želeli preveriti, če sta parametra ADMA in SDMA pomembna pomoč pri diagnostiki stopnje ledvične okvare. Rezultati so pokazali, da bi simetrični dimetil arginin lahko bil dober diagnostični kazalec ledvične okvare. Asimetrični dimetil arginin se v naši raziskavi ni pokazal kot dober diagnostični parameter.

Abstract

At the Ljubljana University Medical centre a survey on dialysis patients was carried out including certain kidney prognosis parameters; symmetric dimethylarginine (SDMA), asymmetric dimethylarginine (ADMA), creatinine and glomerular filtration rate (GFR). The aim of the research was to establish the effect of these parameters on the stage of kidney disease, the course and the prognosis of the illness. The data are extracted from the Ljubljana University Medical centre patient database for the period of five months.

We measured the concentration of endogenous asymmetric dimethylarginine and symmetric dimethylarginine in peripheral blood with immunological method (ELISA). We used the serum level of creatinine as an index of glomerular filtration. In analyzing we used the kinetic Jaffe method. Glomerular filtration rate is the most sensitive and more specific marker of the total kidney function. Glomerular filtration rate levels are in contrast to the other methods estimated with the use of mathematical formula. Namely, due to a wide reference interval and non-linear correlation between the GFR and the creatinine concentration in the serum, the significant reduction of glomerular filtration is reflected only in a small absolute increase in creatinine concentration in the serum. Therefore, the creatinine remains within the limits of the reference interval in persons with low muscle mass despite the occurrence of considerable kidney damage.

In the group of our patients, we have determined the average concentration of ADMA in the amount of 0.644 $\mu\text{mol/l}$, which is within the reference interval (reference interval is 0.4–0.75 $\mu\text{mol/l}$), while the average concentration of SDMA amounted to 0.929 $\mu\text{mol/l}$ (reference interval is 0.3–0.7 $\mu\text{mol/l}$). This indicates the increased value of SDMA in our measurements. The average creatinine concentration was 173.107 $\mu\text{mol/l}$ (reference interval is for; men: 79–125, women: 63–107 $\mu\text{mol/l}$).

With normal GFR and mild to moderate kidney failure, SDMA values increase linearly with the reduction of glomerular filtration rate. Symmetric dimethylarginine is the more sensitive marker of a mild reduction in the value of glomerular filtration than its structural isomer, the asymmetric dimethylarginine. The results obtained from the statistical analysis (histogram, boxplot, Kolmogorov-Smirnov test and ROC curve) demonstrate the diagnostic significance of symmetric dimethylarginine .

In our work, we wanted to check whether the ADMA and SDMA parameters were significant indicators in diagnosing kidney diseases according to degrees. The results showed that symmetric dimethylarginine would be a good diagnostic indicator of kidney diseases. In our research, asymmetric dimethylarginine did not prove to be a good diagnostic parameter.

1. UVOD

Ledvice so najpomembnejši organ za vzdrževanje notranjega okolja in imajo pet glavnih funkcij: izločajo telesu tuje snovi (strupi, zdravila) in druge odpadne snovi, ki nastajajo med presnovo (kreatinin, sečna kislina, fosfati, sečnina, amoniak), shranjujejo za presnovo potrebne snovi, uravnavajo količino elektrolitov (natrij, klor, magnezij, kalij, kalcij) in vode, uravnavajo kislino-bazno ravnovesje krvi (normalni pH med 7,35–7,45; acidoza pri pH < 7,35, alkalozna pri pH > 7,45) ter opravljajo hormonske funkcije – sintetizirajo hormone, kot so eritropoetin, trombopoetin in kalcitriol, hkrati pa na njihovo delovanje vplivajo hormoni, kot so aldosteron, parathormon in antidiuretski hormon (1).

Kronična ledvična bolezen je opredeljena kot funkcijska ali strukturna okvara ledvic z normalno ali zmanjšano hitrost glomerulne filtracije (GFR) $80 \text{ ml/min/1,73m}^2$, ki traja več kot tri mesece (2).

Do nje pride zaradi spremenjene glomerulne filtracije, tubulne resorpcije, tubulne sekrecije in propadanja delujočega ledvičnega tkiva. Omenjena okvara ledvičnega tkiva je nepopravljiva, kronična in trajna (2).

Simetrični dimetil-arginin (SDMA), ki se skoraj ves izloča z urinom, naj bi bil indikator GFR in ga imenujejo »dragi kreatinin«. Ne glede na še nepotrjeno vlogo SDMA pri nastanku ledvične bolezni se zdi, da je SDMA občutljivejši označevalec blagega zmanjšanja vrednosti GFR kot njegov strukturni izomer ADMA (3).

Asimetrični dimetil-arginin (ADMA) je endogeni inhibitor NO sintaze, ki lahko zavira vazodilatacijsko delovanje NO. Je aminokislina, ki se normalno sintetizira v celicah in kroži v plazmi. Je sorazmerno stabilen in lahko prehaja med celicami (preprost vstop in izstop), izloča pa se z urinom. Nahaja se v tkivih in celicah in zavira aktivnost sintaze dušikovega oksida (NOS) (4).

1.1. ANATOMIJA IN FIZIOLOGIJA SEČIL

Ledvici predstavljata glavni del sečil in tvorita urin. Urin odteka po sečnih izvodilih (sečevod sečni mehur, sečnica) na prosto, kjer vstopajo tudi živci, mezgovnice in sečevod (5).

Ledvici (nephros, ren) sta locirani v trebušni votlini pod trebušno prepono, in sicer zadaj ob hrbtenici med 12. prsnim in 13. ledvenim vretencem (5).

Ledvice so temno rjavordeče barve, čvrste konsistence in gladke površine. Ledvica ima fižolasto obliko in je od spredaj sploščena, tako da ločimo sprednjo in zadnjo ploskev ter zgornji in spodnji pol. Na sredini medialnega roba je vdolbina, imenovana ledvična lina (hilus renalis), skozi katero vstopajo žile in živci, izstopa pa sečevod. Iz ledvične line vodijo žile v ledvični sinus (sinus renalis). Ledvico obdaja fibrozna ovojnica (capsula fibrosa), ki se tesno prilega površini ledvic in ob ledvični lini prehaja v vezivo ob žilah. Okoli ovojnice je maščobno tkivo, t.i. maščobna ovojnica (capsula adiposa). Maščobno ovojnico prekriva še vezivo (fascia renalis), kar predstavlja tretjo ledvično ovojnico. Ledvična ali Malpighijevega telesa tvorijo piramide, katerih baza je obrnjena k površini ledvice. V večjo votlino oziroma ledvični meh (pelvis renalis) se stekajo manjše ledvične čašice, ki se med seboj združujejo v večje. Ledvični meh prehaja v sečevod, preko katerega odteka seč v zbiralnik za seč oziroma sečni mehur, ki s krčenjem povzroči odtekanje seča iz telesa skozi sečnico (5).

Približno milijon mikroskopskih enot oziroma nefronov tvori parenhim ledvice, sredico in skorjo. Nefron sestavljajo ledvično telesce (Malpighijevo telesce – corpusculum renis Malpighi) in ledvične cevčice (tubulus renalis). Ledvično telesce tvorijo klobčiči kapilar (glomerulus renis) in dvolistne kapsule, t.i. capsule glomeruli Bowmani. Kri po dovodni arterioli priteka v glomerul (vas afferens) ter se razveja v večje število kapilarnih pentelj, ki se sestavijo nazaj v odvodno arteriolo (vas efferens). Gre za edinstveni primer, kjer v človekovem telesu iz kapilar ene arterije nastane druga arterija. Iz tega razloga žilno mrežo v glomerulu imenujemo tudi »čudežno omrežje« ali »rete mirabile«. Kri se skozi kapilarno steno filtrira v kapsulni prostor in tako nastane primarni seč, t.i. glomerulni filtrat in je sprva enak serumu. Iz primarnega seča se nato v ledvičnih cevčicah snovi ponovno absorbirajo, pride do sekrecije neorganskih ionov in nastanka končnega seča (6).

Zgradba tubulusa je prav zaradi tovrstne zahtevne funkcije zapletena in dolga. Začetni in končni del tubulusa sta zavita, osrednji del tubulusa ima obliko črke U in ga imenujemo Henlejeva pentlja (6).

1.1.1. LEDVIČNA OKVARA

AKUTNA LEDVIČNA OKVARA

Pri akutni okvari ledvic zaradi zmanjšane glomerulne filtracije pride do hitrega upadanja funkcije ledvic (v času od nekaj ur do nekaj tednov). Le-ta se izkazuje s rastočimi serumskimi koncentracijami sečnine in kreatinina. Pred nekaj leti uvedeni pojem „akutna okvara ledvic“, ki je nadomestil starejši izraz „akutna odpoved ledvic“, naj bi zajemal tudi blažje akutne ledvične okvare. V zadnjem času namreč opažamo, da te bolezni lahko napovedujejo slabši izid zdravljenj, četudi pri bolniku ni bilo potrebe po dializi (7).

Ocenjujemo, da se pri 3 do 7 odstotkih hospitaliziranih bolnikih razvije akutna ledvična okvara, pri bolnikih v enotah intenzivne terapije pa v 25 do 30 odstotkih, od tega je 5 do 6 odstotkov bolnikov, ki potrebujejo dializno zdravljenje. Nekateri podatki kažejo, da v intenzivnih enotah kar 2/3 bolnikov z akutno ledvično okvaro potrebuje dializo. Razlogi za to se kažejo v visoki starosti bolnikov, preeksistentni ledvični okvari in komorbidnosti (7).

Zaradi posebnosti v diagnosticiranju in zdravljenju akutne okvare ledvic lahko delimo v 3 skupine:

- akutna okvara ledvic zaradi ledvične hipoperfuzije (funkcijska akutna okvara ledvic, prerenalna azotemija, prerenalna akutna okvara ledvic). Le-ta zajema 55 do 60 odstotkov bolnišničnih akutnih okvar ledvic;
- intrizična akutna okvara ledvic kot posledica poškodbe ledvičnega parenhima (renalna azotemija, parenhimska akutna okvara ledvic). Le-ta zajema 35 do 40 odstotkov bolnišničnih akutnih okvar ledvic. Intrizična akutna okvara ledvic obsega:

- akutno tubulno nekrozo (akutno okvaro ledvic v ožjem smislu, parenhimska akutna okvara ledvic) kot posledico akutne okvare tubulov zaradi ledvične ishemije ali delovanja nefrotoksičnih snovi.

V skupini intrizične akutne okvare ledvic akutna tubulna nekroza v 90 odstotkih zajema:

- bolezni glomerulov (glomerulonefritisi) in/ali malih ledvičnih žil (vaskulitisi),
 - akutne procese v tubulointersticiju,
 - bolezni velikih ledvičnih žil (npr. tromboza ledvične arterije ali vene);
- postrenalna akutna okvara ledvic kot posledica akutne obstrukcije votlega sistema sečil (postrenalna azotemija, obstruktivna akutna okvara ledvic) in zajema manj kot 5 odstotkov akutnih okvar ledvic (7).

KRONIČNA LEDVIČNA OKVARA

Nastane zaradi spremenjene glomerulne filtracije, tubulne resorpcije, tubulne sekrecije in sočasnega zmanjševanja delujočega ledvičnega tkiva. Okvara ledvičnega tkiva je kronična, trajna in nepopravljiva. Njeno pravo incidenco in prevalenco je težko oceniti, saj bolniki s to boleznijo v zgodnjih stopnjah nimajo nobenih težav (7) .

Kazalci kronične ledvične bolezni:

Klinične kategorije kronične ledvične bolezni so definirane po oceni hitrosti glomerulne filtracije ne glede na spol (Preglednica I). Kronično ledvično bolezen glede na GFR delimo na pet stopenj. Kazalci bolezni so: albuminurija ali eritrociturija, perzistentna proteinurija, kazalec ledvične okvare v seču in krvi ter nenormalni sediment seča (7).

Preglednica I : Stopnje kronične ledvične okvare, njihova opredelitev in potrebne preiskave (7)

STOPNJA	oGF (ml/min/1,73m²)	Preiskave (pri stabilni oGF so lahko manj pogoste, pri hitrem slabšanju oGF pa pogostejše od priporočenih)
1	>90* +proteinurija ali albuminurija ali eritrociturija	1 krat letno : -s-kreatinin z oGF, s-K, s-Na, s-Cl,s-glukoza,s-sečnina, krvna slika,SR -osnovne preiskave seča -U-beljakovine/kreatinin in oDP oz. U albumin/kreatinin -UZ sečil - meritve krvnega tlaka
2	60-89 * +proteinurija ali albuminurija ali eritrociturija	1 krat letno : -s-kreatinin z oGF, s-K, s-Na, s-Cl,s-glukoza,s-sečnina, krvna slika,SR -osnovne preiskave seča -U-beljakovine/kreatinin in oDP oz. U-albumin/kreatinin -UZ sečil - meritve krvnega tlaka
3	30-59**	preiskave krvi in seča na 6 mesecev : kot pri stopnji 1 do 2 in po potrebi s-Ca, s- P, s-CO ₂ ali HCO ₃
4	15-29	preiskave krvi in seča na 3 mesece: kot pri stopnji 1 do 3
5	<15	preiskave krvi in seča na 6 tednov : kot pri stopnji 1 do 3

*če so prisotni znaki kronične ledvične bolezni, ponoviti oGF in preiskave seča še 2-krat v treh mesecih od odkritja za oceno napredovanja bolezni

**če je pri prvi določitvi oGF pod 60 ml/min/1,73 m², ponoviti določitev že čez 2 tedna zaradi izključitve akutne ledvične okvare ; pri stabilni vrednosti ponoviti oGF in preiskave seča še 2-krat v treh mesecih od odkritja za oceno napredovanja bolezni

Legenda: s-serumska koncentracija, U-koncentracija v seču, GFR- ocenjena hitrost glomerulne filtracije, UZ-ultrazvočna preiskava.

UREMIJA

Izraz uremija pomeni več kliničnih in laboratorijskih nenormalnosti, ki so lahko posledica zmanjšanega delovanja ledvic in so v celoti za zdaj še nepojasnjena. K uremiji se je v preteklosti uvrščalo tudi arterijsko hipertenzijo, anemijo in krče. Odkar smo pojasnili njihove vzroke, med katere sodijo nezadostna sinteza eritropoetina, retiniranje natrijevega klorida in vode ter hipokalcemija, ne sodijo več med simptome uremičnega sindroma. Uremija lahko nastane kot posledica nezdravljene ali slabo zdravljene akutne in kronične napredujoče ledvične bolezni. Slabše delovanje ledvic povzroči motnje biokemičnih in fizioloških funkcij organskih sistemov, ki se kažejo z različnimi simptomi (7).

KONČNA LEDVIČNA OKVARA

O fazi končne ledvične okvare lahko govorimo takrat, ko je vrednost glomerulne filtracije < 15 ml/min/1,73 m². V končni fazi ledvične okvare je serumski kreatinin višji od 880 μmol/l, prisotni so znaki, ki so značilni za uremijo, kot so utrujenost, apatičnost, glavobol, slabost in bruhanje, hiperrefleksija, zaspanost, krči, motnje zavesti in končno uremična koma; koža postane suha in rumenkasto sive barve, pri perikarditisu in pleuritisu je lahko opaziti drisko (7).

Možni so zapleti. Hiperkaliemija, pri kateri se zviša serumska koncentracija kalija na več kot 8 mmol/liter, je nevaren zaplet in je lahko razlog za akutno okvaro srca. Pri hipervolemiji je v sklopu uremije značilen pojav mokrih pljuč zaradi preobremenitve s tekočino (7).

1.2. DIAGNOZA BOLEZNI

Akutno ledvično okvaro lahko prepoznamo po hitro rastoči vrednosti serumske koncentracije kreatinina. Pri tem se nemalokrat zmanjšuje urna diureza. Pomembno preiskavo predstavlja UZ ledvic in sečnega mehurja. Le-ta lahko izključi sum na kronično ledvično okvaro in pokaže, ali gre v posameznem primeru za zožitev ali zaporo spodnjih sečil (7).

Pri kronični ledvični okvari so levice neravnih kontur, na ultrazvoku je vidno zmanjšanje, parenhim je stanjšán. Pri postrenalni ledvični odpovedi z razširjenim votlim sistemom je treba opraviti retrogradno uretrografijo in cistoskopijo (7) .

Za dokončno diagnozo akutne ledvične okvare je potrebna tudi biopsija ledvic (7).

1.3. BIOLOGIJA IN FUNKCIJA SDMA IN ADMA

Simetrični dimetil-arginin za razliko od asimetričnega dimetil-arginina ni neposredni zaviralec NO sintaze. SDMA nastane kot izomerska oblika ADMA ob hidrolizi proteinov. Zato so dolgo menili, da je SDMA inertna in funkcionalno nedejavna molekula (8).

1.3.1. BIOLOGIJA IN FUNKCIJA SDMA

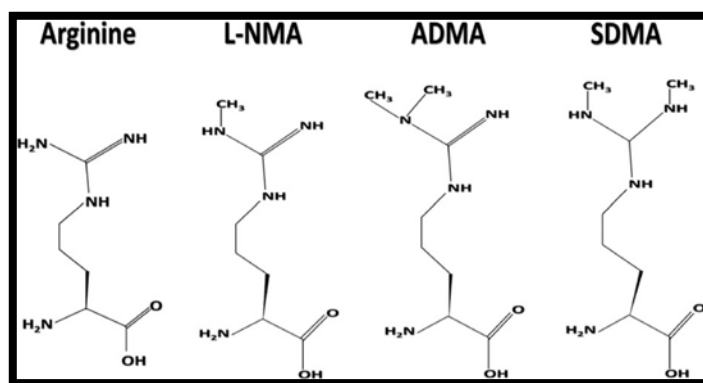
Poskusi na *in vitro* modelih primarnih endotelijskih celic z visoko stopnjo specifičnosti so vseeno pokazali, da SDMA kompetitivno z argininom že v zelo nizkih »fizioloških« koncentracijah glede na velikost odmerka zavira endotelijsko sintazo NO na celičnem prenašalcu in zvišanih znotrajceličnih kisikovih reaktivnih zvrsteh (ROS). Študije vrednosti krožečega SDMA v serumu pri več kohortah bolnikov s srčno-žilnimi in ledvičnimi boleznimi so pokazale povezavo med SDMA in GFR ter stopnjo koronarne bolezni in ateroskleroze (8).

Pri normalni GFR in pri blagi do zmerni ledvični okvari rastejo vrednosti SDMA linearno z zmanjševanjem GFR (3).

1.3.2. BIOLOGIJA IN FIZIOLOGIJA ADMA

ADMA je endogeni inhibitor NO sintaze, ki lahko zavira vazodilatacijsko delovanje NO. Po svoji strukturi je aminokislina (molekulska masa 202 Da), ki nastaja v celicah in kroži v plazmi. Je sorazmerno stabilen in lahko prehaja med celicami (preprost vstop in izstop), izloča pa se z urinom. Nahaja se v tkivih in celicah in zavira aktivnost sintaze dušikovega oksida (NOS) (4).

ADMA se sintetizira ob metilaciji ostankov organskega proteina s katalizo proteinskih arginin metil transferaz (PRMT). S-adenozil metionin (SAM) deluje kot dajalec metilnih skupin s svojim hkratnim preoblikovanjem v S-adenozil homocistein (SAH), ki nato hidrolizira v homocistein. Po razgradnji proteinov, ki vsebujejo metilirani arginin, se v citoplazmi pojavijo prosti L-NMA (Ng monometil-L-arginin), ADMA in SDMA, njihovo strukturo nam prikazuje (Slika1). L-NMA in ADMA sta kompetitivna zaviralca vseh treh izomerov NOS. SDMA nima vloge zaviralca. Potek nastanka ADMA iz prostega arginina še ni pojasnjen.



Slika 1. Biokemična struktura: arginina, L-NMA, ADMA, SDMA (4)

Količina ADMA, ki nastane znotraj celice, je odvisna od metilacije arginina (v glavnem na histonih), od kinetike proteinov in od ravnovesja med znotrajceličnimi in zunajceličnimi proteini (vstopanje arginina v celico s pomočjo prenašalca Y⁺⁻ aminokislin kationov).

Celična sinteza NO je tesno povezana z vstopom zunajceličnega arginina v celico (znotrajcelično združevanje prenašalca Y⁺ in encima endotelijske NO sintaze eNOS). Zunajcelični ADMA je antagonist arginina na ravni transporterja.

V celicah, v vaskularnem endoteliju, je vrednost ADMA desetkrat višja od koncentracije ADMA v plazmi, visoka pa je tudi v ledvicah in vranici. Te znotrajcelične koncentracije ADMA regulirajo aktivnost NOS, ta pa se v posameznih organih pomembno razlikuje (4).

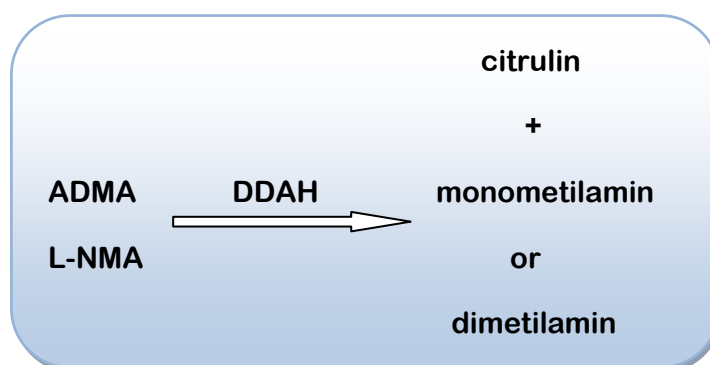
Normalna vloga metilacije arginina še ni pojasnjena, vendar pa obstaja več razlag, npr. da gre za regulacijo sinteze ribonukleinske kisline, regulacijo translacije, obnovo DNK in za medsebojno delovanje proteinov in signalov translacije. PRMT1 (protein-arginin metil transferaza tip 1) je izražen v srcu, celicah gladkih mišic in endotelijskih celicah. Natančen način izražanja PRMT še ni določen, vemo pa, da so izomeri PRMT1 izraženi na žilni steni. Zanimivo je, da pride do zvišanja PRMT1 v endotelijskih celicah kot odgovor na strižne napetosti, kot so žilna perforacija ali porast lipoproteina nizke gostote (LDL). V kulturah človeških endotelijskih celic oksidirani LDL in visoka koncentracija nativnega LDL povročita zvišanje PRMT in celične sinteze ADMA, česar ne moremo preprečiti z antioksidanti. Poznano delovanje ADMA se preusmeri v učinke odvisne oz. neodvisne od NOS (4).

1.3.2.1. Krožeči ADMA

Ni povsem jasno, ali so vrednosti krožečega ADMA biološko aktivne ali le označujejo visoke znotrajcelične koncentracije. Mnogi avtorji menijo, da so normalne vrednosti tako pri zdravih posameznikih (500 nmol/L–1,2 μmol/L pri zdravih 50–75-letnikih v plazmi, določene s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti 0,43–0,56 μmol/L; vrednosti ADMA v serumu so verjetno nekoliko višje) kot tudi pri bolezenskih stanjih (do = 3 μmol/L) prenizke, da bi jih lahko označili kot biološko aktivne. Raziskave se zdaj usmerjajo na korelacijo med vrednostmi ADMA in vrednostmi arginina. Koncentracije arginina v plazmi se gibljejo med 30 in 100 μmol/L, znotrajcelične vrednosti pa med 1 in 2 mmol/L (4).

1.3.2.2. Izločanje ADMA

Metil arginini se izločijo deloma preko ledvic. Medtem ko se SDMA (ki ne zavira NOS) povsem izloči preko ledvic, se ADMA in L-NMA v glavnem izločita s presnovo. (Slika 2) nam prikazuje glavno metabolno pot ki pretvarja ADMA v citrulin in diametilamin ali monometilamin; reakcijo katalizira DDAH (dimetil-arginin-dimetil-aminohidrolaza) (4).



Slika 2. Metabolizem ADMA in L-NMA (4)

1.3.2.3. ADMA PRI BOLEZENSKIH STANJJIH

Vrednosti asimetričnega dimetil-arginina v plazmi so zvišane pri nekaterih obolenjih, kot so arterijska hipertenzija, koronarna bolezen, pljučna hipertenzija, hiperhomocisteinemija, preeklampsija, sladkorna bolezen, periferna vaskularna okluzivna bolezen, kronična ledvična bolezen (od prve do pete stopnje, s proteinurijo ali brez nje) in končna ledvična okvara (stopnja pet) (4).

Več avtorjev je mnenja, da so vrednosti ADMA uporabne kot označevalec:

- a) endotelijske disfunkcije,
- b) povečanega tveganja za obolevnost in smrt zaradi srčno-žilnih bolezni ter
- c) kot prognostični označevalec ledvične okvare.

V več raziskavah so določali vrednosti ADMA z encimskim imunskim testom (ELISA), vendar pa so v zadnjem času potrdili, da so v primerjavi z zlatim standardom, t.j. tekočinsko kromatografijo in tandemsko masno spektrometrijo z elektrorazprševanjem, pri meritvah s testom ELISA vrednosti ADMA pri GFR nad 30 mL/min, precenjene.

Vendar pa je ELISA zelo natančna metoda in z ustrezno kalibracijo lahko vrednosti ADMA korigiramo, kot sledi : $\text{korigirana ADMA} = \text{ADMA}_{\text{ELISA}} \times 0,577 + 0,14$. Druge metode za kvantifikacijo ADMA so tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z uporabo fluorescentnega detektorja, kapilarna elektroforeza in plinska kromatografija z masno spektrometrijo (4).

Asimetrični dimetil-arginin je močan endogeni zaviralec NOS in njegovo kopičenje lahko igra pomembno vlogo pri endotelijski disfunkciji (4).

Do zdaj je veljalo, da je ADMA napovedovalec žilno-srčnih dogodkov, a najnovejše študije so pokazale, da je povezan z arterijsko hipertenzijo ter da povzroča poškodbe glomerulnih kapilar, proteinurijo, intersticijsko in glomerulno fibrozo in oksidativni stres. Vsi ti pa so glavni dejavniki napredovanja okvare delovanja ledvic. Za zdaj še ni povsem jasno, ali je ADMA tudi označevalec napredovanja ledvične bolezni, novi dejavnik tveganja za poslabšanje ledvične bolezni ali oboje. ADMA je lahko vzročni dejavnik za napredovanje bolezni ledvic. Opazovane dokaze za to, da ADMA kakorkoli vpliva na napredovanje kronične ledvične bolezni, je težko razložiti zaradi motenj, ki jih lahko predstavlja prisotnost številnih drugih bolezni (obolenje jeter, žilne bolezni, hipertenzija, starost, dislipidemija, hiperhomocisteinemija itd.), in zaradi možnosti obratne vzročnosti (4).

Po drugi strani pa so nastanek in presnova ADMA s pomočjo DDAH, kot tudi inhibicija dejavnosti NOS s strani ADMA, znotrajcelični procesi. Večina študij poroča o vrednostih ADMA v plazmi zaradi predpostavke, da te vrednosti natančno odražajo znotrajcelične koncentracije ADMA. Privlačna je domneva, da so v določenih (pato) fizioloških stanjih vrednosti znotrajceličnega in krožečega ADMA v obratnem sorazmerju. Do tega lahko pride ob zmanjšani aktivnosti ali izraženosti CAT, s posledično počasnejšim izstopanjem ADMA, kar zviša znotrajcelične in zniža zunajcelične koncentracije ADMA. Nadaljnje zniževanje plazemskih vrednosti ADMA je lahko nov terapevtski cilj pri preprečevanju progresivne ledvične okvare.

V številnih študijah so ugotovili, da vrednosti ADMA v plazmi lahko znižajo zaviralci angiotenzin konvertirajočega encima (ACE) in blokatorji receptorjev angiotenzina. Potrebne so nadaljnje raziskave zdravil z bolj specifičnim vplivom na ADMA (npr. zaviralci PRMT ali induktorji DDAH). Prihodnost imajo tudi nefarmakološki načini zdravljenja, kot je prenos gena DDAH.

Možna je tudi opredelitev genskih polimorfizmov DDAH-1, ki so povezani z zmanjšano transkripcijsko aktivnostjo *in vitro* in z znižanjem vrednosti DDAH-1 m-RNA *in vivo*, s posledičnim porastom koncentracij ADMA. Tako bi lahko prepoznali tiste skupine bolnikov s kronično ledvično boleznijo 1. stopnje, z ali brez arterijske hipertenzije ali sladkorne bolezni, ki imajo večjo možnost, da bo pri njih ledvična okvara še napredovala (4).

2. NAMEN

Uvajanje novih prognostičnih parametrov SDMA in ADMA bi nam, za razliko od že obstoječega nam znanega kreatinina in ocene hitrosti glomerulne filtracije, omogočilo zgodnje diagnosticiranje kroničnih ledvičnih bolezní po stopnjah.

Današnja diagnostika za diagnozo ledvične okvare uporablja kreatinin kot diagnostični parameter, vendar je njegova pomanjkljivost ta, da njegova koncentracija ostane znotraj referenčnega intervala, kljub znatni ledvični okvari. Cilj je v diagnostiko uvesti zgodnejše kazalce za zgodnje odkrivanje ledvične okvare. To možnost nam omogočata še nepotrjena označevalca SDMA in ADMA, ki bi lahko bila dobra pokazatelj ledvične okvare.

Naša prva naloga je merjenje serumske koncentracije SDMA, ADMA s specifično imunološko metodo ELISA, določiti serumsko koncentracijo kreatinina s kinetično modifikacijo Jaffa reakcije in s pomočjo MDRD enačbe oceniti hitrost glomerulne filtracije pri dializnih bolnikih.

V drugem delu spremljamo odvisnost SDMA, ADMA in kreatinina glede na izračun GFR, kakšna je napovedna vrednost za spremljanje poteka bolezní in prognozo.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. OPIS IZBORA TESTIRANCEV

V Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana je bila izvedena raziskava določenih ledvičnih prognostičnih parametrov SDMA, ADMA, kreatinina in GFR pri dializnih bolnikih. Podatki so povzeti iz baze podatkov bolnikov v Kliničnem centru Ljubljana za obdobje pet mesecev.

Raziskava je bila izvedena v skupini 37 udeležencev, od tega je bilo 26 moških in 11 žensk. Starost žensk je bila od 26 do 79 let (52 ± 25) in moških od 20 do 73 let (45 ± 25). Najmlajši udeleženec je bil rojen leta 1992, najstarejši pa leta 1933. Opazili smo, da razen enega udeleženca z odpovedjo 4. stopnje (rojenega leta 1985, moški spol) zaradi odpovedi 5. in 4. stopnje trpijo udeleženci, ki so starejši od 50 let.

Pri vseh udeležencih je bila raziskava opravljena v skladu z etičnimi načeli in kodeksom deontologije.

3.2. OPIS PRIDOBIVANJA VZORCEV

Preiskovancem je bila odvzeta periferna kri sicer v epruveto brez dodanega antikoagulanta. Po centrifugiranju smo pridobili serum, katerega smo takoj odpipetirali od celic in ga shranili do analize na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tako shranjen vzorec je stabilen do 24 mesecev.

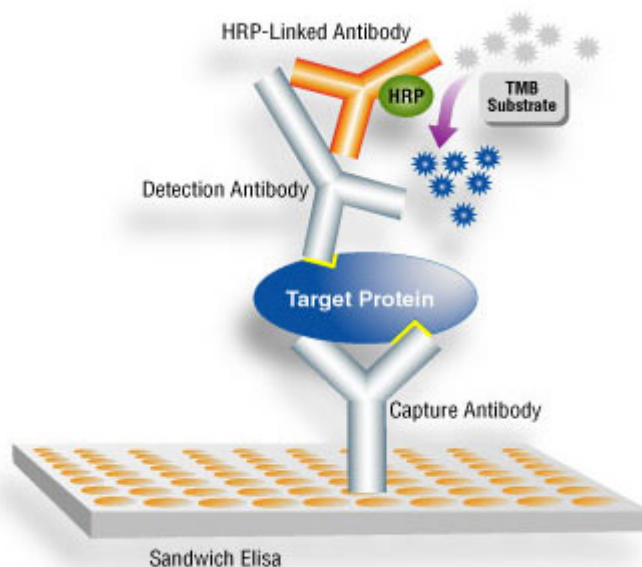
3.3. OPIS ADMA-ELISA IMUNOLOŠKE METODE

3.3.1. PRINCIP METODE

Koncentracijo ADMA–endogenega asimetričnega dimetilarginina smo v periferni krvi izmerili s pomočjo imunološke metode ELISA (9).

3.3.1.1. Princip imunološke metode ELISA

Pri metodi ELISA uporabljamo mikrotitrski format (mikrotitrne ploščice), shematski prikaz (Slika 3). Endogeni asimetrični dimetilarginin je vezan na trdno fazo v mikrotitrski plošči. ADMA, ki se nahaja v plazmi bolnika, acilira in tekmuje v vezanju na ustrezno konstantno število povezanih mest RABBIT-ANTI-ADMA-PROTITELO-VEZANO MESTO. Ko je sistem uravnotežen, se z izpiranjem odstrani višek prostih antigenov in kompleks antigen-antiserum. Vezana protitelesa ADMA (vezana na trdno fazo) se vizualizirajo s pomočjo proti-kunčje peroksidaze (HRP) v reakciji s TMB (tetrametilbenzidin, kromogen). Reakcijo spremljamo pri valovni dolžini 450 nm. Količina vezanih protiteles (ADMA) v trdni fazi je sorazmerna koncentraciji ADMA v vzorcu (9).



Slika 3. Princip ELISA metode (10)

3.3.2. OPREMA IN REAGENTI

Komplet za ELISA hranimo na temperaturi od 2 do 8 °C . Pred uporabo mora biti komplet zaradi ogrevanja reagentov 10 minut na sobni temperaturi (9).

3.3.3. VSEBINA KOMPLETA

Posamezni reagenti v kompletu so pripravljene za uporabo, nekateri pa zahtevajo raztapljanje. Mešanje različnih lotov ni priporočljivo (9).

Vsebina kompleta :

- MT-trakovi (12 trakov z 8 jamicami)
- Standard 1-6
- Kontrola 1 in 2
- Pufer za aciliranje
- Reagent za aciliranje
- Antiserum (rabbit-anti-N-acyl-ADMA)
- Encim konjugat (proti-kunčja-IgG-peroksidaza)
- Pufer za izpiranje
- Substrat (TMB raztopina)
- Stop raztopina (vsebuje 0,3 M žveplove kisline)
- Reakcijska plošča
- Reagent za izenačevanje
- Topilo

3.3.4. PRIPRAVA VZORCEV IN REAGENTOV

a) Priprava reagentov

Pred uporabo morajo biti vsi reagenti na sobni temperaturi. Posamezne reagente že proizvajalci pripravijo za uporabo, nekateri pa zahtevajo raztapljanje, saj so dostavljeni v liofilizirani obliki.

Raztopiti je treba naslednje reagente:

- pufer za raztapljanje - koncentriran, treba ga je razredčiti z destilirano vodo,
- reagent za aciliranje - liofiliziran, treba ga je raztopiti z raztopino, ki jo dostavi proizvajalec,
- reagent za izenačevanje - liofiliziran, treba ga je raztopiti z destilirano vodo.

b) Priprava vzorcev

Za testiranje potrebujemo serum ali plazmo z EDTA. Pri tem ne uporabljamo krvi, ki je hemolitična ali lipemična.

Pred postopkom testa ELISA moramo vzorec (serum/plazmo) acilirati. Z acilacijo se ADMA pretvori v N-acyl-ADMA, ki se uporablja pri ELISI (9).

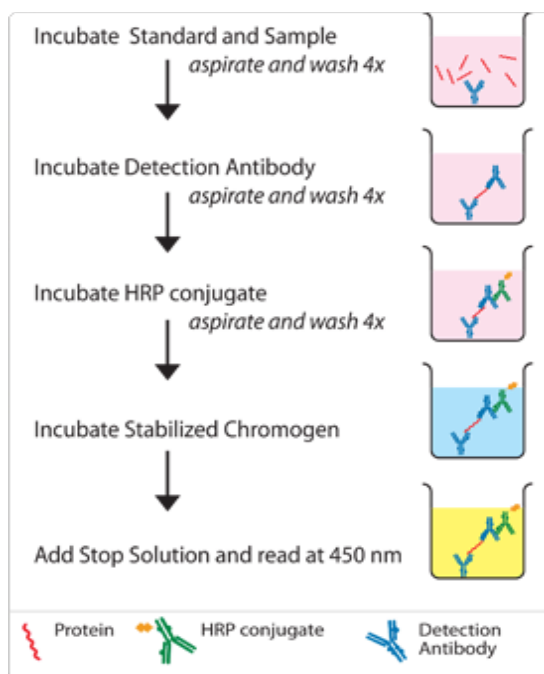
Postopek acilacije izvajamo na MT-trakovih po naslednjem postopku (9) :

- 1) V ustrezne jamice pipetirati 20 μ l standarda 1-6 , 20 μ l kontrole 1 in 2 ter 20 μ l vzorca.
- 2) V vse jamice dodati 25 μ l pufra za aciliranje.
- 3) V vse jamice dodati 200 μ l reagenta za izenačevanje.
- 4) Vse dobro premešati 10 sekund.
- 5) V vse jamice dodati 50 μ l reagenta za aciliranje.
Pozor: reagent se pripravlja neposredno pred uporabo, saj je zelo hlapljiv, priporoča pa se tudi uporaba večkanalne pipete.
- 6) Vse inkubirati 90 min na sobni temperaturi na mešalniku.

3.3.5. POSTOPEK ADMA-ELISA

Vsi reagenti morajo biti pred uporabo na sobni temperaturi. Postopek ELISA (Slika 4) opravimo na mikrotitrski ploščici po naslednjem postopku (9):

- 1) Inkubacija vzorca - v ustrezne jamice mikrotitrnske ploščice dodati po 50 μ l standarda 1-6, 50 μ l kontrole in 50 μ l predhodno pripravljenega vzorca.
V vse jamice dodati po 50 μ l antiseruma in dobro premešati. Mikrotitrnsko ploščico pokriti z ustrezno samolepilno folijo in inkubirati od 15 do 20 ur pri 2 do 8 °C.
- 2) Izpiranje - vsako jamico izprati z 250 μ l pufru za izpiranje. Ostanek vode v jamicah odstraniti s filter papirjem. Postopek ponoviti 4-krat.
- 3) Inkubacija konjugata - v vsako jamico dodati po 100 μ l encim-konjugat reagenta, inkubirati 60 minut pri sobni temperaturi.
- 4) Izpiranje - ponoviti postopek številka 2.
- 5) Inkubacija substrata - v vsako jamico dodati po 100 μ l substrata, inkubirati od 20 do 30 min na sobni temperaturi.
- 6) Zaustavljanje reakcije - v vsako jamico dodati po 100 μ l STOP reagenta.
- 7) Odčitavanje - reakcijo odčitati s fotometrom na valovni dolžini 450 nm.



Slika 4. Postopek ELISA metode (11)

3.3.6. POSEBNE LASTNOSTI ADMA-ELISA

a) Pričakovane referenčne vrednosti

Referenčno območje testa je od 0,4–0,75 $\mu\text{mol/l}$ (80–150 ng/ml).

b) Občutljivost testa

Občutljivost testa znaša 0,05 $\mu\text{mol/l}$.

c) Specifičnost (križne reakcije)

Strukturne komponente, ki se uporabljajo pri ADMA-ELISA testu, so testirane, prav tako so določene možne križne reakcije. Testirani so arginin, monometilarginin (NMMA) in SDMA (9), kot je prikazano v preglednici II. V preglednici III so prikazani rezultati različnih koncentracij ADMA za določitev ponovljivosti.

Preglednica II. Strukturne komponente pri ADMA-ELISA testu (9)

Komponenta ADMA-ELISA	ED-50-Value(ng/ml)	% križne reakcije
ADMA	126	100
Arginin	660,000	<0.02
NMMA	12,200	1.0
SDMA	10,500	1.2

Preglednica III. Rezultati meritev vzorcev z različnimi koncentracijami ADMA za določitev ponovljivosti (9)

INTRA-ANALIZNA VARIACIJA		
Povprečna vrednost $\mu\text{mol/l}$	Koeficient variacije %	Število določitev
0,66 $\mu\text{mol/l}$	5,7 %	42
1,01 $\mu\text{mol/l}$	6,4%	42
INTER-ANALIZNA VARIACIJA		
Povprečna vrednost $\mu\text{mol/l}$	Koeficient variacije %	Število določitev
0,63 $\mu\text{mol/l}$	10,3 %	28
1,01 $\mu\text{mol/l}$	9,8 %	28
1,38 $\mu\text{mol/l}$	9,4 %	28
2,26 $\mu\text{mol/l}$	8,3 %	28

3.4. OPIS SDMA-ELISA IMUNOLOŠKE METODE

3.4.1. PRINCIP METODE

Koncentracijo SDMA-endogenega simetričnega dimetilarginina smo v periferni krvi izmerili s pomočjo imunološke metode ELISA (12).

3.4.1.1. Princip imunološke metode ELISA

Pri metodi ELISA uporabljamo mikrotitrski format (mikrotitrne ploščice). Endogeni asimetrični dimetilarginin je vezan na trdno fazo v mikrotitrski plošči. SDMA, ki se nahaja v plazmi bolnika, acilira in tekmuje v vezanju na ustrezno konstantno število povezanih mest RABBIT-ANTI-SDMA-PROTITELO-VEZANO MESTO. Ko je sistem uravnotežen, se z izpiranjem odstrani višek prostih antigenov in kompleks antigen-antiserum.

Vezana protitelesa SDMA (vezana na trdno fazo) se vizualizirajo s pomočjo proti-kunčje peroksidaze (HRP) v reakciji s TMB (tetrametilbenzidin, kromogen).

Reakcijo spremljamo pri valovni dolžini 450 nm. Količina povezanih protiteles (SDMA) v trdni fazi je sorazmerna koncentraciji SDMA v vzorcu (12).

3.4.2. OPREMA IN REAGENTI

Komplet za ELISA hranimo na temperaturi od 2 do 8 °C. Pred uporabo mora biti komplet zaradi ogrevanja reagentov 10 minut na sobni temperaturi (12).

3.4.3. VSEBINA KOMPLETA

Posamezni reagenti v kompletu so pripravljene za uporabo, nekateri pa zahtevajo raztapljanje. Mešanje različnih lotov ni priporočljivo (12).

Vsebina kompleta :

- MT-trakovi (12 trakov z 8 jamicami)
- Standard 1-6
- Kontrola 1 in 2
- Pufer za aciliranje
- Reagent za aciliranje
- Antiserum (rabbit-anti-N-acyl-SDMA)
- Encim konjugat (proti-kunčja-IgG-peroksidaza)
- Pufer za izpiranje
- Substrat (TMB raztopina)
- Stop raztopina (vsebuje 0,3 M žveplove kisline)
- Reakcijska plošča
- Reagent za izenačevanje
- Topilo

3.4.4. PRIPRAVA VZORCEV IN REAGENTOV

a) Priprava reagentov

Pred uporabo morajo biti vsi reagenti na sobni temperaturi. Posamezne reagente že proizvajalci pripravijo za uporabo, nekateri pa zahtevajo raztapljanje, saj so dostavljeni v liofilizirani obliki.

Raztopiti je treba naslednje reagente:

- pufer za raztapljanje - koncentriran, treba ga je razredčiti z destilirano vodo,
- reagent za aciliranje - liofiliziran, treba ga je raztopiti z raztopino, ki jo dostavi proizvajalec,
- reagent za izenačevanje - liofiliziran, treba ga je raztopiti z destilirano vodo.

b) Priprava vzorcev

Za testiranje potrebujemo serum ali plazmo z EDTA. Pri tem ne uporabljamo krvi, ki je hemolitična ali lipemična. Vzorce krvi lahko hranimo do 24 h na 2 do 8 °C, na -20 °C pa so lahko shranjeni tudi do 24 mesecev.

Pred postopkom testa ELISA moramo vzorec (serum/plazmo) acilirati. Z acilacijo se SDMA pretvori v N-acyl-SDMA, ki se uporablja pri ELISI (12).

Postopek acilacije izvajamo na MT-trakovih po naslednjem postopku (12) :

- 1) V ustrezne jamice pipetirati 20 µl standarda 1-6 , 20 µl kontrole 1 in 2 ter 20 µl vzorca.
- 2) V vse jamice dodati 25 µl pufera za aciliranje.
- 3) V vse jamice dodati 200 µl reagenta za izenačevanje.
- 4) Vse dobro premešati 10 sekund.
- 5) V vse jamice dodati 50 µl reagenta za aciliranje.
Pozor: reagent se pripravlja neposredno pred uporabo, saj je zelo hlapljiv, priporoča pa se tudi uporaba večkanalne pipete.
- 6) Vse inkubirati 90 min na sobni temperaturi na mešalniku.

3.4.5. POSTOPEK SDMA ELISA

Vsi reagenti morajo biti pred uporabo na sobni temperaturi. Postopek ELISA opravimo na mikrotitrski ploščici po naslednjem postopku (12):

- 1) Inkubacija vzorca - v ustrezne jamice mikrotitrskе ploščice dodati po 20 μ l standarda 1-6 , 20 μ l kontrole in 20 μ l predhodno pripravljenega vzorca.
V vse jamice dodati po 50 μ l antiseruma in dobro premešati. Mikrotitrsko ploščico pokriti z ustrezno samolepilno folijo in inkubirati od 15 do 20 ur pri 2 do 8 °C.
- 2) Izpiranje - vsako jamico izprati z 250 μ l pufra za izpiranje. Ostanek vode v jamicah odstraniti s filter papirjem. Postopek ponoviti 4-krat.
- 3) Inkubacija konjugata - v vsako jamico dodati po 100 μ l encim-konjugat reagenta, inkubirati 60 minut pri sobni temperaturi.
- 4) Izpiranje - ponoviti postopek številka 2.
- 5) Inkubacija substrata - v vsako jamico dodati po 100 μ l substrata, inkubirati od 20 do 30 min na sobni temperaturi.
- 6) Zaustavljanje reakcije - v vsako jamico dodati po 100 μ l STOP reagenta.
- 7) Odčitavanje - reakcijo odčitati s fotometrom pri valovni dolžini 450 nm.

3.4.6. POSEBNE LASNOSTI SDMA-ELISA

a) Pričakovane referenčne vrednosti

Referenčno območje testa je od 0,3–0,7 $\mu\text{mol/l}$ (60–140 ng/ml).

b) Občutljivost testa

Občutljivost testa znaša 0,05 $\mu\text{mol/l}$.

c) Specifičnost (križne reakcije)

Strukturne komponente, ki se uporabljajo pri SDMA-ELISA testu, so testirane, prav tako so določene možne križne reakcije. Testirani so arginin, monometilarginin (NMMA) in ADMA (12), rezultati so prikazani v preglednici IV. Preglednica V prikazuje različne koncentracije SDMA za določitev ponovljivosti.

Preglednica IV. Strukturne komponente pri SDMA-ELISA testu (12)

Komponenta SDMA-ELISA	ED-50-Value(ng/ml)	% križne reakcije
SDMA	0,36	100
Arginin	4,500	<0.01
NMMA	43	0,70
ADMA	81	0,44

Preglednica V. Rezultati meritev vzorcev z različnimi koncentracijami SDMA za določitev ponovljivosti (12)

INTRA-ANALIZNA VARIACIJA		
Povprečna vrednost $\mu\text{mol/l}$	Koeficient variacije %	Število določitev
0,524 $\mu\text{mol/l}$	5,7 %	40
0,752 $\mu\text{mol/l}$	6,1 %	40
1,723 $\mu\text{mol/l}$	4,7 %	40

3.5. MERJENJE KONCENTRACIJE KREATININA

Kot merilo GFR najpogosteje uporabljamo serumski kreatinin. V krvi se nahaja kot produkt presnove kreatinina in fosfokreatina mišic ter tako odraža mišično maso. V krvi je koncentracija kreatinina dokaj konstantna (13).

Jaffejeva metoda je v uporabi že od leta 1886, vendar pa je v 126 letih doživela tudi nekatere spremembe. Jaffe jo je predstavil kot reakcijo med pikrinsko kislino in kreatininom v alkalnem mediju, pri katerem nastane oranžno obarvana reakcijska zmes. Vendar pa je metoda zaradi vpliva hemolize, lipemije in ikterije ter možnosti oranžnega obarvanja tudi z nekreatininskimi analiti razglašena kot nespecifična (13).

Encimska metoda je teoretično bolj specifična, prikazuje boljše lastnosti od Jaffe metode, vendar ni brez interferenc ter zaradi cene ni sprejeta v rutini. V rutini se najpogosteje uporablja Jaffe kinetična metoda. Kreatinin se meri izključno za oceno hitrosti GF. Ocena GF se zaradi najzanesljivej šihoporišč dobi iz MDRD CKD-EPI empiričnih formul, ki so validirane pri velikem številu testirancev.

3.5.1. NAČELO JAFFEJEVE KINETIČNE METODE

Načelo Jaffejeve kinetične metode je, da kreatinin reagira s pikrinsko kislino v alkalnem mediju, zato posledično nastane kreatinin-pikrat kompleks, ki je rumeno-oranžne barve. Pri reakciji je pomembna koncentracija alkalnega sredstva, saj število hidroksilnih ionov določa, v kakšnem obsegu bo prišlo do reakcije.

Koncentracija natrijevega hidroksida je manjša od 1 mol/L, pogosto tudi manjša od 0,5 mol/L. Vendar pa ta reakcija ni povsem specifična za kreatinin, saj lahko snovi, kot so glukoza, piruvat, askorbinska kislina in acetoacetat, reagirajo s pikrinsko kislino in ustvarijo podobno obarvane spojine (13).

Ena vrsta nekreatininskega kromogena iz seruma po dodajanju reagenta reagira zelo hitro, in sicer že v prvih 20 sekundah (13).

Druga vrsta kromogena reagira z reagentom šele po 80 do 100 sekundah in zato čas med 20 in 80 sekundami odgovarja reakciji kreatinina z reagentom. Zaradi tega se pri kinetični metodi meri absorbanca v času od 20 do 80 sekund po začetku reakcije.

Vendar pa se na ta način ne izognemo popolnoma interferencam, saj še vedno lahko interferirajo α -keto kisline (pozitivne interference) ali bilirubin (negativna interferenca) (13).

Stopnja spremembe absorbanca pri 520/800 nm je proporcionalna s koncentracijo kreatinina v vzorcu (13).

Kinetično metodo uporabljajo skoraj v vseh laboratorijih, saj omogoča izvajanje testov na različnih modernih biokemičnih analizatorjih (13).

3.5.2. REAGENTI ZA JAFFEJEVO KINETIČNO METODO

Potrebni reagenti za izvedbo Jaffejeve reakcije so (13):

- Natrijev hidroksid (0,5 mol/L)
- Nasičena raztopina pikrinske kisline (87,3 mmol/L)
- Zmes raztopine alkalnega pikrata, pikrinske kisline in NaOH
- Standard

3.5.3. POSTOPEK JAFFEJEVE KINETIČNE METODE

Postopek ki je prikazan v preglednici VI se izvaja pri temperaturi 30 °C. Z alkalnim pikratom se namesti absorbanca 0 na spektrofotometru. Nato se v kiveti velikosti 10 mm pomeša (13):

Preglednica VI. Postopek Jaffejeve kinetične metode (13)

	Test, ml	Standard, ml
Serum	0,1	-
Standard	-	0,1
Alkalni pikrat	2,0	2,0

Potek Jaffejeve reakcije spremljamo z merjenjem absorbance v določenem časovnem obdobju. Čas merjenja je kritičen in ga moramo pričakovati po 20 ali 80 sekundah (13).

Račun:

$$\Delta A_{\text{test}} = A_1 - A_0 \text{ testa}$$

$$\Delta A_{\text{stand.}} = A_1 - A_0 \text{ stand.}$$

$$\text{Kreatinin } \mu\text{mol/L} = \frac{\Delta A_{\text{test}}}{\Delta A_{\text{stand.}}} \times 88,4$$

$$\Delta A_{\text{stand.}}$$

Referenčni razpon v serumu : **Moški :** 79-125 $\mu\text{mol/l}$

Ženske : 63-107 $\mu\text{mol/l}$

3.6. DOLOČITEV GLOMERULNE FILTRACIJE

GFR je najobčutljivejši in najbolj specifični znak sprememb skupne ledvične funkcije. GFR je enak vsoti hitrosti filtracije v vsakem izmed funkcionalnih nefronov in se šteje kot kazalec števila funkcionalnih nefronov oziroma funkcionalnega ledvičnega tkiva.

Najzanesljivejši izračun glomerulne filtracije je po matematični formuli iz serumskega kreatinina, površine telesa in časa. Fiziološko ne obstaja proporcionalno razmerje med GF in serumskim kreatininom, temveč je razmerje eksponencialno, pad koncentracije kreatinina se bistveno poveča, ko hitrost GF bistveno pada. Zaradi najboljše validiranosti se za izračun uporabljata MDRD enačba in CKD-EPI, ki sta standardizirani po referenčni metodi IDMS.

Najpogostejša za oceno je enačba MDRD:

$$\text{OGF (mL/min/1,73 m}^2\text{)} = 186 (\text{kreatinin } (\mu\text{mol/L-}) / 88,4)^{-1,154} \times (\text{starost})^{-0,203} \times (0,742 \text{ za spol- ženske}) \times (1,210 \text{ za raso- črnice})$$

Formula MDRD podaja OGF (enačba 1), izraženo na povprečno telesno površino 1.73 m². Formula je zelo praktična, ker poleg serumske koncentracije kreatinina za izračun OGF potrebujemo le podatke, ki jih lahko povzamemo iz osebnih podatkov preiskovanca (15).

Referenčna vrednost za odrasle:

Moški : 130 mL/min/1.73 m²

Ženske : 120 mL/min/1.73 m²

3.7. STATISTIČNE METODE

Za prikaz rezultatov in statistično obdelavo podatkov smo uporabljali računalniška programa Excel in Medcalc. Izvedli smo Kolmogorov-Smirnov test in izračunali povprečno vrednost izmerjenih koncentracij. Rezultate smo prikazali s pomočjo histograma, kvantilnega, korelacijskega in linijskega diagrama ter krivulje ROC .

4. REZULTATI

4.1. SKUPNI REZULTATI ZA SDMA, ADMA, KREATININ IN OGF NA 37 PACIJENTIH

Razpon serumskih koncentracij ADMA, SDMA in kreatinina ter hitrost glomerulne filtracije so prikazani v (Preglednici VII). Koncentracije serumskih ADMA in SDMA so izmerjene s specifično imunološko metodo ELISA. Serumski kreatinin je določen s kinetično modifikacijo Jaffa reakcije, OGF pa je izračunan z uporabo MDRD enačbe.

Preglednica VII. V preglednici so prikazani skupni rezultati meritev serumske koncentracije ADMA,SDMA in kreatinina ter glomerulne filtracije (OGF)

BOLNIK	ADMA $\mu\text{mol/l}$	SDMA $\mu\text{mol/l}$	KREATININ $\mu\text{mol/l}$	OGF mL/min/ 1.73 m ²
1.	0,695	1,921	381	10
2.	0,613	1,871	414	10
3.	0,714	2,992	368	11
4.	0,488	1,326	377	14
5.	0,783	1,546	276	22
6.	0,79	1,257	224	25
7.	0,733	1,155	145	27
8.	0,736	1,36	201	28
9.	0,797	1,297	145	32
10.	0,771	1,128	185	33
11.	0,524	0,872	137	44
12.	0,571	0,771	94	49
13.	0,829	0,894	133	51
14.	0,665	1,095	113	51
15.	0,554	0,701	120	52
16.	0,636	0,607	127	54
17.	0,569	0,689	94	54
18.	0,537	0,657	90	55
19.	0,669	1,194	96	56

20.	0,578	0,595	116	61
21.	0,59	0,721	114	61
22.	0,624	0,761	112	69
23.	0,76	0,593	95	70
24.	0,583	0,627	93	77
25.	0,691	0,57	75	77
26.	0,673	0,595	84	78
27.	0,457	0,433	69	78
28.	0,604	0,617	68	80
29.	0,551	0,675	101	82
30.	0,566	0,463	64	84
31.	0,51	0,589	83	89
32.	0,927	0,914	77	89
33.	0,437	0,449	47	90
34.	0,598	0,507	72	90
35.	0,776	0,943	76	90
36.	0,517	0,36	57	90
37.	0,72	0,629	50	90

4.2. ODVISNOST ADMA OD IZRAČUNA OGF

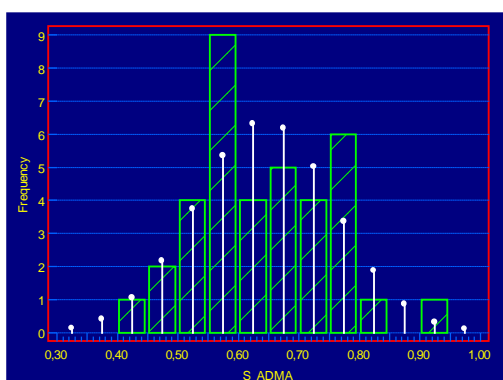
Različne serumske koncentracije ADMA v odnosu na referenčni interval (0,4–0,75 $\mu\text{mol/l}$) vidimo v (Preglednici VIII). Prav tako vidimo delež bolnikov na področjih zunaj in znotraj referenčnega intervala glede na posamezne stopnje OGF.

Preglednica VIII. V preglednici so prikazani rezultati serumske koncentracije ADMA glede na posamezne stopnje OGF

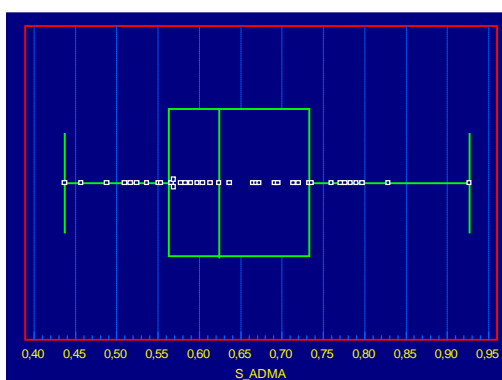
BOLNIK	ADMA $\mu\text{mol/l}$	OGF mL/min/ 1.73 m ²
1.	0,695	10
2.	0,613	10
3.	0,714	11
4.	0,488	14
5.	0,783	22
6.	0,79	25
7.	0,733	27
8.	0,736	28
9.	0,797	32
10.	0,771	33
11.	0,524	44
12.	0,571	49
13.	0,829	51
14.	0,665	51
15.	0,554	52
16.	0,636	54
17.	0,569	54
18.	0,537	55
19.	0,669	56
20.	0,578	61
21.	0,59	61
22.	0,624	69
23.	0,76	70
24.	0,583	77
25.	0,691	77

26.	0,673	78
27.	0,457	78
28.	0,604	80
29.	0,551	82
30.	0,566	84
31.	0,51	89
32.	0,927	89
33.	0,437	90
34.	0,598	90
35.	0,776	90
36.	0,517	90
37.	0,72	90

OGF – posamezne stopnje so različno označene: rdeča – 5. stopnja, oranžna – 4. stopnja, zelena – 3. stopnja, rumena – 2. stopnja, brezbarvno – 1. stopnja; številčne vrednosti, označene z rdečo barvo, so povečane vrednosti glede na referenčni interval.



a) Histogram za ADMA ($\mu\text{mol/l}$)



b) Kvantilni diagram za ADMA ($\mu\text{mol/l}$)

Graf 1. Histogram in kvantilni diagram za ADMA

S histogramom in kvantilnim diagramom (Graf 1) so prikazane vse izmerjene vrednosti koncentracije ADMA ($\mu\text{mol/L}$).

S statistično analizo histograma in kvantilnega diagrama za ADMA lahko vidimo, da se je koncentracija ADMA v serumu testiranih bolnikov gibala v razponu od 0.437 do 0.927 $\mu\text{mol/l}$.

- porazdelitev po Kolmogorov-Smirnov testu: normalna porazdelitev, njena srednja vrednost je bila 0,644 $\mu\text{mol/l}$, s povprečnim odstopanjem 0,114.
- ker je koeficient variacije manjši od 50 % (znaša 17,76 %) je aritmetična sredina reprezentativni kazalnik, zato je mogoče s 95-odstotno gotovostjo trditi, da se koncentracija ADMA giblje od 0,606 do 0,682 $\mu\text{mol/l}$.
- do 50 % vseh vrednosti ima koncentracijo od 0,624 ki je v bistvu podobno povprečni vrednosti. Iz tega je razvidno, da bo porazdelitev koncentracije ADMA pokazala normalnost.

V skladu s tem ima 5 % testiranih bolnikov nižjo koncentracijo od 0,467 $\mu\text{mol/l}$ in 5 % testnih bolnikov višjo koncentracijo od 0,817 $\mu\text{mol/l}$.

4.3. ODVISNOST SDMA OD IZRAČUNA OGF

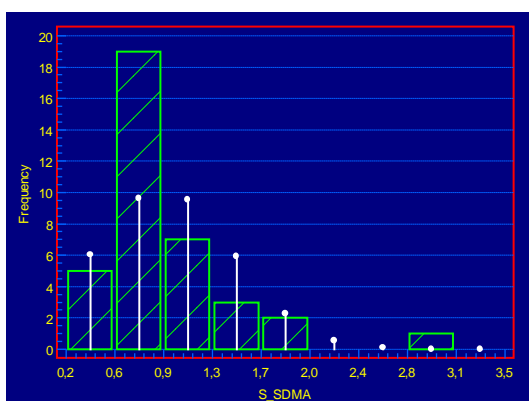
Različne serumske koncentracije SDMA v odnosu na referenčni interval (0,3-0,7 $\mu\text{mol/l}$) vidimo v (Preglednici IX). Prav tako vidimo delež bolnikov na področjih zunaj in znotraj referenčnega intervala glede na posamezne stopnje OGF.

Preglednica IX. V preglednici so prikazani rezultati serumske koncentracije SDMA glede na posamezne stopnje OGF

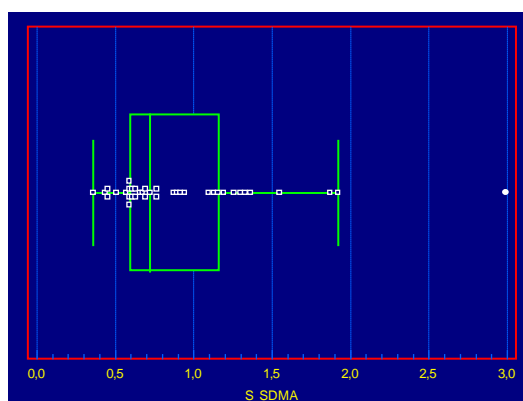
BOLNIK	SDMA $\mu\text{mol/l}$	OGF mL/min/ 1.73 m ²
1.	1,921	10
2.	1,871	10
3.	2,992	11
4.	1,326	14
5.	1,546	22
6.	1,257	25
7.	1,155	27
8.	1,36	28
9.	1,297	32
10.	1,128	33
11.	0,872	44
12.	0,771	49
13.	0,894	51
14.	1,095	51
15.	0,701	52
16.	0,607	54
17.	0,689	54
18.	0,657	55
19.	1,194	56
20.	0,595	61
21.	0,721	61
22.	0,761	69
23.	0,593	70
24.	0,627	77
25.	0,57	77

26.	0,595	78
27.	0,433	78
28.	0,617	80
29.	0,675	82
30.	0,463	84
31.	0,589	89
32.	0,914	89
33.	0,449	90
34.	0,507	90
35.	0,943	90
36.	0,36	90
37.	0,629	90

OGF– posamezne stopnje so različno označene: rdeča – 5. stopnja, oranžna – 4. stopnja, zelena – 3. stopnja, rumena – 2. stopnja, brezbarvno – 1. stopnja; številčne vrednosti, označene z rdečo barvo, so povečane vrednosti glede na referenčni interval.



a) Histogram za SDMA (µmol/l)



b) Kvantilni diagram za SDMA (µmol/l)

Graf 2. Histogram in kvantilni diagram za SDMA

S histogramom in kvantilnim diagramom (Graf 2) so prikazane vse izmerjene vrednosti koncentracije SDMA (µmol/L).

S statistično analizo histograma in kvantilnega diagrama za SDMA lahko vidimo, da so se koncentracije SDMA v serumu testnih bolnikov gibale v razponu od 0.360 do 2.992 $\mu\text{mol/l}$.

- porazdelitev po Kolmogorov-Smirnov testu: normalna porazdelitev, njena srednja vrednost znaša 0,929 $\mu\text{mol/l}$, s povprečnim odstopanjem 0,521.
- ker je koeficient variacije večji od 50 % (znaša 56,13 %) aritmetična sredina ni reprezentativni pokazatelj.

4.4. REZULTATI VSEH PARAMETROV, RAZVRŠČENI V POSAMEZNE SKUPINE GLEDE NA STOPNJO OKVARE

a) Vsi parametri v skupini udeležencev, ki trpijo zaradi okvare 5. stopnje so prikazani v preglednici X in imajo naslednje povprečne vrednosti:

Preglednica X. Povprečne vrednosti parametrov pri okvari 5. stopnje

Merjeni parametri	Povprečna vrednost
ADMA	0,627 $\mu\text{mol/l}$ (v okviru referenčnega intervala)
SDMA	2,027 $\mu\text{mol/l}$ (zvišana vrednost)
KREATININ	385 $\mu\text{mol/l}$ (zvišana vrednost)

V povprečnih vrednostih lahko vidimo zvišane koncentracije SDMA in kreatinina.

b) Vsi parametri v skupini udeležencev, ki trpijo zaradi okvare 4. stopnje so prikazani v preglednici XI in imajo naslednje povprečne vrednosti:

Preglednica XI. Povprečne vrednosti parametrov pri okvari 4. Stopnje

Merjeni parametri	Povprečna vrednost
ADMA	0,760 $\mu\text{mol/l}$ (blago zvišana vrijednost)
SDMA	1,329 $\mu\text{mol/l}$ (zvišana vrednost)
KREATININ	211 $\mu\text{mol/l}$ (zvišana vrednost)

V povprečnih vrednostih lahko vidimo zvišane koncentracije SDMA in kreatinina ter blago zvišanje ADMA.

c) Vsi parametri v skupini udeležencev, ki trpijo zaradi okvare 3. stopnje so prikazani v preglednici XII in imajo naslednje povprečne vrednosti:

Preglednica XII. Povprečne vrednosti parametrov pri okvari 3. Stopnje

Merjeni parametri	Povprečna vrednost
ADMA	0,647 $\mu\text{mol/l}$ (v okviru referenčnega intervala)
SDMA	0,900 $\mu\text{mol/l}$ (zvišana vrednost)
KREATININ	121 $\mu\text{mol/l}$ (v okviru referenčnega intervala)

V povprečnih vrednostih lahko vidimo zvišane koncentracije SDMA.

d) Vsi parametri v skupini udeležencev, ki trpijo zaradi okvare 2. stopnje so prikazani v preglednici XIII in imajo naslednje povprečne vrednosti:

Preglednica XIII. Povprečne vrednosti parametrov pri okvari 2. stopnje

Merjeni parametri	Povprečna vrednost
ADMA	0,624 $\mu\text{mol/l}$ (v okviru referenčnega intervala)
SDMA	0,627 $\mu\text{mol/l}$ (v okviru referenčnega intervala)
KREATININ	88,538 $\mu\text{mol/l}$ (v okviru referenčnega intervala)

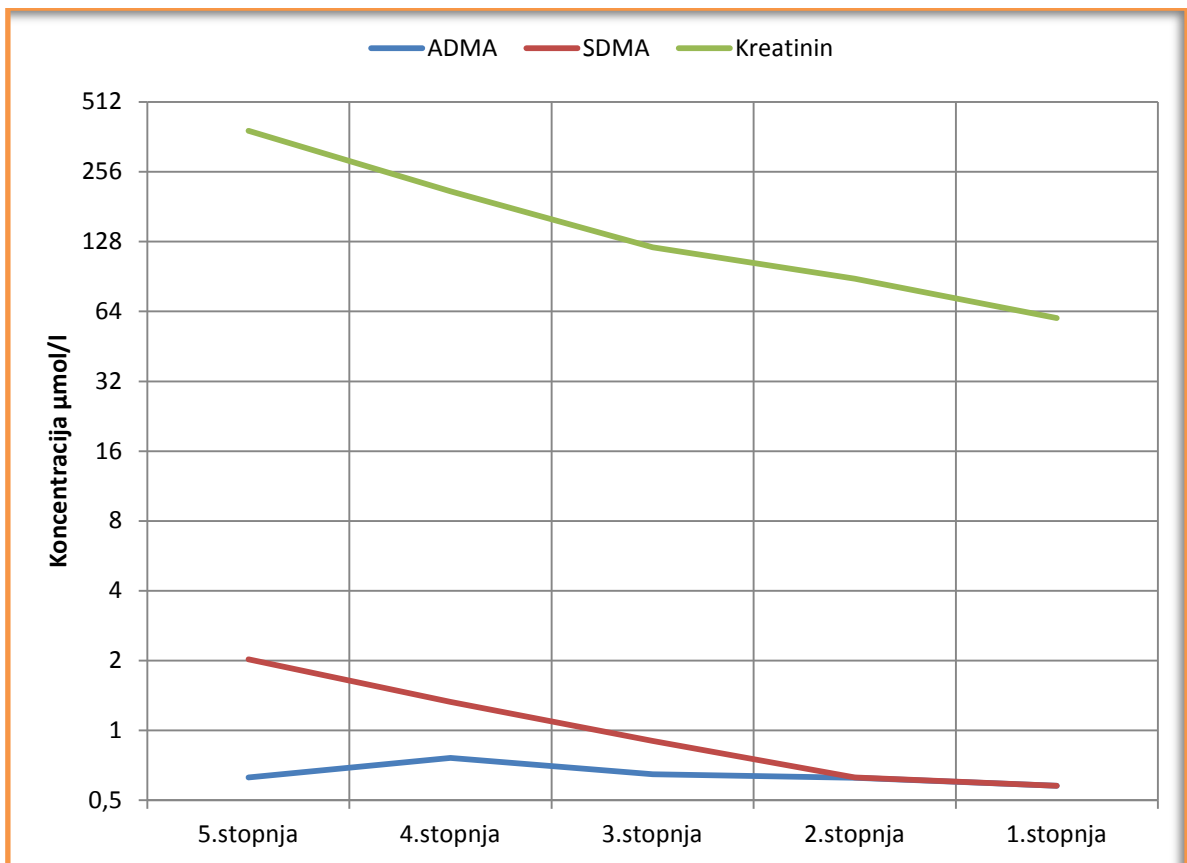
Vse vrednosti se nahajajo v okviru referenčnega intervala.

e) Vsi parametri v skupini udeležencev, ki trpijo zaradi okvare 1. Stopnje so prikazani v preglednici XIV in imajo naslednje povprečne vrednosti:

Preglednica XIV. Povprečne vrednosti parametrov pri okvari 1. Stopnje

Merjeni parametri	Povprečna vrednost
ADMA	0,577 $\mu\text{mol/l}$ (v okviru referenčnega intervala)
SDMA	0,577 $\mu\text{mol/l}$ (v okviru referenčnega intervala)
KREATININ	60 $\mu\text{mol/l}$ (v okviru referenčnega intervala)

Vse vrednosti se nahajajo v okviru referenčnega intervala.

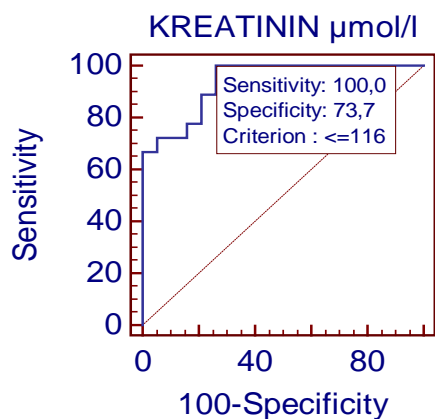


Graf 3. Linijski diagram za ADMA, SDMA in kreatinin

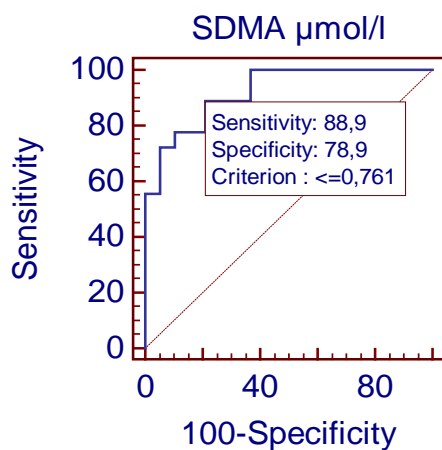
Linijskim diagramom (Graf 3) so prikazane povprečne vrednosti koncentracij ADMA, SDMA in kreatinina pri posamezni stopnji okvare.

Z analizo linijskega diagrama se povečuje specifičnost kreatinina in SDMA glede na stopnjo okvare, pokaže se linearnost porasta koncentracije proti večji stopnji odpovedi. Vidimo tudi, da je razporeditev ADME nelinearna, opazimo, da je največja koncentracija izmerjena v 4. stopnji okvare.

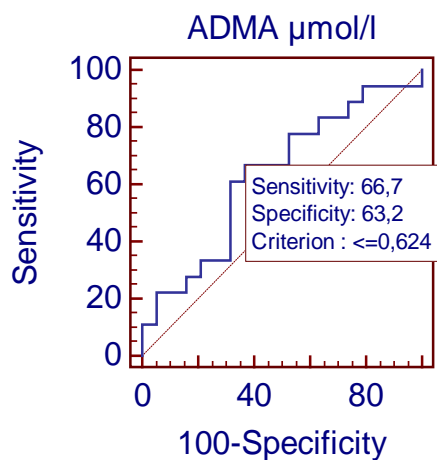
4.5. KRIVULJA ROC ZA ADMA,SDMA IN KREATININ



- občutljivost znaša 100,0 %,
- specifičnost pa 73,7 %.
- površina pod krivuljo je 0,936



- občutljivost znaša 88,9 %,
- specifičnost pa 78,9 %.
- površina pod krivuljo je 0,761



- občutljivost znaša 66,7 %,
- specifičnost pa 63,2 %.
- površina pod krivuljo je 0,624

Graf 4. Prikaz krivulje ROC za ADMA, SDMA in kreatinin za 3.stopnjo ledvične okvare

Izračunane vrednosti (Graf 4) občutljivosti in specifičnosti podane so za 3.stopnjo ledvične okvare.

Iz krivulje ROC (kreatinin) je razvidno, da občutljivost znaša 100,0 %, specifičnost pa 73,7 %. Površina pod krivuljo je 0,936 kar pomeni, da ima kreatinin izvrstno diagnostično točnost.

Iz krivulje ROC (SDMA) je razvidno, da občutljivost znaša 88,9 %, specifičnost pa 78,9 %. Površina pod krivuljo je 0,921 kar pomeni, da ima SDMA izvrstno diagnostično točnost.

Iz krivulje ROC (ADMA) je razvidno, da občutljivost znaša 66,7 %, specifičnost pa 63,2 %. Površina pod krivuljo je 0,632 kar pomeni, da ADMA nima velikega diagnostičnega pomena.

Ugotovili smo višjo diagnostično zanesljivost meritev serumskega kreatinina in SDMA v primerjavi z diagnostično zanesljivostjo meritev ADMA v serumu.

5. RAZPRAVA

Raziskovanje je izvedeno v skupini 37 bolnikov v obdobju 5 mesecev. Vse meritve so primerjane znotraj skupine. Tudi povečanje in pad koncentracij sta primerjana glede na celo skupino, primerjava podatkov posamično na bolniku ni statistično obdelana.

V klinični praksi se pri vseh bolnikih določa kreatinin na isti način, interpretacije rezultatov pa ne more kontrolirati laboratorij, ker ne pozna vseh vhodnih parametrov. Omejitve pri interpretaciji izvidov serumskega kreatinina so dobro znane (starost, mišična masa, ženski spol, manjša mišična masa, vegetarijanska prehrana, uživanje kuhanega mesa, nezadostna prehrana, mišična degeneracija, amputacija, debelost, zdravila, zmanjšana tuburna sekrecija kreatinina itd.), prav tako tudi predanalitične interference.

Pri določenih stopnjah odpovedi ledvic ne opažamo posebne dovzetnosti na bolezen s strani moškega ali ženskega spola. Med posameznimi stopnjami odpovedi sta spola porazdeljena neenakomerno, je pa zanimivo, da so v skupni štirih bolnikov z okvaro 5. stopnje tri ženske, v skupini prav tako štirih bolnikov z okvaro 4. stopnje pa so vsi bolniki moškega spola.

Opazamo tudi, da ima od vseh žensk, ki so sodelovale v raziskavi, povišane koncentracije ADMA samo ena ženska.

Koncentracija kreatinina se uporablja za oceno glomerulne filtracije in s tem tudi za oceno stopnje okvare ledvic. Iz zgoraj navedenih podatkov 37 dializnih bolnikov je razvidno, da pride do povišanja kreatinina v serumu šele na 4. stopnji okvare ledvic. Od 37 bolnikov imajo 4 bolniki 5. stopnjo okvare ter povišano koncentracijo kreatinina v serumu. To opažamo tudi pri 4. stopnji odpovedi, saj imajo 4 bolniki 4. stopnjo odpovedi. Na 3. stopnji imamo 11 testirancev, od katerih jih ima 7 povišane vrednosti kreatinina, kar znaša 77%. Pri testiranih v 1. in 2. stopnji ledvične okvare ni povečanih vrednosti kreatinina. Koncentracija kreatinina raste šele, ko pride do okvare funkcije ledvic za več kot 50 %, kar pa pomeni, da tega parametra ne moremo uporabljati za zgodnje odkrivanje bolezni. To bi v končni fazi izboljšalo tako prognozo kot tudi zdravljenje.

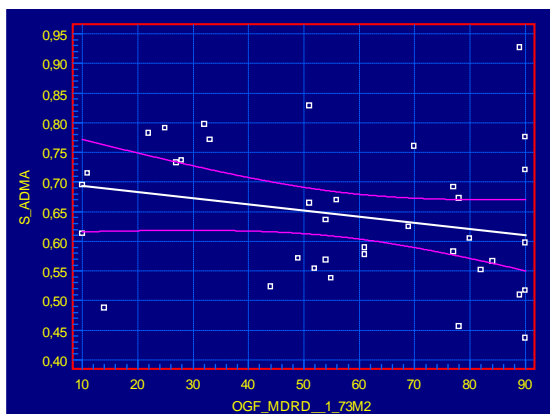
Ta študija je bila usmerjena na oceno vpliva SDMA in ADMA pri različnih stopnjah okvare ledvic. Na osnovi podatkov lahko opazimo, da se pri posameznih stopnjah okvare ADMA ne zvišuje linearno. Od skupaj 37 testirancev imajo 4 bolniki, ki se nahajajo v 5. stopnji, normalne vrednosti ADMA v serumu. V 4. stopnji se prav tako nahajajo 4 testiranci, od katerih imata 2 povišane vrednosti (50 %), od 11 testirancev v 3. stopnji imajo 3 povišane vrednosti (33%).

V 2. stopnji imamo 13 testirancev, od katerih imata 2 povišane vrednosti (26%), v 1. stopnji pa ima od 5 testirancev samo eden povišano vrednost. Čeprav lahko na podlagi rezultatov opazimo, da se vrednosti ADMA v serumu višajo, pa teh podatkov ne moremo neposredno povezati z zmanjšano glomerulno funkcijo, saj ni opaziti določene konstantnosti.

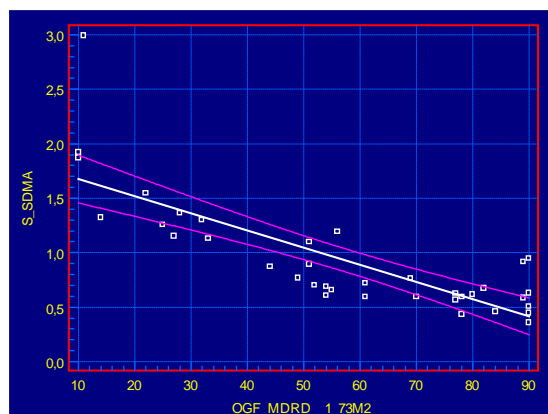
SDMA bi lahko bil boljši kazalec in možni zgodnji marker za odkrivanje okvare glomerulne filtracije. Na podlagi pridobljenih podatkov vidimo, da pride do rahlega zvišanja koncentracije že v 2. stopnji okvare, saj imajo od 13 testirancev v tej stopnji zvišane vrednosti v serumu 3 testiranci (33%), v 3. stopnji pa je opazno občutno zvišanje koncentracije, saj ima od skupaj 11 testirancev zvišane vrednosti 8 testirancev (88%). V 4. in 5. stopnji imajo vsi testiranci zvišane vrednosti. Iz dobljenih rezultatov je pri zmanjševanju funkcije glomerulne filtracije razvidna določena konstantnost zvišanja SDMA v serumu.

Zaradi navedenega ima ocena GFR na osnovi serumskega kreatinina najbolj zanesljivo napovedno vrednost, vendar pa se moramo že vnaprej zavedati, da za oceno GFR ni popolne formule. Dosedanje študije poudarjajo empirične formule MDRD (angl. Modified Diet in Renal Disease) in CKDEPI (angl. Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) kot boljše od ostalih, saj so rezultat obsežnih študij, prav tako pa so potrjene na velikem številu testirancev. Pri tem pa moramo imeti v mislih, da so vsi rutinski laboratorijski pristopi glede ocene ledvične funkcije utemeljeni na oceni GFR, ne pa na meritvah GFR. Ocena GFR ima vendarle najpomembnejšo klinično uporabo pri diagnozi kronične ledvične bolezni, oceni stopnje resnosti bolezni in oceni uspešnosti terapije. Kronična ledvična bolezen je bila sistematično definirana leta 2002 in razvrščena v 5 stadijev prav na osnovi ocene GFR.

Problem kreatinina je v tem, da se njegova vrednost viša šele pri večji okvari ledvic, zato si že danes prizadevajo uvesti občutljivejše diagnostične parametre, ki bi omogočili hitrejše ugotavljanje posameznih stopenj okvare in na ta način izboljšali prognozo in potek ledvičnih bolezni. Taka parametra bi v prihodnosti lahko bila SDMA in ADMA, ker je njun diagnostični postopek hiter in poceni ter bi omogočal širšo dostopnost.



a) Korelacijski diagram za prikaz odnosa ADMA in GFR



b) Korelacijski diagram za prikaz odnosa SDMA in GFR

Graf 5: Korelacijski diagrami za prikaz odnosa ADMA in SDMA prema GFR

Slika (Graf 5) prikazuje diagrame, ki se nanašajo na linearnost ADMA in SDMA do GFR. Bela črta predstavlja regresijsko smer, roza črte pa so interval zaupanja.

Koeficient korelacije prikazuje slabo povezanost med ADMA in GFR MDRD.

Koeficient korelacije za SDMA do GFR MDRD je prav tako negativen, kar pomeni s povečanjem ene spremenljivke raste druga in obratno.

Podobna raziskava je leta 2003 potekala na inštitutu za farmakologijo in toksikologijo na univerzi Friedricha Schillerja v Jeni. Opravili so merjenje pri 26 kontrolnih osebah in 221 ledvičnih bolnikih z različnimi stopnjami okvare. Pri kroničnih ledvičnih bolnikih so raziskovali zvišane koncentracije ADME in SDMA, kakor tudi njihov vpliv na hipertenzijo in aterosklerozo. Merjenja so bila opravljena s HPLC. ADMA in SDMA sta bila v primerjavi s kontrolno skupino pomembno zvišana pri vseh bolnikih (16).

6. SKLEP

- Naši rezultati kažejo, da bi bilo določanje koncentracije SDMA diagnostično pomembno pri ugotavljanju ledvične okvare, predvsem pri bolnikih pri katerih je uporaba MDRD formule vprašljiva. ADMA nam daje slabše rezultate v smislu diagnostike stopnje ledvične okvare.
- S statistično analizo histograma in kvantilnega diagrama za ADMA lahko vidimo, da se je koncentracija ADMA v serumu testiranih bolnikov gibala v razponu od 0.437 do 0.927 $\mu\text{mol/l}$. Iz krivulje ROC je razvidno, da občutljivost znaša 66,7 %, specifičnost pa 63,2 %. Površina pod krivuljo je 0,632 kar pomeni, da ADMA nima velikega diagnostičnega pomena.
- S statistično analizo histograma in kvantilnega diagrama za SDMA lahko vidimo, da so se koncentracije SDMA v serumu testnih bolnikov gibale v razponu od 0.360 do 2.992 $\mu\text{mol/l}$. Iz krivulje ROC je razvidno, da občutljivost znaša 88,9 %, specifičnost pa 78,9 %. Površina pod krivuljo je 0,921 kar pomeni, da ima SDMA izvrstno diagnostično točnost.
- Kreatinin se meri izključno za oceno hitrosti GF. Ocena GF se zaradi najzanesljivejših poročil dobi iz MDRD CKD-EPI empiričnih formul.
- Iz krivulje ROC za kreatinin je razvidno, da občutljivost znaša 100,0 %, specifičnost pa 73,7 %. Površina pod krivuljo je 0,936 kar pomeni, da ima kreatinin izvrstno diagnostično točnost.
- Na osnovi naših rezultatov, lahko predpostavimo, da bi SDMA lahko bil dober diagnostični kazalec ledvične okvare.

7. REFERENCE

1. Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. Jedanaesto izdanje. Medicinska naklada Zagreb 2006; 306-308
2. National Kidney Foundation – K/ DOQI. Clinical practice guidelines for chronich kidney disease : evaluation, classificcaation and stratification . Am J Kidney Dis 2002; 39 (suppl1): S1-266
3. Jazwinska-Kozuba A, Martens-Lobenhoffer J, Surdacki A, Kruszelnicka O, Rycaj J, Godula-Stuglik U, Bode-Boeger S. Associations between Endogenous Dimethylarginines and Renal Function in Healthy Children and Adolescents, International Journal of Molecular Sciences 2012; 13 : 15464-15474
4. Raptis V, Kapoulas S, Grecks D, Role of asymmetrical dimethylarginine in the progression of renal disease, Nefrology 2013; 18 : 11-21
5. Štiblar Martinčić D, Coer A, Cvetko E, Marš T. Anatomija Histologija Fiziologija, Ljubljana 2007; 143-149
6. Draganić V i suradnici., Anatomija čoveka, Mograćni organi, Beograd 2007; 201-205, 237-240
7. Košnik M., Mrevlje F, Štajer D, Koželj M, Černelč P. Interna medicina, Ljubljana 2011; 1102-1118
8. Koch A, Weiskirchen R., Bruensing J, Dueckers H, Buendgens L, Kunze J, Matthes M, Luedde T, Trautwein C, Tackel F. Regulation and Prognostic Relevance of Symmetric Dimethylarginine Serum Concentrations in Critical Illness and Sepsis, Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation 2013; Article ID 413826, 1-8
9. ADMA-ELISA, Enzyme Immunoassay for the Quantitative Determination of Endogenous Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Serum or Plasma, Hamburg 2011; 1-16
10. <http://intimakmur.co.id/detail-product-cat/7/infectious-disease/39/elisa.html>, PT. INTI MAKMUR MEDITAMA, Diagnostic & Research Reagents Supplies
11. <http://www.b2b.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Protein-Expression-and-Analysis/elisa/ELISA-Validation.html>, Invitrogen Part of Life Technologies

12. SDMA-ELISA, Enzyme Immunoassay for the Quantitative Determination of Endogenous Symmetric Dimethylarginine (SDMA) in Serum or Plasma, Hamburg 2009; 1-16
13. Štraus Božidar , Medicinska biokemija, Zagreb 1992; 317-322
14. Stojanović N, Čvorišćec D, Rogić D, Primjena jednadžbi za procjenu klirensa kreatinina odnosno brzine glomerulne filtracije, Biochemia Medica Zagreb 2005; 1-7
15. Gorenjak Maksimiljan, Določitev kreatinina in ocena glomerulne filtracije, Ljubljana 2009; 4-12
16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14500028> - Fleck C, Schweitzer F, Karge E, Busch M, Stein G.