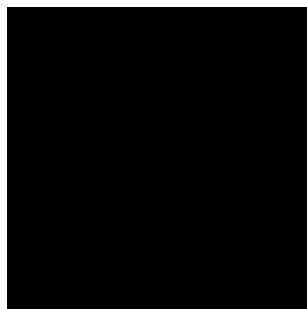


Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Studijní program: Biochemie a patobiochemie



MUDr. Ing. Magdaléna Fořtová

Biomarkery časného poškození ledvin

Biomarkers of early renal injury

Dizertační práce

Školitel: prof. MUDr. Richard Průša, CSc.

Praha, 2018

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze, 17. 9. 2018

Magdaléna Fořtová

Podpis:

IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM

FORŤOVÁ, Magdaléna. *Biomarkery časného poškození ledvin. [Biomarkers of early renal injury]*. Praha, 2018. 154 s. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Ústav lékařské chemie a klinické biochemie. Školitel: Průša, Richard.

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych ráda poděkovala především:

Mému školiteli Prof. MUDr. Richardu Průšovi, CSc. Jemu patří největší poděkování, a to hlavně za hodnotné rady a konzultace, trpělivou a vstřícnou pomoc a neustále nové podněty při řešení zvoleného tématu v průběhu celého mého postgraduálního studia, při psaní odborných publikací i dizertační práce. Oceňuji jeho rozsáhlé odborné kvality a děkuji mu také za jeho lidský přístup, kterého si velmi vážím.

RNDr. Bruno Sopkovi, Ph.D., mému kolegovi z Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF UK a FN Motol, za pomoc při statistickém vyhodnocování naměřených dat, za výbornou spolupráci při sepisování odborných publikací a při výzkumné činnosti.

Ing. Evě Klapkové, Ph.D., mé kolegyni z Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF UK a FN Motol, za trpělivou pomoc při zavádění HPLC metody pro stanovení albuminurie a za spolupráci při psaní odborných publikací.

Ing. Martě Pechové, mé kolegyni z Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF UK a FN Motol, za pomoc při sběru vzorků a s metodou CMIA pro stanovení NGAL.

Ing. Blance Jedličkové, mé kolegyni z Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF UK a FN Motol, za pomoc při vyhledávání různých analytických údajů.

Dalším kolegům z Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF UK a FN Motol, především pak vedoucí laborantce úseku HPLC metod Václavě Havránkové, za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Prof. MUDr. Tomáši Seemanovi, CSc. a Doc. MUDr. Květě Bláhové, CSc. z Pediatrické kliniky 2. LF UK a FN Motol za vynikající spolupráci při výzkumu u dětských pacientů a sepisování odborných článků.

MUDr. Janu Lejskovi (v současné době řediteli Zdravotnické záchranné služby Libereckého kraje) dříve z Kliniky anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny 2. LF UK a FN Motol za spolupráci při výzkumu u dospělých pacientů po kardiochirurgických výkonech.

MUDr. Davidu Zemánkovi, Ph.D. a MUDr. Milanu Oravcovi z Kardiologické kliniky 2. LF UK a FN Motol za spolupráci při výzkumu u dospělých pacientů po angiografiích.

Prof. MUDr. Sylvii Dusilové Sulkové, DrSc. za objevení kouzla oboru nefrologie a záliby ve vědecké činnosti a za rozsáhlou a velmi zajímavou spolupráci v minulosti.

Jeden z mých největších díků patří mojí mamince a mému synovi Vojtíškovi, bez jejichž podpory, pochopení a obrovské pomoci bych se neobešla a tato práce by nevznikla. Ráda bych poděkovala i zbytku rodiny; hlavně mému tátovi, jenž tady bohužel už být nemůže. Vždy mi věřil a podporoval mě a za to mu jsem a celý život budu nesmírně vděčná.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	9
1. ÚVOD	11
1.1. Poškození funkce ledvin, terminologie	11
1.2. Chronické onemocnění ledvin	11
1.2.1. Vyšetření glomerulární filtrace	13
1.2.1.1. Metody měření glomerulární filtrace se sběrem moči	14
1.2.1.1.1. Renální clearance endogenního kreatininu.....	14
1.2.1.1.2. Clearance inulinu.....	15
1.2.1.2. Metody měření glomerulární filtrace bez sběru moči	16
1.2.1.2.1. Výpočtové metody odhadu glomerulární filtrace ze sérového kreatininu.....	16
1.2.1.2.1.1. Odhad clearance kreatininu podle Cockcrofta a Gaulta.....	16
1.2.1.2.1.2. Odhad glomerulární filtrace pomocí rovnic MDRD a CKD-EPI.....	16
1.2.1.2.1.3. Odhad glomerulární filtrace pomocí rovnice Lund-Malmö.....	17
1.2.1.2.1.4. Odhad glomerulární filtrace pomocí kvadratické rovnice Mayo Clinic.....	19
1.2.1.2.1.5. Odhad glomerulární filtrace u dětí a mladistvých.....	19
1.2.1.2.1.6. Odhad glomerulární filtrace u populace celého věkového spektra.....	19
1.2.1.2.2. Výpočtové metody odhadu glomerulární filtrace ze sérového cystatinu C.....	20
1.2.1.2.3. Odhad glomerulární filtrace ze sérového kreatininu a cystatinu C.....	22
1.2.1.2.3.1. Odhad glomerulární filtrace u populace ve věku 70 let a více.....	22
1.2.1.2.4. Izotopové metody vyšetření glomerulární filtrace.....	23
1.2.1.2.5. Plazmatická clearance iohexolu.....	24
1.2.2. Vyšetřování proteinurie	24
1.2.2.1. Klasifikace zvýšeného vylučování bílkovin do moči.....	24
1.2.2.2. Stanovení celkových proteinů a PCR.....	26
1.2.2.3. Stanovení albuminu a ACR.....	27
1.3. Akutní poškození ledvin	30
1.3.1. Markery akutního poškození ledvin	34
1.3.1.1. Cystatin C.....	34
1.3.1.2. N-acetyl- β -D-glukózáminidáza.....	35
1.3.1.3. Kidney injury molecule-1.....	36

1.3.1.4. Interleukin-18.....	38
1.3.1.5. Liver-type fatty acid-binding protein a heart-type fatty acid-binding protein.....	41
1.3.1.6. Neutrofilní s gelatinázou asociovaný lipokalin.....	45
1.3.1.7. Korekce močových markerů akutního poškození ledvin na močový kreatinin.....	51
1.3.1.8. Současná doporučení pro vyšetřování markerů akutního poškození ledvin.....	53
2. CÍLE PRÁCE.....	54
3. METODY.....	55
3.1. Stanovení albuminurie HPLC a sledování vztahu k diagnóze diabetes mellitus.....	55
3.1.1. HPLC metoda pro stanovení albuminurie a testování hypotézy o interferujících proteinech.....	55
3.1.1.1. HPLC sestava a reagentie.....	55
3.1.1.2. Vývoj a validace HPLC metody a testování interferencí.....	55
3.1.2. Imunoturbidimetrická metoda pro stanovení albuminurie.....	66
3.1.3. Testování hypotézy o existenci imunonereaktivního albuminu.....	66
3.1.4. Testování stability albuminu metodou HPLC.....	66
3.1.5. Porovnání HPLC a imunoturbidimetricky stanovené albuminurie v patientských vzorcích a sledování vztahu k diagnóze diabetes mellitus.....	66
3.1.6. Stanovení kreatininu v moči.....	67
3.1.7. Stanovení glykovaného hemoglobinu v krvi.....	68
3.1.8. Statistické zpracování.....	69
3.2. Stanovení močového NGAL u dětí po transplantaci ledviny.....	69
3.2.1. Soubor pacientů.....	69
3.2.2. Stanovení NGAL v moči.....	70
3.2.3. Stanovení sérového kreatininu.....	70
3.2.4. Stanovení sérového „high senzitivity“ C-reaktivního proteinu.....	71
3.1.5. Statistické zpracování.....	71
3.3. Stanovení močového NGAL u dětí s akutním nebo s chronickým onemocněním ledvin.....	72
3.3.1. Soubor pacientů.....	72
3.3.2. Stanovení NGAL v moči.....	72
3.3.3. Stanovení kreatininu v moči.....	72

3.3.4. Statistické zpracování.....	72
3.4. Stanovení močového NGAL u dospělých pacientů po kardiochirurgických výkonech.....	73
3.4.1. Soubor pacientů.....	73
3.4.2. Stanovení NGAL v moči.....	73
3.4.3. Stanovení kreatininu v séru a v moči.....	73
3.4.4. Statistické zpracování.....	73
3.5. Stanovení markerů poškození ledvin u dospělých pacientů po angiografii.....	74
3.5.1. Soubor pacientů.....	74
3.5.2. Stanovení kreatininu v séru a v moči.....	74
3.5.3. Stanovení cystatinu C v séru.....	75
3.5.4. Stanovení NGAL v moči.....	75
3.5.5. Stanovení NAG v moči.....	75
3.5.6. Stanovení albuminu v moči imunoturbidimetry a HPLC.....	76
3.5.7. Stanovení α -1-mikroglobulinu v moči.....	76
3.5.8. Statistické zpracování.....	76
4. VÝSLEDKY.....	77
4.1. Stanovení albuminurie HPLC a sledování vztahu k diagnóze diabetes mellitus.....	77
4.1.1. Stanovení albuminurie HPLC v náhodně vybraných vzorcích patientských močí.....	77
4.1.2. Testování hypotézy o existenci imunonereaktivního albuminu.....	78
4.1.3. Porovnání HPLC a imunoturbidimetry stanovené albuminurie v patientských vzorcích a sledování vztahu k diagnóze diabetes mellitus.....	80
4.2. Stanovení močového NGAL u dětí po transplantaci ledviny.....	86
4.2.1. Stanovení příčiny AKI, výsledky renálních biopsií.....	86
4.2.2. Močové koncentrace NGAL a ostatní biochemické nálezy.....	86
4.3. Stanovení močového NGAL u dětí s akutním nebo s chronickým onemocněním ledvin.....	87
4.4. Stanovení močového NGAL u dospělých pacientů po kardiochirurgických výkonech.....	92
4.4.1. Pooperační renální a oběhové komplikace, rozdělení souboru pacientů.....	92
4.2.2. Biochemické nálezy.....	92

4.5. Stanovení markerů poškození ledvin u dospělých pacientů po angiografii.....	96
4.5.1. Rozdělení souboru pacientů.....	96
4.5.2. Biochemické nálezy.....	96
5. DISKUZE.....	104
5.1. Stanovení albuminurie HPLC a sledování vztahu k diagnóze diabetes mellitus.....	104
5.2. Stanovení močového NGAL u dětí po transplantaci ledviny.....	109
5.3. Stanovení močového NGAL u dětí s akutním nebo s chronickým onemocněním ledvin.....	111
5.4. Stanovení močového NGAL u dospělých pacientů po kardiochirurgických výkonech.....	115
5.5. Stanovení markerů poškození ledvin u dospělých pacientů po angiografii.....	119
6. ZÁVĚR.....	126
7. SOUHRN.....	127
SUMMARY.....	128
8. LITERATURA.....	129
9. SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK.....	151
10. SEZNAM PUBLIKACÍ.....	153

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

- ⁵¹Cr-EDTA: etylendiamintetraoctová kyselina
- ^{99m}Tc-DTPA: dietylentriaminpentaoctová kyselina
- ACR: albumin/creatinine ratio (poměr močový albumin/močový kreatinin)
- AKI: acute kidney injury (akutní poškození ledvin)
- Alpha GST: alpha-glutathione S-transferase
- ANOVA: analysis of variance (analýza rozptylu)
- APACHE skóre: acute physiology and chronic health evaluation score
- ASL: akutní selhání ledvin
- AU: albuminurie
- AUC: area under the curve (plocha pod křivkou)
- AUROC: area under the receiver operating characteristic curve (plocha pod ROC křivkou)
- BIS: the Berlin initiative study
- BMI: body mass index
- CAPA: Caucasian, Asian, Pediatric and Adult cohorts
- CIN: contrast-medium induced nephropathy (kontrastní látkou indukovaná nefropatie)
- CKD: chronic kidney disease (chronické onemocnění ledvin)
- CKD-EPI: Chronic Kidney Disease-Epidemiology
- C_{kr}: clearance sérového kreatininu
- CMIA: chemiluminescent microparticle immunoassay technology
- CRP: C reaktivní protein
- eGF: estimated glomerular filtration (odhadnutá glomerulární filtrace)
- ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay
- ERA-EDTA: European Renal Association – European Dialysis and Transplant Association
- FAS: the full age spectrum
- G-CSF: granulocyte colony stimulating factor (granulocytární kolonie stimulující faktor)
- GF: glomerulární filtrace
- H-FABP: heart-type fatty acid-binding protein (kardiální protein vázající mastné kyseliny)
- HGF: hepatocyte growth factor (hepatocytární růstový faktor)
- HIV: human immunodeficiency virus (virus lidské imunitní nedostatečnosti)
- HPLC: high-performance liquid chromatography (vysokoučinná kapalinová chromatografie)
- HUS: hemolyticko-uremický syndrom
- CHRI: chronická renální insuficience
- CHSL: chronické selhání ledvin
- IFCC: International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

IGF-1: insulin-like growth factor 1 (inzulinu podobný růstový faktor 1)
IGFBP-7: insulin-like growth factor-binding protein-7 (vazebný protein pro inzulinu podobný růstový faktor 7)
IL-17: interleukin 17
IL-18: interleukin 18
IL-1- β : interleukin 1 beta
IL-6: interleukin 6
IT: imunoturbidimetrie
KDIGO: Kidney Disease: Improving Global Outcomes
KIM-1: kidney injury molecule-1 (molekula poškození ledvin-1)
KL: kontrastní látka
LCFAs: long-chain fatty acids (mastné kyseliny s dlouhým řetězcem)
LC-MS/MS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry (tandemová kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií)
L-FABP: liver-type fatty acid-binding protein (jaterní protein vázající mastné kyseliny)
LMR rovnice: revidovaná rovnice Lund-Malmö
MDRD: Modification of Diet in Renal Disease
MMP-9: matrixová metaloproteináza 9
mRNA: messengerová ribonukleová kyselina
NAG: N-acetyl- β -D-glukózaminidáza
NF- κ B: nukleární faktor kappa B
NGAL: neutrofilní s gelatinázou asociovaný lipokalin
PCI: perkutánní koronární intervence
PCR: protein/creatinine ratio (poměr močový protein/močový kreatinin)
Pii GST: glutathione S-transferase pi
P_{kr}: koncentrace kreatininu v plazmě
RIA: radioimunoanalýza
RIFLE klasifikace: Risk–Injury–Failure–Loss–End-stage kidney disease klasifikace
S_{cyst}, S-cystatin C: koncentrace cystatinu C v séru
S_{kr}, S-kreat: koncentrace kreatininu v séru
TGF- α : transforming growth factor-alfa (transformující růstový faktor-alfa)
TIMP-2: tissue inhibitor of metalloproteinase 2
U_{kr}, U-kreat: koncentrace kreatininu v moči
U_{Na}: koncentrace natria v moči
V: objem
YKL-40: 40 kDa heparin and chitin-binding glycoprotein

1. ÚVOD

1.1. Poškození funkce ledvin, terminologie

Snížení glomerulární filtrace (GF) do přibližně 50 % fyziologické hodnoty (v některých případech až do 75 %) nevede ke změnám ve složení vnitřního prostředí, nebo jen ke změnám krátkodobým při vysokých nárocích na organismus. K vzestupu koncentrace sérového kreatininu dochází až při poklesu glomerulární filtrace zhruba na 50 % fyziologické hodnoty. Stadium poklesu glomerulární filtrace bez vzestupu koncentrace sérového kreatininu se nazývá snížení funkce ledvin nebo mírná renální insuficience (Teplan V., 2003).

Selhání funkce ledvin (renální insuficience) je charakterizováno stavem, kdy ledviny nejsou schopny vylučovat dusíkaté katabolity, vodu a elektrolyty ani za bazálních podmínek. Následkem toho dochází k poruše homeostázy v lidském organismu, snížením množství vznikající moči dojde k zadržování vody a vzniku otoků. Hromadící se odpadní látky mohou toxicky působit na ostatní orgány v těle a způsobovat tak další komplikace. Při selhání ledvin je porušena také acidobazická rovnováha, syntéza (erythropoetin, kalcitriol, renin, renální prostaglandiny) i degradace hormonů (inzulin, glukagon, kalcitonin, parathormon) a metabolitů (glukoneogeneze, interkonverze aminokyselin; Teplan V., 2006).

Termín konečné selhání funkce ledvin (anglicky end-stage renal disease, ESRD) popisuje případy, kdy udržení homeostázy celého organismu není možné bez náhrady funkce ledvin (hemodialýza, peritoneální dialýza, transplantace; Viklický O., 2006).

Selhání ledvin se může vyvinout náhle u člověka, jehož funkce ledvin byla předtím normální, tento stav označujeme jako akutní selhání ledvin (ASL). Vzhledem k možnosti přesnějšího určení časných fází poškození ledvin ischemického či toxického původu v současné době označení akutní selhání ledvin nahrazujeme termínem akutní poškození ledvin (z angl. „acute kidney injury“, AKI). Selhání ledvin, které je důsledkem chronického renálního onemocnění, kdy docházelo k postupnému poklesu renálních funkcí, označujeme jako chronické selhání ledvin (CHSL), chronická renální insuficience (CHRI) nebo, v současné době nejčastěji používaný pojem, chronické onemocnění ledvin (z angl. „chronic kidney disease“, CKD; Viklický O., 2006; Teplan V. a Trbušek J., 2010).

1.2. Chronické onemocnění ledvin

Chronické onemocnění ledvin (CKD) je definováno jako funkční nebo strukturální abnormalita ledvin, která trvá déle než 3 měsíce a má dopad na zdraví nositele. Kritéria pro CKD (jakékoliv z následujících přítomné déle než 3 měsíce; Zima T. et al., 2014):

- přítomnost poškození ledvin nebo
- pokles funkce ledvin (pod 1,0 ml/s/1,73 m²).

Ukazatele poškození ledvin jsou:

- Albuminurie ≥ 30 mg/24 hodin nebo poměr albumin/kreatinin $\geq 3,0$ mg/mmol;
- Nález v močovém sedimentu (např. erytrocytární válce, leukocytární válce, granulované válce);
- Nález ukazující na renální tubulární poruchy = elektrolytové a jiné poruchy vnitřního prostředí způsobené tubulárními poruchami (např. renální tubulární acidóza, renální tubulární proteinurie);
- Histologický nález při biopsii;
- Nález zjištěný zobrazovacími metodami (např. polycystické ledviny, hydronefróza způsobená obstrukcí);
- Anamnéza transplantace ledvin.

Pacient s CKD by měl být klasifikován podle:

- Příčiny (např. diabetické CKD, CKD způsobené amyloidózou);
- Kategorie podle glomerulární filtrace (G1, G2, G3a, G3b, G4, G5; tab. 1);
- Kategorie podle albuminurie (A1, A2, A3; tab. 2).

Kategorie	Glomerulární filtrace [ml/s/1,73 m ²]
G1	$\geq 1,50$
G2	1,0 až 1,49
G3a	0,75 až 0,99
G3b	0,5 až 0,74
G4	0,25 až 0,49
G5	$< 0,25$ = selhání ledvin

Tab. 1. Kategorie CKD podle glomerulární filtrace (není-li přítomno poškození ledvin, kategorie G1 a G2 nesplňují kritéria CKD; KDIGO 2012; Zima et al., 2014)

Kategorie	Albuminurie [mg/ 24 h]	ACR [mg/mmol]	Proteinurie [mg/ 24 h]	PCR [mg/mmol]
A1	< 30	< 3	< 150	< 15
A2	30 až 300	3 až 30	150 až 500	15 až 50
A3	> 300	> 30	> 500	> 50

Tab. 2. Kategorie CKD podle albuminurie a porovnání s proteinurií

ACR (albumin/creatinine ratio): poměr močový albumin/močový kreatinin,

PCR (protein/creatinine ratio): poměr močový protein/močový kreatinin (KDIGO 2012; Zima T. et al., 2014)

Riziko stoupá kontinuálně s klesající glomerulární filtrací a stoupající albuminurií, důležité je brát v úvahu také příčinu CKD a event. další komorbidity (Zima T. et al., 2014). Ke vzniku a rozvoji CKD vedou nejčastěji diabetes mellitus 2. typu (cca 30 %, se vzrůstající tendencí) a vaskulární příčiny (arteriální hypertenze, arterioskleróza, cca 22 %, opět se vzrůstající tendencí). Onemocnění glomerulů vedou k selhání ledvin cca ve 12 % případů, následovány jsou intersticiálními nefritidami cca v 8 % případů. Raritnější příčiny CKD jsou dědičné nefropatie (zejména polycystické onemocnění ledvin), diabetes mellitus 1. typu a systémová onemocnění. V méně než 10 % není příčina CKD zjištěna. K postupnému selhání ledvin dochází během několika let až desetiletí (Vachek J. et al., 2012).

Prevalence a incidence CKD se v populaci neustále zvyšuje (což souvisí především s nárůstem zmíněných civilizačních chorob), často se užívá termínu epidemie chronického onemocnění ledvin. Incidence CKD se v rozvinutých zemích západní Evropy odhaduje na 10/100 000 obyvatel ročně, prevalence CKD definovaného jako $GFR < 1 \text{ ml/s/1,73 m}^2$ je okolo 12 %. Prudký nárůst výskytu CKD v populaci vede k závažným zdravotním následkům pro jednotlivce, přičemž nejde pouze o progresi do konečného stadia selhání ledvin, ale především o zvýšení kardiovaskulární morbidity a mortality (Zakiyanov O. et al., 2014).

1.2.1. Vyšetření glomerulární filtrace

Glomerulární filtrace je (spolu s tubulární resorpcí a sekrecí) jedním ze základních mechanismů sloužících k udržení homeostázy vnitřního prostředí. Faktory rozhodující o filtraci v glomerulárních kapilárách jsou: rozsah kapilárního řečiště (velikost filtrační plochy), permeabilita kapilár a gradienty hydrostatických a onkotických tlaků přes kapilární stěnu.

Určení GF je základním postupem pro posouzení funkce ledvin a současně je trvalým problémem, kdy existuje řada postupů snažících se optimalizovat odhad glomerulární filtrace (Teplan V. a Zima T., 2008). Navíc, stejně jako každé fyziologické měření, se i GF vyznačuje vnitřní biologickou variabilitou, jejíž pochopení je zásadní pro správné hodnocení změn souvisejících s onemocněním. Hodnoty biologického koeficientu variability GF pro jednotlivce byly popsány v rozmezí 5 až 12 % (Lamb E. J. a Stevens P. E., 2014).

V současné době měříme GF pomocí clearance endogenního nebo exogenního markeru filtrace. Všechny metody pro zjištění clearance jsou složité, hlavním limitujícím faktorem je správný sběr moči. Proto je v klinické praxi GF nejčastěji odhadována z více či méně komplikovaných rovnic (počítáme tzv. eGF, estimated glomerular filtration) vycházejících ze sérové koncentrace kreatininu, popřípadě sérové koncentrace cystatinu C (Zima T. et al., 2014).

1.2.1.1. Metody měření glomerulární filtrace se sběrem moči

1.2.1.1.1. Renální clearance endogenního kreatininu

Koncentrace sérového kreatininu (S_{kr}) je samotná nepřesně prediktivní. Významné je její užití ve výpočtových vzorcích pro stanovení clearance kreatininu (C_{kr}) či GF. Je ovlivněna množstvím svalové hmoty (rozdíl hodnot u mužů, žen a dětí, ale též s ohledem na věk, když ve stáří svalové hmoty ubývá) a příjmem proteinů a aminokyselin (Zima T. et al., 2014).

Stanovení kreatininu se provádí nejčastěji dvěma základními metodami: 1. Jaffého a 2. enzymovou metodou. Principem Jaffého metody je reakce kreatininu s kyselinou pikrovou v alkalickém prostředí za vzniku oranžového komplexu. S kyselinou pikrovou však reaguje také glukóza, kyselina močová, askorbát, acetacetát, pyruvát a některé léky (např. cefalosporiny, trimetoprim, cimetidin). Enzymové stanovení kreatininu je specifitější, avšak finančně nákladnější. Referenční metodou stanovení kreatininu je plynová chromatografie s izotopovou dilucí a hmotnostní spektrometrií. Byly vytvořeny referenční materiály, od kterých se odvozují komerční soupravy pro stanovení kreatininu, které mají eliminovat nízkou specifitost stanovení (Zima T. et al., 2014).

Posouzení GF na podkladě S_{kr} vychází ze zjištění, že mezi těmito parametry existuje významná hyperbolická závislost. S klesající GF stoupá S_{kr} . Vzhledem k tomu, že závislost je hyperbolická (nikoli lineární), je vzestup S_{kr} při poklesu GF z hodnot normálních k hodnotám středně sníženým relativně malý, a proto i významný pokles GF může uniknout rozpoznání. Zvláště je toto důležité u pacientů se svalovou atrofií, malnutricí a závažnějším jaterním postižením (Zima T. et al., 2014).

Zatímco hodnota interindividuální variability S_{kr} je velká, malá intraindividuální variabilita dovoluje užít jeho stanovení při sledování vývoje onemocnění v čase. Hodnota S_{kr} není dostatečně validní pro určení GF, avšak slouží k základnímu nefrologickému vyšetření a vysoké hodnoty spolurozhodují o zahájení dialyzační léčby. Z hodnoty sérového (a močového) kreatininu vychází i výpočet kreatininové clearance (Zima T. et al., 2014).

U zdravého dospělého člověka clearance kreatininu jen lehce přesahuje GF (o 10 až 20 %) v důsledku nevelké tubulární sekrece kreatininu v proximálním tubulu. U jedinců s chronickým renálním onemocněním (CKD podle GF 4 až 5) se tubulární sekrece kreatininu relativně zvyšuje a v konečných stádiích chronického selhání ledvin může C_{kr} přesahovat GF o 100 i více procent (Zima T. et al., 2014).

Renální clearance kreatininu se počítá podle vzorce: $C_{kr} = (U_{kr} \cdot V) / S_{kr}$, kde: U_{kr} je koncentrace kreatininu v moči v $\mu\text{mol/l}$, V je objem moči vytvořený za sledovanou časovou jednotku v ml/s a S_{kr} je koncentrace kreatininu v krevním séru v $\mu\text{mol/l}$. Hodnota C_{kr}

poskytuje lepší představu o GF než odhad na základě S_{kr} , protože tato veličina není ovlivněna extrarenálními faktory působícími na hodnotu S_{kr} . Jde o extrarenální vylučování kreatininu především střevem u jedinců v pokročilejším stadiu CKD, změny distribučního prostoru kreatininu (zvláště u jedinců s velkými otoky), a zejména rozdíly v objemu svalové hmoty, event. i příjmu masa. Produkce kreatininu závisí též na funkci jater. V játrech je tvořen kreatin, který je uvolňován do cirkulace, vychytáván ve svalech, kde je neenzymaticky přeměněn na kreatinin. Hodnoty C_{kr} se přepočítávají na ideální tělesný povrch $1,73 \text{ m}^2$.

Pro výpočet C_{kr} je nutný přesný sběr moči, což může být v běžné denní praxi často velkým problémem a chyby v neúplném sběru moči znemožňují posoudit C_{kr} správně. To je jedním z hlavních důvodů, proč řada kliniků raději volí odhad GF z výpočtových vzorců, v nichž figuruje sérový (nikoliv však močový) kreatinin (Zima T. et al., 2014).

1.2.1.1.2. Clearance inulinu

Posouzení GF měřené na podkladě clearance inulinu se stále považuje za nejpřesnější a referenční metodu zjištění glomerulární filtrace, přestože se používá zcela vzácně. Inulin je fruktózový polysacharid, který volně prochází glomerulární membránou a v tubulech není ani resorbován ani secernován. Jeho relativní molekulová hmotnost se pohybuje okolo 5200, což odpovídá 32 molekulám fruktózy. Nevýhodou inulinu je, že není rozpustný ve studené vodě, což komplikovalo jeho přípravu k aplikaci. V současné době se používá polyfruktozan (což je rovněž fruktózový polymer), jehož relativní molekulová hmotnost je o 1000 menší než inulinu, je rozpustný ve vodě, což umožňuje jeho expedici v ampulích a snadnou aplikaci nárazové a udržovací dávky (Schück O. et al., 2006).

Měření renální clearance inulinu je založeno na principu přesného měření vyloučeného množství inulinu do moči za časovou jednotku za podmínek stabilizované plazmatické koncentrace. Vyžaduje přesné a metodicky poměrně náročné laboratorní vyšetření za standardních podmínek hydratace. Hodnota GF je počítána podle standardního clearancového vzorce (Zima T. et al. 2014; Schück O. et al., 2006).

Opět je však nutný přesný sběr moči a právě proto se rozšiřuje metoda, která spočívá pouze ve sledování plazmatických hladin inulinu a k výpočtu nevyžaduje znalost močového vylučování. Jestliže je během infuze při vyšetření plazmatická hladina stabilizována (na hodnotě P), pak můžeme předpokládat, že močové vylučování (UV) je stejně velké, jako je množství inulinu dodávaného infuzí (I_{inf}) a výpočet clearance může být proveden na podkladě vztahu: $C_{in} = I_{inf}/P$. Dojde-li k zakolísání P během vyšetřování, počítáme clearanci podle vzorce: $C_{in} = \text{celkové množství inulinu inundované během vyšetření}/AUC$. AUC (area under

the curve) značí plochu vymezenou plazmatickými koncentracemi a časovou osou (Schück O. et al., 2006).

1.2.1.2. Metody měření glomerulární filtrace bez sběru moči

1.2.1.2.1. Výpočtové metody odhadu glomerulární filtrace ze sérového kreatininu

Cílem všech výpočtových vzorců je odhad glomerulární filtrace bez sběru moči. Hodnota odhadnuté glomerulární filtrace (eGF, estimated glomerular filtration) však podléhá stejným analytickým (interference) a biologickým (neadekvátní svalová hmota, malnutrice, jaterní postižení) limitům jako stanovení sérového kreatininu (Zima T. et al., 2014).

1.2.1.2.1.1. Odhad clearance kreatininu podle Cockcrofta a Gaulta

Hodnoty C_{kr} vypočítané podle vzorce, který vytvořili Cockcroft a Gault, korelují s hodnotami C_{kr} změřenými na podkladě přesného sběru moči. Při přesném měření hodnot GF zvláště u jedinců s vysokou tělesnou hmotností a vyšších věkových kategorií však byly zaznamenány větší rozptyly hodnot. Proto je tento odhad již považován za obsolentní a neměl by se tudíž užívat (Zima T. et al., 2009; Zima T. et al., 2014).

1.2.1.2.1.2. Odhad glomerulární filtrace pomocí rovnic MDRD a CKD-EPI

V posledních letech se celosvětově nejvíce doporučovalo používat pro eGF metodu vypracovanou na podkladě velké multicentrické studie, která sledovala vliv příjmu bílkovin v potravě na rychlost progresu renálních onemocnění. Tato studie se označuje MDRD (Modification of Diet in Renal Disease). Na podkladě této studie, kterou vedl Levey a spol., byly krokovou multivariantní regresní analýzou odvozeny v roce 1999 tzv. MDRD rovnice. Nejdříve byla vyvinuta rovnice se šesti členy, následně byla zjednodušena na rovnici se čtyřmi členy a tato zjednodušená verze byla doporučována mezinárodně (tab. 3). V souvislosti se zaváděním standardizované metody stanovení kreatininu (kdy výsledky jsou metrologicky návazné na mezinárodní standard) a použitím metody stanovení ID-MS z roku 2005 je v případě stanovení kreatininu standardizovanou metodou rovnice modifikována (tab. 3). MDRD studie však zahrnovala pouze pacienty s chronickým onemocněním ledvin a MDRD rovnice mají i další nevýhody (např. u vypočtených hodnot vyšších než $1,5 \text{ ml/s/1,73 m}^2$ se doporučuje uvádět hodnotu $\geq 1,5 \text{ ml/s/1,73 m}^2$ vzhledem k nepřesnosti rovnice v této oblasti; Zima T. et al., 2014).

Proto byla stejnými autory snaha vytvořit rovnice nové, které budou použitelné i pro zdravou populaci. Výsledkem byly rovnice představené v roce 2009 tímto sdružením pro

epidemiologii chronického onemocnění ledvin (Chronic Kidney Disease-Epidemiology, CKD-EPI). Rovnice CKD-EPI jsou 4: pro muže a ženy, a vždy pro dvě pásma sérové koncentrace kreatininu (a podobně jsou 4 rovnice pro černou rasu) a byly odvozeny na souboru 5504 pacientů, interně validovány na souboru 2750 pacientů a externě na souboru 3896 pacientů. Poskytují výsledky nejbližší reálné GF a v současné době je doporučované k odhadu GF používat právě tyto rovnice (tab. 4, Jabor A. et al., 2009; KDIGO, 2012; Zima T. et al., 2014).

Je třeba poznamenat, že oba vzorce byly vytvořeny pro populaci v USA, a že tedy jednoduché přenesení do jiných zemí s odlišnou populací může být problematické (Viklický O., 2015). Koeficient pro černošské etnikum byl vytvořený pro použití u Afroameričanů, není použitelný u jiných populací afrického původu. V Australasii, Evropě a Severní Americe se rovnice CKD-EPI_{creat} lépe osvědčuje při vyšších hodnotách GF (> 1 ml/s/1,73 m²), zatímco rovnice MDRD je vhodnější při hodnotách nižších než 1 ml/s/1,73 m². Žádná z rovnic není u asijské nebo africké populace tak přesná jako u severoamerické nebo evropské populace (Lamb E. J. a Stevens P. E., 2014).

Vzorec pro výpočet eGF [ml/s/1,73 m ²]	
547,1535 . S _{kr} ^{-1,154} . věk ^{-0,203} . 0,742 (ženy). 1,21 (černá populace)	
515,3832 . (stand.S _{kr}) ^{-1,154} . věk ^{-0,203} . 0,742 (ženy). 1,21 (černá populace)	

Tab. 3. Rovnice MDRD (1999) a její modifikace pro stanovení kreatininu standardizovanou metodou (2005) (přejato z lit. Zima T. et al., 2014)

	S _{kr} [μmol/l]	Vzorec pro výpočet eGF [ml/s/1,73 m ²]
Ženy	≤ 62	2,4 . (S _{kr} /61,9) ^{-0,329} . 0,993 ^{věk} . 1,159 (černá populace)
	> 62	2,4 . (S _{kr} /61,9) ^{-1,209} . 0,993 ^{věk} . 1,159 (černá populace)
Muži	≤ 80	2,35 . (S _{kr} /79,6) ^{-0,411} . 0,993 ^{věk} . 1,159 (černá populace)
	> 80	2,35 . (S _{kr} /79,6) ^{-1,209} . 0,993 ^{věk} . 1,159 (černá populace)

Tab. 4. Rovnice CKD-EPI z roku 2009 (přejato z lit. Zima T. et al., 2014)

1.2.1.2.1.3. Odhad glomerulární filtrace pomocí rovnice Lund-Malmö

Zcela nový přístup zastávají Skandinávci. Rovnice označovaná jako Lund-Malmö byla publikována Björkem v roce 2007 (Björk J. et al., 2007) a její použití pro dětský věk bylo ověřeno v roce 2008 (Nyman U. et al., 2008). V roce 2011 byla rovnice Lund-Malmö revidovaná (Björk J. et al., 2011). Obdobně jako originální rovnice byla odvozena na švédské populaci (N = 850, věk 18 až 95 let) a vykazuje správnější výsledky než rovnice původní, a to

především v oblasti glomerulární filtrace $\geq 1,5 \text{ ml/s/1,73 m}^2$. Výsledky byly vztahovány k měřené GF pomocí plazmatické clearance iohexolu a porovnávány rovnicemi CKD-EPI a MDRD. Autoři uzavírají, že rovnice Lund-Malmö jsou pro současnou švédskou populaci nejlepší volbou pro odhad GF, nelze je však doporučit pro použití ve všeobecné klinické praxi, dokud nebudou validovány též u jiných populací.

V rovnicích je zohledněna plazmatická koncentrace kreatininu, pohlaví a věk. Je doporučována též korekce na „libovou“ hmotu (lean body mass), která se určuje postupem podle Jamese z tělesné výšky (doporučený interval 67 až 189 cm) a hmotnosti (doporučený interval 8 až 111 kg; Jabor A. et al., 2009; Jabor A., 2010).

V roce 2014 Nyman, Björk a spolupracovníci publikovali výsledky své další studie, která porovnávala rovnice MDRD a CKD-EPI s revidovanou Lund-Malmö rovnicí u 2847 dospělých švédských pacientů. Výsledky byly vztahovány k plazmatické clearance iohexolu (mGF). Revidovaná rovnice Lund-Malmö vykazovala opět nejlepší všechny validační parametry. MDRD a CKD-EPI nadhodnocovaly mGF u pacientů se sníženou funkcí ledvin, u mladých dospělých a u starších osob. Všechny tři rovnice nadhodnocovaly mGFR a vykazovaly nízkou správnost u pacientů s BMI $< 20 \text{ kg/m}^2$, zřetelněji u mužů.

Nejrecentnější Björkova studie (Björk J. et al., 2018) srovnává několik rovnic k odhadu glomerulární filtrace u Evropanů ve věku ≥ 70 let: revidovanou Lund-Malmö (LMR), BIS (the Berlin Initiative Study), FAS (the Full Age Spectrum) a CKD-EPI. Právě revidovaná rovnice Lund-Malmö prokázala nejlepší výsledky. Tato rovnice byla testovaná i na Korejské populaci (Ji M. et al., 2016), kdy byla porovnávána s rovnicemi MDRD a CKD-EPI. LMR vykazovala obdobné výsledky jako MDRD; tyto dvě rovnice spolu velmi významně korelovaly. LMR (nikoliv MDRD) rovnice však významně podhodnocovala eGF u Korejské populace ve věku ≥ 60 let.

Rovnice Lund-Malmö by mohly být optimální variantou pro odhad GF z řady důvodů – jsou odvozeny pro standardizované stanovení kreatininu, je možné je použít jak pro dospělé, tak pro děti od 1 roku života, dobře korelují se standardní metodou měření GF, původní verzi lze použít v rozsahu kreatininu od 45 do 545 $\mu\text{mol/l}$, revidovanou ještě v širším (Jabor A., 2010).

Výpočet odhadu GF podle rovnice Lund-Malmö by mohla být alternativou pro dosud používané metody výpočtu eGF. Tato rovnice však byla vyvinuta pouze na švédské populaci; etnické rozdíly by proto mohly odhad GF ovlivnit. V současné době je potvrzená platnost i u Evropské populace staršího věku (Björk J. et al., 2018).

1.2.1.2.1.4. Odhad glomerulární filtrace pomocí kvadratické rovnice Mayo Clinic

Rovnice byla vyvinuta na Mayo Clinic a publikována v roce 2004 (Rule A. D. et al., 2004). Byla odvozena na pacientech s chronickým onemocněním ledvin a na zdravých lidech. Autoři uvádějí jako jednu z jejích výhod, že dokáže lépe stanovit GF u lidí se zachovanou renální funkcí (ve srovnání s MDRD rovnicemi). Tato rovnice však u nás nedoznala většího rozšíření.

1.2.1.2.1.5. Odhad glomerulární filtrace u dětí a mladistvých

Na základě současných poznatků Česká pediatrická společnost, Česká nefrologická společnost a Česká společnost klinické biochemie ČLS JEP doporučují pro výpočet odhadu glomerulární filtrace u dětí a mladistvých do 18 let používat rovnici podle Schwartzze z roku 1987 a 2009: $eGF = (F \cdot \text{výška})/S_{kr}$ [ml/s/1,73 m²], kde výška je vyjádřena v cm, S_{kr} v $\mu\text{mol/l}$ a F je faktor dán následující tabulkou :

Podmínky	Faktor F (stanovení S_{kr} Jaffého metodou)	Faktor F (stanovení S_{kr} enzymatickou metodou)
Věk do 1 roku	0,663 0,487 u předčasně narozených	0,60
Dívky, věk od 1 do 18 let	0,810	0,60
Chlapci, věk od 1 do 12 let	0,810	0,60
Chlapci, věk od 12 do 18 let	0,959	0,60

Tab. 5. Faktor F Schwartzovy rovnice vycházející ze sérového kreatininu stanoveného Jaffého metodou a enzymaticky (přejato z lit. Zima T. et al., 2014)

V roce 2012 bylo publikováno, že korekce Jaffého metody na celkovou bílkovinu podává srovnatelné výsledky s enzymatickou metodou (Speeckaert M. M. et al., 2012). V roce 2009 Schwartz a spolupracovníci vyvinuli novou rovnici pro dětský věk založenou na výšce, sérovém kreatininu, cystatinu C, močovíně a pohlaví, která však do doporučení našich odborných společností nebyla dosud zahrnuta (Schwartz G. J. et al., 2009).

Některé země (např. skandinávské) k odhadu GF u dětí používají rovnici Counahana a Barratta (Counahan R. et al., 1976). Tato jednoduchá rovnice je obdobou Schwartzovy rovnice: $eGF = (0,43 \cdot \text{výška})/S_{kr}$ [ml/s/1,73 m²].

1.2.1.2.1.6. Odhad glomerulární filtrace u populace celého věkového spektra

V roce 2016 Pottel a spolupracovníci vyvinuli a validovali rovnici pro odhad glomerulární filtrace, která může být použita v celém věkovém spektru (the Full Age Spectrum equation, FAS): $FAS (eGF) = 107,3/(S_{kr}/Q)$ pro věk ≥ 2 roky a ≤ 40 let,

$$FAS (eGF) = 107,3/(S_{kr}/Q) \times 0,988^{(\text{věk}-40)} \text{ pro věk } >40 \text{ let.}$$

Rovnice je založena na normalizovaném sérovém kreatininu (S_{kr}/Q), kde Q je medián sérového kreatininu ze zdravých populací s ohledem na věk a pohlaví. Koeficienty pro rovnici zajišťují kontinuitu během přechodu z pediatrického do mladšího dospělého věku a ze středního do staršího dospělého věku. Do studie bylo zařazeno celkem 6870 osob bílé rasy (zdravých a s renální insuficiencí), z toho 735 dětí ve věku <18 let, 4371 dospělých ve věku 18 až 70 let a 1764 starších dospělých ve věku ≥ 70 let s naměřenou hodnotou GF (clearance inulinu, iohexolu, iothalamátu). FAS rovnice vykazovala menší hodnotu bias a vyšší správnost u dětí a dospívajících (ve srovnání se Schwartzovým vzorcem) a u starších dospělých (ve srovnání s rovnicí CKD-EPI), u dospělých mladšího a středního věku byly validační parametry srovnatelné s rovnicí CKD-EPI. FAS rovnice tedy zajišťuje kontinuitu hodnot eGF v celém věkovém spektru a překonává problém nepředvídatelných změn eGF u pacientů, které by jinak nastaly v přelomových věkových obdobích (v 18 a 70 letech) v důsledku používání různých věkově specifických rovnic (Pottel H. et al., 2016).

1.2.1.2.2. Výpočtové metody odhadu glomerulární filtrace ze sérového cystatinu C

Cystatin C je mikroprotein, který patří do velké rodiny inhibitorů cysteinových proteáz. Je vytvářen všemi jadernými buňkami. Díky malé molekulové hmotnosti (13,5 kDa) volně prochází glomerulární membránou a následně je zachycován a metabolizován tubulárními buňkami, takže do peritubulární extracelulární tekutiny žádný cystatin C neprechází. Výsledkem těchto procesů je, že očišťování extracelulární tekutiny od cystatinu C je přímo úměrné glomerulární filtraci. Sérové koncentrace cystatinu C jsou v průběhu 24 hodin téměř konstantní. Cystatin C není secernován tubulárními buňkami, jeho nález v definitivní moči ukazuje na poškození tubulárních buněk (Zima T. et al., 2014).

Řada prací nasvědčuje tomu, že sérové koncentrace cystatinu C se zvyšují při malém poklesu glomerulární filtrace dříve než sérové koncentrace kreatininu (v tzv. slepé oblasti pro sérový kreatinin), a proto je tato látka považována za citlivější indikátor mírného poklesu glomerulární filtrace. Při větším poklesu GF (pod 0,7 ml/s/1,73 m²) nebyl prokázán významný rozdíl v senzitivitě ve srovnání se sérovým kreatininem.

V minulosti byly doporučovány pro odhad GF ze sérového cystatinu C rovnice podle Grubba: $eGF = 1,4115 \cdot S_{cyst}^{-1,680} \cdot F$ [ml/s/1,73 m²] v případě imunoturbidimetrického stanovení a rovnice podle Leveyova: $eGF = 1,278 \cdot S_{cyst}^{-1,19} \cdot F$ [ml/s/1,73 m²] v případě imunonefelometrického stanovení (ve kterých $F = 1,384$ pro děti do 14 let, 1 pro muže a 0,948 pro ženy, S_{cyst} je vyjádřen v jednotkách mg/l). U pacientů s pokročilým renálním selháním, kde dochází k poklesu GF pod 0,3 ml/s, se tyto rovnice nedají použít.

Podle posledních doporučení České nefrologické společnosti a České společnosti klinické biochemie by se pro odhad GF ze sérového cystatinu C u dospělých měly užívat rovnice CKD-EPI z roku 2012, cystatin C musí být stanoven metodou metrologicky navázanou na referenční materiál DA ERM 471/IFCC (tab. 6, Zima T. et al., 2014).

S_{cyst} [mg/l]	Vzorec pro výpočet eGF [ml/s/1,73 m ²]
$\leq 0,8$	$2,217 \cdot (S_{cyst}/0,8)^{-0,499} \cdot 0,996^{věk} \cdot 0,932$ (pro ženy)
$> 0,8$	$2,217 \cdot (S_{cyst}/0,8)^{-1,328} \cdot 0,996^{věk} \cdot 0,932$ (pro ženy)

Tab. 6. Rovnice CKD-EPI (cystatin C) z roku 2012 (přejato z lit. Zima T. et al., 2014)

V roce 2014 Grubb a spolupracovníci vyvinuli jednoduchou rovnici pro odhad GF z cystatinu C, obsahující pouze 2 proměnné (koncentraci cystatinu C a věk):

$eGF = 130 \cdot S_{cyst}^{-1,069} \cdot věk^{-0,117} - 7$. Pro její optimální diagnostickou účinnost nejsou nutné členy určující etnicitu a pohlaví (Grubb A. et al., 2014; rovnice je též označovaná jako CAPA od „Caucasian, Asian, Pediatric and Adult cohorts“).

V pediatrii lze aplikovat tento vzorec: $eGF = 70,69 \cdot (S_{cyst})^{-0,931}$. Stanovením cystatinu C v krvi plodu lze posoudit funkci jeho ledvin, cystatin C totiž oproti kreatininu neprochází fetoplacentární bariérou (krev plodu je možno získat kordocentézou při amnioskopii). Výhodou stanovení cystatinu C u dětí je nezávislost jeho hladiny na věku resp. tělesné výšce, což je zásadní rozdíl proti hladině sérového kreatininu, která je u dětí na tělesné výšce významně závislá (Zima T. et al., 2014).

Hodnota eGF vypočtená ze sérové koncentrace cystatinu C (eGF_{cyst}) má vyšší výpovědní hodnotu než samotná hodnota cystatinu C. Výsledky stanovení cystatinu C v séru a hodnoty eGF_{cyst} by se proto měly vydávat společně (Zima T. et al., 2014).

Cystatin C by měl být využit zejména v následujících situacích:

- U pacientů, kteří ztratili svalovou hmotu (nemají adekvátní svalovou hmotu vzhledem ke svému věku, pohlaví a rase), např. při dlouhodobé imobilizaci, svalové dystrofii, malnutrici či ztrátě významné části končetiny.
- K potvrzení chronického onemocnění ledvin: GF pod 1,0 ml/s/1,73 m² podle odhadu ze sérového kreatininu, zejména nejsou-li přítomné markery poškození ledvin.
- U stavů, kde koncentrace kreatininu v séru je významně ovlivněna (těhotné, generalizované otoky, malé děti, rychlé změny stavu aj.).

Cystatin C je lepší prediktor kardiovaskulárních příhod a mortality než kreatinin (Zima T. et al., 2014; Zand F. et al., 2015).

Koncentraci cystatinu C významně ovlivňuje řada dalších faktorů: zvyšuje ji podávání kortikoidní terapie, ke zvýšení dochází též u pacientů s některými malignitami (např. s lymfoproliferativními procesy, progredujícím melanomem či kolorektálním karcinomem), v septickém stavu či s nekompenzovanou hypertyreózou, u pacientů s nekompenzovanou hypotyreózou dochází naopak ke snížení cystatinu C. Přesto je koncentrace sérového cystatinu C považována za spolehlivější parametr glomerulární filtrace než koncentrace sérového kreatininu (Zima T. et al., 2014).

1.2.1.2.3. Odhad glomerulární filtrace ze sérového kreatininu a cystatinu C

Současně známé rovnice odhadu glomerulární filtrace nejsou zdaleka optimální a zahrnutí cystatinu C do rovnic CKD-EPI vede ke zpřesnění výpočtu (tab. 7):

	S _{kr} [μmol/l]	S _{cyst} [mg/l]	Vzorec pro výpočet eGF [ml/s/1,73 m ²]
Ženy	≤ 62	≤ 0,8	$2,17 \cdot (S_{kr}/61,9)^{-0,248} \cdot (S_{cyst}/0,8)^{-0,375} \cdot 0,995^{\text{věk}} \cdot 1,08$ (černá populace)
	≤ 62	> 0,8	$2,17 \cdot (S_{kr}/61,9)^{-0,248} \cdot (S_{cyst}/0,8)^{-0,711} \cdot 0,995^{\text{věk}} \cdot 1,08$ (černá populace)
	> 62	≤ 0,8	$2,17 \cdot (S_{kr}/61,9)^{-0,601} \cdot (S_{cyst}/0,8)^{-0,375} \cdot 0,995^{\text{věk}} \cdot 1,08$ (černá populace)
	> 62	> 0,8	$2,17 \cdot (S_{kr}/61,9)^{-0,601} \cdot (S_{cyst}/0,8)^{-0,711} \cdot 0,995^{\text{věk}} \cdot 1,08$ (černá populace)
Muži	≤ 80	≤ 0,8	$2,25 \cdot (S_{kr}/79,6)^{-0,207} \cdot (S_{cyst}/0,8)^{-0,375} \cdot 0,995^{\text{věk}} \cdot 1,08$ (černá populace)
	≤ 80	> 0,8	$2,25 \cdot (S_{kr}/79,6)^{-0,207} \cdot (S_{cyst}/0,8)^{-0,711} \cdot 0,995^{\text{věk}} \cdot 1,08$ (černá populace)
	> 80	≤ 0,8	$2,25 \cdot (S_{kr}/79,6)^{-0,601} \cdot (S_{cyst}/0,8)^{-0,375} \cdot 0,995^{\text{věk}} \cdot 1,08$ (černá populace)
	> 80	> 0,8	$2,25 \cdot (S_{kr}/79,6)^{-0,601} \cdot (S_{cyst}/0,8)^{-0,711} \cdot 0,995^{\text{věk}} \cdot 1,08$ (černá populace)

Tab. 7. Kombinovaná rovnice CKD-EPI z roku 2012 (přejato z lit. Zima T. et al., 2014)

1.2.1.2.3.1. Odhad glomerulární filtrace u populace ve věku 70 let a více

Rovnice CKD-EPI_{creat} není cílená na odhad glomerulární filtrace u starší populace. Rovnice doporučené ve Studii Berlínské iniciativy (The Berlin Initiative Study equations, BIS 1_{creat} odhadovaná ze sérového kreatininu, BIS 2_{creat+cyst} odhadovaná ze sérového kreatininu a cystatinu C) byly vyvinuté speciálně pro starší dospělé. Do této studie (Schaeffner E. S. et al., 2012) bylo zařazeno 610 osob ve věku 70 let a více. Glomerulární filtrace byla měřena pomocí plazmatické clearance iohexolu. Z rovnic pro odhad GF vykazovala nejlepší validační parametry rovnice BIS 2_{creat+cyst}, následovaná BIS 1_{creat} (rovnice byly srovnávány např. s rovnicemi CKD-EPI, Cockcroft-Gault). BIS rovnice potvrdily vysokou prevalenci (téměř 50 %) osob ve věku 70 let a starších s GF menší 1 ml/s/1,73 m².

Pro odhad GF u osob ve věku 70 let a starších s normální nebo mírně až středně sníženou funkcí ledvin by měla být použita rovnice BIS 2. Není-li k dispozici vyšetření sérového cystatinu C, je přijatelnou alternativou rovnice BIS 1.

Také revidovaná rovnice Lund-Malmö (LMR; Nyman U. et al., 2014) a rovnice pro celé věkové spektrum (the Full Age Spectrum equation, FAS, Pottel H. et al., 2016) prokázaly slibné výsledky u starší populace.

Cílem studie Björka a spolupracovníků (Björk J. et al., 2018) bylo ověření rovnic CKD-EPI, BIS, FAS a LMR ve velké multicentrické kohortě 3226 Evropanů ve věku 70 let a více. Glomerulární filtrace byla měřena pomocí plazmatické clearance iohexolu (mGF; medián 44 ml/min/1,73 m² neboli 0,73 ml/s/1,73 m²). Validace rovnic se zaměřovala na bias, přesnost a správnost. Bias byl definován jako medián jednotlivých rozdílů mezi eGF a mGF, přesnost jako interkvartilové rozpětí a správnost byla hodnocena jako hodnota P30, tj. procento odhadů nelišících se od mGF o více než 30 %. Aby byla eGF považována za „dostatečnou pro správné klinické rozhodování“, mělo by být alespoň 75 % eGF v rozmezí do 30 % od mGF.

V případě použití všech čtyř rovnic (odvozovaných pouze ze sérového kreatininu) bylo dosaženo uspokojivých hodnot glomerulární filtrace (v porovnání s plazmatickou clearancí iohexolu), nejlepších výsledků při použití rovnice LMR_{creat} (a následovala FAS_{creat}), nejhorších při užití CKD-EPI_{creat}. Neuspokojivé hodnoty P30 (<75 %) byly zaznamenány pro všechny rovnice při mGF <0,5 ml/s/1,73 m² a při hodnotách BMI (body mass index) < 20 a ≥ 35 kg/m². Použití rovnic LMR_{creat} a FAS_{creat} k odhadu glomerulární filtrace ze sérového kreatininu je u Evropanů ve věku 70 let a více významnou alternativou k rovnici CKD-EPI_{creat}.

Zahrnutí cystatinu C vedlo k významnému zlepšení odhadu glomerulární filtrace všemi čtyřmi rovnicemi (o P30 > 85 %), nejlepší výsledky byly dosaženy opět při využití rovnice Lund-Malmö, konkrétně aritmetického průměru LMR a CAPA.

1.2.1.2.4. Izotopové metody vyšetření glomerulární filtrace

Principem je intravenózní podání izotopem značené látky pacientovi a sledování rychlosti poklesu její aktivity v plazmě, která je dána velikostí GF, resp. tubulární sekrece. Při dynamické scintigrafii je také možnost posoudit odděleně funkci pravé a levé ledviny. Nejčastěji se používají: ^{99m}Tc-DTPA (dietyltriainpentaoctová kyselina), ⁵¹Cr-EDTA (etylendiamintetraoctová kyselina), ¹²⁵I-thalamát. V běžné klinické praxi však tyto metody k odhadu glomerulární filtrace užívány nejsou (Zima T. et al., 2014).

1.2.1.2.5. Plazmatická clearance iohexolu

Další možností odhadu GF je stanovení plazmatické clearance iohexolu. Jde o jodovou rentgen kontrastní látku, která je opět vylučovaná z organismu pouze glomerulární filtrací. Stanovuje se vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií nebo rentgenovou fluorescenční spektroskopií. Běžně se toto stanovení neprovádí z důvodu nákladnějšího technického zařízení. V současné době se o iohexolu dokonce hovoří jako o potenciálním novém zlatém standardu, který by mohl nahradit „historický“ zlatý standard-inulin (Delanaye P. et al., 2016).

1.2.2. Vyšetřování proteinurie

Vyšetření močových bílkovin je jedním ze základních vyšetření v nefrologii. Nezastupitelné místo má jak v časně diagnostice nemocí ledvin, tak v monitorování jejich aktivity, odpovědi na léčbu a odhadu rizika vývoje selhání ledvin i kardiovaskulárního rizika.

Současná diagnostika je založena především na vyšetření celkové bílkoviny a albuminu v moči, méně často je vyšetřována močová exkrece jednotlivých dalších močových proteinů. Vyšetření odpadů proteinů močí za 24 hodin zůstává významným základním parametrem hodnocení proteinurie, v poslední době se doporučuje stanovovat poměr protein/kreatinin (protein creatinine ratio, PCR) nebo častěji albumin/kreatinin (albumin creatinine ratio, ACR), a to především v prvním ranním vzorku moči vzhledem k nejnižší biologické variabilitě a nejvyšší výpovědní hodnotě (Zima T. et al., 2014). Užívání těchto poměrů eliminuje faktor nepřesného sběru moči. Výsledky PCR a ACR je doporučeno vyjadřovat v jednotkách mg/mmol, g/mol, mg/g nebo µg/mg (Miller W. G. et al., 2009). Poměr koncentrace albuminu a kreatininu v moči nelze použít při koncentraci kreatininu v séru > 250 µmol/l (Tesař V. et al., 2010).

Pro včasné odhalení počínajícího poškození ledvin u diabetiků a hypertoniků má význam především stanovení albuminu. Pro diagnostiku tubulární a prerenální proteinurie musí být v moči kvantitativně stanoven vhodný mikroprotein, nejlépe α -1-mikroglobulin nebo cystatin C, nebo protein způsobující prerenální proteinurii – myoglobin, hemoglobin, volné lehké řetězce imunoglobulinů (Zima T. et al., 2014).

1.2.2.1. Klasifikace zvýšeného vylučování bílkovin do moči

V roce 1978 doporučili Robinson a Dennis jako diskriminační limit pro definici patologické proteinurie exkreci 150 mg bílkovin denně. Nejde o referenční hodnotu

stanovenou standardními postupy IFCC, spíše zkušenostmi v klinické praxi podložené kritérium (Schüick O. et al., 2006). Podle velikosti ztrát bílkovin do moči se proteinurie dělí na malou (0,15 až 1,5 g/ 24 h), střední (1,5 až 3,5 g/ 24 h) a velkou (> 3,5 g/ 24 h; Zima T. et al., 2014).

Z hlediska etiologie můžeme proteinurii dělit do několika skupin:

1. Prerenální proteinurie

Její příčinou je vysoká koncentrace bílkovin o nízké molekulové hmotnosti v plazmě (např. lehké řetězce imunoglobulinů u některých monoklonálních gamapatií, myoglobin u rhabdomyolýzy, hemoglobin u akutní hemolýzy, β -2-mikroglobulin u hematologických malignit, tkáňové katabolity či proteiny akutní fáze u akutních stavů), které jsou volně filtrovány a po překročení kapacity tubulární resorpce vylučovány do moče (Schüick O. et al., 2006).

2. Glomerulární proteinurie

Může být způsobena ztrátou negativního náboje glomerulární bazální membrány, důsledkem je zejména albuminurie (jde tedy o tzv. selektivní proteinurii) nebo těžším poškozením glomerulární membrány se vznikem rozsáhlejších defektů, kterými procházejí i proteiny s velkou molekulovou hmotností, např. IgG (tzv. neselektivní proteinurie). Selektivní proteinurie je typická např. pro tzv. nefrotický syndrom s minimálními změnami glomerulů, počínající diabetickou neuropatií; neselektivní je obligátním nálezem u nemocných při trvalém poklesu glomerulární filtrace pod 0,6 ml/s (u všech chronicky probíhajících glomerulopatií, rozvinuté diabetické nefropatii, fokálně segmentální glomerulosklerózy a dalších; Schüick O. et al., 2006; Zima T. et al., 2014).

Na náboji a na velikosti závislá filtrace plazmatických bílkovin a jejich rozdílná resorpce v tubulech zůstává stále užitečným základem interpretace proteinurií, přestože existují studie, které tuto koncepci zpochybňují. Např. prokazují, že prostorová distribuce povrchových nábojů molekuly albuminu se při elektrostatické repulzi může uplatnit jen málo, že k odštěpování náboje dochází již na úrovni glomerulárních kapilár a ve skutečnosti jsou filtrovány molekuly bez náboje. Trojrozměrná síť kolagenu bazální membrány zřejmě také není určující strukturou filtrace bílkovin podle jejich velikosti, podstatně větší význam mají zřejmě strukturní podocytární proteiny (např. nefrin) na úrovni interpedicelární šterbinové membrány. Koncentrace plazmatických bílkovin v ultrafiltrátu je podle těchto studií podstatně vyšší, než bylo uváděno a exkreci profiltrovaných bílkovin do moči ovlivňuje rozhodujícím způsobem jejich resorpce v tubulárních buňkách (Schüick O. et al., 2006).

3. Tubulární proteinurie

Vznikají při absolutním nebo relativním snížení tubulární resorpce volně filtrovatelných nízkomolekulárních bílkovin (např. α -1-mikroglobulinu, β -2-mikroglobulinu). Může být projevem tubulointersticiální nefropatie (např. při pyelonefritidě), toxického poškození tubulů (např. gentamycinem, nesteroidními antirevmatiky, rtuť), ischemie, metabolických dysbalancí (např. při hypokalémii, hyperkalcémii, hyperurikémii) nebo součástí tzv. Fanconiho syndromu např. u mnohočetného myelomu či Wilsonovy choroby. Může vzniknout při obstrukční uropatii nebo při překročení resorpční kapacity tubulárních buněk (Zima T. et al., 2014).

4. Postrenální proteinurie

Je způsobena sekrecí bílkovin do moči ve vývodných močových cestách v důsledku zánětlivých, nádorových a krvácivých onemocnění. Typická je přítomnost IgM, α -2-makroglobulinu, lipoproteinů, fibrinogenu v moči, tj. bílkovin, které ani při značném poškození glomerulární kapiláry do ultrafiltrátu neprocházejí (Schüick O. et al., 2006).

5. Funkční proteinurie

Jedná se o přechodnou proteinurii, která se může vyskytnout u osob se zdravými ledvinami, např. při těžší práci, při cvičení nebo při emočním stresu. Je nejspíše glomerulárního původu a mechanismus jejího vzniku je pravděpodobně hemodynamický, podobně jako v případě tzv. ortostatické proteinurie, která je charakterizována malou proteinurií (do 1 g/24 h) vestoje a nezvýšenou proteinurií vleže. Ortostatická proteinurie se vyskytuje u 2 až 5 % mladých, jinak zdravých jedinců, častěji mužů (Zima T. et al., 2014).

1.2.2.2. Stanovení celkových proteinů a PCR

Metody stanovení celkového proteinu nejsou dostatečně standardizované. Není k dispozici mezinárodní referenční materiál. Výsledky měření jsou silně závislé na složení vzorku. Turbidimetrické a fotometrické metody, obecně k stanovení používané, vykazují mnohem vyšší analytickou citlivost k albuminu, než ke globulinům. Metody také postrádají dostatečnou preciznost v oblastech nižších koncentrací a vykazují nižší úroveň mezilaboratorní preciznosti v důsledku diferencí výsledků mezi výrobcí testovacích souprav. V indikovaných případech (například u monoklonálních gamapatií) je však zapotřebí preferovat stanovení PCR před ACR (Zima T. et al., 2014).

1.2.2.3. Stanovení albuminu a ACR

Dominantní roli v analýze proteinů u chronické renální choroby zaujímá stanovení albuminurie (Redon J., 2006). Albumin v moči je citlivějším a specifitějším ukazatelem změn glomerulární permeability než celkový protein. Hodnoty albuminurie/24 h a ACR stratifikují populaci do tří kategorií podle stupně renální choroby (tab. 2). Albuminurie je dosud považována za nejdůležitější indikátor rozvoje a progresu diabetické nefropatie, hraje významnou roli i v diagnostice dalších nefropatií a srdečních chorob (McQueen M. J. et al., 2006; Greenland P. et al., 2010), predikuje rozvoj nefropatie u hypertoniků a souvisí se zvýšením mortality obecně (Magliano D. J. et al., 2007). Je významným markerem v patologickém těhotenství a zvažuje se jeho vyšetřování též v souvislosti s akutním poškozením ledvin (Bolisetty S. a Agarwal A., 2011).

Pojmy „mikroalbuminurie“ a „makroalbuminurie“ se doporučují přestat používat, jednak kvůli zavádějícím názvům a jednak kvůli tomu, že jakákoliv albuminurie představuje riziko vzniku především kardiovaskulárních komplikací (Miller W. G. et al., 2009; Miller W. G. a Bruns D. E. 2009; KDIGO 2012).

Hodnoty albuminurie přibližně do 8 mg/mmol kreatininu jsou popisovány za reverzibilní, a proto vyžadují maximální úsilí o kompenzaci případného diabetu a kontrolu krevního tlaku (Monhart V., 2008). Snížení albuminurie brání progresi diabetických a některých nediabetických onemocnění ledvin, je známkou úspěšného léčení hypertenze.

Nález albuminu v moči byl dlouhou dobu vysvětlován především poškozením glomerulární membrány resp. ztrátou její negativity při poškození povrchových proteoglykanů (koncepte na náboji závislé selektivní filtrace bílkovin). Jak již bylo zmíněno výše, některé studie tuto koncepci zpochybňují a uvádějí, že koncentrace plazmatických bílkovin v glomerulárním filtrátu je až o dva řády vyšší, než bylo uváděno, a exkreci profiltrovaných bílkovin do moče významně ovlivňuje též jejich resorpce v tubulárních buňkách (Schüick O. et al., 2006).

Glomerulárními kapilárami prochází denně cca 37 000 g albuminu, z toho cca 1,3 g (0,004 %) přechází do močového prostoru. Většinu molekul albuminu tedy nepropustí filtrační glomerulární bariéra, avšak do glomerulárního filtrátu přechází ještě více než 1 g albuminu za den. Většina molekul albuminu z filtrátu se váže na receptorovou molekulu megalinu, která zprostředkuje rychlý transtubulární transport do extracelulární tekutiny. Receptorová molekula cubulinu uskutečňuje transport albuminu z ultrafiltrátu do lyzosomů (< 5 % z profiltrovaného množství albuminu), kde dochází k jeho rychlé degradaci s následnou exkrecí degradačních produktů (o molekulové hmotnosti < 10 kDa) do moče

(Russo L. M. et al., 2002; Russo L. M. et al., 2004; Schüick O. et al., 2006). V definitivní moči fyziologicky nacházíme do 30 mg albuminu za den (tzn. cca do 2 % z profiltrovaného albuminu) a albuminové fragmenty (které imunochemické metody nezachytí). To znamená, že podle těchto autorů je „materiál odvozený od albuminu“ v definitivní moči tvořen z cca 30 % albuminem a cca ze 70 % albuminovými fragmenty. Jiné práce uvádějí, že definitivní moč obsahuje méně než 1 % intaktního albuminu a více než 99 % albuminových fragmentů (Babic N. et al., 2006; Hilliard L. M. et al., 2006).

Při hodnocení albuminurie je nutné zohlednit situace spojené se zvýšeným rizikem nálezu buď falešně pozitivního (tělesná námaha, dehydratace, zvýšený příjem bílkovin v dietě, těhotenství, hematurie, horečnatý a jiný akutní stav, infekce močových cest, extrémně alkalická moč s $\text{pH} > 8$) nebo falešně negativního (zvýšený příjem hypotonických tekutin spojený se zvýšenou diurézou) a cirkadiánní rytmy (ve dne je albuminurie cca o 25 % vyšší než v noci, rozdíly mezi jednotlivými dny mohou být až 40 %). U diabetiků pravděpodobně cirkadiánní variabilita chybí (Friedecký B. et al., 2006).

Albuminurii běžně stanovujeme imunochemickými metodami, nejčastěji imunoturbidimetricky či imunonefelometricky, méně často metodami RIA či ELISA. Dalšími možnostmi stanovení jsou elektroforetické metody (v polyakrylamidovém gelu či kapilární) nebo vysokoúčinná kapalinová chromatografie (Babic N. et al., 2006).

Přehledový článek z roku 2011 (Speeckaert M. M. et al., 2011) navrhuje následovat doporučení „The National Kidney Disease Education Program – IFCC Working Group on Standardization of Albumin in urine“: Albuminurii vyšetřovat imunochemickými metodami užívajícími polyklonální protilátky proti albuminu, protože reagují s mnoha formami albuminu (včetně modifikovaných). Užívání metod s monoklonálními protilátkami se uvádí jako nevhodné.

V roce 2012 popsala pracovní skupina IFCC pro standardizaci albuminu v moči současný stav referenčního systému (Lieske J. C. et al., 2013). Za referenční metodu se považuje tandemová kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) po předchozí tryptické digesci vzorku moči. Metoda byla vyvinuta na Mayo Clinic v USA.

V roce 2014 byla publikována studie, která srovnává výsledky stanovení albuminu v moči dosažené imunoanalytickými metodami 17 hlavních výrobců s metodou LC-MS/MS (Bachmann L. M. et al., 2014). Bylo vyšetřeno 332 vzorků moči, čerstvé vzorky byly vyšetřeny imunochemicky, rozmrazené vzorky LC-MS/MS. Diference jsou významné. Jednotlivé imunochemické metody stanovení albuminu v moči vykazují hodnoty bias proti referenční LC-MS/MS metodě -35 až +34 % u vzorků s koncentracemi albuminu kolem

15 mg/l. Při koncentracích albuminu >30 mg/l dosahovaly průměrné diference 10 %, s vyššími koncentracemi albuminu se diference snižují. Při výpočtu ACR (Jacobson E. B. et al., 2015) byly zjištěny vždy negativní hodnoty bias (-10 až -20 %).

Ukazuje se tedy potřeba aplikovat u rutinních metod jejich návaznost na referenční systém (Graziani M. S. a Plebani M., 2015; Friedecký B., 2015), aby byla diagnostická klasifikace co nejméně závislá na použité rutinní metodě. Bez kalibrační korekce rutinních metod na referenční mělo jen 10 % vzorků bias ≤ 15 %. Tento systém je již několik let navržen a verifikován (referenční materiály: 15 N-albumin, SRM 2925 NIST, ERM DA 470k/IFCC, SRM 3667 NIST, referenční metoda: ID-LC-MS/MS po tryptické digesci, vnitřní standard 15N albumin, verifikace bias SRM 2925 NIST human albumin, preciznost CV = 0,6–4,1 %, výtěžnost 97–104 %, Lieske J. et al., 2013). Při měřeních v rutinních laboratořích ani při tvorbě doporučení (KDIGO, 2012; Zima T. et al., 2014; American Diabetes Association, 2013) však není respektován (Friedecký B., 2015).

Imunochemické metody stanovení albuminu (imunoturbidimetrie/immunofelometrie) vykazují mez detekce 2 až 10 mg/l (pro srovnání: mez detekce celkového proteinu v moči pomocí stanovení testovacími proužky je asi 150 mg/l). Pro rutinní měření albuminurie je nejvhodnější skladování vzorků před analýzou při teplotě 2 až 8 °C a temperování vzorků před měřením na pokojovou teplotu k odstranění případných precipitací. Stabilita při této teplotě je minimálně 7 dní. Zamrazování se nedoporučuje, protože není dostatečně prostudovaná případná sorpce na stěny odběrových zkumavek ani jiné ovlivňující faktory (Zima T. et al., 2014).

V minulosti byly imunochemické metody srovnávány hlavně s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). Bylo zjištěno, že HPLC (obdobně jako referenční metoda LC-MS/MS) poskytuje především v oblasti albuminurie kategorie A1 a A2 (dle tab. 2) významně vyšší výsledky než imunochemické metody. Rozdíl mezi metodami byl vysvětlován dvěma zcela odlišnými způsoby: 1) existencí imunonereaktivního albuminu v moči, který imunochemickým metodám uniká (Comper W. D. et al., 2003; Comper W. D. et al., 2004; Osicka T. M. a Comper W. D., 2004), 2) nespecifičností HPLC metody (Sviridov D. et al., 2006).

Není přesně známo, jaké děje způsobí ztrátu imunoreaktivity některých molekul albuminu. Především u diabetiků a hypertoniků pravděpodobně dochází k nekompletnímu zpracování albuminu lyzomálními enzymy v renálních tubulárních buňkách a k jeho následným konformačním změnám. Výsledkem je vznik tzv. „nicked albuminu“, který je imunonereaktivní (Osicka T. M. et al., 2000; Burne M. J. et al., 1998; Russo L. M. et al.,

2002, Peters T. Jr., 2004). Aktivitu lyzomálních proteolytických enzymů potlačuje transformující růstový faktor- β . Lokální tvorbu tohoto prosklerotického cytokinu zvyšuje systém renin-angiotensin, který je aktivován systémovými faktory, např. změnami glykémie či krevního tlaku (Hilliard L. M. et al., 2009; Russo L. M. et al., 2002; Speeckaert M. M. et al., 2011). U diabetiků je také popisováno, že ztrátu imunoreaktivity albuminu může způsobit navázání některých ligandů, např. glukózy či mastných kyselin (Osicka T. M. a Comper W. D., 2004). Tyto modifikované formy albuminu (imunochemicky nereaktivní) jsou HPLC detekovány ve stejném píku jako nemodifikovaný (imunochemicky reaktivní) albumin (Comper W. D. et al., 2004).

Potvrzení hypotézy o existenci imunochemicky nereaktivního albuminu by mělo dopad i na klinickou praxi. V některých studiích se uvádí, že HPLC umožní identifikovat jedince s přítomnou albuminurií o cca 2 až 4 roky dříve než imunochemické metody. Pozitivní bias HPLC stanovené albuminurie klesá se zvyšující se koncentrací albuminu (Comper W. D. et al., 2003; Comper W. D. et al., 2004).

Kontroverzní hypotéza přičítá rozdíl mezi imunochemickými metodami a HPLC především nespecifičnosti HPLC metody. Podle ní nejsou vyšší hodnoty albuminurie zjištěné HPLC metodou způsobeny imunochemicky nereaktivním albuminem, ale společnou elucí některých proteinů ze separační kolony s albuminem (údajně koeluuje např. α -1-kyselý glykoprotein neboli orosomukoid, α -1-antitrypsin, α -1-antichymotrypsin, transferin, hemopexin, prealbumin neboli transthyretin, α -2-HS glykoprotein, Gc-globulin). Tím by HPLC poskytovala hodnoty falešně vyšší (Sviridov D. et al., 2006; Shaikh A. et al., 2008).

1.3. Akutní poškození ledvin

Akutní poškození ledvin (acute kidney injury, AKI) je náhlý, především v časných stádiích reverzibilní pokles exkrementně-metabolické funkce ledvin, který je ve své těžší formě spojen s výrazným poklesem diurézy (oligoanurická forma AKI). Neoligoanurické AKI je spojeno s těžkým poklesem renálních funkcí, avšak při zachované diuréze díky reziduální funkci v zachovalých okřscích renální tkáně (Teplan V., 2006). Jedná se o rychle progredující onemocnění, které nezávisle předpovídá morbiditu a mortalitu (Brivet F. G. et al., 1996; Kaufman J. et al., 1991; Liaño F. a Pascual J., 1996). 20 až 60 % pacientů s akutním poškozením ledvin vyžaduje dialyzační léčbu a úmrtnost se podle statistiky ERA-EDTA pohybuje od 8 % do 50 až 80 % v případě multiorgánového postižení (Chertow G. M. et al., 2005; Chertow G. M. et al., 2006; Van Biesen W. et al., 2006).

AKI je častou komplikací u ambulantních a hospitalizovaných pacientů a jeho incidence se v posledních letech zvyšuje, a to i u dětských pacientů. Incidence u novorozenců v průmyslově rozvinutých zemích je cca 4/1000 živě narozených a 35/1000 novorozenců přijatých na novorozeneckou jednotku intenzivní péče. Incidence poruch renálních funkcí u hospitalizovaných dětí se pohybuje mezi 5 až 10 %. Incidence AKI u nehospitalizovaných dětí není přesně známa, a proto se jen odhaduje na 10 až 15 dětí/1 milion dětské populace ve věku od 0 až 15 let (Zaoral T., 2016).

Incidence AKI u dospělých pacientů se v rozvinutých zemích pohybuje kolem 100 až 175 případů /milion obyvatel (při sérovém kreatininu >500 $\mu\text{mol/l}$) či dokonce 500 až 600 případů /milion obyvatel (při sérovém kreatininu >300 $\mu\text{mol/l}$). Výskyt AKI u hospitalizovaných nemocných činí 5 až 7 %, až u 20 % z nich se rozvine akutní selhání ledvin. Incidence pooperačního AKI mírně klesá, zatímco stoupají počty nemocných s HIV, AKI po transplantaci či kardiální resuscitaci. Multiorganové poškození, sepse a věk představují nejvýznamnější rizikové faktory z hlediska přežívání nemocných (Teplan V. a Trbušek J., 2010).

Na vzniku AKI se podílejí čtyři hlavní mechanismy: 1. pokles průtoku krve kortikální vrstvou ledviny, 2. změna permeability glomerulární membrány, 3. tubulární reflux filtrátu a 4. tubulární obstrukce. Podle dnešních názorů však nepůsobí jediný osamocený z uvedených činitelů, ale souhra více prvků. Kromě toho mohou v průběhu AKI stát v popředí různé patogenetické mechanismy. Spouštěčem selhání bývá často změna prokrvení ledvin z různých příčin (Teplan V., 2006).

Přestože je AKI vždy způsobeno poškozením renálním, z hlediska základní příčiny lze užít zjednodušené dělení příčin AKI na:

- prerenální, tzv. funkční (snížený efektivní intravaskulární volum, snížený srdeční výdej, poruchy v intrarenální hemodynamice);
- renální (primární poškození renálního parenchymu, např. rychle progredující glomerulonefritida, akutní tubulární nekróza ischemické či nefrotoxické etiologie, akutní tubulointersticiální nefritida poléková či infekční);
- postrenální (urologické, při obstrukci močových cest; Teplan V., 2006).

Akutní poškození ledvinné tkáně se vyvíjí hodiny až dny a časnou diagnostikou a účinnou léčbou můžeme tíži poškození významně ovlivnit. Diagnóza akutního poškození ledvin je v současnosti založena zejména na parametrech souvisejících se sérovým kreatininem a diurézou (RIFLE klasifikace, AKI-stadia, tab. 8).

Při zvažování léčby se musíme nejdříve snažit odlišit prerenální a postrenální formy AKI, neboť jejich způsob léčby se zásadně liší od léčby primární ledvinné etiologie. Navíc se při včasné úpravě základní prerenální, resp. postrenální příčiny akutní selhání ledvin nemusí vůbec rozvinout či proběhne v mnohem mírnější formě. K odlišení prerenálního a renálního AKI lze kromě klinických příznaků využít i laboratorních močových a sérových nálezů (tab. 9).

Důležité je též odlišit AKI od akutně zhoršené chronické renální insuficience (CHRI). U CHRI laboratorně nacházíme anémii a poruchy kalciofosfátového metabolismu (hypokalcémii a hyperfosfatémii), nápomocné bývá i ultrazvukové vyšetření ledvin.

RIFLE	S _{Kr} [μmol/l], GF [ml/s]	Diuréza [ml/kg/h]	AKI – stadia
Riziko (Risk)	vzestup S _{Kr} o > 25 μmol/l nebo o > 150 – 200 % (1,5–2x) nebo pokles GF o > 25 % v průběhu 1 – 7 dní	oligurie – diuréza < 0,5 ml/kg/h minimálně 6 h neoligoanurie – diuréza zachována	I. stadium
Poškození ledvin (Injury)	vzestup S _{Kr} o > 200 – 300 % (2–3x) nebo pokles GF o > 50 %	oligurie – diuréza < 0,5 ml/kg/h minimálně 12 h neoligoanurie – diuréza zachována	II. stadium
Selhání ledvin (Failure)	vzestup S _{Kr} o > 300 % (>3x) či S _{Kr} > 350 μmol/l při vzestupu o 50 μmol/l nebo pokles GF o > 75 %	oligurie – diuréza < 0,5 ml/kg/h delší než 24 h či anurie min. 12 h neoligoanurie – výjimečně diuréza zachována	III. stadium
Ztráta funkce ledvin (Loss)	akutní selhání ledvin s afunkcí delší než 4 týdny	anurie či oligurie	
Terminální selhání funkce (End-stage kidney disease)	afunkce trvající déle než 3 měsíce	anurie či oligurie	

Tab. 8. Kritéria RIFLE a stadia akutního poškození ledvin (AKI)

S_{Kr}: sérová koncentrace kreatininu, GF: glomerulární filtrace, pokles (vzestup) se týká vždy změny od výchozí hodnoty, tj. hodnoty GF či S_{Kr} před příhodou vedoucí k poškození ledvin (Teplan V. a Trbušek J., 2010; Zima T. et al., 2014)

	Normální hodnoty	Prerenální formy AKI	Renální formy AKI
Specifická hmotnost moči	1015–1025	> 1020	≈ 1010 (izostenurie)
Osmolalita moči [mmol/kg H ₂ O]	400–600	> 400	< 400 (blíží se plazmatické)
Koncentrace sodíku v moči, U _{Na} [mmol/l]	15–40	< 20	> 30
Močový/plazmatický kreatinin, U _{Kr} /P _{Kr}	20–60	> 40	< 20
Frakční exkrece Na [%]	1–3	< 1	> 3
Index ASL (U _{Na} x P _{Kr} /U _{Kr})	2–3	< 1	> 3
Clearance bezsolutové vody, C _{H₂O} , V-C _{Osm} [ml/s]	záporné hodnoty	záporné hodnoty	kladné hodnoty
Sérová koncentrace kreatininu [μmol/l]	*muži: 55–96 *ženy: 42–80	normální či lehce zvýšená	významně zvýšená
Sérová koncentrace urey [mmol/l]	*muži 2,8–8,0 *ženy: 2,0–6,7	lehce zvýšená	významně zvýšená

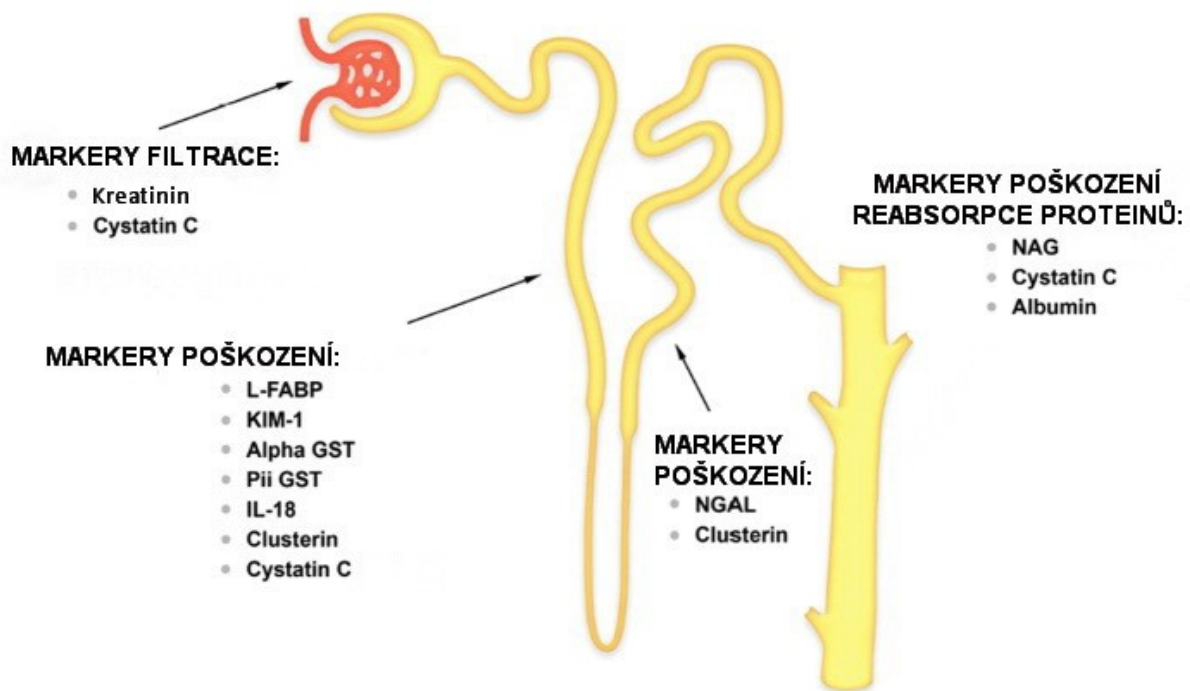
Tab. 9. Laboratorní nálezy při diferenciální diagnóze prerenální a renální formy akutního poškození ledvin, *normální hodnoty u dospělých (upraveno podle Teplan V., 2006)

Přestože je diagnóza AKI v současnosti založena zejména na parametrech souvisejících se sérovým kreatininem, kreatinin není nejvhodnější marker pro sledování akutních změn funkce ledvin. Koncentrace kreatininu může kolísat v širokém rozmezí v závislosti na věku, pohlaví, svalové hmotě, metabolismu svalů, užívaných lécích a na stavu hydratace. Při akutních změnách glomerulární filtrace neodráží koncentrace kreatininu v séru – až do dosažení ustáleného stavu – přesně funkci ledvin. Nárůst kreatininu je pozorován obvykle nejdříve až za 24 až 72 hodin po začátku poškození, kdy již 50 % funkce ledvin může být ztraceno (Teplan V. a Trbušek J., 2010).

Měření GF u nemocných s AKI může být obtížné a nepřesné, neboť se mohou rychle měnit parametry vnitřního prostředí, hydratace a perfuze. Často je nemožný přesný sběr moči či je přítomna oligurie nebo dokonce anurie. Vyšetření pomocí kreatininové clearance se provádí při diuréze větší než 500 ml/24 h, výpočtové vzorce lze užít i bez ohledu na diurézu. V poslední době se věnuje pozornost užití cystatinu C, který je vhodnější při rychlých změnách složení tělesných tekutin (Zima T. et al., 2014).

Klasické biomarkery v moči, jako jsou válce a frakční exkrece sodíku, nejsou dostatečně citlivé a jsou také nespecifické pro časné rozpoznání AKI (Teplan V. a Trbušek J., 2010).

V posledních letech probíhá intenzivní výzkum s cílem nalezení snadno stanovitelného markeru z krevního odběru nebo ze vzorku moči, který by umožnil časnou diagnózu AKI a byl by specifický vzhledem k renálním funkcím (Deravajan P., 2008; Waikar S. S. et al., 2008; Honore P. M. et al., 2007). V experimentech jsou studovány desítky biomarkerů, za nejperspektivnější jsou považovány: cystatin C, NAG (N-acetyl- β -D-glukózaminidáza), KIM-1 (kidney injury molecule-1), IL-18 (interleukin-18), L-FABP (liver-type fatty acid-binding protein) a především NGAL (neutrofilní s gelatinázou asociovaný lipokalin), ojedinele se vyšetřují např. TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase 2), IGFBP-7 (insulin-like growth factor-binding protein-7) YKL-40 (40 kDa heparin and chitin-binding glycoprotein), calprotectin (S100A8/9), clusterin a další. Lokalizaci v nefronu a diagnostický význam některých z nich znázorňuje obrázek 1.



Obr. 1. Biomarkery akutního poškození ledvin, jejich lokalizace v nefronu a diagnostický význam (L-FABP: liver-type fatty acid-binding protein, KIM-1: kidney injury molecule-1, Alpha GST: Alpha-glutathione S-transferase, Pii GST: glutathione S-transferase pi, IL-18: interleukin-18, NGAL: neutrofilní s gelatinázou asociovaný lipokalin, NAG: N-acetyl- β -D-glukózaminidáza, upraveno podle Malyszko J. et al., 2015)

1.3.1. Markery akutního poškození ledvin

1.3.1.1. Cystatin C

Již bylo zmíněno (kapitola 1.2.1.2.2), že sérové koncentrace cystatinu C se zvyšují při malém poklesu glomerulární filtrace dříve než sérové koncentrace kreatininu. Studie z roku 2013 uzavírá, že v podmínkách intenzivní péče 50 % zvýšení sérové koncentrace cystatinu C předpovědělo rozvoj AKI o 1 až 2 dny dříve, než došlo k vzestupu sérové koncentrace kreatininu (Murty M. S. N. et al., 2013). Jiná studie však neprokázala vyšší spolehlivost sérové koncentrace cystatinu C v časně diagnostice AKI v porovnání se sérovou koncentrací kreatininu, pomocí sérové koncentrace cystatinu C nebylo možné předpovědět výsledný klinický stav (Berger-Rosenthal S. et al., 2004).

Zvažuje se zařazení cystatinu C do sérového „AKI-panelu“, v první řadě se ale jedná o citlivý ukazatel poklesu glomerulární filtrace, nikoli o ukazatel vlastního poškození ledvin. Výsledky by proto měly být vydávány společně s eGF odhadnutou ze sérové koncentrace cystatinu C. Bylo zjištěno, že eGF_{cyst} u dospělých pacientů lépe koresponduje s horším se AKI než GF odhadnutá z kreatininu (Murty M. S. N. et al., 2013; Séronie-Vivien S. et al., 2008). Studie u kriticky nemocných dětí z r. 2013 však nepotvrdila lepší prediktivní hodnotu

sérového cystatinu C (ani z ní odhadnuté eGF) pro diagnostiku AKI ve srovnání se sérovým kreatininem (resp. Schwartzovým vzorcem pro výpočet eGF ze sérového kreatininu; Hamed H. M. et al., 2013).

Cystatin C v moči je markerem poškození tubulárních buněk. Bylo zjištěno, že u pacientů s prokázaným AKI jeho vylučování do moče předpovídá nutnost zahájení náhrady funkce ledvin přibližně o den dříve v porovnání se sérovým kreatininem. Močový cystatin C byl shledán nezávislým prediktorem 30denní mortality na jednotce intenzivní péče (Nejat M. et al., 2010).

1.3.1.2. N-acetyl- β -D-glukózaminidáza

N-acetyl- β -D-glukózaminidáza (NAG) je enzym lyzosomů zodpovědný za degradaci mukopolysacharidů a glykoproteinů. Nachází se v lyzosomech renálních tubulárních buněk, dále např. v akrosomech spermií, v ejakulátu, synoviální tekutině, v moči, v amniové tekutině. Jedná se o protein o molekulové hmotnosti 140–150 kDa, za normálních okolností neprochází glomerulární membránou, do moče se za normálních okolností dostává v malém množství jako výsledek exocytózy a pinocytózy epiteliálních buněk ledvinových tubulů. Za patologických okolností se do moče dostává při poruše glomerulární membrány nebo poškození buněk renálních tubulů nebo při kombinaci obou dějů. Stanovení v moči se využívá při tubulopatiích (např. po intoxikaci léky, těžkými kovy), při diabetu v rámci pátrání po diabetické nefropatii, při rejekci ledviny. V důsledku působení nefrotoxických látek (např. aminoglykosidů) na buňky proximálního tubulu dojde k jejich cytolýze a následné nekróze a uvolnění N-acetyl- β -D-glukózaminidázy z lyzosomů.

Bylo publikováno několik studií, které sledovaly močové koncentrace NAG (většinou společně s dalšími markery) u pacientů ohrožených AKI. Např. dvě studie z roku 2009 demonstrují, že koncentrace NAG, KIM-1, NGAL a IL-18 v moči byly významně zvýšeny v době ještě normálních hladin sérového kreatininu u dospělých pacientů podstupujících kardiologický výkon, nejdříve došlo k vzestupu KIM-1. Zmíněné biomarkery umožní časnější detekci rozvoje postoperačního AKI než hladiny sérového kreatininu, doporučuje se kombinace několika biomarkerů (Liangos O. et al., 2009; Han W. K. et al., 2009). Obdobně, studie z roku 2012 sledovala močové koncentrace NAG společně s močovým L-FABP u dospělých pacientů po kardiologické operaci a poukazuje na význam těchto markerů (opět především jejich kombinace) v časnější detekci AKI. Močový L-FABP vykazoval vyšší senzitivitu, NAG detekoval AKI s vyšší specificitou (Katagiri D. et al., 2012). Studie z roku

2013 zjistila významné zvýšení močové NAG u pacientů, jež rozvinuli AKI po perkutánní nefrolitotripsi (Jiang C. et al., 2013).

Zvýšení NAG v moči při diabetes mellitus se jako časná známka tubulopatie objevuje dříve, než je prokazatelná porucha bazální membrány glomerulů v období negativní albuminurie (profiltrovaný albumin se díky zvýšené reabsorpci v proximálním tubulu do moče nedostává a v moči je tak přítomna pouze NAG). V dalším stadiu je překročena reabsorpční kapacita tubulů a objevuje se albuminurie (společně s NAG v moči) a později je přítomnost NAG v moči podmíněna nejen destrukcí tubulárních buněk, ale také poruchou glomerulární bazální membrány.

1.3.1.3. Kidney injury molecule-1

Molekula poškození ledvin-1 (kidney injury molecule-1, KIM-1, známá též jako TIM-1, T cell immunoglobulin and mucin containing molecule-1) byla poprvé popsána Ichimurou v roce 1998 (Ichimura T. et al., 1998). Jedná se o transmembránový glykoprotein typu 1 o molekulové hmotnosti 104 kDa se dvěma extracelulárními doménami („6-cysteine immunoglobulin-like“ a „mucin-like O-glycosylated protein“), cytoplazmatickou a transmembránovou doménou. Ve zdravých ledvinách je exprimován v minimálním množství, v moči se za fyziologických okolností téměř nevyskytuje (Brooks C. R. et al., 2015; Huo W. et al., 2010).

V dediferencovaných buňkách proximálního tubulu po ischemickém nebo nefrotoxickém poškození, a také u chronických onemocnění ledvin a u akutní či chronické dysfunkce transplantované ledviny, dochází k jeho zvýšené expresi a v moči lze následně snadno detekovat jeho proteolyticky odštěpenou extracelulární část o molekulové hmotnosti 80 až 90 kDa (Edelstein Ch. L., 2008; Huo W. et al., 2010; Malyszko J. et al., 2015).

V časně fázi působení škodlivého inzultu působí zvýšená exprese KIM-1 jako ochranný faktor tubulárních buněk – snižuje produkci prozánětlivých cytokinů, zvyšuje sekreci protizánětlivých růstových faktorů buňkami proximálního tubulu, zprostředkovává fagocytózu apoptotických tělísek epiteliálních buněk, a tím působí protizánětlivě (Yang L. et al., 2015); zvažuje se jeho využití jako biomarkeru ledvinného hojení (Zhang P. L. et al., 2008). Jeho chronicky zvýšené vyjádření v buňkách proximálního tubulu působí naopak škodlivě; Huo W. et al., 2010).

Škodlivé působení KIM-1 popisuje i další studie prováděná na myších modelech, která došla k závěrům, že KIM-1 zvyšuje nefrotoxicitu cisplatinu. Protilátky proti KIM-1 potlačily nefrotoxicitu cisplatinu (prostřednictvím T buněčné odpovědi). Užívání KIM-1 inhibitorů by

se tak mohlo stát preventivním opatřením, které by mohlo zabránit rozvoji AKI u pacientů užívajících cysplatinu (Notami Y. et al., 2011; Huo W. et al., 2010).

V průřezové studii bylo z bioptických vzorků ledvin zjištěno, že v proximálních tubulech ledvin u pacientů s prokázaným AKI (převážně ischemické etiologie) se výrazně zvýšila tvorba KIM-1 a na základě přítomnosti KIM-1 v moči bylo možné rozlišit ischemické AKI od prerenální azotémie a chronického onemocnění ledvin (Han W. K. et al., 2002).

Kromě ischemie ledviny zvyšuje koncentraci KIM-1 v moči také toxické poškození proximálního tubulu, popsán byl efekt aminoglykosidů a již zmíněné cisplatinu (Tecke B. K. et al., 2015; Luo Q. H. et al. 2014). U dětských pacientů bylo zveřejněno několik studií, jež zjistily zvýšený KIM-1 po podávání nefrotoxických látek (McWilliam S. J. et al., 2011; McWilliam S. J. et al., 2017) a u kardiologických pacientů (Jefferies J. L. a Devarajan P., 2016). Rozvoj AKI po kardiologických výkonech byl sledován i u dospělých pacientů (Parikh C. R. et al., 2013; Liangos O. et al., 2009; Han W. K. et al., 2009), koncentrace močového KIM-1 dosahovaly maxima za 2 až 3 hodiny po výkonu a přetrvávaly zvýšené 24 až 48 hodin. V těchto studiích byl močový KIM-1 označen za nejlepší a nejčasnější marker AKI, který predikuje přechod do stadia selhání ledvin.

Studie z roku 2007 sledovala expresi KIM-1 v bioptických vzorcích ledvinné tkáně u dalších ledvinných onemocnění než AKI a zjistila jeho zvýšené vyjádření např. u fokálně segmentální glomerulosklerózy, IgA nefropatie, membranoproliferativní glomerulonefritidy, membranózní nefropatie, akutní rejekce ledviny, chronické dysfunkce transplantované ledviny, systémového lupusu erytematodes, Wegenerovy granulomatózy, diabetické a hypertenzní nefropatie. KIM-1 byl vyjádřen zejména na lumenální straně dediferencovaných buněk proximálních tubulů v oblastech s fibrózou a v oblastech zánětu v makrofázích. Ledvinový KIM-1 pozitivně koreloval s poškozením ledvin a s močovým KIM-1. KIM-1 (jak ledvinový, tak močový) negativně koreloval s funkcí ledvin, nekoreloval s proteinurií. Studie uzavírá, že KIM-1 je up-regulován u rozličných onemocnění ledvin a je asociován s renální fibrózou a zánětem, močový KIM-1 může být užíván jako neinvazivní biomarker různých onemocnění ledvin (Van Timmeren M. M. et al., 2007).

Předmětem výzkumu byl i vztah mezi močovým KIM-1 a progresí do terminální fáze selhání ledvin či úmrtím u hospitalizovaných pacientů s AKI. Zvýšená koncentrace KIM-1 v moči byla spojena s negativním výsledným stavem (Edelstein Ch. L., 2008; Endre Z. H. et al., 2011).

Zvýšená exprese KIM-1 a jeho koncentrace v moči byla nalezena také u pacientů se zhoršenou funkcí transplantované ledviny. Jedna ze studií uzavírá, že by KIM-1 mohl u těchto

pacientů sloužit jako potenciální časný marker renálního poškození, vyšetřovat by se měl zvláště u pacientů s dalšími rizikovými faktory jako je hypertenze nebo diabetes (Malyszko J. et al., 2010). Dřívější studie Marcuse však nezaznamenala statisticky významný rozdíl v koncentracích močového KIM-1 mezi skupinami pacientů s opožděnou a normální funkcí štěpu (Marcus R. J. et al., 2007) a přehledový článek z roku 2015 (Malyszko J. et al., 2015) označuje vyšetřování močového KIM-1 jako markeru opožděné funkce transplantované ledviny přímo jako neúčelné a zbytečné. Studie z roku 2014 (Field M. et al., 2014) však poukazuje na význam vyšetřování KIM-1 u potenciálních dárců ledviny (autoři vyšetřovali KIM-1 u 182 multiorgánových dárců, jimž byla diagnostikována smrt mozku), tento marker byl statisticky významně vyšší u dárců, jejichž ledviny vykazovaly aberantní časnou funkci.

Další studie označuje KIM-1 jako nadějný marker fibrózy transplantované ledviny. Expres KIM-1 proteinu a KIM-1 mRNA byla zvýšená v bioptických vzorcích transplantátu ledviny s intersticiální fibrózou a tubulární atrofií. Byly zjištěny signifikantní korelace mezi KIM-1 proteinem a mRNA v ledvinné tkáni, mezi KIM-1 mRNA expresí ve tkáni a v moči a mezi expresí tkáňového KIM-1 a močovou mRNA. Stanovení močové KIM-1 mRNA by se mohlo stát užitečným biomarkerem poškození ledvinného štěpu (Nogare A. L. et al., 2015; Nogare A. L. et al., 2012).

1.3.1.4. Interleukin-18

Interleukin-18 (IL-18, známý též jako „interferon-gama-inducing factor“) je součástí cytokinové rodiny interleukinu 1 (rodina interleukinu-1 obsahuje 11 různých cytokinů, které hrají významnou úlohu v regulaci zánětlivých reakcí v důsledku infekcí či sterilního zánětu). Je produkován jako inaktivní forma o molekulové hmotnosti 24 kDa, která je štěpena kaspázou-1 (intracelulární cysteinovou proteázou) na aktivní formu o molekulové hmotnosti 18 kDa. Jedná se o prozánětlivý cytokin exprimovaný zejména makrofágy, ale také monocyty, dendritickými buňkami a renálními epiteliálními buňkami. U zdravých lidí nacházíme hladiny sérového a močového IL-18 nízké.

IL-18 moduluje vrozenou i získanou imunitní odpověď, významně ovlivňuje Th-1 imunitní odpověď (Matsumoto K. a Kanmatsuse K., 2001), hraje významnou roli v obraně proti celé řadě infekcí. Je up-regulován v zánětlivých stavech, jeho aktivita byla popsána i u širokého spektra zánětlivých onemocnění např. u zánětlivé střevní nemoci, zánětlivé artritidy, systémového lupusu erytematodes, chronické hepatitidy, roztroušené sklerózy, psoriázy.

IL-18 se podílí na rozvoji ischemicko-reperfučního poškození. Experimentálně bylo zjištěno, že potlačení aktivity IL-18 (podáváním selektivního inhibitoru kaspázy-1 nebo

podáváním IL-18 neutralizačního antiséra) ochránilo myokard a ledviny před poškozením (McMahon G. M. a Waikar S. S., 2013). Na myším modelu byla prokázána zvýšená koncentrace IL-18 v moči při ischemickém AKI (Melnikov V. Y. et al., 2001). O IL-18 se hovoří především jako o možném biomarkeru ischemického poškození ledvin. Jeho tvorba je indukována v proximálním tubulu po akutním poškození ledvin, kdy je jeho proforma přeměňována kaspázou-1 na aktivní formu, která opouští buňku a vylučuje se do moče (McMahon G. M. a Waikar S. S., 2013).

U dětí bylo publikováno mnoho studií potvrzující význam vyšetření IL-18 v moči po kardiochirurgickém výkonu, většinou je zdůrazňován význam vyšetření společně s dalšími markery AKI (Parikh C. R. et al., 2006; Krawczeski C. D. et al., 2011; Zheng J. et al., 2013; Hazle M. A. et al., 2013; Parikh C. R. et al., 2011). Např. studie Parikha z roku 2006 sledující 71 dětských pacientů popisuje signifikantní zvýšení močové koncentrace IL-18 za 4 až 6 hodin po kardiochirurgickém výkonu, s maximem (25 násobné zvýšení) za 12 hodin po výkonu, zvýšení močové koncentrace setrvalo minimálně 48 hodin po výkonu, ale senzitivita nedosahovala hodnot NGAL nebo KIM-1 (Parikh C. R. et al., 2006). Studie Krawczeskiho z roku 2011 sledující 220 dětí po operaci kardiopulmonálního bypassu uvádí rozvoj AKI u 27 % dětí. Nejdříve došlo k významnému vzestupu NGAL (za 2 hodiny po výkonu), následoval vzestup IL-18 a L-FABP (za 6 hodin) a k vzestupu KIM-1 došlo 12 hodin po výkonu (Krawczeski C. D. et al., 2011). Další studie ze stejného roku (Parikh C. R. et al., 2011) sledující 311 dětí zjistila, že koncentrace močového IL-18, podobně jako koncentrace močového NGAL, signifikantně stoupají hlavně v prvních 24 hodinách po kardiochirurgické operaci (s maximem kolem 6 hodin). Tato studie uzavírá, že močový IL-18 a močový (nikoliv plazmatický) NGAL úspěšně predikují AKI a jeho progresi a korelují s nepříznivým klinickým stavem, např. s trváním mechanické ventilace, nutností hospitalizace na jednotce intenzivní péče či celkovou délkou hospitalizace.

Obdobné studie probíhaly i u dospělých pacientů. Do studie Haaseho z roku 2008 bylo zařazeno 100 pacientů podstupující operaci kardiopulmonálního bypassu. AKI se vyvinulo u 20 % z nich a oproti očekávání nebyl shledán významný rozdíl v hodnotách močového IL-18 mezi touto skupinou pacientů a pacienty, jenž AKI nevyvinuli. IL-18 byl vyšetřován bezprostředně po operaci a následně za 24 hodin (Haase M. et al., 2008).

Metaanalýza z roku 2015 vyhodnocující výsledky plazmatických (či sérových) nebo močových biomarkerů AKI (NAG, cystatin C, NGAL, KIM-1, IL-18 a L-FABP) 28 studií z let 1990 až 2015 uzavírá, že sledované markery mají u dospělých pacientů pouze omezený

potenciál v predikci AKI v prvních 24 hodinách po kardiochirurgických výkonech (Ho J. et al., 2015).

Jiné studie však poukazují na význam IL-18 u pacientů s rozvojem AKI po kardiochirurgickém zákroku. V roce 2012 byla publikována studie sledující 1219 dospělých pacientů. AKI vyvinulo 35 % pacientů a 90 % z nich mělo zvýšené sledované markery (močový IL-18, ACR, močový a plazmatický NGAL), přičemž s progresí AKI korelovaly všechny, nejlépe plazmatický NGAL (Koyner J. L. et al., 2012). Studie z roku 2014 sledovala koncentrace 32 možných močových biomarkerů u 95 pacientů a právě IL-18 byl nejlepším markerem předvídajícím horšení AKI nebo úmrtí, dobrými prediktory byly též L-FABP, NGAL a KIM-1 (Arthur J. M. et al., 2014).

V průřezové studii Parikha a spolupracovníků z roku 2004 byla koncentrace IL-18 v moči výrazně zvýšená u pacientů s prokázaným AKI, ne však u jedinců s infekcí močových cest, s chronickým onemocněním ledvin, s nefrotickým syndromem nebo se selháním ledvin prerenální etiologie. Výhoda IL-18 byla spatřována právě v možnosti odlišení AKI od zmiňovaných onemocnění (Parikh C. R. et al., 2004).

Studie Matsumota a Kanmatsuse z roku 2001 však demonstruje, že u pacientů s nefrotickým syndromem s minimálními změnami glomerulů močový IL-18 významně koreloval s proteinurií a se závažností nemoci jako takové. IL-18 byl detekován pouze ve skupině pacientů s aktivní formou nefrotického syndromu (u pacientů v remisi zůstal nízký) a koreloval s aktivitou nemoci. Tyto nálezy podporují hypotézu, že by IL-18 mohl hrát roli v patofyziologických mechanismech rozvoje nefrotického syndromu (Matsumoto K. a Kanmatsuse K., 2001).

Nedávno publikovaná studie (Mojtahedzadeh M. et al., 2016) sledovala, zda vyšetření močových markerů IL-18 a NGAL může predikovat opožděnou funkci kadaverózní ledviny u transplantovaných pacientů. U 19 % z 69 pacientů byla zaznamenána opožděná funkce štěpu. Významné zvýšení poměru močový IL-18/močový kreatinin bylo zaznamenáno již za 2 hodiny po transplantaci u pacientů s opožděnou funkcí štěpu (ve srovnání s pacienty s normální funkcí, $p = 0,003$), za 24 hodin bylo zvýšení ještě markantnější ($p < 0,001$), ke zvýšení poměru močový NGAL/močový kreatinin za 2 hodiny nedošlo, zvýšení bylo patrné až za 24 hodin ($p = 0,004$). Multivariantní analýza prokázala, že poměr IL-18/kreatinin v moči významně zlepšuje predikci opožděné funkce transplantované ledviny.

Obdobně, studie publikované v dřívější době (Parikh C. R. et al., 2006; Hall I. E. et al., 2010) poukazují na zmíněné močové markery IL-18 a NGAL (bez korekce na močový kreatinin) jako na časné prediktory opožděné funkce ledvinného štěpu (většinou definované

jako potřeba dialýzy v průběhu prvního týdne po transplantaci ledviny či obnovení funkce do 3 měsíců po transplantaci). Močový KIM-1 tuto vypovídající hodnotu neměl.

Studie sledující vznik opožděné funkce transplantované ledviny od žijících dárců zaznamenala významnou asociaci mezi opožděnou funkcí štěpu a močovými hladinami NGAL již 1. den po transplantaci, ke zvýšení hladin močového IL-18 došlo až 3. den po transplantaci. Močový NGAL byl tedy označen jako časnější, a tedy i přínosnější marker (Salamzadeh J. et al., 2012).

V této souvislosti byly sledovány také sérové koncentrace IL-18 a NGAL. Zatímco sérový NGAL byl označen jako časný a senzitivní biomarker dysfunkce transplantované ledviny, sérový IL-18 v této studii vypovídající hodnotu neměl, nerozlišil mezi opožděnou a okamžitou funkcí štěpu (Lee E. Y. et al., 2012).

Zajímavé výsledky přineslo sledování močového IL-18 v kohortě 451 dospělých pacientů v intenzivní péči, u nichž byla zvýšená koncentrace IL-18 v moči horším markerem AKI, ale dobře korelovala s celkovou závažností stavu (vývojem sepse, potřebou akutní dialýzy) a s mortalitou (Siew E. D. et al., 2010). Těsnou asociaci mezi systémovým zánětem či celkově nepříznivým stavem a hladinami močového IL-18 demonstrují i další studie (Gracie J. A. et al., 2003, Parikh C. R. et al., 2011). Možnou limitací tohoto markeru může být právě tato skutečnost. Jedná se spíše o marker infekce a rozvinutého zánětlivého stavu než o specifický marker AKI (McMahon G. M. a Waikar S. S., 2013).

1.3.1.5. Liver-type fatty acid-binding protein a heart-type fatty acid-binding protein

Liver-type fatty acid-binding protein (L-FABP, jaterní protein vázající mastné kyseliny, známý též pod označením „fatty acid-binding protein 1“, FABP1) patří do rodiny „fatty acid-binding“ proteinů (FABPs), jež byla objevena v roce 1972. Dosud bylo identifikováno deset členů této proteinové rodiny: FABP1-9 a v roce 2011 byl popsán FABP12 (Ockner R. K., 1990; Smathers R. L. a Petersen D. R., 2011). Jedná se o malé (14 až 15 kDa), vysoce konzervované cytoplazmatické proteiny. Jsou schopny vázat mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (LCFAs, long-chain fatty acids), čímž zvyšují jejich solubilitu a usnadňují jejich transport z cytoplazmatické membrány k místům jejich oxidace, esterifikace či do jádra, kde mají regulační funkce (Glatz J. F. a Van der Vusse G. J., 1996). FABPs jsou pojmenovány podle orgánů, ve kterých byly prvně identifikovány nebo ve kterých se nejvíce vyskytují. Jejich exprese však není vázána výlučně na tyto orgány, např. L-FABP je exprimován především v játrech, ale také ve střevě, pankreatu, ledvinách, plicích a žaludku (Smathers R. L. a Petersen D. R., 2011).

FABPs, společně s dalšími dvěma skupinami ligand-vázajících proteinů (lipokaliny a avidiny), jsou součástí větší „superrodiny“ – calycinů. Pro všechny calyciny je typická terciární struktura β -válece uzavírající vnitřní vazebné místo pro ligand, FABP β -válec je 10-vláknitý a nesouvislý (Smathers R. L. a Petersen D. R., 2011; Flower D. R., 1996).

L-FABP představuje v játrech 7–11 % ze všech cytoplazmatických proteinů (Vergani L. et al., 1990). Tento protein vykazuje ve srovnání s ostatními členy FABPs rodiny jedinečnou strukturu, jež mu umožňuje vázat rozmanité ligandy, a navíc může vázat až dva ligandy souběžně, v závislosti na jejich velikosti. Kromě LCFAs je schopný vázat hem, žlučové kyseliny, bilirubin, monoglyceridy, eikosanoidy, endokanabinoidy, fytoKANabinoidy. Navázáním hemu, mastných kyselin a některých dalších molekul pravděpodobně zabraňuje jejich potenciálnímu cytotoxickému účinku (Wang G. et al., 2015). Z buněk proximálního tubulu ledvin je L-FABP vyloučen do tubulárního lumen společně s navázanými toxickými produkty peroxisomů (Schrezenmeier E. V. et al., 2017).

Zvýšená exprese L-FABP a také jeho zvýšená sérová hladina bývá popisována u pacientů s rozličnými metabolickými problémy, např. s obezitou, zhoršeným lipidickým profilem, inzulinovou rezistencí (Shi J. et al., 2012). Zvýšené koncentrace L-FABP v moči a v séru jsou též významnými markery střevní ischemie (Thuijls G. et al., 2011).

V poslední době je výzkumně vyšetřován především v souvislosti s onemocněním ledvin. L-FABP je vyjádřen v proximálních tubulech. Kromě L-FABP se v ledvinách vyskytuje ještě H-FABP (heart-type), jenž exprimují distální tubulární buňky. FABPs pravděpodobně chrání ledviny před poškozením. K jejich up-regulaci dochází u různých renálních poškození, např. po působení toxických látek, po renální ischemii v návaznosti např. na operaci kardiálního bypassu nebo transplantaci ledviny, ale též u konečné fáze selhání ledvin (Pelsers M. M., 2008). Na zvýšené koncentraci FABPs v moči se podílí též snížený peritubulární kapilární tok za ischemických podmínek (za normálních okolností jsou tubulárními buňkami zpětně neabsorbovány; Przybylowski P. et al., 2011). Zvýšení močových L-FABP a H-FABP bylo popsáno i u pacientů s idiopatickou membranózní nefropatií. Mezi těmito markery byla nalezena významná korelace, svědčící na existenci současného poškození proximálních i distálních tubulárních buněk, oba markery predikují prognózu těchto pacientů (Hofstra J. M. et al., 2008).

Výzkum je však zaměřen především na L-FABP. Jeho zvýšená močová koncentrace je schopna identifikovat pacienty v riziku rozvoje ledvinových onemocnění (Xu Y. et al., 2015; Hishikari K. et al., 2017). Lze ho využít také jako prediktoru uzdravení akutně poškozených ledvin (Wang L. et al., 2015). Signifikantně vyšší koncentrace L-FABP v moči byla zjištěna u

skupiny pacientů s progredující chronickou renální insuficiencí ve srovnání s neprogredující, L-FABP odráží klinickou prognózu chronické renální choroby (Kamijo A. et al., 2004).

O tomto markeru se hovoří především v souvislosti s rozvojem AKI. Existuje celá řada studií vyšetřující L-FABP v souvislosti s kardiochirurgickými a cévně chirurgickými výkony. Po endovaskulárním výkonu na abdominální aortě se močový L-FABP významně zvýšil za 4 hodiny po výkonu, po otevřené operaci aorty již za 2 hodiny, zatímco sérový kreatinin významně vzrostl až 2. pooperační den (Obata Y. et al., 2016). Studie sledující 408 dětských pacientů po kardiopulmonálním bypassu vyšetřovala markery renálního poškození (plazmatický cystatin C, NGAL v plazmě i v moči, močové IL-18, KIM-1, L-FABP, albumin) a 10 plazmatických markerů zánětu. AKI se rozvinulo u 43 % dětí a právě močový L-FABP vykazoval nejlepší schopnost zachytit AKI progresi (ze zánětlivých markerů to byl IL-8, Greenberg J. H. et al., 2018). K obdobným závěrům došla studie sledující dospělé pacienty po kardiopulmonálním bypassu: močový L-FABP byl významně vyšší u pacientů, kteří rozvinuli AKI, a to již na konci výkonu a 3 hodiny po výkonu, 3 hodiny po výkonu bylo nalezeno významné zvýšení i močového NGAL (Moriyama T. et al., 2016).

Proti těmto zjištěním stojí u dospělých pacientů výsledky již zmíněné metaanalýzy z roku 2015 poukazující na omezenou výpovědní hodnotu markerů AKI (včetně L-FABP) v predikci AKI u dospělých pacientů po kardiochirurgických výkonech (Ho J. et al., 2015).

Močový L-FABP společně s močovým NGAL byl vyšetřován též u pacientů podstupující jiné velké chirurgické výkony. Nejvyšší hodnoty L-FABP byly zaznamenány 4 hodiny po operaci (172násobné zvýšení v porovnání s hodnotou před operací) a NGAL 12 hodin po operaci (16násobné zvýšení) ve skupině pacientů, kteří později vyvinuli AKI. Kombinace těchto markerů může ještě zlepšit jejich diagnostické využití (Zeng X. F. et al., 2014). Stejně markery (močový NGAL a L-FABP) byly vyšetřovány u pacientů po transplantaci jater, senzitivnější a specifitější byl v této studii NGAL (Li Y. et al., 2012).

L-FABP (většinou společně s dalšími markery) byl vyšetřován i u pacientů s patologií na koronárních cévách podstupujících koronarografii s cílem predikovat kontrastem indukované AKI. Studie z roku 2017 nezaznamenala statisticky významně vyšší močové koncentrace L-FABP u pacientů, jenž vyvinuli AKI (byly u nich však zjištěny významně vyšší močové koncentrace KIM-1 a IL-18; Wybraniec M. T. et al., 2017). Stejně tak studie z roku 2015 poukazuje na neuspokojivou prediktivní hodnotu L-FABP pro AKI u pacientů po koronarografii (AUC 0,64; Torregrosa I. et al., 2015). Zcela recentní studie z roku 2018 vyšetřovala markery AKI (plazmatický NGAL, sérové L-FABP, KIM-1, IL-18, kreatinin a močové NGAL, cystatin C) po podání kontrastní látky u pacientů s chronickým

onemocněním ledvin. AKI nejlépe predikoval sérový L-FABP ve 4. hodině a plazmatický NGAL v 6. hodině po podání kontrastu. Autoři uzavírají, že kombinace právě těchto markerů zvýší specifitu zjištění kontrastem indukovaného AKI na 97 % (Connolly M. et al., 2018).

U pacientů s AKI zvýšené hodnoty močových L-FABP a NAG významně korespondovaly s mortalitou (Hiruma T. et al., 2014). Další studie vyšetřovala u kriticky nemocných pacientů s časným AKI kromě močového L-FABP v moči též NGAL, IL-18, KIM-1 a zjistila, že pouze L-FABP byl schopný predikovat špatný klinický stav (progresi AKI, potřebu dialýzy nebo úmrtí během 7 následujících dnů; Parr S. K. et al., 2015). Studie na transgenních myších potvrdila schopnost L-FABP detekovat AKI s vysokou senzitivitou a též vypovídat o jeho závažnosti, např. při AKI komplikovaném septickým stavem (Doi K., 2010). L-FABP je tedy významným markerem schopným detekovat vysoce rizikové pacienty a mohl by přispět k rozvoji nových AKI diagnostických kritérií v kritické péči.

Oproti tomu, studie sledující pacienty po transplantaci ledviny neshledala asociaci močového L-FABP s rizikem vzniku nepříznivého klinického stavu, jako je výskyt kardiovaskulární příhody, selhání funkce štěpu, úmrtí. Močový NGAL asocioval se všemi zmíněnými stavy, KIM-1 a IL-18 pouze s úmrtím. (Bansal N. et al., 2016).

Močové koncentrace L-FABP, NGAL, KIM-1, IL-18 a albuminu vyšetřované u 1304 zemřelých dárců ledvin silně korespondovaly s přítomností AKI (jenž bylo zjištěno u 9 % potenciálních dárců). Vyšší hladiny močového NGAL byly asociovány též s opožděnou funkcí štěpu, ostatní vyšetřované markery měly v tomto ohledu omezenou výpovědní hodnotu (Reese P. P. et al., 2016). Menší studie ze stejného roku vyšetřovala močové markery L-FABP a NGAL u 94 zemřelých potenciálních dárců ledviny a uzavírá, že tyto biomarkery jsou schopné odhalit eventuální sníženou funkci transplantované ledviny (Koo T. Y. et al., 2016), což bylo potvrzeno i dalšími studiemi, avšak IL-18 a KIM-1 tuto vypovídající schopnost neměly (Parikh C. R. et al., 2016; Przybylowski P. et al., 2011; Yang J. et al., 2014).

Ledviny získané od dárců po srdeční smrti můžou zvýšit pool těchto orgánů, ale jsou spojeny s vysokou incidencí opožděné funkce štěpu. Využití močového L-FABP jako časného markeru AKI je limitováno u opožděné funkce štěpu vzhledem k nedostupnosti močových vzorků. Studie z roku 2014 proto před a po transplantaci vyšetřovala sérové hladiny L-FABP, které rapidně klesly u pacientů s bezprostřední funkcí transplantátu, pomalu u opožděné funkce transplantátu a mírně stouply u pacientů vyžadujících hemodialyzační léčbu častěji než 1x týdně (Kakai A. et al., 2014).

1.3.1.6. Neutrofilní s gelatinázou asociovaný lipokalin

Neutrofilní s gelatinázou asociovaný lipokalin (NGAL, synonyma: lipokalin-2 (Lcn2), onkogenní protein 24p3, siderocalin) patří do lipokalinové rodiny (náležící mezi calyciny), která tvoří velkou skupinu funkčně rozdílných malých extracelulárních proteinů s charakteristickou terciární strukturou, které obvykle váží malé hydrofobní molekuly. Vzhledem k této schopnosti byly v minulosti označovány jako transportní proteiny, postupně však byly objevovány jejich další funkce (např. regulace buněčné homeostázy a modulace imunitní odpovědi). Lipokaliny vykazují velkou rozmanitost na úrovni sekvenčního uspořádání, všechny však sdílejí krátký konzervovaný sekvenční motiv, jehož přítomnost je nutná pro začlenění určitého proteinu do lipokalinové rodiny. Terciární struktura lipokalinů je (v kontrastu s nízkou sekvenční homologií) vysoce konzervovaná a představuje ji β -válec tvořený osmi antiparalelními strukturami β -skládaného listu (jež jsou do výsledné struktury válce zformovány pomocí vodíkových můstků). Vazebné místo ligandu „šálkového tvaru“ se nachází uvnitř β -válce. Skupinu lipokalinů můžeme rozdělit na dvě podskupiny: strukturálně příbuzné „kernel“ (core) lipokaliny a méně početné, různorodější „outlier“ lipokaliny (Flower D. R. et al., 1993; Flower D. R., 1996).

NGAL byl objeven na začátku 90. let minulého století a patří do skupiny „kernel“ lipokalinů. Jedná se o malý proteáza-rezistentní glykoprotein (25 kDa, 178 aminokyselinových zbytků), který byl původně identifikován v neutrofilních granulích, v nichž je kovalentně vázán na gelatinázu B (matrixovou metaloproteinázu 9, MMP-9, Kjeldsen L. et al., 1993; Kjeldsen L. et al., 1994). NGAL však není vždy asociován s MMP-9. Je syntetizován v časných stádiích granulopoézy (v myelocytech – v průběhu formace sekundárních granulí), zralé neutrofilny ho postrádají. Proto byl navrhován i za časný marker diferenciacie granulocytů. Expresi NGAL v myeloidních buňkách (před začátkem diferenciacie v granulocyty) indukují IGF-1 a G-CSF (Liu M. et al., 2005).

Jeho exprese byla zjištěna také v dalších buňkách: v adipocytech, chondrocytech, endometriálních, endoteliálních a epiteliálních buňkách, fibroblastech, hepatocytech, keratinocytech, makrofázích, mezangiálních buňkách, myelocytech, myoblastech, pneumocytech typu 2, splenocytech, tymocytech, buňkách hladké svaloviny cév, buňkách některých karcinomů (např. ovaria či pankreatu). Nachází se tedy v celé řadě tkání a orgánů – např. v plicích, žaludku, střevě, játrech, prostatě, děloze, slinných žlázách. Nejvyšší produkce ze všech výše uvedených buněk byla zjištěna v buňkách tlusté části vzestupného raménka Henleho kličky, distálních tubulů a sběracích kanálků nefronu (Yan Q. W. et al., 2007;

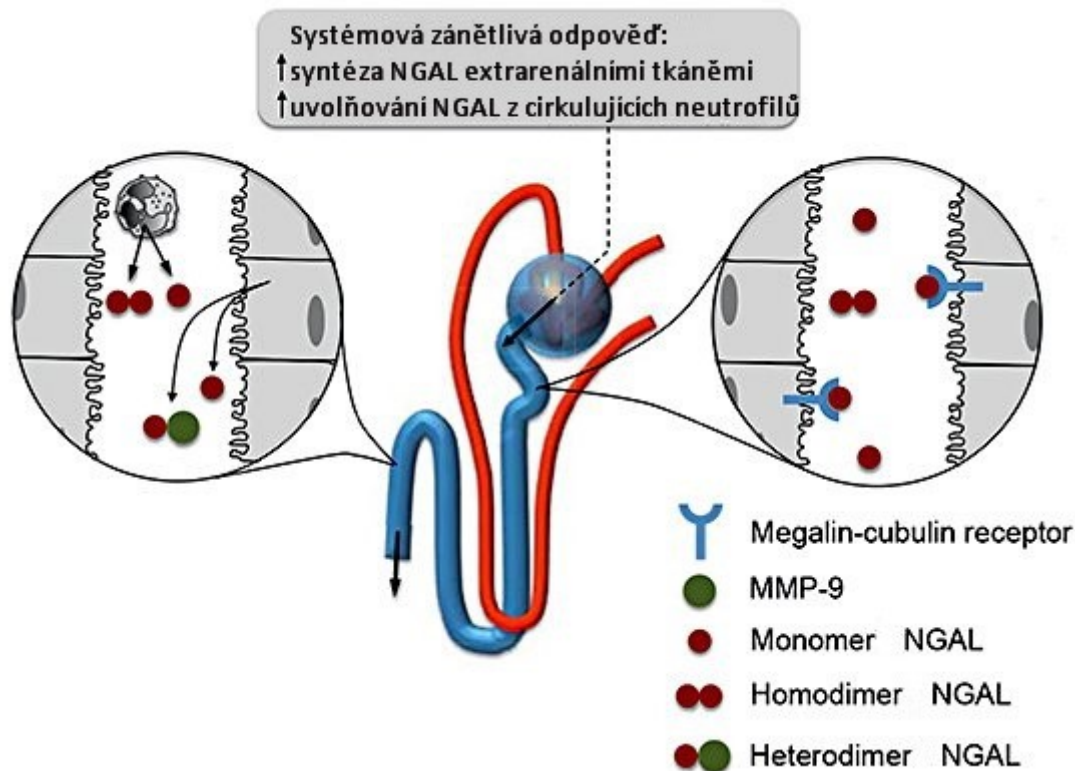
Cowland J. B. et al., 1997; Mishra J. et al., 2003; Jayaraman A. et al., 2005; Mallbris L. et al., 2002; Sunil V. R. et al., 2007; Bu D. X. et al., 2006).

Ve zmíněných buněčných typech je syntéza NGAL indukována různými faktory – např.: bakteriálními lipopolysacharidy, dexametazonem, G-CSF, HGF, IGF-1, IL-1- β , IL-6, leptinem, kyselinou retinovou, TGF- α , IL-17, NF- κ B (Cowland J. B. et al., 2003; Jayaraman A. et al., 2005; Sunil V. R. et al., 2007; Bu D. X. et al., 2006). V některých situacích je exprese NGAL regulována autokrinním mechanismem. NGAL vykazuje pleiotropní biologické aktivity v rozličných buněčných typech a tkáních. Díky některým z nich bychom mohli NGAL též klasifikovat jako cytokin nebo růstový faktor (Sørensen O. E. et al., 2003; Hekerman P. et al., 2007).

Vzhledem k malé velikosti molekuly a rezistenci vůči odbourávání je NGAL snadno renálně vyloučen a detekován v moči – jak jeho volná forma (nejčastěji jako monomer, v malém množství též jako dimer), tak v komplexu s MMP-9. Je volně filtrovatelný, ale může být též zpětně reabsorbován. Hladiny v moči korelují s hladinami v plazmě nebo v séru. Zvláště vysoké koncentrace v moči můžeme očekávat v případě, kdy je NGAL uvolňován do moče přímo ledvinnými tubuly nebo uroteliálním karcinomem (Yan L. et al., 2001).

Syntéza NGAL je významně indukována poškozením epitelu (při zánětu, ischemii nebo neoplastických transformacích). Kromě AKI jsou to např. nádory, záněty střeva, infekce močových cest či systémové infekce, adenokarcinom prsu, pankreatu, uroteliální karcinom, nádory mozku (Friedl A. et al., 1999; Fernández C. A. et al., 2005; Nickolas T. L. et al., 2008; Smith E. R. et al., 2008; Nielsen B. S. et al., 1996). Je produkován též v endotelu, byl prokázán v aterosklerotických plátech, v aneuryzmatech aorty (Hemdahl A. L. et al., 2006; Folkesson M. et al., 2007) a byl označen jako prediktor kardiovaskulárního rizika (Orenes-Piñero E. et al., 2013). Jeho produkce se zvyšuje v orgánech, ve kterých probíhá involuce, jako je poporodní děloha a prsní žláza po laktaci či v klimakteriu; v těchto orgánech zvýšená syntéza NGAL indukuje apoptózu (Bong J. J. et al., 2004; Liu Q. et al., 1997). Vlastnosti a zdroje NGAL v průběhu AKI a systémových infekcí znázorňuje obrázek 2.

O NGAL se hovoří též jako o adipokinu zvyšující inzulínovou rezistenci. Je hojně exprimován v tukových tkáních a játrech a bývá označován jako zánětlivý marker asociovaný s obezitou, inzulínovou rezistencí a hyperglykemií (Yan Q. W. et al., 2007; Wang Y. et al., 2007). Je hojně vyjádřen též v progenitorových buňkách erytrocytů, indukuje jejich apoptózu, inhibuje jejich diferenciaci ve zralé erytrocyty. Během akutní anémie je exprese NGAL v erytroidních buňkách redukována autokrinním zpětně vazebným mechanismem (Miharada K. et al., 2005).



Obr. 2. Vlastnosti a zdroje NGAL v plazmě a moči při akutním poškození ledvin.

Systémová infekce indukuje syntézu NGAL extrarenálními tkáněmi a jeho uvolnění z (nezralých) neutrofilů. Močový NGAL se zvyšuje z důvodu jeho snížené reabsorpce (down-regulace megalin-cubulinových receptorů v proximálních tubulech), zvýšené syntézy ve stresovaných tubulárních buňkách distálního nefronu a uvolněním z infiltrujících neutrofilů. Neutrofilové uvolňují hlavně dimerické formy (a do určité míry monomerní formy), zatímco tubulární buňky produkují hlavně monomerní formy a v určité míře NGAL konjugované s MMP-9 (matrixovou metaloproteinázou 9), tzv. heterodimerický NGAL (upraveno podle Mårtensson J. a Bellomo R., 2014).

NGAL má význam též v imunitní a zánětlivé odpovědi. V pokusech na myších bylo zjištěno, že je jeho exprese indukována aktivací Toll-like receptorů (TLR) na imunitních buňkách. Tyto receptory jsou nástrojem pro včasnou detekci charakteristických mikrobiálních produktů (např. lipopolysacharidů, bakteriální či virové NK) a k zahájení rychlých obranných reakcí. Exprese NGAL je významně snížena v případě chybění TLR2 signalizace (Draper D. W. et al., 2006).

NGAL pevně váže bakteriální enterobaktin a některé další siderofory (látky produkované a vylučované ve zvýšené míře bakteriemi, které komplexují Fe (III) a transportují ho do bakteriální buňky). Sekvestrací sideroforů s navázaným Fe brání přísunu železa do bakteriální buňky, a tím omezuje bakteriální růst. Bakterie jsou však schopné siderofory modifikovat, a tím zabránit navázání NGAL (Goetz D. H. et al., 2002).

V roce 2005 byla publikována studie, jež simulovala model těžkého renálního ischemicko-reperfučního poškození u myši. Podání NGAL a následná tvorba komplexu „NGAL: siderofor: Fe“ významně ochránilo ledvinu up-regulací exprese protektivního enzymu hemoxygenázy-1, chránil N-cadherin proximálního tubulu a inhibující buněčnou smrt. Dále bylo zjištěno, že komplexy NGAL s železo-vázajícími siderofory mohou přeměnit ledvinné progenitorové buňky na epitelální buňky renálních tubulů. V postischemické ledvině se NGAL přednostně kumuluje v proximálních tubulech spolu s proliferujícími buňkami, což hypotézu, že NGAL indukuje reepitalizaci, podpořilo (Mori K. et al., 2005).

NGAL poskytuje organizmu alternativní cestu v uvolnění železa do cytoplazmy (vedle transferinu), a tak zprostředkovává aktivaci nebo represi železo-vnímavých genů. Tato cesta hraje roli v organogenezi během mezenchymo-epitelální přeměny (Yang J. et al., 2002).

V roce 2005 byl naklonován myší receptor pro NGAL (označený jako 24p3 receptor). Jeho exprese uděluje buňkám schopnost přijímat železo a následně regulovat apoptózu. NGAL chudý na železo snižuje intracelulární koncentraci železa, což indukuje expresi pro-apoptického proteinu Bim a způsobí buněčnou smrt. Na železo bohatý NGAL intracelulární koncentraci železa zvyšuje, apoptóza není podněcována (Devireddy L. R. et al., 2005).

Ve stejném roce byl identifikován další vysokoafinitní receptor pro NGAL. Jedná se o receptor z low-density lipoprotein receptorové rodiny low density lipoprotein-related protein 2 (LRP2), který je známý také jako gp330, megalin nebo rat Heymann nephritis antigen a je vyjádřený hlavně v epitelálních buňkách. Váže velké množství specifických ligandů, zahrnující cytokiny, hormony, další proteiny a nízkomolekulární substance. Hraje významnou roli ve vývoji organismu a v ledvinné fyziologii a patofyziologii (Hvidberg V. et al., 2005).

NGAL je jedním z nejčasnějších proteinů, jejichž syntéza je indukována v ledvinách po ischemickém a nefrotoxickém poškození; jeho zvýšení v séru a moči lze pozorovat během 2 hodin po vzniku poškození ledvin, 24 až 48 hodin před zvýšením sérového kreatininu (Nickolas T. L. et al., 2008). V průřezové studii vykazovali děti s prokázaným akutním selháním ledvin (definovaným jako zdvojnásobení sérové koncentrace kreatininu v období kratším než pět dnů) více než desetinásobný vzestup sérové koncentrace NGAL a více než stonásobný vzestup jeho koncentrace v moči oproti kontrolním osobám (Mishra J. et al., 2005).

Přínos stanovení tohoto markeru pro časnou detekci akutního poškození ledvin byl pozorován u dětských pacientů na jednotkách intenzivní péče (Zappitelli M. et al., 2007), s tzv. kontrastní nefropatií a po podávání nefrotoxických léčiv (Hirsch R. et al., 2007).

Prospektivní studie u dětí po kardiochirurgických výkonech (Bennett M. et al., 2008; Wagener G. et al., 2006) poukazuje na NGAL jako na velmi časný prediktivní marker potřeby dialýzy.

U nemocných po transplantaci ledviny se močový NGAL ukázal jako nejcitlivější biomarker opožděného nástupu funkce štěpu a jeho hodnoty korelovaly s délkou studené ischemie štěpu. Výpovědní hodnota sérového NGAL těsně následovala, L-FABP a IL-18 měly výpovědní hodnotu nižší (Parikh C. R. et al., 2006; Kohei J. et al., 2013; Reese P. P. et al., 2016). Studie z roku 2015 doporučuje kombinaci několika markerů (v tomto případě močových NGAL, IL-18 a sérového kreatininu) k odhalení pacientů v riziku opožděné funkce štěpu (Cui L. Y. et al., 2015).

NGAL se jeví jako užitečný biomarker také u dalších renálních poškození. Bylo např. zjištěno, že koncentrace NGAL v moči pozitivně korelují se závažností renálního poškození u proteinurických pacientů (Bolignano D. et al, 2008). Další studie stejných autorů uvádí, že by NGAL mohl hrát významnou roli v patofyziologii rozvoje diabetické nefropatie a mohl by se tak stát jejím časným biomarkerem (Bolignano D. et al, 2009). Močový NGAL by mohl sloužit také jako časný biomarker tubulointersticiálního poškození u IgA nefropatie (Ding H. et al., 2007), nefroaktivity lupusové nefritidy (Pitashny M. et al., 2007). U chronického onemocnění ledvin jeho sérové i močové koncentrace významně korelují s glomerulární filtrací (Bolignano D. et al., 2009). Studie z roku 2017 popisuje souvislost mezi močovým NGAL a progresí CKD resp. až vyvinutím konečného stadia CKD či zvýšeným rizikem úmrtí (Lobato G. R. et al., 2017).

Význam vyšetření NGAL u diagnóz souvisejících s rozvojem AKI byl podrobně popsán v předchozím textu v souvislosti s vyšetřením již zmíněných AKI biomarkerů, zmíněna byla i jeho omezená výpovědní hodnota v předpovědi AKI u dospělých pacientů po kardiochirurgických výkonech (Ho J. et al., 2015). Velmi často byl NGAL vyšetřován společně s L-FABP.

Možné limitace užití NGAL jako časného biomarkeru AKI jsou následující: plazmatické hladiny můžou být ovlivněny přítomností chronického onemocnění ledvin, systémových infekcí, systémových zánětlivých stavů a malignitami, močové koncentrace pak např. chronickým onemocněním ledvin, zánětem ledvin a infekcí močových cest (Devarajan P., 2010).

V minulosti se o NGAL hovořilo (i přes zmíněné limitace) jako o excelentním a nejperspektivnějším markeru AKI, často byl dokonce označován jako „troponin-like“

marker AKI (jeho schopnost predikovat AKI byla přirovnávána ke schopnosti kardiálního troponinu predikovat akutní infarkt myokardu; Devarajan P., 2010).

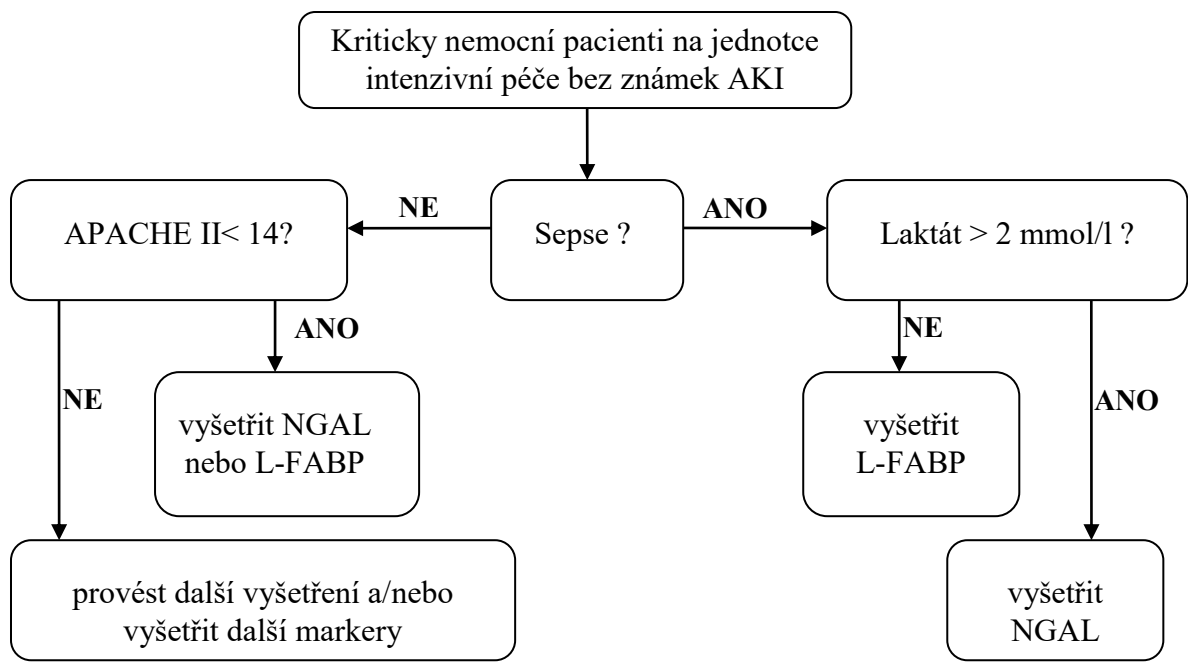
Později však právě jeho nepředvídatelné uvolňování při různých klinických stavech, komplexní povaha jeho molekuly a nemožnost specificky stanovit NGAL uvolněný tubulárními buňkami ledvin byly označeny jako překážka použití NGAL jako specifického markeru AKI u heterogenní kriticky nemocné populace pacientů (Mårtensson J. a Bellomo R., 2014).

V poslední době NGAL zažívá opět svou renezanci a potvrzuje to celá řada studií zmíněných výše (např. Torregrosa I. et al., 2015; Connolly M. et al., 2018; Bansal N. et al., 2016; Parikh C. R. et al., 2016). Velká pozornost je věnována právě pacientům v kritickém stavu v riziku rozvoje AKI. Koncentrace NGAL je možné sledovat v séru i v moči, obě hodnoty jsou využitelné jako prediktory AKI. Vyšetření NGAL v moči je v současné době považováno za přínosnější, praktičtější a snad i více efektivní, doporučuje se zavést do běžné klinické praxe, je dostupná diagnostická souprava k jeho stanovení. Někteří autoři upřednostňují hodnoty močového NGAL vztáhnout na močový kreatinin (což bude ještě diskutováno v kapitole 1.3.1.7.). Sérový NGAL by své místo měl u anurických pacientů, kde je ale diagnóza AKI jasná, a navíc v současné době není v České republice dostupná komerční diagnostická souprava k vyšetření NGAL v séru.

Na základě studie z roku 2016 (Asada T. et al., 2016) byl vyvinut dokonce nový algoritmus, který by umožnil zlepšit prediktivní hodnoty močových NGAL a L-FABP stratifikací AKI pacientů pomocí APACHE (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation) II skóre, zjištění přítomnosti sepse a hladin laktátu v krvi (obr. 3).

Studie vyšetřovala tyto močové markery u 249 kriticky nemocných pacientů a sledovala jejich možné souvislosti s různými patologickými stavy (zánětem, hypoperfuzí a jaterní dysfunkcí). NGAL lineárně koreloval se zánětlivými markery (s leukocytózou a CRP), zatímco L-FABP s hypoperfuzí a markery jaterního poškození (jaterními transaminázami, bilirubinem a laktátem).

Studie zdůrazňuje, že při používání nových biomarkerů pro predikci AKI by měl být zvažován klinický kontext, jako je přítomnost dalších („nonrenálních“) onemocnění a závažnost celkového stavu (Asada T. et al., 2016).



Obr. 3. Vyšetřovací algoritmus L-FABP a NGAL jako biomarkerů predikce AKI (upraveno podle Asada T. et al., 2016)

1.3.1.7. Korekce močových markerů akutního poškození ledvin na močový kreatinin

Vhodnost užívání poměru močový NGAL (event. i další močové biomarkery)/ močový kreatinin je poměrně často diskutována (Goldstein S. L., 2010). Např. Waikar a kolektiv (Waikar S. S. et al., 2010) ve své studii uvádějí, že užívání těchto poměrů je zvláště u pacientů s akutním poškozením ledvin nespolehlivé. Interpretace zvýšeného poměru biomarkeru na kreatinin závisí na znalosti změny ve vylučování biomarkeru vzhledem ke změně vylučování kreatininu. NGAL a další močové biomarkery AKI odrážejí strukturální a funkční následky poškození ledvin. Vylučování kreatininu může být při akutním poškození ledvin značně proměnlivé, jedná se o dynamický proces řízený jak glomerulární filtrací, tak tubulární sekrecí, proto lze změny v poměru interpretovat jen velmi obtížně. Korekce močového NGAL (a dalších biomarkerů) na močový kreatinin může nadhodnotit stadium akutního poškození ledvin v důsledku akutních a nestabilních změn kreatininu v moči (s klesající glomerulární filtrací dochází ke snižování koncentrací kreatininu v moči, což vyústí ve zvýšení hodnot poměrů NGAL/kreatinin v moči).

Prvořadým úkolem by však mělo být zlepšit prognózu pacientů s AKI, a to právě díky časnější detekci onemocnění (Chertow G. M. et al., 2005). Opakovaně bylo prokázáno, že ke zvýšení zmíněných močových biomarkerů dochází dříve, než dojde ke zvýšení sérového

kreatininu (Waikar S. S. a Bonventre J. V., 2008; Han W. K. et al., 2002; Zappitelli M. et al., 2007; Parikh C. R. et al., 2004; Haase M. et al., 2009). V tomto stadiu dochází již někdy k poklesu glomerulární filtrace, a právě snížení kreatininu v moči může zesílit užitečnost markeru (vztaženého na močový kreatinin) k detekci AKI (Goldstein S. L., 2010).

Na druhou stranu, nárůst koncentrace markeru AKI by měl předcházet poklesu glomerulární filtrace. Pokud by k detekci AKI v rané fázi bylo zapotřebí snížení glomerulární filtrace, pak by vyhodnocení biomarkerů AKI bylo zcela nadbytečné a stačilo by provádět vyšetření močového kreatininu (Goldstein S. L., 2010).

Korekce močových biomarkerů (opět především NGAL) na močový kreatinin byla předmětem výzkumu i u pacientů s chronickým onemocněním ledvin. Autoři studií opět uzavírají, že při užívání těchto poměrů by mělo být bráno v potaz snížené vylučování kreatininu močí u pacientů s pokročilejším CKD (Waikar S. S. et al., 2010). U pacientů s CKD dochází navíc k pomalejšímu vylučování kreatininu do moče (v porovnání s pacienty bez CKD, Mitch W. E. et al., 1980) a kreatininová exkrece močí může též klesat v průběhu progresu CKD v důsledku zvýšení extrarenální degradace kreatininu (Levey A. S. et al., 1989). Výslednou hodnotu kreatininu v moči ovlivňuje i relativní zvýšení tubulární sekrece (vzhledem k velmi snížené GF) u pacientů v konečných stádiích CKD, kdy clearance kreatininu může přesahovat glomerulární filtraci o 100 % i více.

Studie z roku 2013 (Helmerson-Karlqvist J. et al., 2013) sledovala biologickou variabilitu močového NGAL a poměru močový NGAL/močový kreatinin u zdravých jedinců dvou věkových kategorií (skupina mladých dospělých: medián věku 29 let, N=130; a skupina starších dospělých: medián věku 78 let, N=400). Pro močový NGAL byla zjištěna biologická variabilita 27 % a pro poměr močový NGAL/močový kreatinin 101 %. Koncentrace močového NGAL se lineárně zvyšovala s koncentrací močového kreatininu ($r=0,19$, $p<0,001$ u skupiny starších dospělých a hraniční korelace $r=0,16$, $p=0,08$ u skupiny mladých dospělých). Tento výsledek potvrzuje vhodnost korekce močového NGAL na močový kreatinin. Poměr močový NGAL/močový kreatinin byl však s močovým kreatininem asociován negativně ($r= -0,14$; $p<0,01$ u skupiny starších dospělých a $r= -0,16$; $p=0,07$ u skupiny mladých dospělých), což ukazuje na nadměrnou adjustaci hodnot NGAL. Tato studie korekci močového NGAL na močový kreatinin podporuje, avšak s tím, že je třeba mít na paměti velkou biologickou variabilitu tohoto poměru a riziko nadměrné korekce močového NGAL. Uzavírá, že např. pro odhad chronické tubulární dysfunkce by měly být užívány markery oba (jak nekorigovaný, tak korigovaný močový NGAL).

1.3.1.8. Současná doporučení pro vyšetřování markerů akutního poškození ledvin

Z výše uvedeného jednoznačně vyplývá, že NGAL a/nebo další biomarkery strukturálního poškození ledvin např. L-FABP, IL-18, KIM-1, NAG by měly najít uplatnění v klinické praxi, a to i přes zmíněné limitace jejich užití. Jejich zvýšení bez současného zvýšení sérového kreatininu bývá často označováno jako „subklinické AKI“. Korekce močových markerů na močový kreatinin je předmětem častých diskuzí (např. Goldstein S. L., 2010), většina autorů (např. Helmersson-Karlqvist J. et al., 2013) však nakonec doporučuje uvádět hodnoty obě – nekorigovanou i korigovanou na močový kreatinin (s vědomím zmiňovaných rizik při interpretaci korigovaných hodnot).

V současné době je AKI diagnostikováno většinou z hodnot sérového kreatininu (event. cystatinu C) a diurézy. V tomto stadiu již však dochází k poškození funkce ledvin až k renálnímu selhávání s daleko větším rizikem vzniku různých komplikací.

Dostupnost vyšetření markerů AKI umožní identifikovat pacienty s AKI bez snížení funkce ledvin. Je však nepravděpodobné, že by se našel tzv. renální troponin, tj. marker s dostatečnou senzitivitou a specificitou pro diagnózu AKI. V současné době se proto doporučuje vyšetřovat kombinaci alespoň dvou markerů. Např. hladiny NGAL a IL-18 můžou být zvýšeny nejen z důvodu AKI, ale i z důvodu infekce, diagnostickou pravděpodobnost AKI proto podpoří současné zvýšení dalšího markeru, např. KIM-1 nebo L-FABP. Diagnostická kritéria AKI by tedy bylo vhodné rozšířit o vyšetření dvou markerů AKI, dosud však nejsou definované jejich cut-off hodnoty, které by měly být navíc specifické pro jednotlivé diagnózy a měly by se hodnotit v klinickém kontextu. Většina studií označuje za nejvýznamnější marker NGAL, i vzhledem k tomu, že jeho zvýšení významně koreluje se závažností AKI, u pacientů s prerenální etiologií AKI nacházíme významně nižší hodnoty, než u pacientů s „renálním“ AKI (Murray P. T. et al., 2014; Schrezenmeier E. V. et al., 2017).

Časná diagnostika AKI umožní časnější terapeutickou intervenci (např. v případě zjištění opožděné funkce transplantované ledviny modifikací imunosupresivní terapie atd.) a může tak zlepšit celkovou prognózu pacientů (Malyszko J. et al., 2015).

2. CÍLE PRÁCE

2.1. Stanovení albuminurie HPLC a sledování vztahu k diagnóze diabetes mellitus

- Zavést vlastní validovanou a verifikovanou HPLC metodu pro stanovení albuminurie
- Testovat hypotézu o interferujících proteinech (např. α -1-kyselý glykoprotein, transferin, α -1-antitrypsin, hemopexin) a imunonereaktivním albuminu
- Porovnat hodnoty albuminurie stanovené imunoturbidimetry a chromatograficky v patientských vzorcích, sledovat vztah k diagnóze diabetes mellitus

2.2. Stanovení močového NGAL u dětí po transplantaci ledviny

- Studovat schopnost močového NGAL rozlišit etiologii akutního poškození ledvin v souboru dětských pacientů po transplantaci ledviny

2.3. Stanovení močového NGAL u dětí s akutním nebo s chronickým onemocněním ledvin

- Porovnat močové koncentrace NGAL a poměr močový NGAL/močový kreatinin v souborech dětských pacientů s akutním a s chronickým selháním ledvin s kontrolním souborem zdravých dětí

2.4. Stanovení močového NGAL u dospělých pacientů po kardiochirurgických výkonech

- Vyšetřit močový NGAL, poměr močový NGAL/močový kreatinin a sérový kreatinin v souboru dospělých pacientů podstupujících kardiochirurgický výkon

2.5. Stanovení markerů poškození ledvin u dospělých pacientů po angiografii

- Sledovat močové markery NGAL, NAG, albumin, α -1-mikroglobulin a sérové markery kreatinin a cystatin C a z nich odhadnuté glomerulární filtrace v souboru dospělých pacientů podstupujících angiografii (selektivní koronarografii nebo digitální subtrakční angiografii končetinových tepen) v závislosti na vstupních hodnotách odhadnuté glomerulární filtrace (MDRD)

3. METODY

3.1. Stanovení albuminurie HPLC a sledování vztahu k diagnóze diabetes mellitus

3.1.1. HPLC metoda pro stanovení albuminurie a testování hypotézy o interferujících proteinech

3.1.1.1. HPLC sestava a reagentie

HPLC analýzy albuminurie byly prováděny HPLC sestavou Agilent 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) vybavenou detektorem diodového pole. Chromatogramy byly vyhodnocované softwarem Chemstation (Chem 32; Agilent Technologies).

Purifikovaný standard albuminu (Albumin from human serum approx. 99 % agarose gel electrophoresis, lyophilized, kat. č. A8763, lot: 086K7535) byl zajištěn od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika), kontrolní vzorek albuminu K1 s rozsahem koncentrace 58,2–81,5 mg/l (Liquichek Microalbumin Control, kat. č. 379, lot: 96650) od firmy Bio-Rad (Mnichov, Německo). Kontrolní vzorek albuminu K2 o koncentraci 350 mg/l jsme připravili ze standardního vzorku albuminu (firemní kontrola o vyšší koncentraci se nevyrábí). Dále jsme připravili 2 kontrolní vzorky o koncentracích 60 mg/l a 320 mg/l, jejichž koncentrace jsme změřili 12krát imunoturbidimetricky a HPLC před zahájením měření souboru pacientů, abychom ověřili kvalitu našeho albuminového standardu.

Purifikované standardy α -1-kyselého glykoproteinu (Alpha-1-acid glycoprotein from human plasma), transferinu (Transferrin human, min. 98 %), prealbuminu (Prealbumin from human plasma, 1 mg), hemopexinu (Hemopexin from human plasma, 500 μ g), α -1-antitrypsinu (Alpha-1-antitrypsin from human plasma, 1 mg) a α -1-antichymotrypsinu (Alpha-1-antichymotrypsin from human plasma, 1 mg) byly také od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika).

K přípravě vzorků jsme používali destilovanou vodu určenou pro HPLC (Water for chromatography, Merck, Praha, Česká republika) a k přípravě mobilních fází následující reagentie: acetonitril (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika), dihydrogenfosforečnan sodný (Lachema Brno, Česká republika), kyselina trifluoroctová (Penta, Praha, Česká republika).

3.1.1.2. Vývoj a validace HPLC metody a testování interferencí

Ačkoliv byla publikována řada studií týkajících se stanovení albuminurie metodou HPLC, v žádném z recentních článků jsme nenašli přesné analytické podmínky měření. Při zavádění metody jsme vycházeli z více než 20 let starého článku (Turpeinen U. et al., 1987), ve kterém byly podmínky přesně definovány – tj. složení mobilní fáze, teplota analýzy,

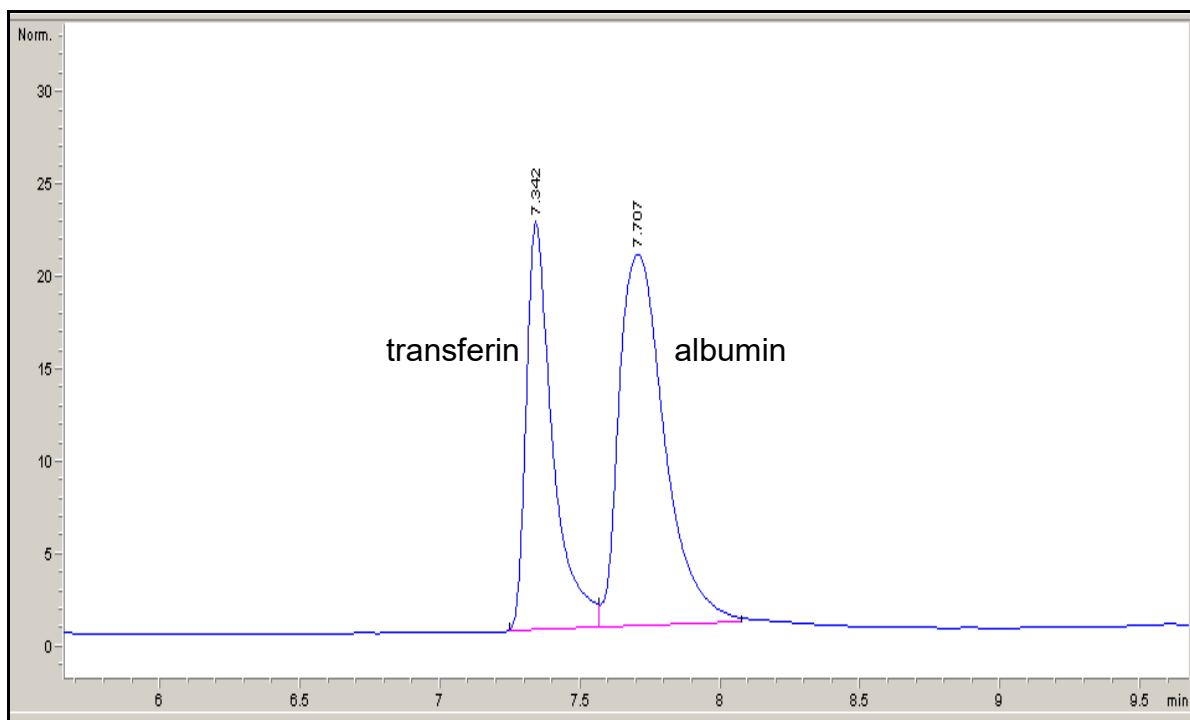
vlnová délka detekce, typ kolony. Touto studií jsme se inspirovali i stran vyšetřovaných analytů (albumin, α -1-kyselý glykoprotein a β -2-mikroglobulin). Přestože byl dodržen postup analýzy publikovaný v uvedeném článku, nebylo dosaženo účinné separace. Podmínky chromatografické analýzy musely být opakovaně optimalizovány (vlnová délka, teplota, složení mobilní fáze a nakonec jsme změnili i chromatografickou kolonu). Metodu jsme zavedli za následujících analytických podmínek (Fořtová M. et al., 2010):

- složení mobilní fáze: složka A) 0,1 % trifluoroctová kyselina ve vodě, složka B) 0,1 % trifluoroctová kyselina v 90 % acetonitrilu,
- kontinuální gradient mobilní fáze: v čase 0 obsahuje mobilní fáze 15 % složky B (85 % složky A), procentuální zastoupení složky B plynule narůstá do 15. minuty analýzy, kdy je 100 %, 100 % zůstává do 18. minuty, od které opět klesá na 15 % ve 20. minutě (ve které by měla být analýza již ukončena),
- průtok mobilní fáze 1ml/min,
- teplota analýzy 35 °C,
- UV detekce při 280 nm,
- kolona Zorbax 300 SB C 18 (Agilent Technologies, USA).

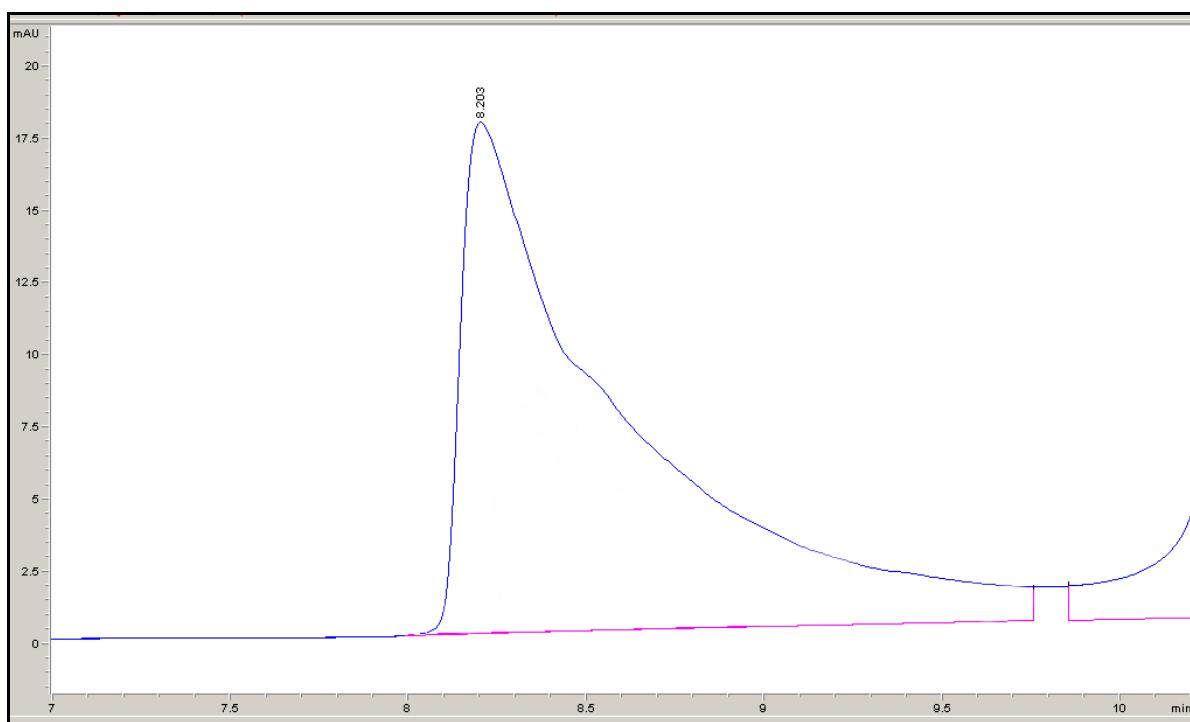
Dalším krokem bylo testování hypotézy o interferujících proteinech. β -2-mikroglobulin, α -1-antitrypsin a α -1-kyselý glykoprotein byl od albuminu účinně separovatelný, transferin v některých analýzách s albuminem koeluoval (obr. 4, obr. 5).

Snažili jsme se objasnit důvod interferencí pouze v některých analýzách a standardní vzorky albuminu a transferinu jsme analyzovali s různým časovým odstupem po uložení do zásobníku vzorků kapalinového chromatografu v časech 0; 3 a 5,5 hodin (obr. 6). Zjistili jsme, že s časovým odstupem 5,5 hodin (tj. vzorek byl uložen 5,5 hodin v zásobníku chromatografu při laboratorní teplotě) dochází k posunu retenčního času transferinu směrem k albuminu a ke zmenšení výšky elučních křivek a plochy pod křivkou vyšetřovaných standardů (z toho vyplývá, že s postupem času dochází též k poklesu jejich koncentrací). Vzhledem k dlouhému trvání jedné analýzy (20 minut čistého času) byla tato metoda pro stanovení albuminurie nepoužitelná, protože po analýze 10 až 15 vzorků začalo docházet k nežádoucím interferencím a snižování koncentrací.

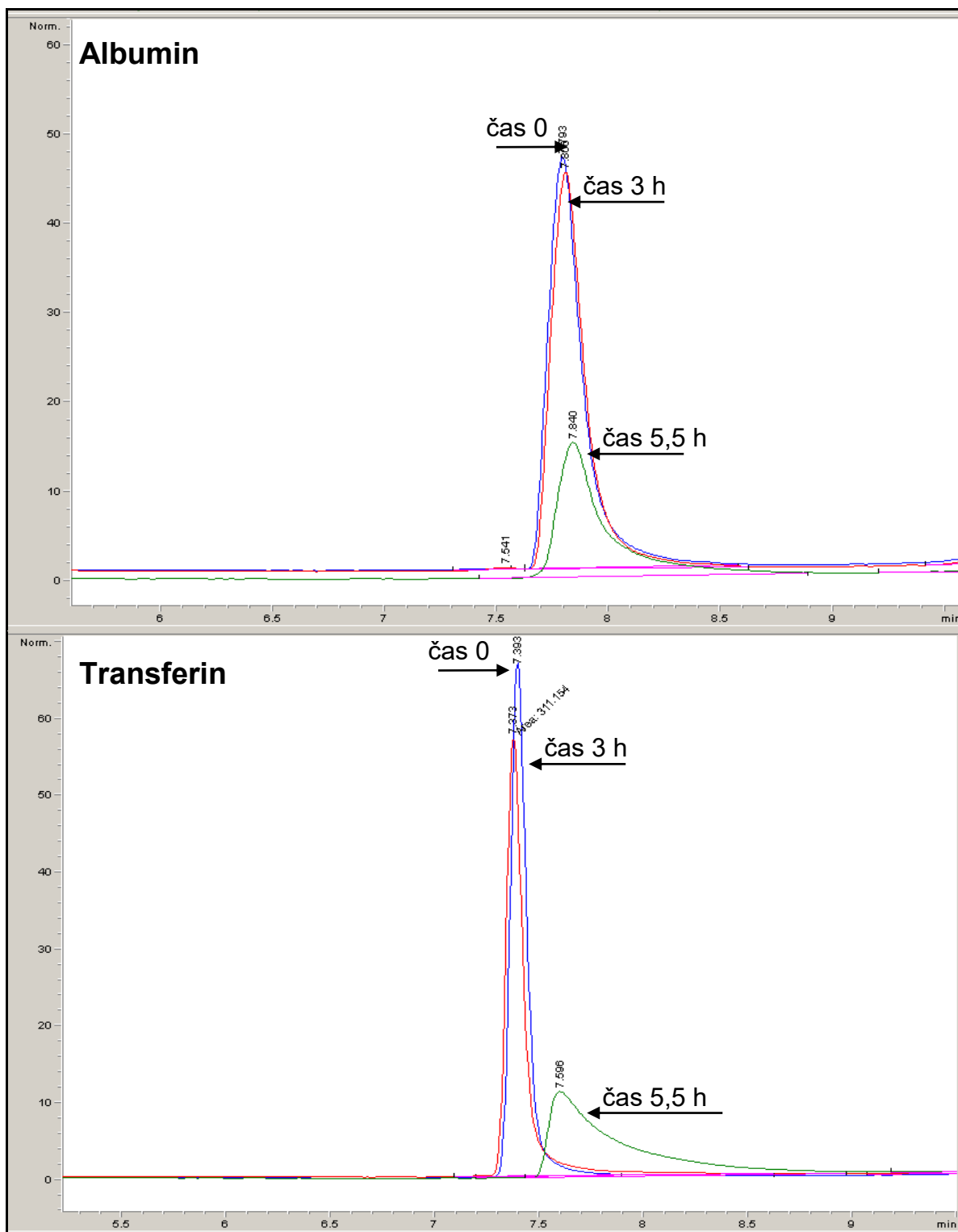
Obrázky 7 až 9 znázorňují příklady analýz patientských močí s účinnou a neúčinnou separací albuminu od transferinu a dalších proteinů.



Obr. 4. Účinná separace transferinu od albuminu, analýza standardních vzorků
(za chromatografických podmínek podle Fořtová M. et al., 2010)

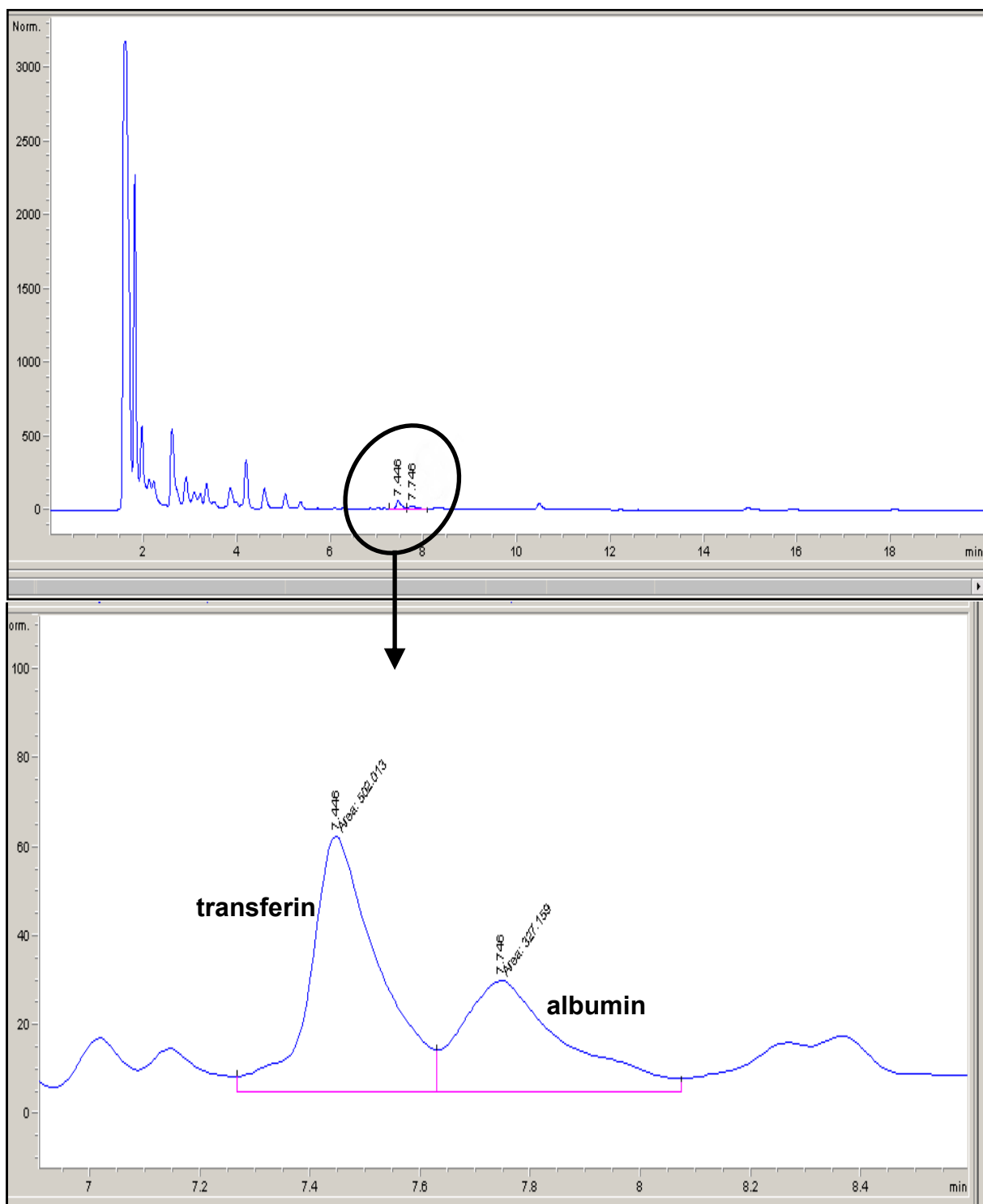


Obr. 5. Koeluce transferinu s albuminem, analýza standardních vzorků
(za chromatografických podmínek podle Fořtová M. et al., 2010)

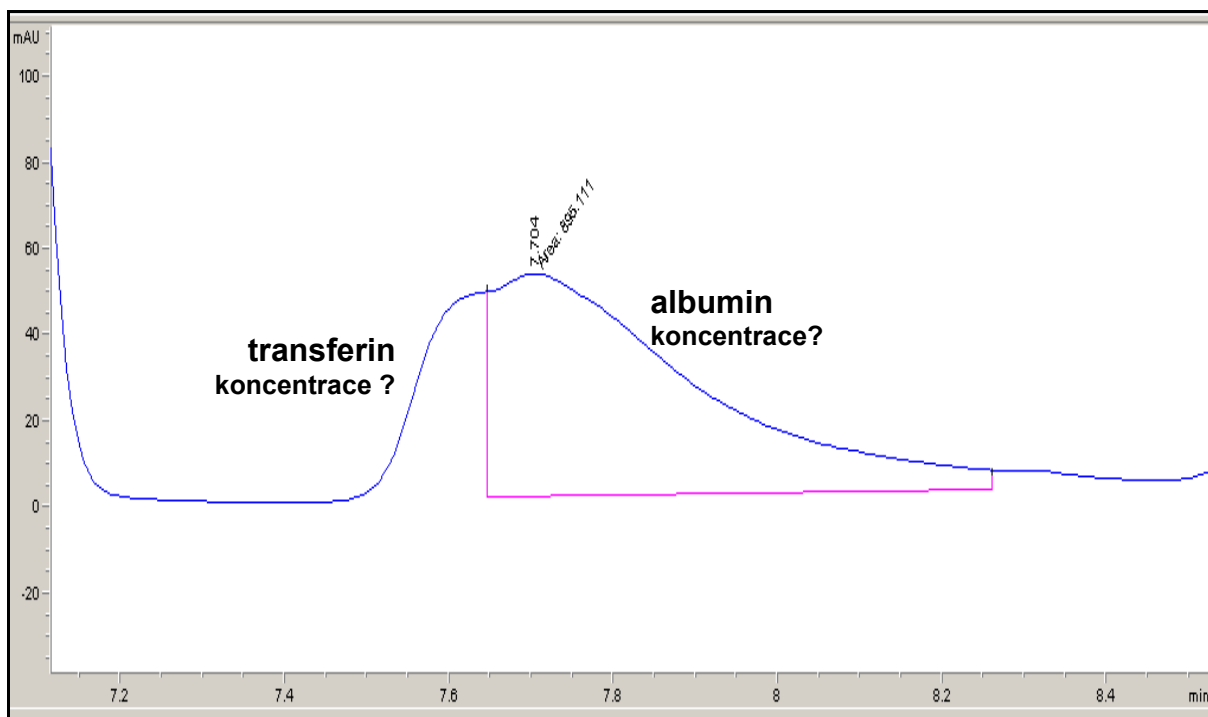


Obr. 6. Analýzy standardních vzorků albuminu a transferinu v čase 0 a s časovým odstupem 3 a 5,5 hodin po uložení do zásobníku vzorků kapalinového chromatografu (za chromatografických podmínek podle Fořtová M. et al., 2010)

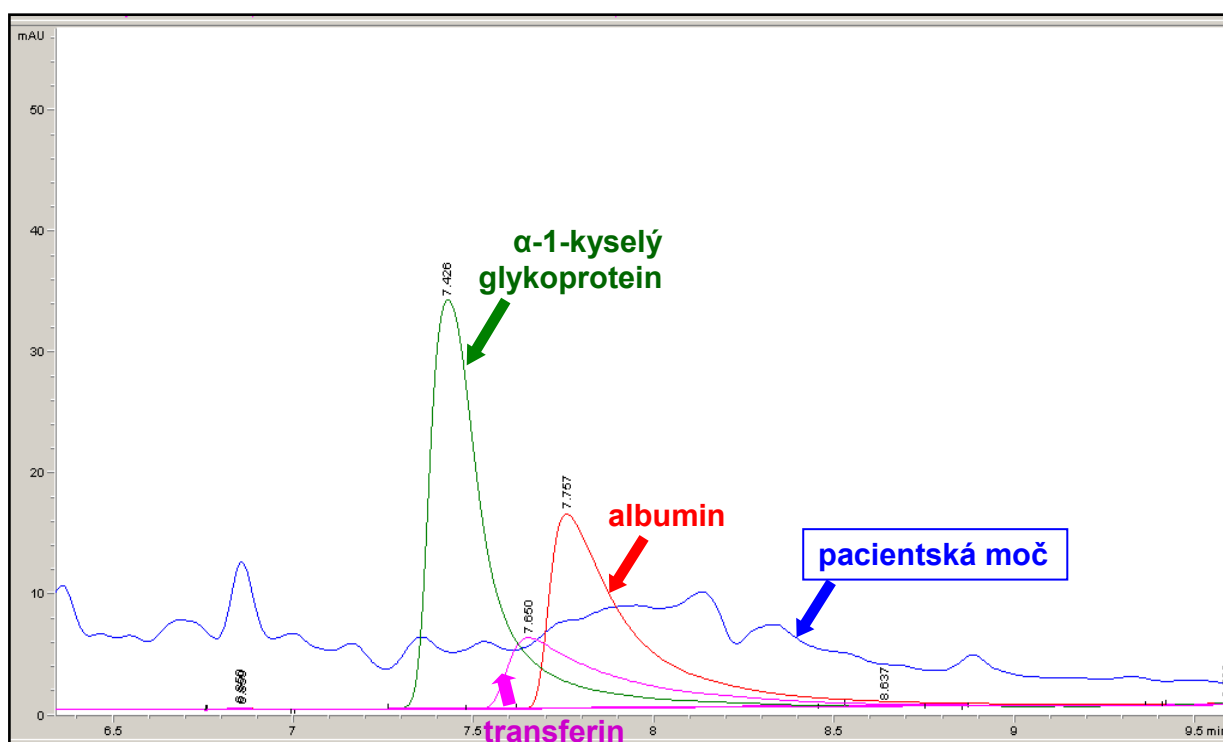
S postupem času uchovávání vzorků v zásobníku dochází k posunu retenčního času transferinu směrem k albuminu a ke zmenšení výšky elučních křivek a plochy pod křivkou vyšetřovaných standardů, pro názornost znázorněno jako překryvání elučních křivek analýz v časech 0; 3 a 5,5 h.



Obr. 7. Příklad analýzy pacientské moči s účinnou separací albuminu od transferinu
 (za chromatografických podmínek podle Fořtová M. et al., 2010)
 V horní části obrázku znázorněn průběh celé analýzy, v dolní části výběr části analýzy
 s eluční křivkou albuminu.

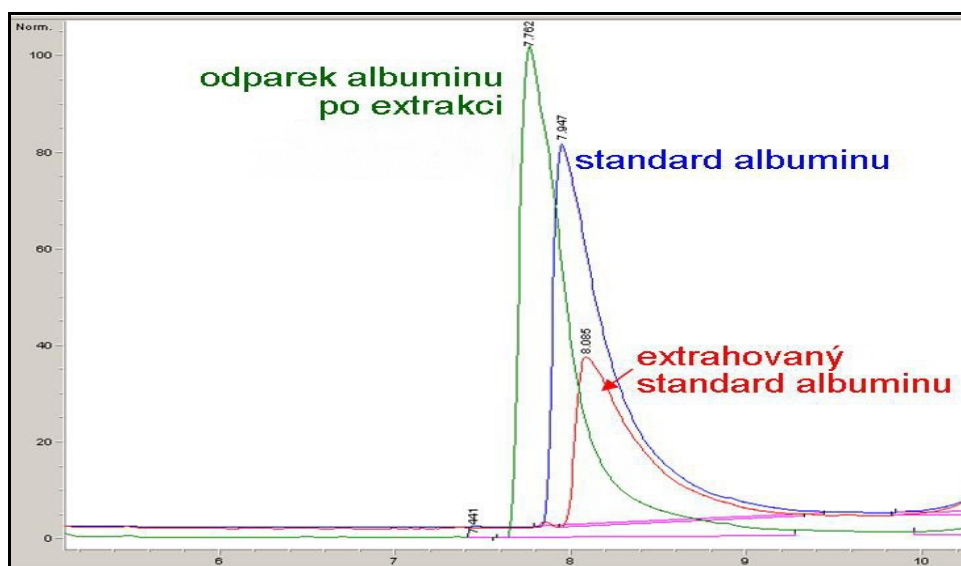


Obr. 8. Příklad analýzy pacientské moči s neúčinnou separací albuminu od transferinu (za chromatografických podmínek podle Fořtová M. et al., 2010)
Znázorněn výběr části analýzy s eluční křivkou albuminu koelující s eluční křivkou tranferinu. Z této analýzy nelze vyhodnotit koncentraci albuminu.

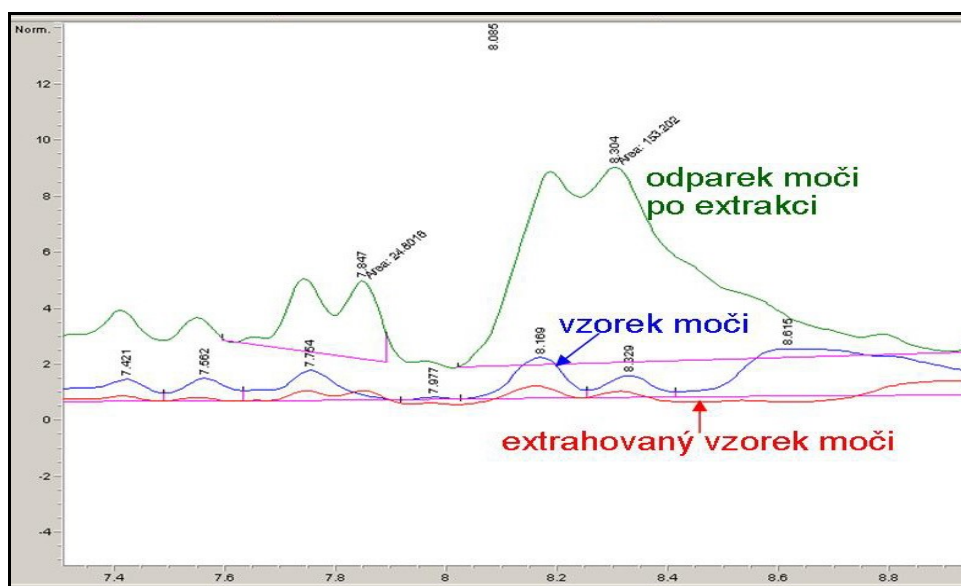


Obr. 9. Příklad analýzy pacientské moči s neúčinnou separací albuminu od dalších proteinů (za chromatografických podmínek podle Fořtová M. et al., 2010)
Znázorněn výběr části analýzy, ve které eluuje albumin. Pro názornost křivka pacientské moči překryta křivkami standardů albuminu, transferinu a α -1-kyselého glykoproteinu. Z této analýzy nelze určit eluční křivku albuminu, natož vyhodnotit jeho koncentraci.

V dalším postupu jsme se pokoušeli upravit vzorky extrakcí na pevné fázi s použitím kolonek GracePure™ SPE C18-Aq (Grace). Analyzovali jsme jednak extrahované vzorky, jednak odparky po extrakci rozpuštěné v mobilní fázi. Předpokládali jsme, že se podaří odstranit některé retenční křivky, které rušily analýzu, nebo že dojde ke zviditelnění retenční křivku albuminu. Ani tento postup však nepřinesl zlepšení v analýze patientských vzorků (obr. 10, obr. 11).



Obr. 10. Úprava standardního vzorku albuminu extrakcí na pevné fázi (za chromatografických podmínek podle Fořtová M. et al., 2010); znázorněn standard albuminu, extrahovaný standard albuminu, odparek albuminu po extrakci rozpuštěný v mobilní fázi; znázorněno překrýváním jednotlivých křivek z různých analýz



Obr. 11. Úprava vzorku patientské moči extrakcí na pevné fázi (za chromatografických podmínek podle Fořtová M. et al., 2010); znázorněna analýza nativního vzorku moči, extrahovaného vzorku moči, odparku moči po extrakci rozpuštěného v mobilní fázi; znázorněno překrýváním jednotlivých křivek z různých analýz

Podmínky chromatografické analýzy jsme proto opět optimalizovali – opakovaně jsme měnili teplotu analýzy, složení mobilní fáze, detekční vlnové délky, typ chromatografické kolony atd. V roce 2011 jsme zavedli následující HPLC metodu pro stanovení albuminurie (Fořtová M. et al., 2012):

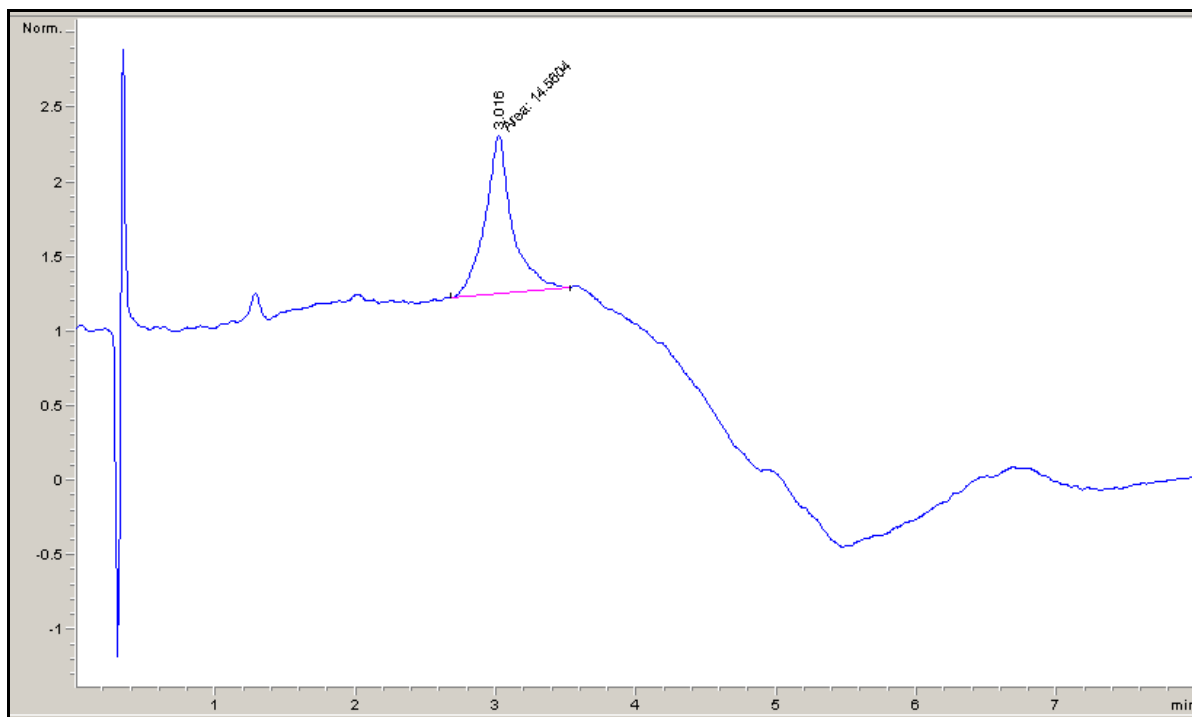
- složení mobilní fáze: složka A) voda, složka B) acetonitril, složka C) 100 mM NaH₂PO₄ a složka D) 1 % trifluoroctová kyselina,
- kontinuální gradient mobilní fáze (průběh v čase analýzy viz tab. 10),
- průtok mobilní fáze 2 ml/min,
- teplota analýzy 22 °C,
- UV detekce při 280 nm,
- trvání analýzy 8 minut,
- kolona Zorbax 300 SB-C3; 3,5 µm; 4,6 mm x 50 mm (Agilent Technologies, USA).

Čas [min]	A [%]	B [%]	C [%]	D [%]
0	44,0	36,0	0	20
2	41,6	38,4	0	20
4	51,0	39,0	10	0
6	35,0	60,0	0	5
8	44,0	36,0	0	20

Tab. 10. Složení mobilní fáze v průběhu gradientové eluce

Retenční čas albuminu je 3,02 minuty a během testování nedocházelo k jeho posunu (obr. 12), mez detekce je 2,7 mg/l a mez kvantifikace 7,8 mg/l. Kalibrační křivka byla lineární v celém rozsahu (7 bodová kalibrace: 10, 30, 50, 100, 300, 600 a 800 mg/l, $r^2 = 0,99941$). Koncentrace byly vypočteny z plochy píků. U standardů o koncentracích albuminu 300 mg/l a vyšších docházelo ke štěpení jejich píků (což však neovlivnilo výsledky kalibrace).

Zavedená HPLC metoda splnila požadavky úspěšné validace. Opakovatelnost a reprodukovatelnost byla vyhodnocena z měření 20 analýz dvou kontrolních vzorků: K1 o koncentraci 70 mg/l a K2 o koncentraci 350 mg/l. Variační koeficienty opakovatelnosti byly 5,0 % pro kontrolu K1 a 3,0 % pro kontrolu K2, variační koeficienty reprodukovatelnosti 4,0 % pro kontrolu K1 a 3,9 % pro kontrolu K2. Správnost (tj. bias neboli těsnost shody mezi průměrnou hodnotou koncentrace z řady výsledků našeho měření a očekávanou skutečnou hodnotou koncentrace) byla v případě opakovatelnosti 4,2 % pro kontrolu K1 a 2,5 % pro kontrolu K2, v případě reprodukovatelnosti 4,5 % pro kontrolu K1 a 2,1 % pro kontrolu K2 (Fořtová M. et al., 2012; Klapková E. et al., 2016).



Obr. 12. Analýza standardního vzorku albuminu
(za chromatografických podmínek podle Fořtová M. et al., 2012)

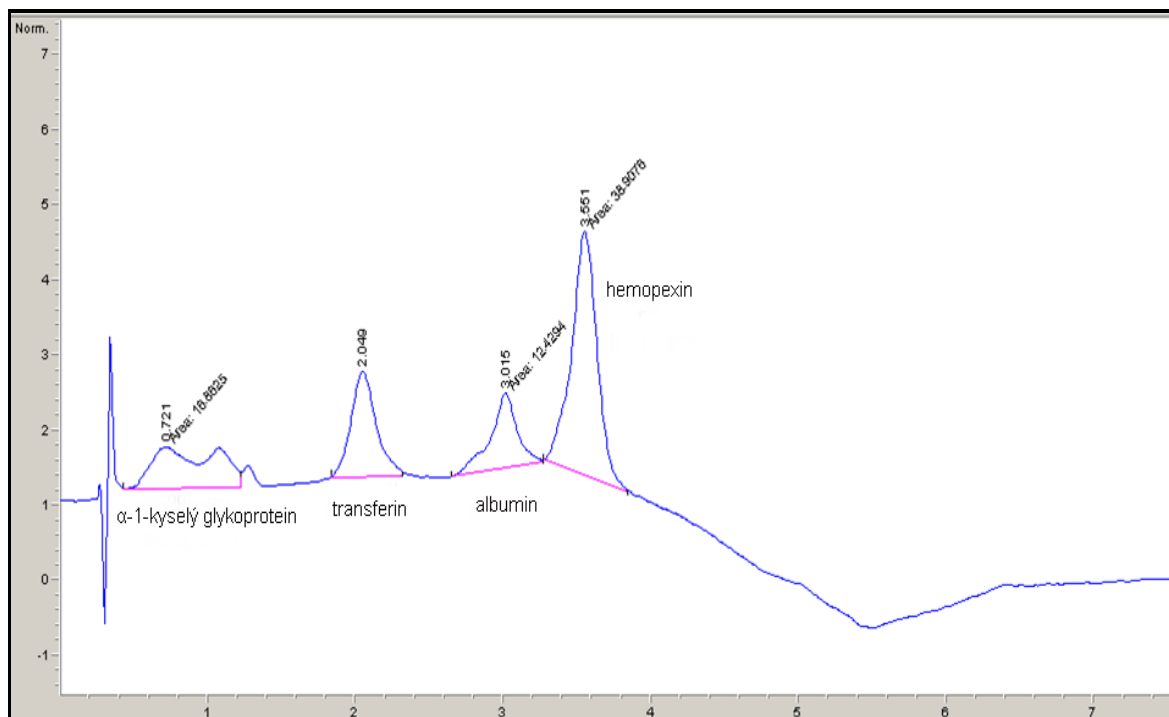
Po zavedení metody jsme ověřovali kvalitu našeho standardu albuminu. Srovnávali jsme koncentrace připravených kontrolních vzorků o koncentracích 60 mg/l a 320 mg/l měřením HPLC a imunoturbidimetricky (IT). Výsledky byly následující: 60,4 ± 2,6 mg/l IT vs. 58,5 ± 2,5 mg/l HPLC, $p=0,26$; 324,4 ± 5,8 mg/l IT vs. 325,6 ± 5,9 mg/l HPLC, $p=0,61$. Tyto rozdíly jsou statisticky nevýznamné, výsledky tedy potvrdily dostatečnou kvalitu námi používaného standardu albuminu.

V další fázi výzkumu jsme zjišťovali separovatelnost α -1-kyselého glykoproteinu, transferinu, hemopexinu, α -1-antitrypsinu, α -1-antichymotrypsinu a prealbuminu od albuminu. Eluce α -1-kyselého glykoproteinu probíhá v první minutě analýzy, jeho eluční křivka se štěpí na dva píky. K eluci transferinu dochází přibližně ve druhé a hemopexinu přibližně ve čtvrté minutě analýzy. Všechny tyto proteiny jsou od albuminu účinně separovatelné. Za testovaných podmínek nedošlo k eluci α -1-antitrypsinu ani α -1-antichymotrypsinu, tyto bílkoviny tedy s albuminem neinterferují. Analýza směsného vzorku standardů všech těchto bílkovin je uvedena na obrázku 13.

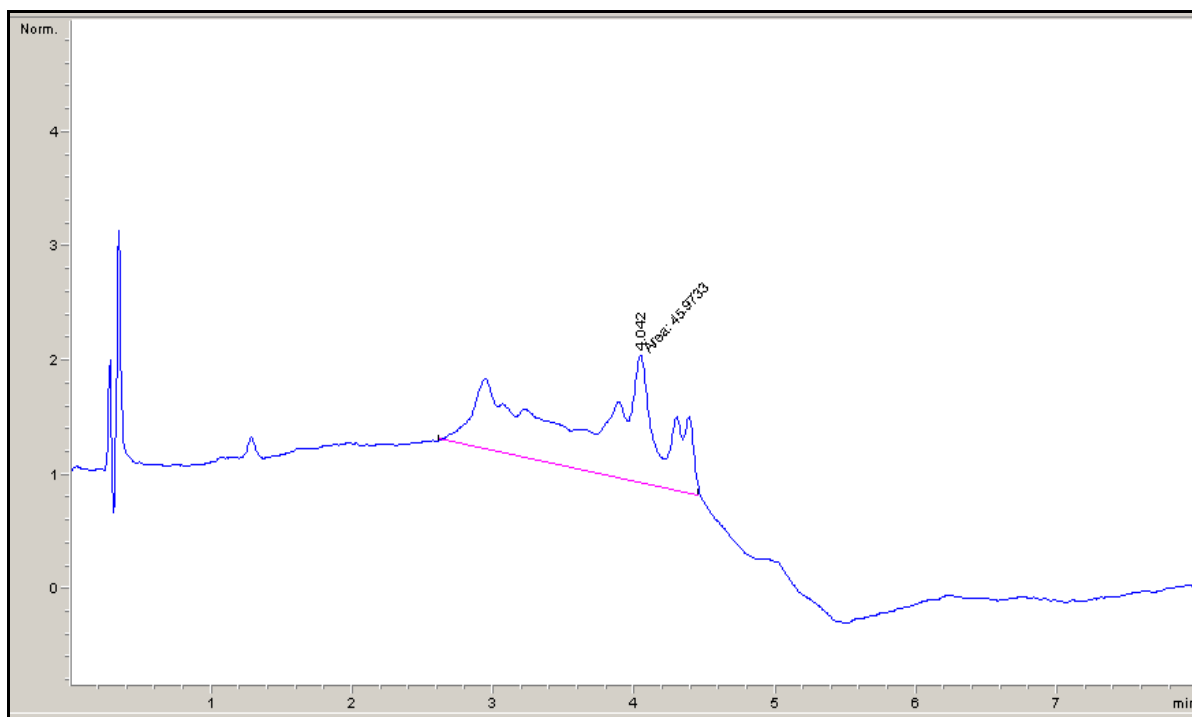
Eluční křivka prealbuminu se štěpí na několik píků, z nichž část z nich s albuminem koeluje (obr. 14). Eluční čas prealbuminu se pohybuje v rozmezí 2,5 a 4,5 minuty. Testovali jsme závažnost ovlivnění analýzy albuminu přítomností prealbuminu. Připravili jsme směsný vzorek standardu albuminu o koncentraci albuminu 100 mg/l a standardu prealbuminu

o vysoké koncentraci 50 mg/l. Koncentrace odvozená z píku albuminu se zvýšila na 125 mg/l, z čehož je zřejmé, že došlo k významnému ovlivnění analýzy albuminu prealbuminem (obr. 15).

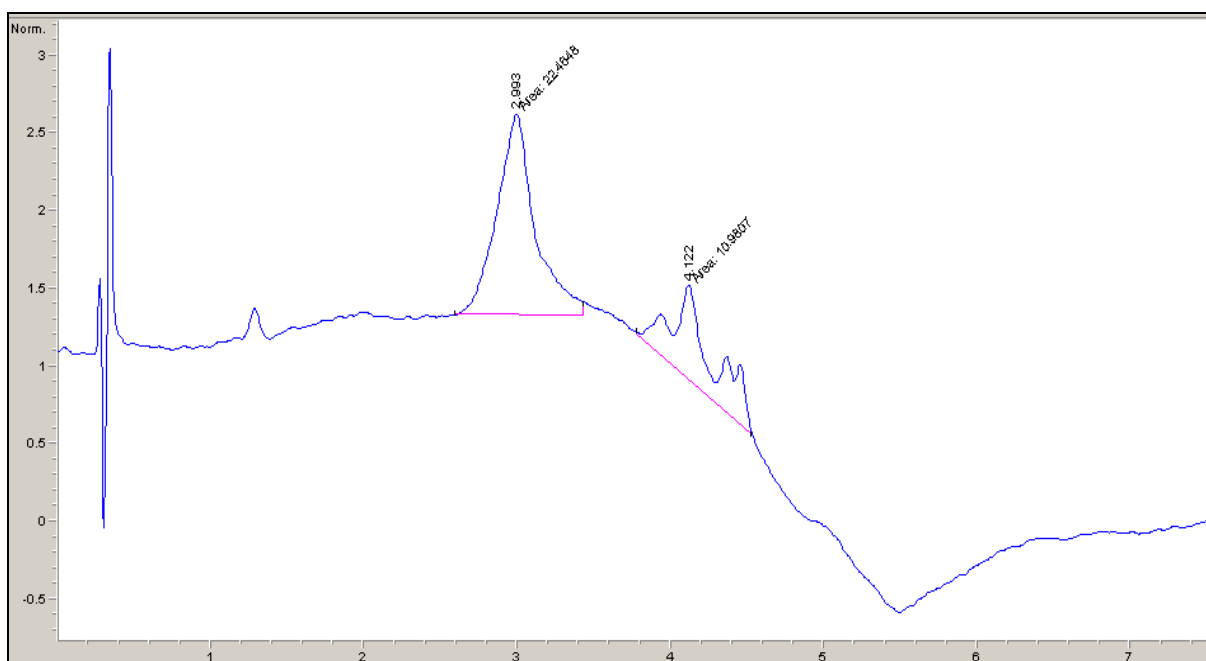
Fyziologická koncentrace prealbuminu v séru je 0,2 až 0,4 g/l a jeho exkrece močí je méně než 0,15 mg/l (Beetham R. et al., 1993; Devoto G. et al., 2006). Testovaný směsný vzorek albuminu a prealbuminu obsahoval koncentraci prealbuminu 50 mg/l, tedy více než 300násobek horní hranice normálního rozmezí v moči. V dostupné literatuře jsme našli pouze jednu studii (Tormey W. P. a O'Brien P. A., 1993) sledující výskyt vysokých koncentrací prealbuminu v séru a moči. V této studii bylo vyšetřeno 9697 vzorků a zvýšené koncentrace prealbuminu byly zjištěny u 46 sérových vzorků (tzn. u 0,48 % ze všech vyšetřovaných vzorků) a u 9 močových vzorků (tzn. u 0,09 %). Vzhledem k těmto zjištěním a vzhledem k velmi nízké fyziologické koncentraci prealbuminu v moči je ovlivnění analýzy albuminu prealbuminem velmi nepravděpodobné a klinicky zanedbatelné. V případě přítomnosti prealbuminu v moči je jeho koncentrace většinou nižší než detekční limit. Pro stanovení albuminurie je interference albuminu s prealbuminem jak analyticky, tak klinicky irelevantní.



**Obr. 13. Analýza směsného vzorku standardů albuminu, α -1-kyselého glykoproteinu, transferinu, hemopexinu, α -1-antitrypsinu a α -1-antichymotrypsinu (za chromatografických podmínek podle Fořtová M. et al., 2012)
K eluci α -1-antitrypsinu a α -1-antichymotrypsinu nedochází.**



Obr. 14. Analýza standardního vzorku prealbuminu
(za chromatografických podmínek podle Fořtová M. et al., 2012)



Obr. 15. Analýza směšného vzorku standardů albuminu o koncentraci 100 mg/l a prealbuminu o koncentraci 50 mg/l
(za chromatografických podmínek podle Fořtová M. et al., 2012)
Koncentrace odvozená z píku albuminu se zvýšila na 125 mg/l.

3.1.2. Imunoturbidimetrická metoda pro stanovení albuminurie

Imunoturbidimetricky byla albuminurie vyšetřována automatickým analyzátozem Cobas Integra 400 (Roche Diagnostics, Německo). Byla použita metoda Tina-quant Albumin 2. generace (kat.č. 04469658, Roche Diagnostics, Německo) obsahující kalibrátor C.f.a.s. PUC, (kat.č. 03121305) a kontroly Precinorm PUC (kat.č. 03121313) a Precipath PUC (kat.č. 03121291).

Metoda využívá polyklonální ovčí protilátky proti lidskému albuminu, které reagují s antigenem (tj. albuminem) ve vzorku a vytváří komplex antigen/protilátka. Následná aglutinace je změřena turbidimetricky při 340 nm.

Kalibrační závislost je nelineární, šestibodová křivka. Pracovní rozsah metody byl 3–210 mg/l a mez detekce i kvantifikace albuminu v moči 3,0 mg/l. Metoda byla standardizována podle interní metody s návazností na referenční materiál CRM470.

V průběhu této tříleté studie (probíhající v letech 2011–2013) i studie popsané v dalším textu (probíhající do roku 2015) jsme použili minimálně 15 různých lotů této metody a neshledali jsme významné „lot-to-lot“ diference. Variační koeficient byl maximálně 5 % pro kontrolu o koncentraci kolem 30 mg/l a 3,7 % pro kontrolu o koncentraci kolem 100 mg/l; hodnoty bias byly maximálně 5 % pro obě kontroly.

3.1.3. Testování hypotézy o existenci imunonereaktivního albuminu

Imunoturbidimetricky a HPLC jsme analyzovali vzorky dvou směsných močí. První směsná moč byla připravena ze vzorků 30 močí s imunoturbidimetricky fyziologickou albuminurií (průměrná koncentrace albuminu stanovená imunoturbidimetricky byla 4,4 mg/l). Do této směsi byl přidán standard albuminu, výsledná koncentrace stanovená imunoturbidimetricky byla $79,1 \pm 1,7$ mg/l (směs 1). Druhá směsná moč byla připravena z 30 vzorků moči s imunoturbidimetricky zjištěnou středně zvýšenou albuminurií (kategorie albuminurie A2 – dle tab. 2), výsledná imunoturbidimetricky stanovená koncentrace byla $79,5 \pm 2,1$ mg/l (směs 2). Albuminurie byla měřena imunoturbidimetricky i HPLC 16krát v obou těchto experimentálních směsných močích.

3.1.4. Porovnání HPLC a imunoturbidimetricky stanovené albuminurie v patientských vzorcích a sledování vztahu k diagnóze diabetes mellitus

Vzorky močí ke stanovení albuminurie metodou HPLC byly získávány v průběhu naší 3leté studie jako zbytkový materiál od pacientů, u nichž bylo vyšetření albuminurie (imunoturbidimetrickou metodou) součástí jejich rutinního vyšetření ve FN Motol.

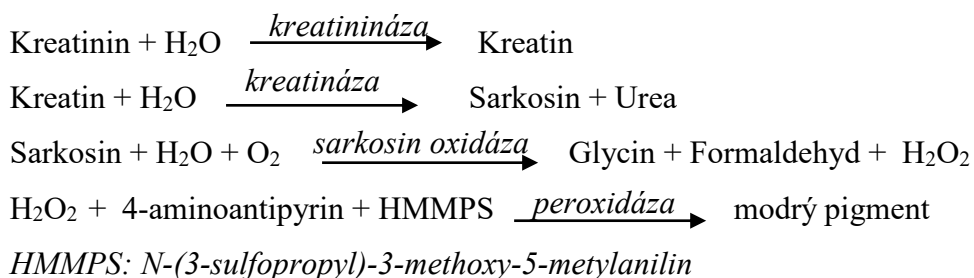
Hodnoty albuminurie stanovené imunoturbidimetricky jsme porovnávali s hodnotami stanovenými HPLC v souboru 1092 pacientů. Soubor tvořilo 636 diabetiků (384 pacientů s diagnózou diabetes mellitus (DM) 1. typu, 222 pacientů s DM 2. typu a 30 pacientů s jiným typem diabetu; 345 mužů a 291 žen; průměrný věk ± výběrová směrodatná odchylka (SD): 50,1 ± 22,3 let) a 456 nediabetiků (244 pacientů s onemocněním ledvin vyjma diabetické nefropatie, 55 pacientů s hypertenzí nebo s jinými kardiovaskulárními chorobami, 157 pacientů s dalšími diagnózami, např. s onemocněním trávicího traktu, s endokrinopatiemi atd; 250 mužů a 206 žen; průměrný věk ± SD: 33,9 ± 27,0 let).

Vzorky 1. ranní moči pacientů byly do laboratoře doručeny v plastových zkumavkách určených pro uchovávání moči (Sarstedt, Německo) a po centrifugaci byla nejdříve vyšetřena albuminurie imunoturbidimetricky (a další požadovaná vyšetření dle ordinace lékařů). Zbytkový materiál byl přepipetován do mikrozkuvek (Eppendorf) a byl buď ve stejný den použit k vyšetření albuminurie metodou HPLC nebo byl skladován maximálně 4 dny při teplotě 2 až 8 °C (až do doby HPLC analýzy). Bezprostředně před analýzou byly vzorky moči opět centrifugovány při 4000 otáčkách po dobu 10 minut a následně přepipetovány do speciálních HPLC viálek.

3.1.5. Stanovení kreatininu v moči

Zároveň se stanovením albuminurie byla v patientských vzorcích moči vyšetřována koncentrace kreatininu (enzymová kolorimetrická metoda, Enzymatic Creatinine_2, kat.č. 04992596, Siemens, USA; automatický analyzátor Advia 1800, Siemens, USA) a byl použit kalibrátor pro jednobodovou kalibraci SETPoint calibrator (kat.č. 09784096, Siemens, USA) a kontroly Liquichek Urine Chemistry Control (kat.č. 397 level 1, a kat.č. 398 level 2, BioRad, Mnichov, Německo).

Stanovení je navázáno na standardní referenční materiál NIST SRM 967 metodou LC-IDMS (liquid chromatography-isotope dilution mass spektrometry) a je založeno na enzymatické reakci Fossatiho, Precipa a Bertiho, měří se výsledná absorbance barevného produktu při 596/694 nm.



Variační koeficienty byly v průběhu této tříleté studie (probíhající v letech 2011–2013) i dalších studií (probíhající do roku 2015) maximálně 2,0 % pro obě hladiny a hodnoty bias maximálně 2,0 % pro level 1 a 5,5 % pro level 2. Detekční limit pro močový kreatinin byl 0,5 mmol/l a pracovní rozsah 0,1–21,6 mmol/l.

Referenční rozmezí pro dospělé muže i ženy bylo definováno: 5,7–14,7 mmol/l; ve sběru moči: pro muže 7,1–17,7 mmol/24 h, pro ženy 5,3–15,9 mmol/24 h. Pro děti je vztaženo k věku dítěte: do 1 měsíce: 1,2–4,4 mmol/l, 0,4–0,6 mmol/24 h; 1 měsíc až 1 rok: 0,4–5,4 mmol/l, 0,5–1,2 mmol/24 h; 1 rok až 5 let: 5,7–14,7 mmol/l, 1,0–4,2 mmol/24 h; 6 až 18 let: 5,7–14,7 mmol/l, 3,3–9,2 mmol/24 h.

Následně byl hodnocen poměr albumin/kreatinin, a to jak v případě albuminurie změřené imunoturbidimetry, tak HPLC.

3.1.6. Stanovení glykovaného hemoglobinu v krvi

Glykovaný hemoglobin HbA_{1c} byl stanoven v krvi všech diabetiků a u 76 nediabetiků HPLC metodou (automatický analyzátor Tosoh G8, Tosoh Bioscience, kat.č. 021560). Analyzátor pracuje s katexovou kolonou, kde dochází k separaci 6 hemoglobinových frakcí (včetně HbA_{1c}) na základě rozdílného náboje jednotlivých molekul za použití mobilní fáze s měnícím se gradientem o 3 různých koncentracích solí. Jednotlivé frakce jsou detekovány měřením absorpance na 2 vlnových délkách (415 a 510 nm). Před vlastním chromatografickým rozdělením přístroj přidá ke vzorku hemolyzační pufr. Příkladový software integruje plochu zaznamenaného chromatogramu a množství HbA_{1c} vyhodnotí v procentech z celkového množství eluovaných frakcí hemoglobinu.

K tzv. dvoubodové kalibraci byl použit HbA_{1c} Calibrator set (kat.č. 018767, Tosoh Bioscience) a jako kontrolní materiál HbA_{1c} Control Set (kat.č. 021974, Tosoh Bioscience). Variační koeficienty byly v průběhu této tříleté studie (probíhající v letech 2011–2013) maximálně 6,0 % pro kontrolu kolem 45 mmol/mol a maximálně 2,0 % pro kontrolu kolem 110 mmol/mol a hodnoty bias maximálně 12,0 % pro nižší kontrolu a maximálně 5,0 % pro vyšší kontrolu. Mez detekce byla 1 mmol/mol a pracovní rozsah 0–1000 mmol/mol.

Referenční rozmezí pro zdravou dospělou populaci bylo definováno: 20–42 mmol/mol a rozhodovací meze pro kompenzované diabetiky: 43–53 mmol/mol. Stanovení glykovaného hemoglobinu bylo opět součástí běžného vyšetření těchto pacientů ordinovaného lékaři FN Motol. Zjišťovali jsme korelační vztahy mezi HbA_{1c} a albuminurií.

3.1.7. Statistické zpracování

Nejdříve jsme testovali rozložení dat a zjistili jsme jejich nenormální distribuci. Abychom přešli z kreslení díky tomuto typu rozložení dat, použili jsme ke statistickému zpracování bootstrapovanou statistickou analýzu s 404496 opakováním (White I. R. a Thompson S. G., 2003; Carpenter J. a Bithell J., 2000). Byl použit R statistický program (R Core Team, 2015; Canty A. a Ripley B. D., 2015).

Bootstrapovou metodou byly pro jednotlivé soubory dat vypočteny průměry, 95 % konfidenční intervaly, Spearmanovy korelační koeficienty, byla provedena ANOVA analýza. Hodnoty $p < 0,05$ byly považovány za statisticky významné.

Bootstrapovou metodou jsme testovali také lineární závislost albuminurie stanovené HPLC a albuminurie stanovené imunoturbidimetricky, a to nejdříve v souboru všech 1092 pacientů a následně (po rozdělení tohoto souboru) v souborech diabetiků 1. a 2. typu a nediabetiků. V případě zjištění linearit bylo naším cílem najít příslušné korekční rovnice pro odhad HPLC albuminurie z albuminurie změřené imunoturbidimetricky. Závislost metod jsme ověřili ještě Demingovou regresí, která je také doporučována pro porovnání metod v klinické biochemii (Armitage P. et al., 2002).

Pro statistické účely jsme soubor pacientů rozdělili i podle věku na 8 věkových skupin: 0–5 let, 6–15 let, 16–30 let, 31–45 let, 46–60 let, 61–75 let, 76–90 let a > 90 let.

3.2. Stanovení močového NGAL u dětí po transplantaci ledviny

3.2.1. Soubor pacientů

Kritéria pro zařazení do studie: všechny děti indikované k biopsii ledvinného transplantátu kvůli vzniku AKI sledované v letech 2013 – 2014 v dětském transplantačním centru FN Motol. Všichni pacienti byli déle než 21 dní po transplantaci ledviny, na udržovací imunosupresivní léčbě, bez známek sepse.

AKI bylo definované podle pRIFLE (the pediatric Risk, Injury, Failure, Loss of kidney function and End-stage kidney disease) kritérií (Akcan-Arikan A. et al., 2007). Funkce ledvinného štěpu byla posuzovaná podle glomerulární filtrace odhadnuté ze sérového kreatininu pomocí Schwartzova vzorce (Schwartz G. J. et al., 2009).

Soubor tvořilo 15 dětských pacientů (12 chlapců a 3 dívky) po transplantaci ledviny průměrného věku $14,8 \pm 2,8$ let. Medián času po transplantaci byl 0,4 roku (od 0,1 do 3,8 let). 13 dětí dostalo ledvinný štěp od zemřelého dárce; u 14 dětí se jednalo o první

transplantaci. Jedno dítě podstoupilo preemptivní transplantaci (tj. transplantaci ledviny ještě před zahájením dialyzační léčby).

Většina dětí užívala trojkombinaci imunosupresiv: 13 dětí užívalo takrolimus, 12 kortikoidy, 10 mykofenolát mofetil, 3 azathioprin a 2 děti sirolimus. Renální biopsie byly klasifikovány podle BANFF kritérií (Sis B. et al., 2010). Na základě výsledků renálních biopsií byli pacienti klasifikováni do 2 skupin: do „skupiny pacientů s rejekcí“ byli zařazeni pacienti s histologickým nálezem akutní buněčné nebo humorální rejekce, do „skupiny pacientů bez rejekce“ byli zařazeni pacienti s jinými příčinami AKI než rejekce štěpu.

3.2.2. Stanovení NGAL v moči

Koncentrace močového NGAL byly prospektivně stanovovány ve vzorcích první ranní moči odebraných v den renální biopsie chemiluminiscenční mikročasticovou imunoanalýzou (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay technology, CMIA, kat. č. 1P37-25, automatický analyzátor Architect i4000, Abbott). Jedná se o dvoukrokovou imunoanalýzu, kdy během prvního kroku se přidá vzorek k paramagnetickým mikročasticím, které jsou potažené monoklonálními myšími anti-NGAL protilátkami. NGAL přítomný ve vzorku se naváže na protilátky anti-NGAL na mikročasticích. Po inkubaci a promytí se během druhého kroku přidá konjugát monoklonálních myších anti-NGAL protilátek s akridinem. Množství NGAL přítomné ve vzorku je přímo úměrné jednotkám RLUs (relative light units, relativním světelným jednotkám)

K osmibodové kalibraci byly použity kalibrátory Urine NGAL Calibrators (kat. č. 1P37-01), pracovní rozsah byl 1–1500 µg/l a při využití automatického naředění až do 6000 µg/l, limit detekce 1 µg/l a limit kvantifikace 1,5 µg/l.

K validaci metody byly použity kontroly Urine NGAL Controls (kat.č. 1P37-10) na třech hladinách (Control L: 20 µg/l, Control M: 200 µg/l a Control H: 1200 µg/l). Variační koeficienty byly v průběhu této studie i studií popisovaných v dalším textu maximálně 10,0 % pro Control L, maximálně 12,5 % pro Control M a maximálně 4,5 % pro Control H; hodnoty bias maximálně 8,0 % pro Control L, maximálně 7,0 % Control M a maximálně 5,5 % pro Control H. Výrobce byla definována hodnota cut-off pro AKI: 131,7 µg/l.

3.2.3. Stanovení sérového kreatininu

Koncentrace sérového kreatininu byly stanoveny enzymovou kolorimetrickou metodou (Enzymatic Creatinine_2, kat.č. 04992596, automatický analyzátor Advia 1800,

Siemens, USA, princip stanovení viz kapitola 3.1.5.), byl použit kalibrátor pro jednobodovou kalibraci SETPoint calibrator (kat.číslo 09784096, Siemens USA) a kontroly Liquid Assayed Multiquel (Level 1, kat.č. 694 a Level 2, kat.č. 696, Biorad, Mnichov, Německo). Variační koeficienty byly v průběhu této studie i dále popsanych studií maximálně 2,5 % pro obě hladiny a hodnoty bias maximálně 6,0 % pro Level 1 a 1,5 % pro Level 2. Stanovení je navázáno na standardní referenční materiál NIST SRM 967 metodou LC-IDMS.

Detekční limit pro sérový kreatinin byl 5,0 $\mu\text{mol/l}$ a pracovní rozsah 9,0–2652,0 $\mu\text{mol/l}$. Referenční rozmezí se odvíjí podle věku dítěte; 0 až 7 dní: 53–97 $\mu\text{mol/l}$, 7 dní až 1 měsíc: 27–62 $\mu\text{mol/l}$, 1 měsíc až 1 rok: 4–35 $\mu\text{mol/l}$, 1 rok až 5 let: 4–40 $\mu\text{mol/l}$, 6 až 9 let: 18–46 $\mu\text{mol/l}$, 10 až 11 let: 19–52 $\mu\text{mol/l}$, 12 až 18 let: 19–62 $\mu\text{mol/l}$.

Ze stanovených koncentrací kreatininu byly následně odhadnuty glomerulární filtrace pomocí Schwarzova vzorce z roku 2009.

3.2.4. Stanovení sérového „high senzitivity“ C-reaktivního proteinu

Koncentrace „high senzitivity“ C-reaktivního proteinu (hsCRP) byly stanoveny imunoturbidimetrickou metodou (CRP-HS II LT R1, kat.č. 462-39493, CRP-HS II LT R2, kat. č. 468-39593, Wako Chemicals GmbH, Neuss, Německo, automatický analyzátor Advia 1800, Siemens, USA). CRP obsažený ve vzorku reaguje s kozí protilátkou proti lidskému CRP navázanou na latexových částicích za vzniku nerozpustného komplexu, který zvyšuje turbiditu reakční směsi. Stupeň turbidity je měřen opticky při 596 nm a je úměrný množství CRP ve vzorku.

K šestibodové kalibraci byl použit CRP-HS LT Calibrator set HO, kat. č. 460-25801 (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Německo), limit detekce byl 0,2 mg/l a pracovní rozsah metody 0,5–350,0 mg/l. Kontrola byla prováděna materiály Seronorm CRP liquid L-1, kat.č. 202205 a Seronorm CRP liquid L-3, kat.č. 213205 (SERO). Variační koeficienty byly 3,1 % pro L-1 a 1,4 % pro L-2, bias 2,4 % pro L-1 a 4,5 % pro L-2. Metoda ADVIA 1800 CRP-HS je navázána na referenční materiál CRM 470. Referenční rozmezí od 1 do 60 let: 0–5 mg/l.

3.2.5. Statistické zpracování

Ke statistickému zpracování byl použit GraphPad Prism statistický software a R statistický program (R Core Team, 2015; Canty A. a Ripley B. D., 2015). Byly vypočteny mediány, minima, maxima, průměry, výběrové směrodatné odchylky. Abychom překonali limitaci naší studie, a sice malý počet pacientů, k testování rozdílů mezi skupinami (pacientů s rejekcí a pacientů bez rejekce) jsme použili bootstrapovaný t-test s 1000000 opakováním

(White I. R. a Thompson S. G., 2003; Carpenter J. a Bithell J., 2000; Davidson A. C. a Hinkley D. V., 1997). Korelační závislosti byly hodnoceny stanovením Spearmanových korelačních koeficientů. Hodnoty $p < 0,05$ byly považovány za statisticky významné.

3.3. Stanovení močového NGAL u dětí s akutním nebo s chronickým onemocněním ledvin

3.3.1. Soubor pacientů

Soubor tvořilo 28 dětských pacientů (16 chlapců a 12 dívek) průměrného věku $4,7 \pm 6,4$ let (od 1 měsíce do 18 let; medián 2 roky): čtrnáct pacientů s akutním onemocněním ledvin (hypoxické postižení ledvin, hemolyticko-uremický syndrom), jedenáct pacientů s chronickým onemocněním ledvin (nefrotický syndrom, IgA nefropatie) a tři pacienti s prerenální azotémií. Kontrolní soubor tvořilo deset zdravých dětí (8 chlapců a 2 dívky) průměrného věku $8,0 \pm 6,5$ let (od 2 měsíců do 16 let; medián 10,5 let).

3.3.2. Stanovení NGAL v moči

Koncentrace NGAL v moči byla stanovena ve vzorcích první ranní moči. Metodika je uvedena v kapitole 3.2.2.

3.3.3. Stanovení kreatininu v moči

Současně s koncentrací NGAL byl ve stejných vzorcích moči stanoven i močový kreatinin (metodika je uvedena v kapitole 3.1.5.) a byl počítán poměr NGAL/kreatinin v moči.

3.3.4. Statistické zpracování

Ke statistickému zpracování byl použit R statistický program (R Core Team, 2015; Cauty A. a Ripley B. D., 2015) a bootstrapované metody statistických výpočtů s 1000000 opakováním (vzhledem k malému počtu a nenormální distribuci dat v některých souborech). Byly vypočteny bootstrapované průměry, výběrové směrodatné odchylky, mediány atd. Ke zjištění statistických rozdílů mezi všemi soubory byla použita bootstrapovaná ANOVA a následně ke zjištění rozdílů mezi dvěma soubory bootstrapovaný Tukeyho HSD Post-hoc test (White I. R. a Thompson S. G., 2003; Carpenter J. a Bithell J., 2000; Davidson A. C. a Hinkley D. V., 1997).

3.4. Stanovení močového NGAL u dospělých pacientů po kardiochirurgických výkonech

3.4.1. Soubor pacientů

Soubor tvořilo 10 pacientů ve věku 49 až 76 let (průměr $62,9 \pm 8,3$ let, 8 mužů a 2 ženy), kteří podstoupili kardiochirurgický výkon. U 4 pacientů byla předoperačně zvýšená koncentrace sérového kreatininu, ale pouze 1 pacient měl předoperačně diagnostikovanou chronickou renální insuficienci (jeho koncentrace kreatininu byla $157 \mu\text{mol/l}$, u ostatních 3 pacientů byla koncentrace kreatininu jen mírně nad referenčním rozmezím). Devíti pacientům byla provedena revaskularizace myokardu pro ischemickou chorobu srdeční (1krát bez použití mimotělního oběhu), jeden pacient podstoupil náhradu aortální chlopně pro stenózu.

Stav pacientů byl sledován do druhého pooperačního dne. Pooperační průběh byl vyhodnocen jako „**průběh s renálními komplikacemi**“ v případě vzniku alespoň jedné z následujících komplikací:

- pokles diurézy pod $0,7 \text{ ml/kg/h}$,
- vzestup sérové koncentrace kreatininu nad dvojnásobek předoperační hodnoty,
- potřeba diuretické podpory furosemidem v dávce vyšší než 1 mg/kg/den .

Jako „**průběh s oběhovými komplikacemi**“ byl hodnocen stav, kdy bylo nutné podávat noradrenalin v dávce nad $0,25 \mu\text{g/kg/min}$, dobutamin v dávce nad $10 \mu\text{g/kg/min}$, milrinon v dávce nad $0,35 \mu\text{g/kg/min}$, levosimendan nebo použít mechanickou podporu oběhu.

Vzorky moči k vyšetření byly odebírány po úvodu do celkové anestézie (T_{preop}) a dále v odstupu jedné (**T1**), pěti (**T5**) a deseti hodin (**T10**) od konce operace resp. od příjmu na jednotku intenzivní péče. Zároveň se stanovením NGAL byla ve vzorcích moči vyšetřena koncentrace kreatininu. Sérový kreatinin byl vyšetřen v časech T_{preop} , T1 a T10.

3.4.2. Stanovení NGAL v moči

Metodika je uvedena v kapitole 3.2.2.

3.4.3. Stanovení kreatininu v séru a v moči

Metodika je uvedena v kapitolách 3.2.3. a 3.1.5. Referenční rozmezí sérového kreatininu v případě dospělých je pro muže definováno: $55\text{--}96 \mu\text{mol/l}$ a pro ženy: $42\text{--}80 \mu\text{mol/l}$.

3.4.4. Statistické zpracování

Při statistickém zpracování jsme postupovali podle doporučení pro výzkum v klinické biochemii (Armitage P. et al., 2002; Swaminathan R., 2011). Nejdříve jsme testovali

rozložení dat a zjistili jsme jejich nenormální distribuci. Pomocí Kruskal-Wallisova testu jsme testovali statistickou významnost rozdílů močového NGAL, poměru močový NGAL/močový kreatinin a sérového kreatininu v případě všech čtyř odběrů. Významnost rozdílů mezi jednotlivými dvěma odběry u těchto markerů jsme hodnotili Mann-Whitney testem. Korelační závislosti byly hodnoceny stanovením Spearmanových korelačních koeficientů. Hodnoty $p < 0,05$ byly považovány za statisticky významné. Byly vypočteny průměry, výběrové směrodatné odchylky, mediány. *(Bootstrapované statistické metody jsme v tomto případě nepoužili proto, že jsme chtěli zachovat návaznost na námi již publikovaný článek (Fořtová M. et al., 2011) a statistické zpracování uvedené v tomto článku jsme zachovali.)*

3.5. Stanovení markerů poškození ledvin u dospělých pacientů po angiografii

3.5.1. Soubor pacientů

Soubor tvořilo 41 pacientů (24 mužů a 17 žen) průměrného věku $66,4 \pm 11,0$ let (od 39 do 85 let, medián 67 let), kteří podstoupili angiografický výkon. 28 pacientů podstoupilo selektivní koronarografii (základní diagnóza byla u 25 pacientů chronická ischemická choroba srdeční, u 1 pacienta bolest na hrudi, u 1 pacienta angina pectoris a u 1 pacienta stenóza aortální chlopně). 13 pacientů podstoupilo digitální subtrakční angiografii pro aterosklerózu končetinových tepen. U většiny pacientů se jednalo o plánované nekomplikované výkony s propuštěním den následující po výkonu. Z tohoto důvodu jsme nemohli provést vyšetření za 48 resp. 72 hodin po podání kontrastní látky a hodnotit případný rozvoj kontrastem indukované nefropatie.

V časech 0, 4 a 24 hodin (**T0, T4, T24**) po podání kontrastní látky byly odebrány vzorky séra k vyšetření kreatininu a cystatinu C a v časech 0, 4, 12 a 24 hodin (**T0, T4, T12, T24**) po podání kontrastní látky vzorky moči k vyšetření NGAL, NAG, albuminu, α -1-mikroglobulinu a kreatininu. Tyto markery jsme hodnotili jednak v souboru všech pacientů a jednak po jeho rozdělení podle vstupní eGF_{MDRD} **v podsouborech s $eGF \geq 1,2 \text{ ml/s/1,73 m}^2$ a $<1,2 \text{ ml/s/1,73 m}^2$.**

3.5.2. Stanovení kreatininu v séru a v moči

Metodika je uvedena v kapitolách 3.2.3. a 3.1.5. Vzhledem k tomu, že stanovení bylo navázáno na standardní referenční materiál NIST SRM 967 metodou LC-IDMS, pro odhady glomerulární filtrace ze sérových koncentrací kreatininu byla použita modifikovaná MDRD rovnice z roku 2005 (tab. 3).

3.5.3. Stanovení cystatinu C v séru

Koncentrace cystatinu C v séru byly stanoveny imunoturbidimetrickou metodou pomocí automatického analyzátoru Advia 1800 (Siemens, USA). Vzorek lidského séra nebo plazmy obsahující stanovovaný antigen se promíchá s purifikovanou imunoglobulinovou frakcí králičího antiséra proti cystatinu C kovalentně navázanou na uniformní polystyrenové částice. Proběhne imunochemická reakce a dojde k aglutinaci částic. Vytvořený zákal se měří při 545 nm.

Metoda užívá reagentie Cystatin C Immunoparticles ERM (kat. č. LX00410-2, Dako Cytomation) a Reaction buffer 9 (kat. č. S236130, Dako Cytomation), kalibrátor k šestibodové kalibraci Cystatin C Calibrator (kat. č. X 7912, Dako Cytomation) a kontroly Cystatin C Control Set (level 1, level 2, kat.č. X0973, Dako Cytomation). Pracovní rozsah metody byl 0,48–7,10 mg/l a detekční limit 0,15 mg/l. Variační koeficienty byly 2,0 % pro nižší hladinu a 1,2 % pro vyšší hladinu, bias 2,9 % pro nižší hladinu a 0,9 % pro vyšší hladinu. Referenční rozmezí pro věk 1 až 50 let bylo definováno: 0,55–1,15 mg/l a pro věk 50 až 150 let: 0,63 – 1,44 mg/l.

K naměřenému výsledku sérového cystatinu C systém automaticky vypočte odhadovanou hodnotu glomerulární filtrace podle CAPA rovnice (Grubb A. et al., 2014).

3.5.4. Stanovení NGAL v moči

Metodika je uvedena v kapitole 3.2.2.

3.5.5. Stanovení NAG v moči

Koncentrace NAG (N-acetyl- β -D-glukosaminidázy) v moči byly stanoveny kolorimetrickou metodou N-acetyl-b-D-glucosaminidase (NAG) Assay (kat. č. DZ062A, Diazyme, automatický analyzátor Advia 1800, Siemens, USA), při které NAG hydrolyzuje v alkalickém prostředí substrát 2-methoxy-4-(2' nitrovinyl)-fenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosid (MNP-GlcNAc) na 2-methoxy-4-(2' nitrovinyl)-fenol. Koncentrace NAG je přímo úměrná změně absorbance při 505 nm.

Metoda užívá kalibrační materiál k dvoubodové kalibraci Calibrator NAG (kat. č. DZ062A-CAL, Diazyme) a kontroly NAG Controls (level 1, level 2, kat.č. DZ062A-CON, Diazyme). Pracovní rozsah metody byl 5–30000 nkat/l, limit detekce 1,5 nkat/l. Variační koeficienty byly 4,4 % pro nižší hladinu a 2,6 % pro vyšší hladinu, bias 1,7 % pro nižší hladinu a 6,9 % pro vyšší hladinu. Referenční rozmezí bylo definované pro močový NAG vztažený na močový kreatinin a pro věk 15 až 60 let: 0–15,7 nkat/mmol kreatininu.

3.5.6. Stanovení albuminu v moči imunoturbidimetricky a HPLC

Metodika je uvedena v kapitole 3.1.2. a 3.1.1.

3.5.7. Stanovení α -1-mikroglobulinu v moči

Koncentrace α -1-mikroglobulinu v moči byly stanoveny imunoturbidimetrickou metodou (alpha-1-Microglobulin TQ w/o Calib, kat. č. 03576116, Roche Diagnostics, Německo, automatický analyzátor Advia 1800, Siemens, USA). Antigen (α -1-mikroglobulin) stanovovaný v moči reaguje s ovčí polyklonální protilátkou proti lidskému α -1-mikroglobulinu. Vznikne nerozpustný imunokomplex a vytvořený zákal se měří turbidimetricky při 340 nm.

Metoda užívá kalibrační materiál k pětibodové kalibraci Calibrator for automated systems C.f.a.s. PUC (kat. č. 03121305) a kontroly Precinorm PUC (kat. č. 03121313) a Precipath PUC (kat. č. 03121291), vše od Roche Diagnostics, Německo. Pracovní rozsah byl 10–200 mg/l a limit detekce byl 5 mg/l. Variační koeficienty byly 7,2 % pro nižší hladinu a 6,8 % pro vyšší hladinu, bias 3,1 % pro nižší hladinu a 3,8 % pro vyšší hladinu.

Referenční meze pro věk 15 až 60 let: 0–12 mg/l.

3.5.8. Statistické zpracování

Nejdříve jsme testovali rozložení dat a zjistili jsme jejich nenormální distribuci. Abychom předešli zkreslení díky tomuto typu rozložení dat, použili jsme ke statistickému zpracování bootstrapované statistické analýzy s 1000 opakováním (White I. R. a Thompson S. G., 2003; Carpenter J. a Bithell J., 2000) a R statistický program (R Core Team, 2015; Canty A. a Ripley B. D., 2015).

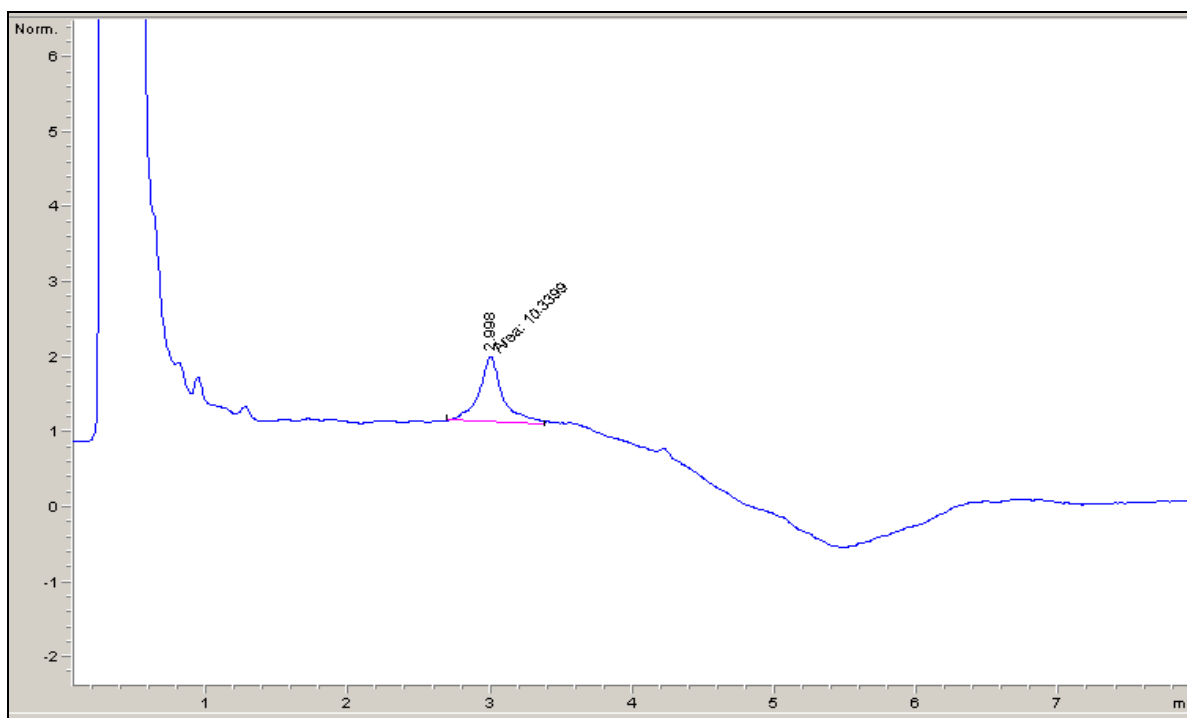
Byly vypočteny průměry, výběrové směrodatné odchylky, mediány atd. Ke zjištění statistických rozdílů ve vývoji hodnot jednotlivých parametrů v čase (kreatininu, cystatinu C, NGAL a dalších), odlišnosti hodnot jednotlivých parametrů mezi podsoubory s $eGF_{MDRD} \geq 1,2 \text{ ml/s/1,73 m}^2$ a $<1,2 \text{ ml/s/1,73 m}^2$ a odlišnosti vývoje jednotlivých parametrů v čase mezi těmito podsoubory jsme použili bootstrapovanou dvoucestnou ANOVA analýzu, ke zjištění rozdílů mezi dvěma časy odběrů u jednotlivých parametrů jsme následně použili bootstrapovaný Tukeyho HSD Post-hoc test. Provedli jsme binární porovnání eGF z MDRD rovnice a z hodnot cystatinu C. Korelační závislosti mezi jednotlivými parametry byly hodnoceny stanovením Spearmanových korelačních koeficientů. Hodnoty $p < 0,05$ byly považovány za statisticky významné.

4. VÝSLEDKY

4.1. Stanovení albuminurie HPLC a sledování vztahu k diagnóze diabetes mellitus

4.1.1. Stanovení albuminurie HPLC v náhodně vybraných vzorcích patientských močí

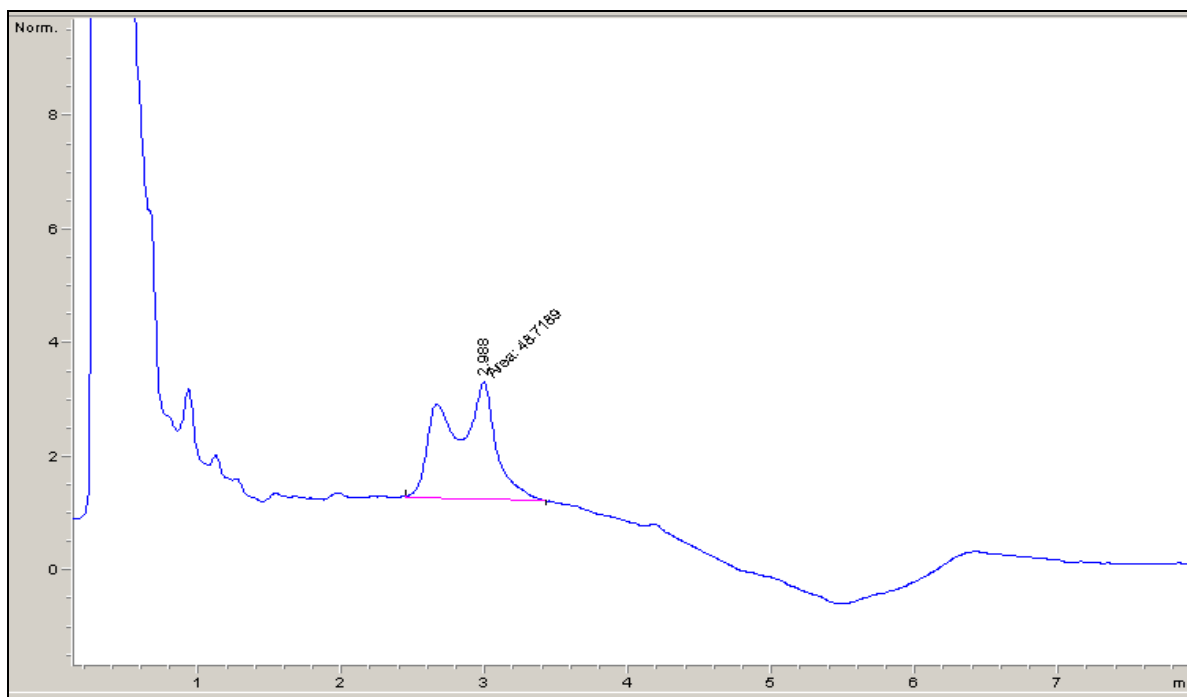
Po úspěšné validaci HPLC metody a vyloučení významných interferencí jsme analyzovali několik náhodných vzorků patientských močí. Zjistili jsme významný rozdíl mezi imunoturbidimetrickou metodou a HPLC. Ve vzorcích močí s vysokou koncentrací albuminu (cca od 250 mg/l) docházelo ke štěpení eluční křivky albuminu (což jsme zaznamenali i u standardů albuminu určených ke kalibraci). Hypoteticky by tento jev mohl souviset s tvorbou dimerů nebo trimerů ve vyšších koncentracích. Analýzy patientských vzorků jsou znázorněny na obrázcích 16 a 17.



Obr. 16. Analýza vzorku patientské močí

(za chromatografických podmínek podle Fořtová M. et al., 2012)

Koncentrace stanovená imunoturbidimetricky byla 46,3 mg/l a HPLC 60,0 mg/l (HPLC hodnota o 30 % vyšší).



Obr. 17. Analýza vzorku pacientské moči se štěpením píku albuminu

(za chromatografických podmínek podle Fořtová M. et al., 2012)

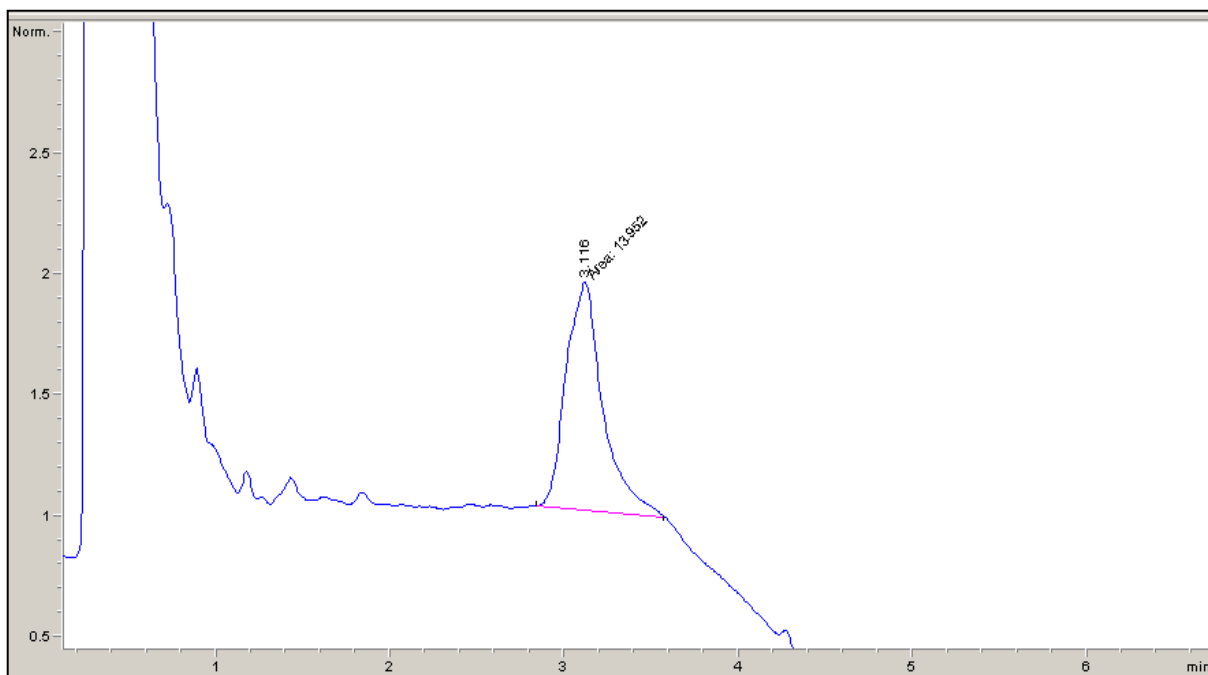
Koncentrace stanovená imunoturbidimetricky byla 213,0 mg/l a HPLC 280,8 mg/l (HPLC hodnota o 32 % vyšší).

4.1.2. Testování hypotézy o existenci imunoreaktivního albuminu

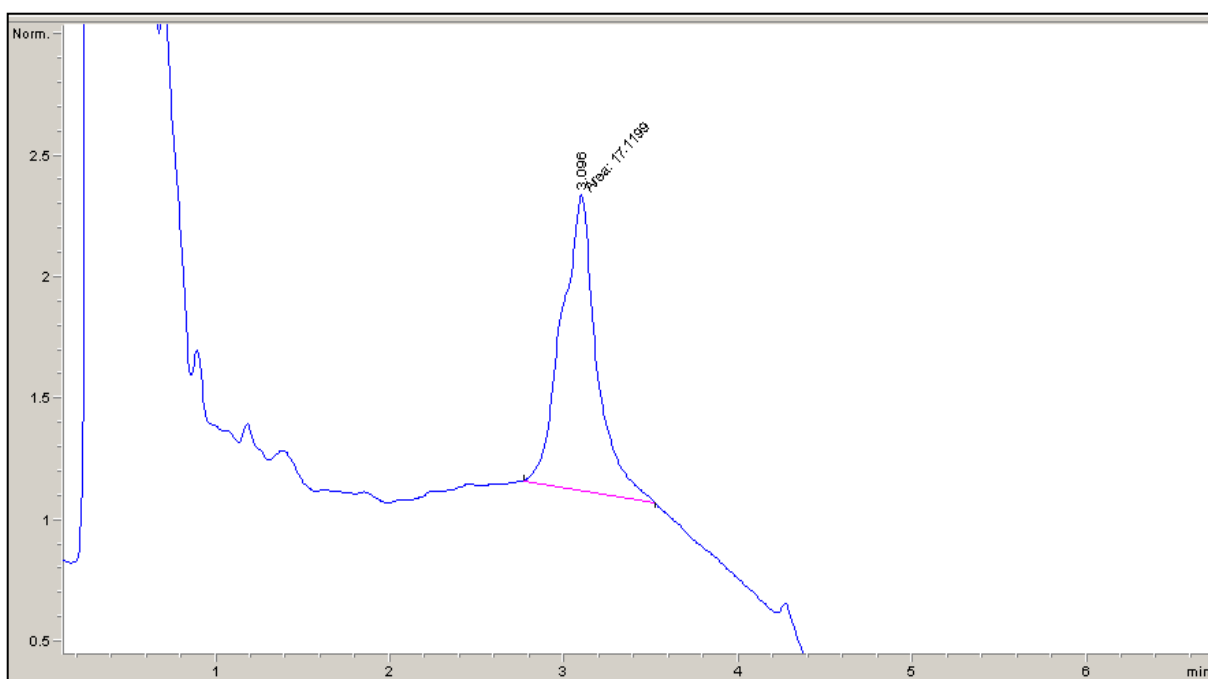
V experimentální směsné moči 1 s arteficiálně přidaným standardem albuminu jsme neshledali statisticky významný rozdíl v hodnotách albuminurií stanovených oběma metodami. Koncentrace albuminu stanovená imunoturbidimetricky byla $79,1 \pm 1,7$ mg/l a koncentrace stanovená HPLC $82,5 \pm 1,6$ mg/l, tj. průměrně pouze o 4 % vyšší, $p = 0,052$ (u obou metod se jednalo o průměrné koncentrace 16 analýz).

Oproti tomu, v experimentální směsné moči 2 připravené z pacientských vzorků s imunoturbidimetricky změřenou středně zvýšenou albuminurií $79,5 \pm 2,1$ mg/l byla HPLC zjištěná hodnota $99,9 \pm 1,7$ mg/l (opět průměrné koncentrace 16 analýz), tj. průměrně o 26 % vyšší, $p < 0,001$. Výsledky analýz jsou uvedeny na obrázcích 18 a 19.

Výsledky analýz směsných močí (významné rozdíly mezi metodami ve směsné moči 2) nasvědčují na existenci imunoreaktivního albuminu, jenž ztratil svoji imunoreaktivitu pravděpodobně při průchodu renálními tubuly a nelze jej zachytit imunochemickými metodami, a potvrzují dostatečnou kvalitu našeho standardu albuminu (téměř stejné koncentrace albuminu stanovené oběma metodami ve směsné moči 1). Tyto výsledky společně s výsledky testování hypotézy o potenciálních interferencích též prakticky vylučují možnost systematického nadhodnocování hodnot albuminurie metodou HPLC.



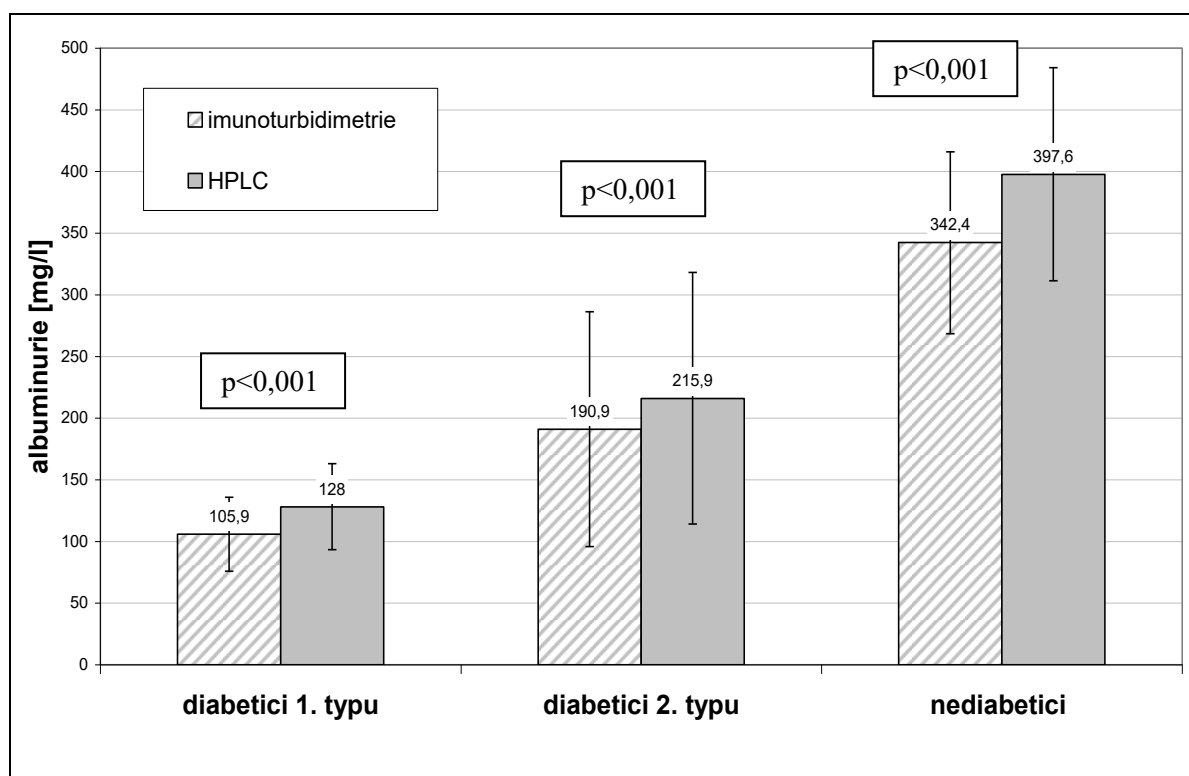
Obr. 18. HPLC analýza experimentálního směsného vzorku 1 s arteficiálně středně zvýšenou albuminurií (za chromatografických podmínek podle Fořtová M. et al., 2012) Směsný vzorek z 30 vzorků moči s imunoturbidimetricky (IT) fyziologickou albuminurií s přidaným standardem albuminu, koncentrace stanovená IT $79,1 \pm 1,7$ mg/l a HPLC $82,5 \pm 1,6$ mg/l (statisticky nesignifikantní rozdíl mezi metodami).



Obr. 19. HPLC analýza experimentálního směsného vzorku 2 s reálnou středně zvýšenou albuminurií (za chromatografických podmínek podle Fořtová M. et al., 2012) Směsný vzorek z 30 vzorků moči s imunoturbidimetricky (IT) stanovenou středně zvýšenou albuminurií, koncentrace stanovená IT $79,5 \pm 2,1$ mg/l a HPLC $99,9 \pm 1,7$ mg/l (rozdíl průměrných hodnot 26 %, $p < 0,001$).

4.1.3. Porovnání HPLC a imunoturbidimetricky stanovené albuminurie v patientských vzorcích a sledování vztahu k diagnóze diabetes mellitus

Albuminurie stanovená HPLC byla významně vyšší než albuminurie stanovená imunoturbidimetricky jak v souboru všech diabetiků [HPLC stanovená průměrná hodnota a 95 % konfidenční intervaly: 159,8 mg/l (118,6 mg/l; 201,3 mg/l) vs. imunoturbidimetricky stanovená průměrná hodnota a 95 % konfidenční intervaly: 136,5 mg/l (98,8 mg/l; 174,4 mg/l)], tak po rozdělení tohoto souboru na diabetiky 1. a 2. typu, a také v souboru nediabetiků (ve všech případech $p < 0,001$; obrázek 20).



Obr. 20. Albuminurie stanovená imunoturbidimetricky a HPLC v souboru diabetiků 1. typu (N=384), diabetiků 2. typu (N=222) a nediabetiků (N=456)

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměry (vyjádřeny číselně a jako sloupcové grafy) a 95 % konfidenční intervaly (znázorněny jako úsečky vycházející ze sloupcových grafů).

Průměrné rozdíly v albuminuriích stanovených HPLC a imunoturbidimetricky v závislosti na výši imunoturbidimetricky stanovené albuminurie jsou uvedeny v tabulce 11. Rozdíly byly největší v oblasti imunoturbidimetricky stanovené albuminurie do 15 mg/l, kde HPLC výsledky byly v souboru všech pacientů průměrně o 159 % vyšší. V této oblasti koncentrací vykazovali statisticky významně vyšší rozdíly diabetici než nediabetici ($p < 0,05$) a diabetici 1. typu než 2. typu ($p < 0,01$). V dalších oblastech koncentrací se rozdíly postupně snižovaly, nezaznamenali jsme statisticky významné rozdíly mezi diabetiky a nediabetiky;

v oblasti 15 až 29,9 mg/l jsme zjistili statisticky významný rozdíl mezi diabetiky 1. a 2. typu ($p < 0,01$), ostatní rozdíly mezi těmito skupinami byly statisticky nevýznamné (tab. 11).

Albuminurie IT [mg/l]	Albuminurie HPLC vyšší o x % než IT				
	x [%]				
	Celý soubor (N=1092)	Nediabetici (N=456)	Diabetici (N=636)	Diabetici 1. typu (N=384)	Diabetici 2. typu (N=222)
< 15	159,0 ± 91,6	153,6 ± 95,4	161,8 ± 89,6	167,2 ± 90,5	149,8 ± 90,7
15 – 29,9	52,5 ± 42,8	51,6 ± 40,9	53,2 ± 44,6	58,3 ± 47,8	38,2 ± 32,8
30 – 99,9	22,3 ± 19,1	22,1 ± 21,5	22,5 ± 16,9	21,0 ± 16,0	23,2 ± 16,9
100 – 299,9	15,3 ± 13,5	15,6 ± 12,3	15,0 ± 14,7	15,6 ± 17,3	14,6 ± 12,0
≥ 300	13,3 ± 12,5	13,6 ± 12,9	12,9 ± 12,2	13,6 ± 14,9	12,4 ± 8,2

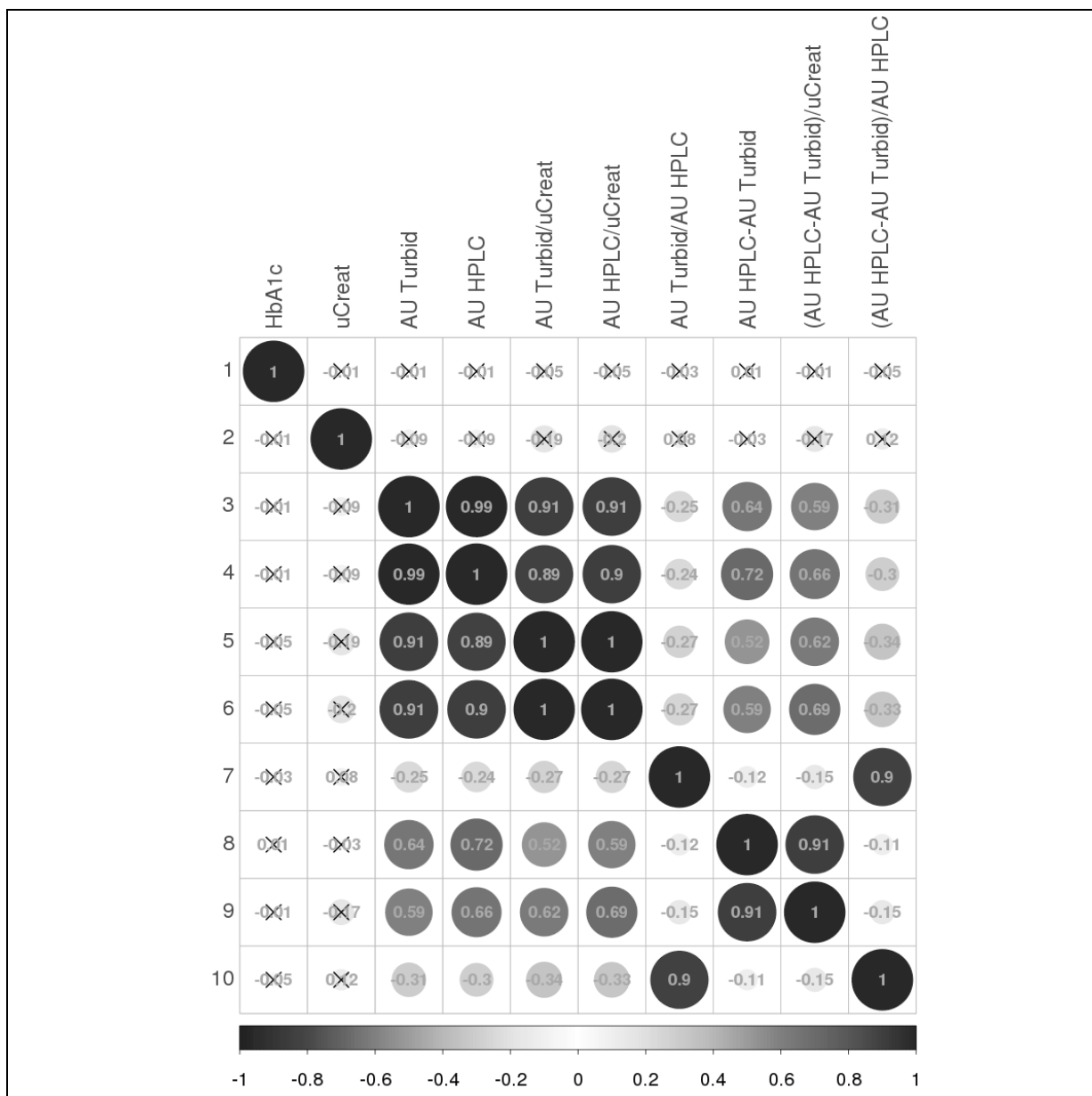
Tab. 11. Procentuální rozdíl mezi HPLC a imunoturbidimetricky (IT) stanovenou albuminurií v souboru všech pacientů a po jeho rozdělení na nediabetiky a diabetiky (a po rozdělení na diabetiky 1. a 2. typu) v závislosti na IT stanovené albuminurii
Výsledky uvedené jako průměry ± výběrové směrodatné odchylky.

Albuminurie stanovená HPLC významně korelovala s albuminurií stanovenou imunoturbidimetricky (korelační koeficient 0,994) a významně korelovaly též poměry albumin/kreatinin v moči s HPLC vs. imunoturbidimetricky stanovenou albuminurií (korelační koeficient 0,999, obrázek 21).

V tabulce 12 jsou uvedeny hodnoty glykovaného hemoglobinu u diabetiků (kde byl vyšetřen u všech pacientů) a nediabetiků (vyšetřen u 76 pacientů). U nediabetiků byly nalezeny fyziologické hodnoty, u diabetiků zvýšené hodnoty, které se významně lišily u diabetiků 1. a 2. typu. Jedním z cílů naší práce bylo zjistit, zda glykovaný hemoglobin koreluje s imunoreaktivním albuminem (vypočteným jako: albuminurie HPLC – albuminurie imunoturbidimetricky) nebo s albuminurií jako takovou či dalšími parametry odvozené od albuminurie. Žádná významná korelace mezi glykovaným hemoglobinem a dalšími parametry však nebyla nalezena (obrázek 21).

	Nediabetici (N=76)	Diabetici (N=636)	Diabetici 1. typu (N=384)	Diabetici 2. typu (N=222)
HbA _{1c} [mmol/mol]	40,5 (39,6; 41,4)	73,1 (71,1; 75,2)	77,2 (74,6; 79,7)	67,2 (63,8; 70,6)

Tab. 12. Koncentrace glykovaného hemoglobinu HbA_{1c} v souboru nediabetiků, v souboru diabetiků a po jeho rozdělení na soubory diabetiků 1. a 2. typu
Výsledky vyjádřeny jako průměrné hodnoty a 95 % konfidenční intervaly.



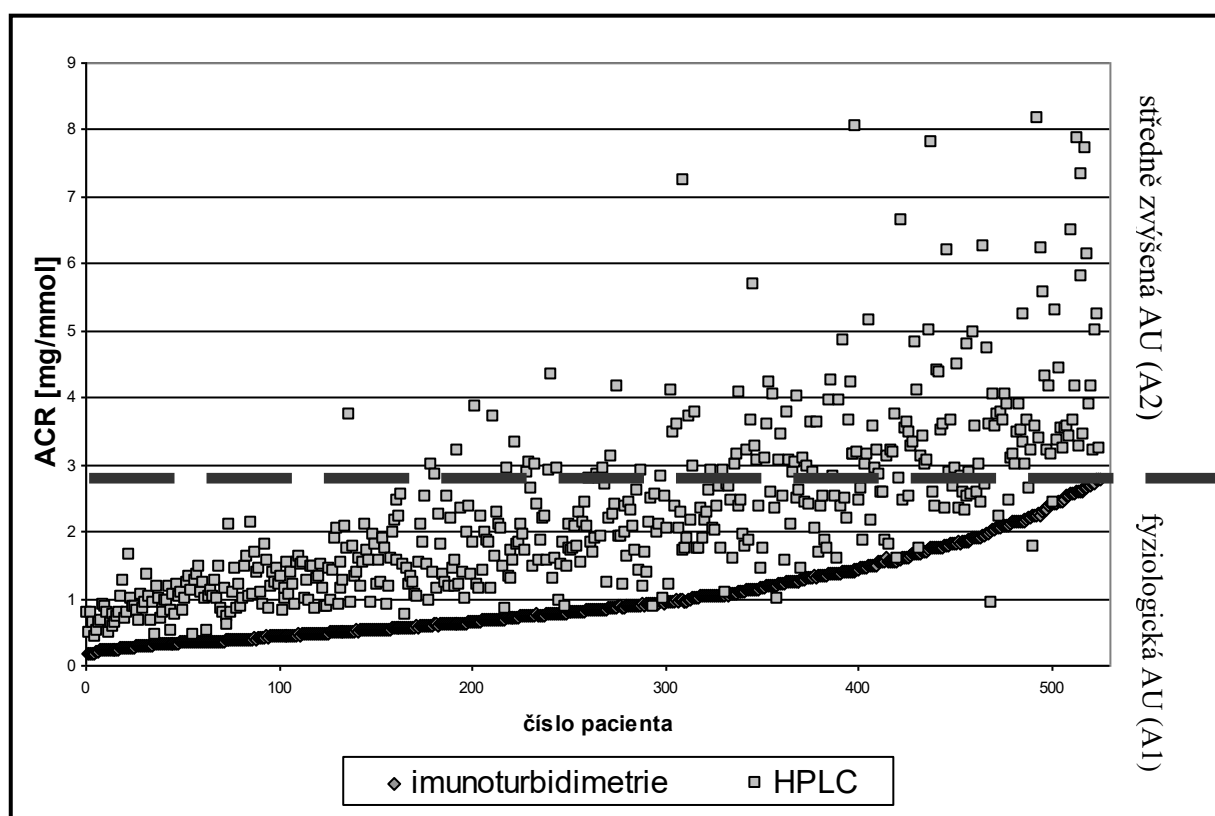
Obr. 21. Bootstrapovaná korelační matice stanovených markerů v souboru všech pacientů (N=1092)

HbA_{1c}: glykovaný hemoglobin, uCreat: kreatinin v moči, AU Turbid: albuminurie stanovená imunoturbidimetricky, AU HPLC: albuminurie stanovená HPLC

Pořadí proměnných na svislé ose je stejné jako na horizontální. Stupně šedi korespondují s významností korelačních závislostí (viz též stupnice pod korelační maticí), v jednotlivých políčkách (resp. v kroužcích) jsou uvedeny hodnoty korelačních koeficientů, přeškrtnutím hodnot je zdůrazněna nevýznamnost korelačních koeficientů (jejich $p > 0,1$).

Z korelační matice je např. patrná významnost korelací mezi albuminurií stanovenou HPLC a imunoturbidimetricky (v korelační matici koeficient 0,99; bez zaokrouhlení 0,994) a mezi poměry albumin/kreatinin v moči s HPLC vs. imunoturbidimetricky stanovenou albuminurií (v korelační matici koeficient 1; bez zaokrouhlení 0,999). Je z ní také jasně vidět, že glykovaný hemoglobin nekoreloval s žádným ze sledovaných markerů – tzn. ani s albuminuriemi stanovenými imunoturbidimetricky či HPLC, ani s parametry od nich odvozenými, např. s imunonereaktivním albuminem (AU HPLC-AU Turbid).

Soubor všech pacientů jsme dále rozdělili podle imunoturbidimetricky stanovené albuminurie hodnocené poměrem albumin/kreatinin v moči. Po tomto rozdělení bylo zjištěno, že 27 % pacientů s imunoturbidimetricky fyziologickou albuminurií (21 % diabetiků a 40 % nediabetiků, průměrná albuminurie \pm SD: $1,86 \pm 0,67$ mg/mmol kreatininu) se posunulo do oblasti středně zvýšené albuminurie (A2) při vyhodnocení stejných vzorků metodou HPLC ($4,11 \pm 1,22$ mg/mmol kreatininu). V případě pacientů imunoturbidimetricky se středně zvýšenou albuminurií (A2) nastal posun do významně zvýšené albuminurie (A3) stanovené HPLC pouze u 8 % z nich (7 % diabetiků a 9 % nediabetiků s albuminurií stanovenou imunoturbidimetricky: $25,42 \pm 3,59$ mg/mmol kreatininu a HPLC: $33,76 \pm 5,50$ mg/mmol kreatininu). Porovnání hodnot poměrů albumin/kreatinin v moči (imunoturbidimetrie vs. HPLC) v případě pacientů s imunoturbidimetricky fyziologickou albuminurií je znázorněno na obrázku 22.



Obr. 22. Poměr albumin/kreatinin v moči (ACR) u pacientů s imunoturbidimetricky stanovenou fyziologickou albuminurií

Hodnoty albuminurií stanovené imunoturbidimetricky a HPLC jsou u jednotlivých pacientů vyneseny nad sebou. 27 % pacientů s imunoturbidimetricky stanovenou fyziologickou albuminurií se posunulo do oblasti HPLC stanovené středně zvýšené albuminurie. Na obrázku se nacházejí HPLC výsledky těchto pacientů nad přerušovanou čarou (oddělující oblast fyziologické a středně zvýšené albuminurie (AU)).

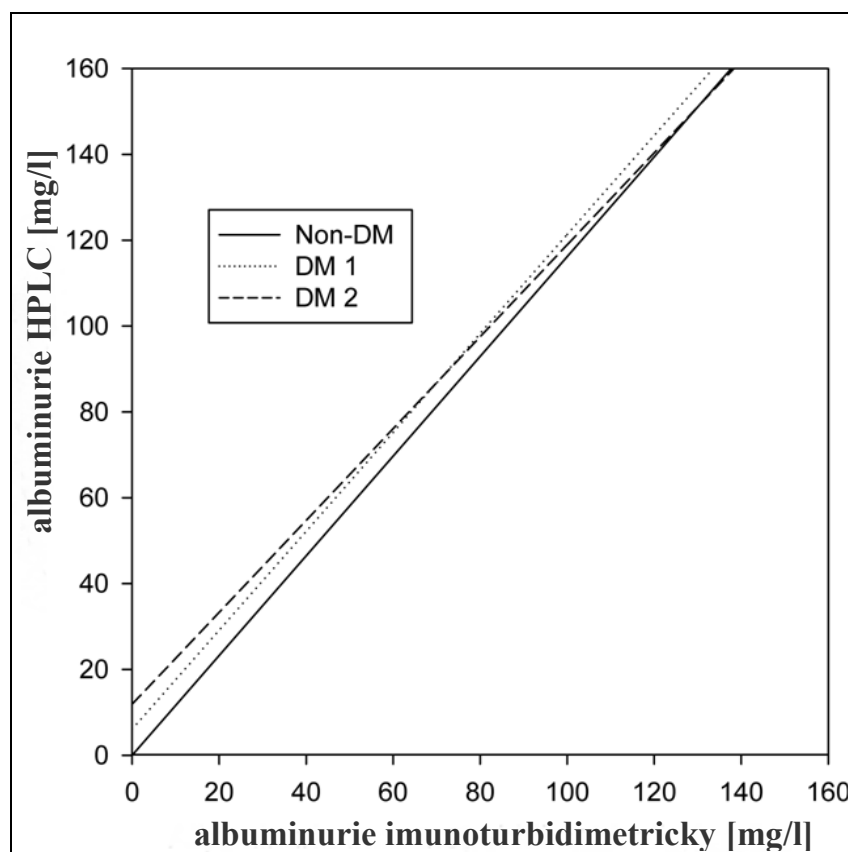
Bootstrapovanou metodou lineární regrese bylo zjištěno, že výsledky stanovení albuminurie imunoturbidimetricky a HPLC jsou silně lineárně závislé. Navíc byly nalezeny významné rozdíly v lineárních závislostech u diabetiků a nediabetiků, v případě diabetiků pak také mezi diabetiky 1. a 2. typu. S tím souvisí i rozdílné koeficienty lineárních závislostí (směrnice neboli „slope“ a konstanta neboli „intercept“, tj. bod, ve kterém regresní přímka protne osu y), které souvisejí s přítomností, a navíc i s typem, diagnózy diabetes mellitus (obrázek 23). Pomocí Demingovy regresní metody jsme získali obdobné výsledky s významnými rozdíly ve směrnici a interceptu (tab. 13).

Celková albuminurie (tzn. imunochemicky reaktivní + imunochemicky nereaktivní albuminurie, odvozená z HPLC stanovení) může být odhadnuta z imunoturbidimetricky (IT) stanovené albuminurie použitím následujících korekčních rovnic (bootstrapované metody):

Pro diabetiky 1. typu: $AU_{HPLC} [mg/l] = 1,152 \times AU_{IT} + 6,101$;

Pro diabetiky 2. typu: $AU_{HPLC} [mg/l] = 1,070 \times AU_{IT} + 11,911$;

Pro nediabetiky: $AU_{HPLC} [mg/l] = 1,162 \times AU_{IT} + 0,164$.



Obr. 23. Rozdíly v bootstrapované lineární závislosti HPLC a imunoturbidimetricky stanovené albuminurie u diabetiků 1. typu (N=384), 2. typu (N=222) a u nediabetiků (N=456)

Jednotlivé naměřené hodnoty jsme nezobrazili záměrně vzhledem k velkému počtu dat (N=1062), regresní přímky by byly nečitelné.

		Bootstrapovaná lineární regrese				Demingova lineární regrese			
		Hodnota	CI.Low	CI.High	p	Hodnota	CI.Low	CI.High	p
Non-DM	Intercept	0,164	-3,733	6,061	100'0 >	2,375	-2,777	9,247	100'0 >
	Slope	1,162	1,141	1,183		0,855	0,821	0,882	
DM typ 1	Intercept	6,101	3,932	8,270		4,650	-0,007	8,632	
	Slope	1,152	1,104	1,120		1,166	1,093	1,252	
DM typ 2	Intercept	11,911	5,813	18,009		11,340	2,451	20,955	
	Slope	1,070	1,012	1,128		1,072	0,984	1,160	

Tab. 13. Parametry bootstrapované lineární regrese a Demingovy lineární regrese při porovnání albuminurie stanovené HPLC a imunoturbidimetricky u nediabetiků (N=456), diabetiků 1. typu (N=384) a diabetiků 2. typu (N=222)

Všechny hodnoty jsou v jednotkách mg/l, CI: 95 % konfidenční intervaly (dolní a horní mez).

Výsledky bootstrapované metody ANOVA jsou uvedeny v tabulce 14. Byly nalezeny významné rozdíly mezi diabetiky a nediabetiky v hodnotách glykovaného hemoglobinu, močového kreatininu a poměru albuminurie HPLC/albuminurie IT. Stejně parametry se lišily mezi různými věkovými skupinami. Albuminurie jako taková se významně nelišila ve skupině diabetiků a nediabetiků, ani v případě testování dalších sledovaných charakteristik či jejich kombinací (např. věku, pohlaví atd.).

	Hodnoty p								
	HbA _{1c}	U _{kreat}	AU _{IT}	AU _{HPLC}	AU _{IT} /U _{kreat}	AU _{HPLC} /U _{kreat}	AU _{HPLC} /AU _{IT}	AU _{HPLC} - AU _{IT}	(AU _{HPLC} - AU _{IT})/U _{kreat}
DM (ano/ne)	<0,001	0,007	0,078	0,097	0,053	0,058	<0,001	0,672	0,368
Pohlaví (M/Ž)	0,173	<0,001	0,696	0,752	0,342	0,358	0,441	0,729	0,735
Věk (skupiny)	0,030	<0,001	0,344	0,382	0,167	0,169	<0,001	0,852	0,459
DM x pohlaví	<0,001	<0,001	0,063	0,081	0,020	0,022	0,021	0,720	0,260
DM x věk	0,001	0,002	0,318	0,357	0,267	0,285	<0,001	0,885	0,673
Pohlaví x věk	0,003	<0,001	0,307	0,342	0,124	0,123	<0,001	0,914	0,463
DM x věk x pohl.	0,003	<0,001	0,132	0,148	0,120	0,127	<0,001	0,790	0,526

Tab. 14. Bootstrapovaná ANOVA v souboru všech pacientů (N=1092)

Statisticky významné hodnoty „p“ jsou znázorněny tučně. Glykovaný hemoglobin HbA_{1c}, močový kreatinin U_{kreat} a poměr AU_{HPLC}/AU_{IT} vykazují významné rozdíly mezi diabetiky a nediabetiky a mezi věkovými skupinami. Imunonereaktivní albumin je vyjádřen rozdílem: AU_{HPLC} - AU_{IT}. (IT: imunoturbidimetrie, AU: albuminurie).

4.2. Stanovení močového NGAL u dětí po transplantaci ledviny

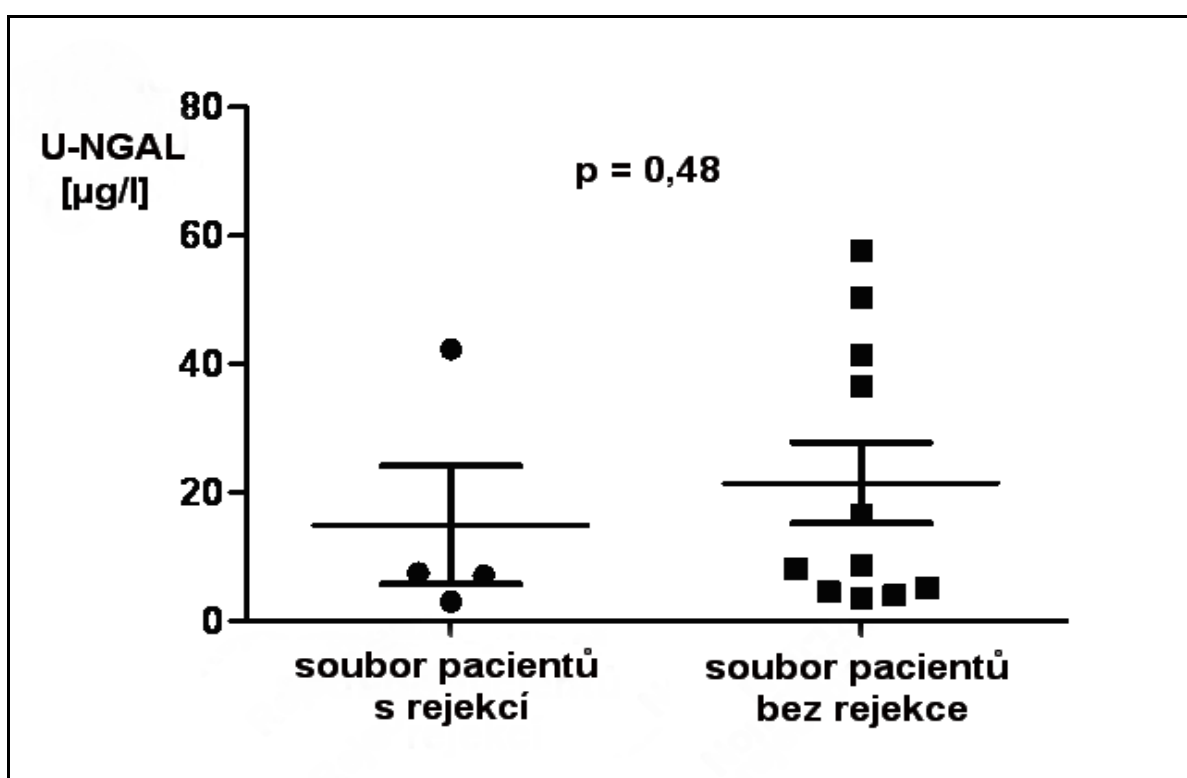
4.2.1. Stanovení příčiny AKI, výsledky renálních biopsií

Čtyři pacienti měli biopsií prokázanou akutní rejekci transplantované ledviny („soubor s rejkci“): akutní buněčná rejekce podle BANFF klasifikace typ IA byla prokázána u dvou pacientů, akutní humorální rejekce také u dvou pacientů. U jedenácti dětí byla prokázána jiná příčina AKI: u čtyř dětí dehydratace, u tří dětí tzv. hraniční změny, u jednoho dítěte taktrolimová nefrotoxicita, u jednoho dítěte mírné aterosklerotické změny u dárce ledviny, u jednoho dítěte intersticiální fibróza a tubulární atrofie, u jednoho dítěte chronická humorální rejekce.

4.2.2. Močové koncentrace NGAL a ostatní biochemické nálezy

Průměrná odhadnutá glomerulární filtrace podle Schwartzova vzorce byla 49 ± 16 ml/min/1,73 m² ($0,82 \pm 0,27$ ml/s/1,73 m²). Průměrná hodnota hsCRP byla $<0,5$ mg/l.

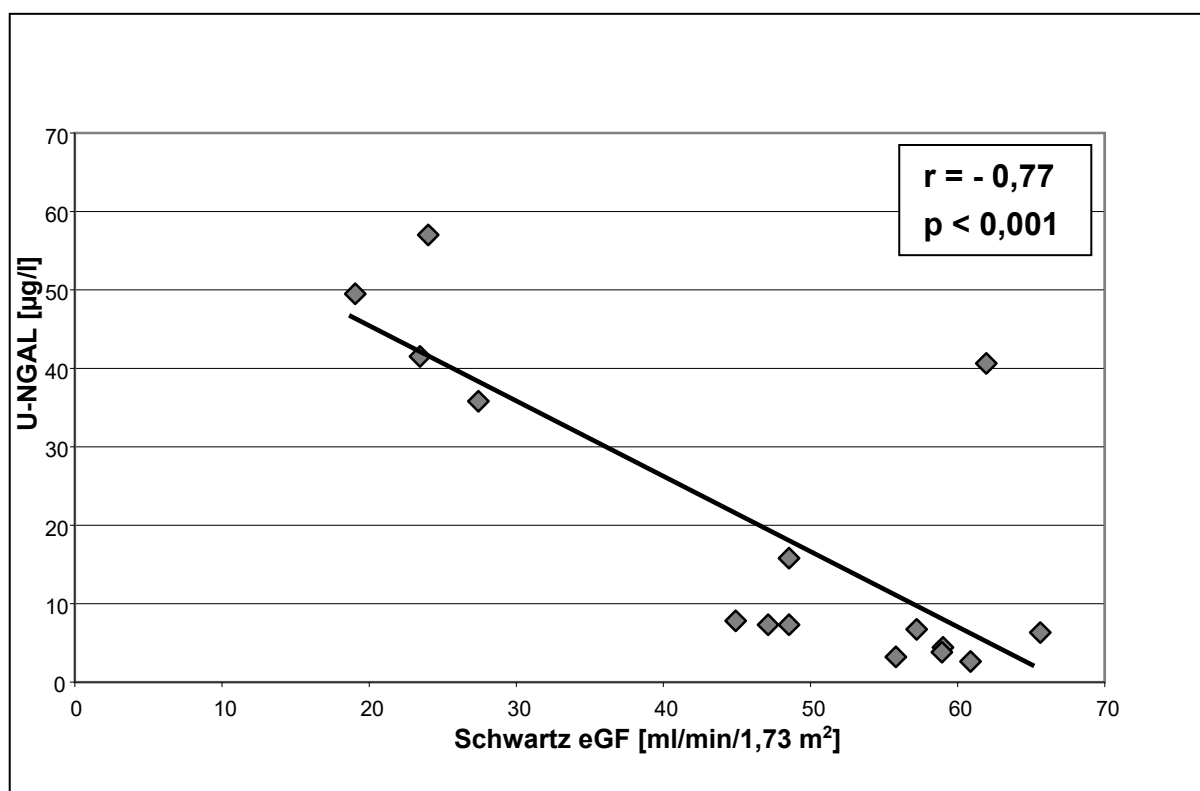
Medián močových koncentrací NGAL v souboru pacientů s rejkci se významně nelišil od mediánu NGAL v souboru pacientů bez rejkce (7,3 µg/l, rozmezí 3,0–42,3 µg/l vs. 8,6 µg/l, rozmezí 3,4–57,8 µg/l; $p = 0,48$; obrázek 24).



Obr. 24. Močové koncentrace NGAL (U-NGAL) u dětských pacientů s rejkční příčinou (soubor pacientů s rejkci, N=4) a jinými příčinami (soubor pacientů bez rejkce, N=11) akutního poškození transplantované ledviny

Výsledky vyjádřeny jako průměry a 95 % konf. intervaly, též vyneseny jednotlivé hodnoty.

Byly nalezeny signifikantní korelace mezi močovým NGAL a eGF ($r = -0,77$; $p < 0,001$; obrázek 25) a mezi močovým NGAL a sérovým kreatininem ($r = 0,81$; $p < 0,001$). Mezi močovým NGAL a sérovým hsCRP významná korelace nalezena nebyla.

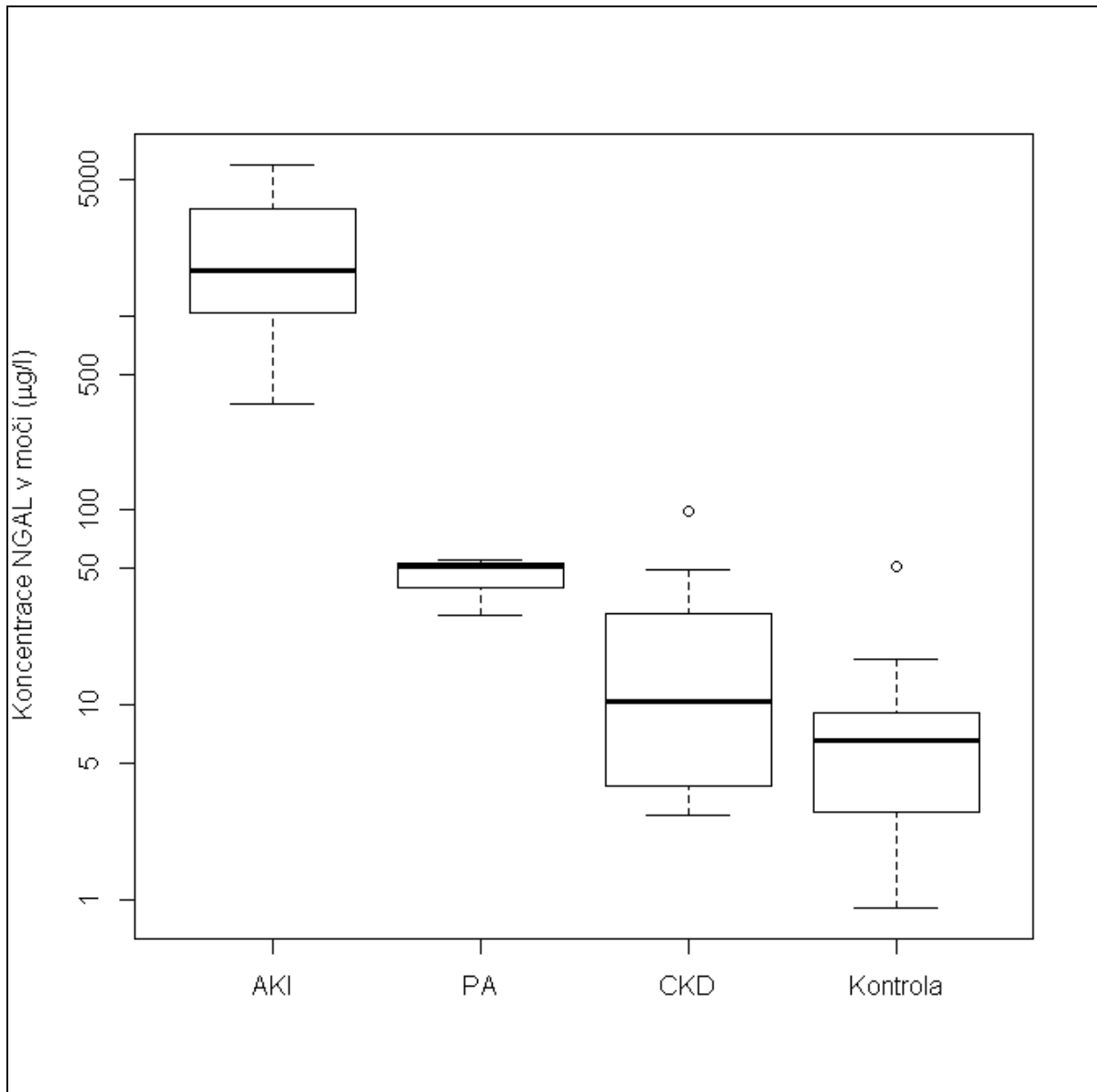


Obr. 25. Negativní korelační vztah mezi močovými koncentracemi NGAL (U-NGAL) a odhadnutou glomerulární filtrací (ze Schwartzova vzorce) v souboru všech dětských pacientů s akutním poškozením ledvin (N=15)

4.3. Stanovení močového NGAL u dětí s akutním nebo s chronickým onemocněním ledvin

Zvýšené koncentrace močového NGAL byly zjištěny u všech pacientů s akutním poškozením ledvin (AKI), hodnota cut-off pro AKI (131,7 µg/l) byla překročena 2,7 a vícekrát (minimální koncentrace byla 354,3 µg/l; průměr ± SD: 2499,8 ± 451,4 µg/l). U žádného pacienta z dalších vyšetřovaných souborů nepřekročila hladina NGAL hodnotu cut-off pro AKI, u souboru s chronickým onemocněním ledvin (CKD) byla maximální hodnota 99,4 µg/l (průměr ± SD: 22,8 ± 7,4 µg/l), u souboru s prerenální azotémií (PA) 56,0 µg/l (průměr ± SD: 45,2 ± 2,7 µg/l) a u kontrolního souboru 51,0 µg/l (průměr ± SD: 10,8 ± 3,2 µg/l). Soubor pacientů s prerenální azotémií tvořili pouze 3 pacienti, s dalšími soubory jsme tento malý soubor mohli porovnávat jen díky užití bootstrapovaných statistických metod. Byly nalezeny statisticky významné rozdíly ($p < 0,001$) mezi všemi

soubory pacientů: tj. mezi AKI a PA, AKI a CKD, AKI a kontrolním souborem, PA a CKD, PA a kontrolním souborem, CKD a kontrolním souborem. Výsledky jsou znázorněny na obrázku 26.



Obr. 26. Výsledky vyšetření močového NGAL v souborech pacientů s akutním poškozením ledvin (AKI), prerenální azotémií (PA), chronickým onemocněním ledvin (CKD) a u kontrolního souboru zdravých dětí (Kontrola)

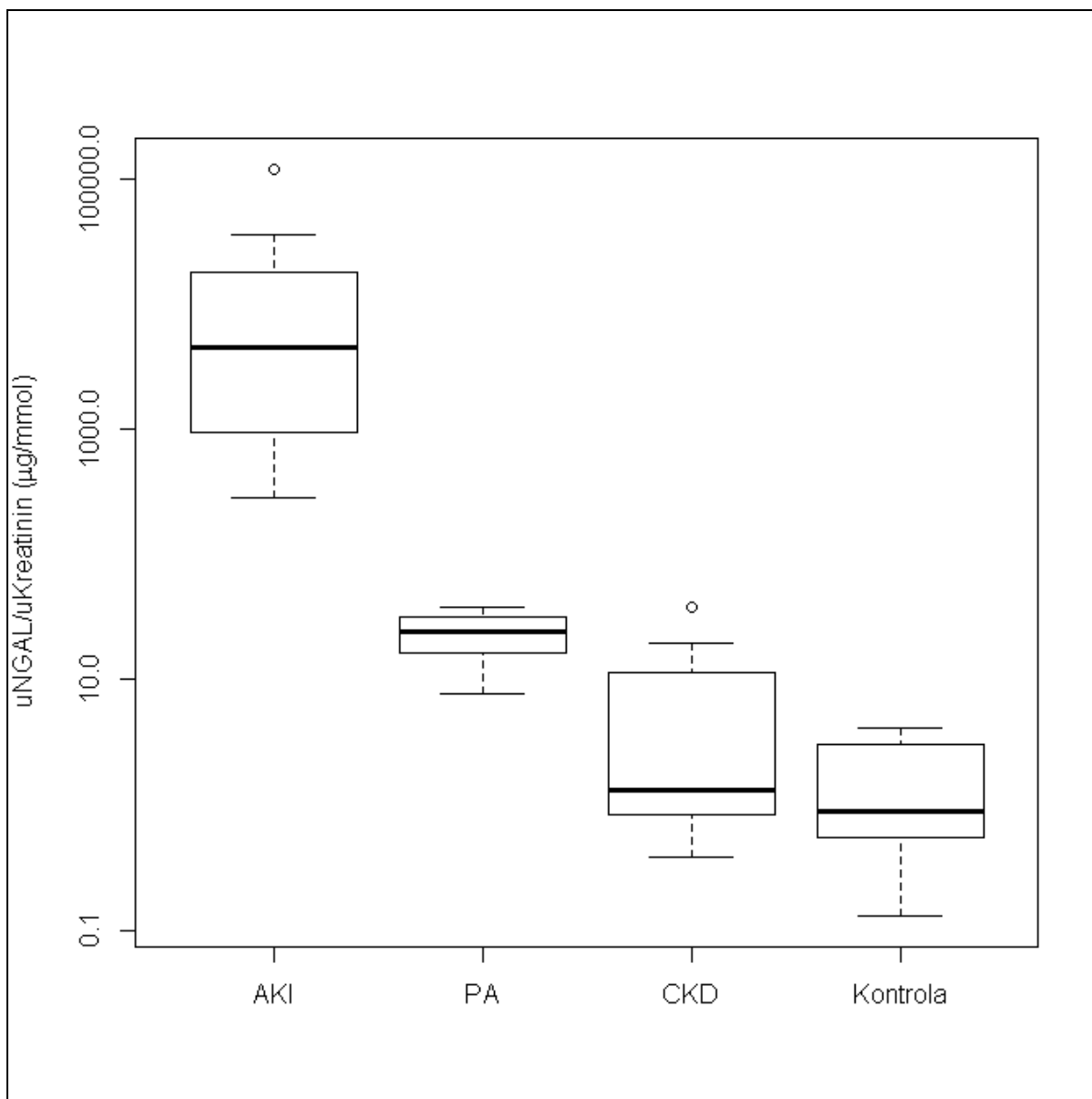
Vyjádřeno jako bootstrapované boxplot grafy, osa y vyjádřena v logaritmicím měřítku, statisticky významné rozdíly mezi všemi soubory ($p < 0,001$).

Hodnoty močového NGAL vztažené na močový kreatinin zobrazuje obrázek 27. Hodnota cut-off U-NGAL/U-kreatinin pro AKI není běžně v diagnostických soupravách definována, proto jsme pro hodnocení našich výsledků použili hodnoty cut-off užívané v klinických studiích. Většina studií užívá hodnotu 15 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ (Tuladhar S. M. et al., 2009;

Nickolas T. L et al., 2008), Ramirez-Sandoval užil přísnější hodnotu 59 $\mu\text{g/g}$ tzn. 6,7 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ (Ramirez-Sandoval J. C. et al., 2014). U všech pacientů s AKI byly tyto hodnoty cut-off několikanásobně překročeny (minimální hodnota U-NGAL/U-kreat byla 283,4 $\mu\text{g}/\text{mmol}$). Pacienti s prerenální azotémií vykazovaly hodnoty U-NGAL/U-kreat: 38,3 $\mu\text{g}/\text{mmol}$, 24,5 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ a 7,8 $\mu\text{g}/\text{mmol}$, neboli hodnoty korigovaného NGAL překročily i u (některých) těchto pacientů hodnoty cut-off. Při užití hodnoty cut-off 15 $\mu\text{g}/\text{mmol}$, u pacientů s prerenální azotémií byla tato hodnota překročena maximálně 2,5krát, oproti tomu, u pacientů s AKI minimálně 19krát a maximálně více než 8000krát. Ačkoliv hodnoty u obou souborů překročily hodnoty cut-off, z výsledků je patrný významný rozdíl mezi soubory AKI a PA, který byl navíc potvrzen bootstrapovaným Tukeyho testem ($p < 0,00001$). Hodnota cut-off 15 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ (i 6,7 $\mu\text{g}/\text{mmol}$) byla překročena u tří pacientů s CKD (hodnoty U-NGAL/U-kreat: 37,7 $\mu\text{g}/\text{mmol}$, 19,4 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ a 19,3 $\mu\text{g}/\text{mmol}$), u ostatních pacientů z tohoto souboru byly hodnoty U-NGAL/U-kreat nižší než 3,6 $\mu\text{g}/\text{mmol}$; u celého souboru s CKD průměr \pm SD: 8,0 \pm 3,2 $\mu\text{g}/\text{mmol}$. U žádného pacienta z kontrolního souboru zdravých dětí hodnoty U-NGAL/U-kreat nepřekročily hodnoty cut-off (maximální hodnota byla 4,1 $\mu\text{g}/\text{mmol}$; průměr \pm SD: 1,6 \pm 0,3 $\mu\text{g}/\text{mmol}$). Byly nalezeny statisticky významné rozdíly ($p < 0,00001$, tzn. statisticky ještě významnější než v případě nekorigovaného NGAL) mezi všemi soubory pacientů: tj. mezi AKI a PA, AKI a CKD, AKI a kontrolním souborem, PA a CKD, PA a kontrolním souborem, CKD a kontrolním souborem.

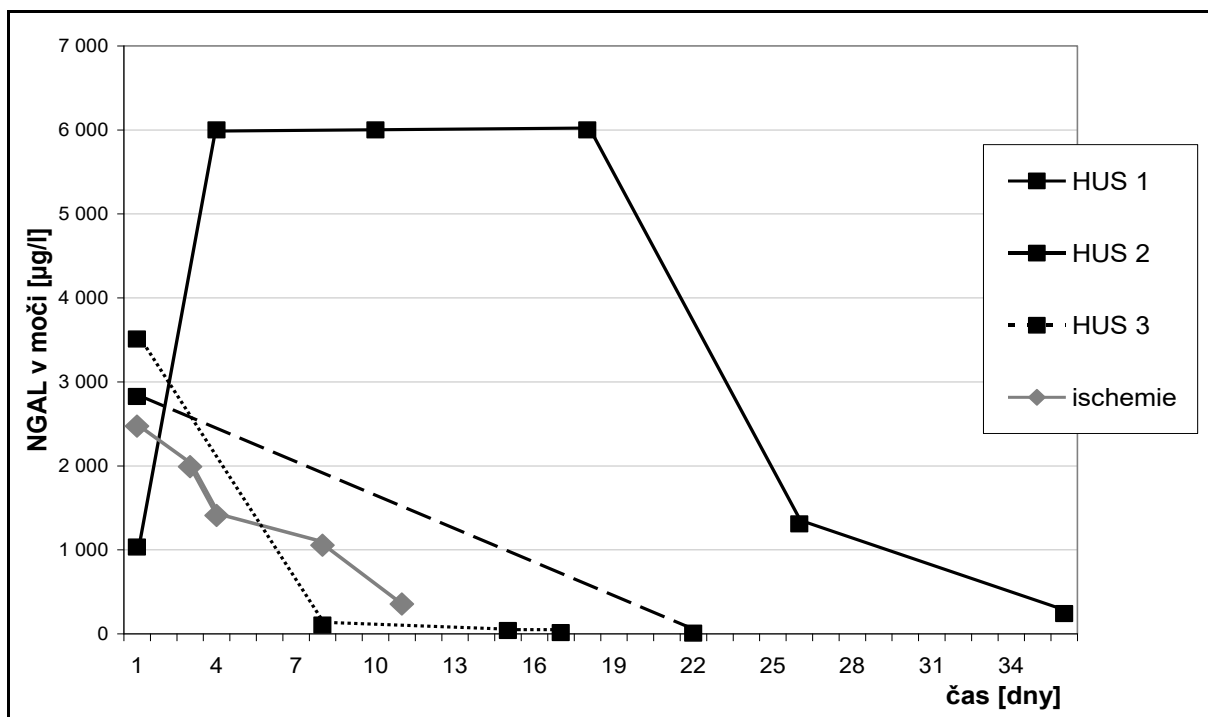
Dynamiku hodnot NGAL u některých pacientů s akutním poškozením ledvin znázorňuje obrázek 28. U tří pacientů došlo k rozvoji AKI v důsledku hemolyticko-uremického syndromu (HUS), z toho pouze u jednoho pacienta jsme zachytili vývoj hodnot NGAL v průběhu celého onemocnění, tj. vzestup NGAL, hodnoty NGAL nad maximální stanovitelnou hodnotou ($>6000 \mu\text{g}/\text{l}$) a snižování hodnot NGAL. Zbylé dva pacienty s HUS jsme sledovali již ve fázi zlepšování stavu a s tím korespondoval i pokles NGAL. U jednoho pacienta došlo k rozvoji AKI v důsledku ischemického poškození ledvin a obrázek 20 znázorňuje již snižování hladin NGAL.

Obrázek 29 zobrazuje průběh hodnot poměrů NGAL/kreatinin v moči u stejných pacientů. U pacienta „HUS 1“ začal tento poměr klesat dříve než močový NGAL a u pacienta s renální ischemií je na začátku sledovaného období patrný ještě vzestup poměru NGAL/kreatinin v moči (v tuto dobu již močový NGAL začal klesat). Vývoj ostatních hodnot těchto poměrů je obdobný jako v případě močového NGAL.



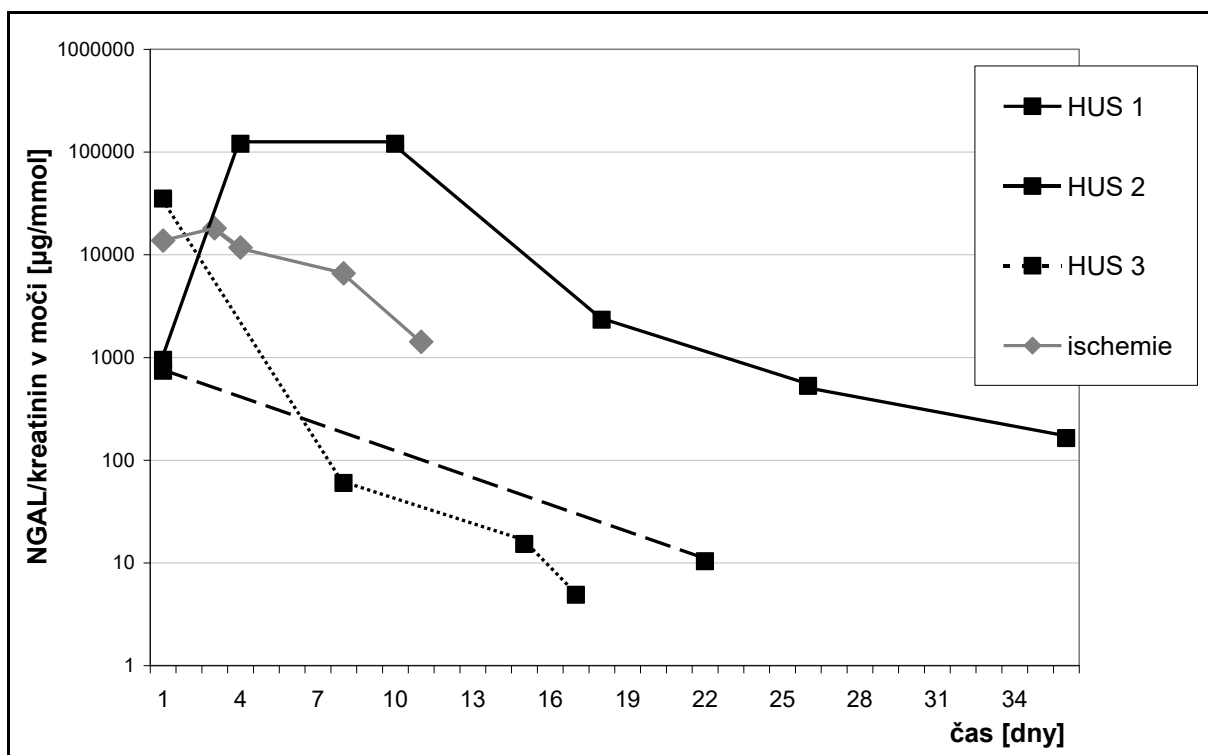
Obr. 27. Výsledky vyšetření močového NGAL vztaženého na močový kreatinin v souborech pacientů s akutním poškozením ledvin (AKI), chronickým onemocněním ledvin (CKD), prerenální azotémií (PA) a u kontrolního souboru zdravých dětí (Kontrola)

Vyjádřeno jako bootstrapované boxplot grafy, osa y vyjádřena v logaritmickém měřítku, statisticky významné rozdíly mezi všemi soubory ($p < 0,00001$).



Obr. 28. Průběh koncentrací NGAL v moči v čase u čtyř pacientů s akutním poškozením ledvin

3 pacienti s hemolyticko-uremickým syndromem (HUS), jednotlivé hodnoty znázorněny jako černé čtverce a propojeny plnými nebo přerušovanými černými čarami, 1 pacient s ischemickým poškozením ledvin, jednotlivé hodnoty znázorněny jako šedé kosočtverce a propojeny šedými čarami.



Obr. 29. Průběh poměru koncentrací NGAL/kreatinin v moči v čase u čtyř pacientů s akutním poškozením ledvin

Symbolika shodná s obr. 28, osa y vyjádřena v logaritmickém měřítku.

4.4. Stanovení močového NGAL u dospělých pacientů po kardiochirurgických výkonech

4.4.1. Pooperační renální a oběhové komplikace, rozdělení souboru pacientů

Pooperační renální komplikace byly zaznamenány u 4 pacientů (všichni tito pacienti měli i komplikace oběhové), pooperační oběhové komplikace u 6 pacientů, 4 pacienti byli zcela bez komplikací. Výsledky vyšetření jsme hodnotili jednak v souboru všech pacientů a jednak v souborech pacientů s renálními komplikacemi a bez nich.

4.2.2. Biochemické nálezy

Průměrné hodnoty \pm výběrové směrodatné odchylky a mediány koncentrací NGAL v moči, poměrů koncentrací NGAL/kreatinin v moči a koncentrací sérového kreatininu jsou uvedeny v tabulce 15 až 17.

odběr	U-NGAL [$\mu\text{g/l}$]	U-NGAL/ U-kreat [$\mu\text{g}/\text{mmol}$]	S-kreat [$\mu\text{mol/l}$]
T_{preop}	8,2 \pm 5,9 (5,3)	0,54 \pm 0,17 (0,57)	92,4 \pm 26,1 (90,0)
T1	7,9 \pm 4,0 (7,3)	2,22 \pm 1,16 (2,52)	97,8 \pm 37,9 (91,0)
T5	10,1 \pm 5,7 (7,5)	3,15 \pm 2,31 (3,27)	-
T10	16,4 \pm 16,2 (11,5)	4,51 \pm 6,05 (2,35)	131,4 \pm 70,2 (116,5)

Tab. 15. Soubor všech pacientů po kardiochirurgických výkonech (N=10)

Výsledky vyjádřeny jako průměry \pm výběrové směrodatné odchylky, v závorce tučně mediány, odběr T_{preop}: preoperačně, po úvodu do celkové anestézie, T1: v odstupu 1 hodiny od konce operace, T5: v odstupu 5 hodin od konce operace, T10: v odstupu 10 hodin od konce operace.

odběr	U-NGAL [$\mu\text{g/l}$]	U-NGAL/ U-kreat [$\mu\text{g}/\text{mmol}$]	S-kreat [$\mu\text{mol/l}$]
T_{preop}	10,7 \pm 7,7 (12,8)	0,52 \pm 0,28 (0,57)	106,8 \pm 36,3 (99,5)
T1	4,4 \pm 0,8 (4,4)	1,10 \pm 0,75 (1,10)	123,8 \pm 48,3 (106,0)
T5	7,7 \pm 4,8 (6,6)	2,54 \pm 2,00 (2,29)	-
T10	8,0 \pm 4,6 (10,4)	1,87 \pm 1,11 (1,93)	180,8 \pm 92,4 (143,5)

Tab. 16. Soubor pacientů s postoperačními renálními komplikacemi (N=4)

Symbolika shodná s tab. 15.

odběr	U-NGAL [$\mu\text{g/l}$]	U-NGAL/ U-kreat [$\mu\text{g}/\text{mmol}$]	S-kreat [$\mu\text{mol/l}$]
T_{preop}	6,3 \pm 4,4 (4,8)	0,55 \pm 0,09 (0,57)	82,8 \pm 12,7 (83,5)
T1	10,3 \pm 3,2 (9,9)	2,96 \pm 0,57 (2,75)	80,5 \pm 16,8 (79,0)
T5	13,4 \pm 6,1 (14,5)	3,96 \pm 2,88 (3,72)	-
T10	24,8 \pm 20,7 (13,6)	7,15 \pm 8,33 (2,69)	98,5 \pm 22,4 (102,5)

Tab. 17. Soubor pacientů bez postoperačních renálních komplikací (N=6)

Symbolika shodná s tab. 15.

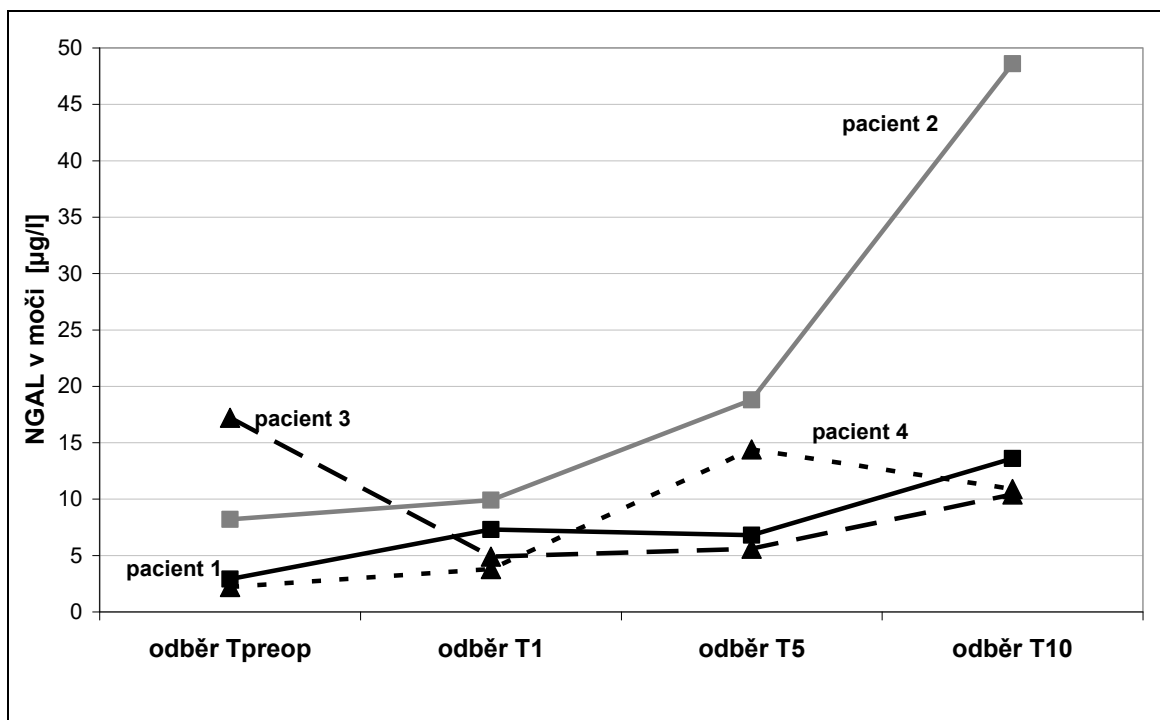
Průměrné hodnoty koncentrací NGAL v moči nevykazovaly ani dvojnásobný vzestup oproti předchozím hodnotám (tzn. odběr T1 vůči odběru T_{preop} atd.) jak v souboru všech pacientů, tak v souborech pacientů bez renálních komplikací ani s renálními komplikacemi. Oproti tomu, poměry koncentrací NGAL/kreatinin v moči dosahovaly více než dvojnásobného vzestupu mezi prvním a druhým odběrem ve všech souborech, v souboru pacientů s renálními komplikacemi jsme navíc zaznamenali více než dvojnásobný vzestup i mezi druhým a třetím odběrem. Pooperační průměrné hodnoty i hodnoty mediánů U-NGAL a poměrů U-NGAL/U-kreat byly zaznamenány vyšší v souboru pacientů bez renálních komplikací ve srovnání s pacienty s renálními komplikacemi. Oproti tomu, sérové koncentrace kreatininu byly vyšší v souboru s renálními komplikacemi.

Vzhledem k malému počtu pacientů jsme statisticky hodnotili pouze soubor všech 10 pacientů, kde nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v hodnotách U-NGAL, v případě poměru U-NGAL/U-kreat nebyl na 5 % hladině významnosti též zaznamenán statisticky významný vztah (nejtěsnější vztah byl zjištěn mezi odběrem T_{preop} a T10, kdy $p=0,07$), v případě kreatininu byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi odběrem T_{preop} a T10 ($p=0,03$).

U žádného ze sledovaných pacientů koncentrace NGAL v moči předoperačně ani pooperačně nepřesáhla cut-off hodnotu pro AKI (131,7 $\mu\text{g/l}$), resp. byla vždy hluboko pod ní, nejvyšší naměřená koncentrace byla 48,6 $\mu\text{g/l}$ (pacient 2 na obrázku 30). Dokonce i pooperační hodnoty U-NGAL u pacienta s chronickou renální insuficiencí byly nízké (nejvyšší hodnota 7,5 $\mu\text{g/l}$), zatímco hodnota sérového kreatininu významně stoupala (157...318 $\mu\text{mol/l}$).

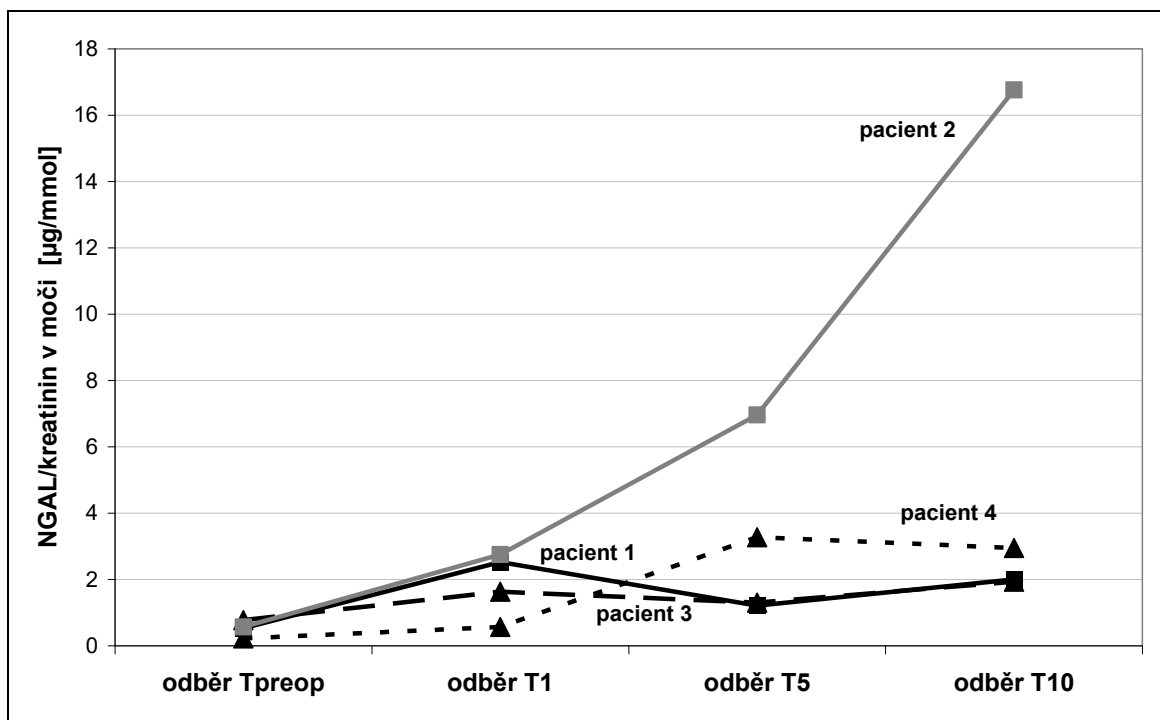
Cut-off hodnota poměru NGAL/kreatinin v moči pro AKI 15 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ (definována např. ve studiích Tuladhar S. M. et al., 2009; Nickolas T. L et al., 2008) byla překročena u jednoho pacienta bez renálních, avšak s oběhovými komplikacemi v odběru T10 (16,8 $\mu\text{g}/\text{mmol}$). Jinými autory byla hodnota cut-off definována jako 6,7 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ (Ramirez-Sandoval J. C. et al., 2014). Poté by nad hodnotou cut-off byl výsledek poměru NGAL/kreatinin v moči ještě v odběru T5 u stejného pacienta, kdy byla zjištěna hodnota 7,0 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ (pacient 2 na obrázku 31). Hodnoty poměrů u všech dalších pacientů ve všech odběrech dosahovaly maxima 3,7 $\mu\text{g}/\text{mmol}$.

Obrázky 30 až 32 pro ilustraci znázorňují průběhy hodnot koncentrací močového NGAL, poměru NGAL/kreatinin v moči a sérového kreatininu u 4 pacientů (pacient 1 se zcela nekomplikovaným průběhem, pacient 2 s oběhovými a nikoliv renálními komplikacemi, pacienti 3 a 4 s renálními a současně s oběhovými komplikacemi).

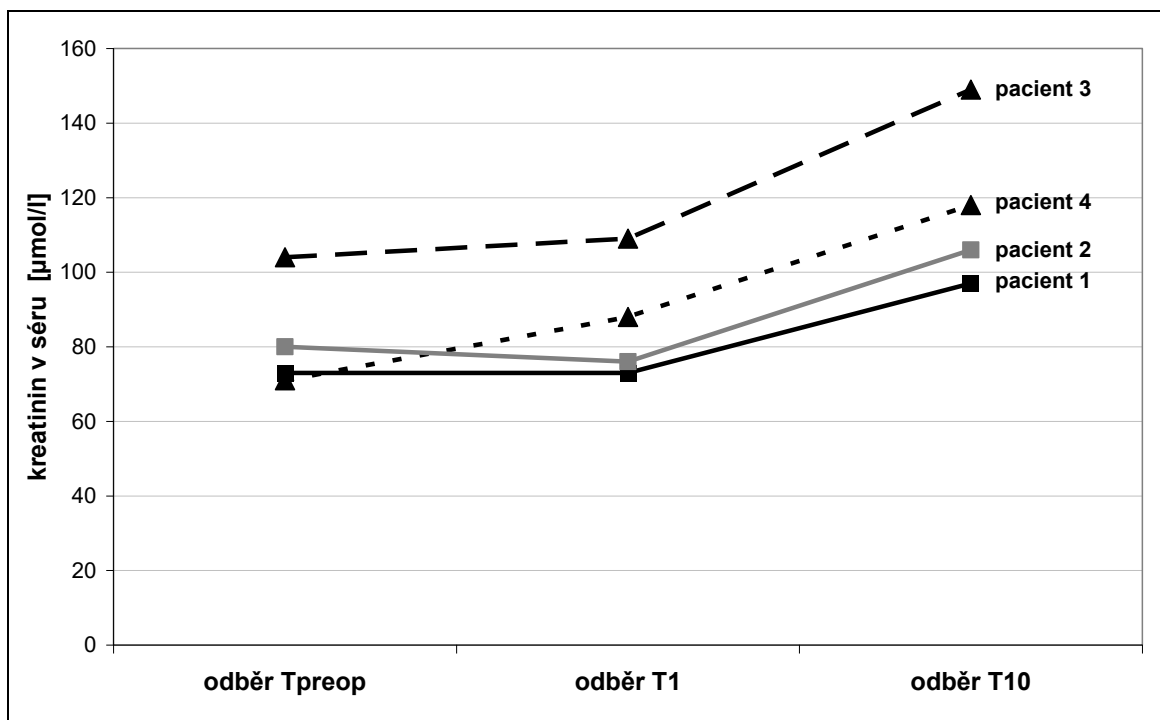


Obr. 30. Průběh koncentrací NGAL v moči u čtyř pacientů podstupujících kardiochirurgický výkon

Pacient 1: nekomplikovaný pooperační průběh, jednotlivé hodnoty znázorněny jako černé čtverce a propojeny černými plnými čarami; pacient 2: oběhové komplikace, jednotlivé hodnoty jako šedé čtverce propojené šedými plnými čarami; pacienti 3 a 4: renální a současně oběhové komplikace, jednotlivé hodnoty jako černé trojúhelníky propojené černými přerušovanými čarami, odběr T_{preop}: preoperačně, T1, T5, T10: 1, 5, 10 hodin po operaci.

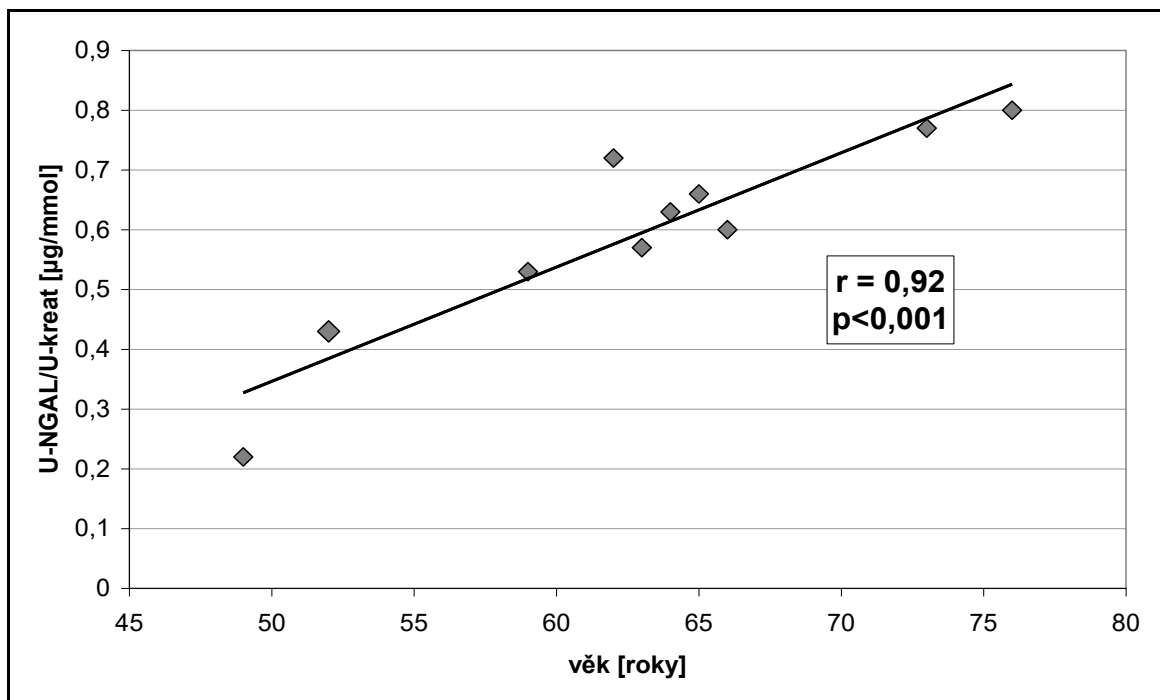


Obr. 31. Průběh poměru koncentrací NGAL/kreatinin v moči u čtyř pacientů podstupujících kardiochirurgický výkon, symbolika shodná s obr. 30



Obr. 32. Průběh koncentrací sérového kreatininu u čtyř pacientů podstupujících kardiochirurgický výkon, symbolika shodná s obr. 30

Poměr NGAL/kreatinin v moči u vzorků odebraných preoperačně významně koreloval s věkem pacienta ($r = 0,92$, $p < 0,001$, obr. 33), korelace věk vs. U-NGAL byla méně významná ($r = 0,80$, $p < 0,05$), korelace věk vs. sérový kreatinin nevýznamná ($r = 0,27$).



Obr. 33. Korelace U-NGAL/U-kreatinin s věkem pacientů (N=10) u vzorků moči odebraných preoperačně, pro věkové rozpětí pacientů studie

4.5. Stanovení markerů poškození ledvin u dospělých pacientů po angiografii

4.5.1. Rozdělení souboru pacientů

Podle vstupní hodnoty odhadnuté glomerulární filtrace (MDRD) jsme soubor všech pacientů (N = 41) rozdělili na dva podsoubory: Soubor s $eGF \geq 1,2 \text{ ml/s/1,73 m}^2$ („soubor s $eGF \geq 1,2$ “) tvořilo 28 pacientů, 19 mužů a 9 žen, průměrného věku $61,5 \pm 10,7$ let a soubor s $eGF < 1,2 \text{ ml/s/1,73 m}^2$ („soubor s $eGF < 1,2$ “, nejnižší vstupní eGF podle MDRD: $0,67 \text{ ml/s/1,73 m}^2$) 13 pacientů, 5 mužů a 8 žen, průměrného věku $74,2 \pm 6,0$ let. Výsledky vyšetření jsme hodnotili jednak v souboru všech pacientů a jednak v těchto podsouborech podle eGF_{MDRD} . V dalším kroku jsme provedli binární porovnání odhadů glomerulárních filtrací z MDRD rovnice a z hodnot cystatinu C. Tuto metodu jsme použili vzhledem k tomu, že rovnice MDRD je v oblasti hodnot $eGF \geq 1,2 \text{ ml/s/1,73 m}^2$ nepřesná a není zde doporučováno uvádět konkrétní číslo (hodnotám $eGF < 1,2 \text{ ml/s/1,73 m}^2$ jsme při tomto statistickém testu přiřadili číslo „0“ a hodnotám $eGF \geq 1,2 \text{ ml/s/1,73 m}^2$ číslo „1“ v obou případech odhadů GF). Zjistili jsme, že odhadnuté GF (z rovnice MDRD a z cystatinu C) spolu významně korelují ($p < 0,001$), metody odhadu GF jsou tedy v našich souborech srovnatelné. Rozdělení podle výsledků z MDRD rovnice (ve které figuruje z biochemických markerů pouze sérový kreatinin) jsme zvolili proto, že se jedná o odhad GF v běžné klinické praxi dostupnější než odhad z cystatinu C.

4.5.2. Biochemické nálezy

Výsledky vyšetření jednotlivých sérových a močových markerů v souboru všech pacientů a po jeho rozdělení v souborech pacientů s $eGF < a \geq 1,2$ jsou uvedeny v tabulce 18 až 23. Výsledky bootstrapované ANOVA analýzy jsou uvedeny v tabulce 24 a korelační matice mezi jednotlivými markery na obrázku 34.

V průběhu našeho sledování nedošlo k významným změnám koncentrací sérového kreatininu a cystatinu C, ani glomerulárních filtrací z těchto markerů odvozených.

Došlo však ke změnám některých močových markerů. Statisticky významný vzestup NGAL ve srovnání s výchozími hodnotami byl zjištěn v čase 12 hodin po podání kontrastní látky (T12, $p < 0,05$), v čase 24 hodin po podání kontrastu (T24) bylo zvýšení ještě významnější ($p < 0,01$). Mezi korigovanými močovými koncentracemi NGAL (na močový kreatinin) v čase nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl. Cut-off hodnota pro AKI 131,7 $\mu\text{g/l}$ byla překročena již ve vstupním vyšetření u jednoho pacienta ze souboru s $eGF < 1,2$; v odběru T4 hladina u tohoto pacienta sice klesla, avšak v dalších odběrech opět

významně stoupala (v odběru T24 hodnota $>1500 \mu\text{g/l}$). Korigovaný NGAL na močový kreatinin (cut-off pro AKI $15 \mu\text{g}/\text{mmol}$ dle Nickolase T. L. et al., 2008) byl u tohoto pacienta v odběrech T0 až T12 prakticky shodně zvýšený (cca $75 \mu\text{g}/\text{mmol}$), významný vzestup nastal v odběru T24 ($>125 \mu\text{g}/\text{mmol}$). V tomto souboru byla cut-off hodnota NGAL překročena ještě u jednoho pacienta v čase T4 (poměr NGAL/kreatinin byl u něho nad hodnotou cut-off ve všech odběrech, v čase T4 však nejvyšší); cut-off hodnota pouze korigovaného NGAL také u jednoho pacienta, a to v čase T4 (v tomto odběru měl i nejvyšší hodnotu NGAL: $87 \mu\text{g/l}$). V souboru s $\text{eGF} \geq 1,2$ byla cut-off hodnota NGAL překročena u jednoho pacienta v odběrech T12 a T24 (korigovaný NGAL u něj byl zvýšený pouze v odběru T12), u dalších dvou pacientů pouze v odběru T24 (avšak korigovaný NGAL byl normální), u jednoho pacienta jsme zjistili zvýšený pouze korigovaný NGAL, a to v čase T24.

Obdobné změny v čase byly zaznamenány v případě močového α -1-mikroglobulinu (T0 vs. T12: $p < 0,05$; T0 vs. T24: $p < 0,01$). Tento marker se významně lišil i mezi podsoubory podle eGF, $p < 0,05$. Jeho hodnoty (jak vstupní, tak všechny další po podání kontrastní látky) byly s podivem vyšší v podsouboru s $\text{eGF} \geq 1,2$. Překvapující pro nás bylo také zjištění, že většina močových koncentrací α -1-mikroglobulinu byla nad referenčním rozmezím: v případě pacientů s $\text{eGF} \geq 1,2$ to bylo 82 % vstupních hodnot a dokonce 99 % hodnot po podání kontrastní látky a v případě pacientů s $\text{eGF} < 1,2$ 85 % vstupních hodnot a 95 % hodnot po podání kontrastní látky. Referenční meze pro poměr močový α -1-mikroglobulin/močový kreatinin nebývají běžně definovány, v článku z roku 1996 (Tencer J. et al., 1996) jsme našli horní mez pro tento poměr $0,7 \text{ mg}/\text{mmol}$; další literatura uvádí horní mez o něco vyšší: např. $0,83 \text{ mg}/\text{mmol}$ (Gan S. L. et al., 1994) nebo $1,7 \text{ mg}/\text{mmol}$ (Yu H. et al., 1983). Všechny zmíněné mezní hodnoty by v naší studii překročili hodnoty tohoto poměru všech pacientů ve všech odběrech. Také v případě korigovaného močového α -1-mikroglobulinu byly zjištěny statisticky významné změny v čase (T0 vs. T4; $p < 0,05$).

V případě močového NAG byl zjištěn statisticky hraniční vzestup jeho koncentrace v čase mezi odběry T0 a T24 ($p = 0,05$). Poměr močový NAG/močový kreatinin statisticky významné souvislosti nevykazoval. Referenční meze tohoto markeru bývá zvykem uvádět pouze korigované na močový kreatinin a byly překročeny ve všech čtyřech odběrech u jednoho pacienta ze souboru s $\text{eGF} \geq 1,2$ (s klesajícím trendem $49 \dots 29 \text{ nkat}/\text{mmol}$, avšak nekorigované hodnoty NAG u stejného pacienta vykazovaly naopak stoupající trend $178 \dots 526 \text{ nkat/l}$) a u jednoho pacienta ze souboru s $\text{eGF} < 1,2$ (opět s klesajícím trendem $34 \dots 23 \text{ nkat}/\text{mmol}$ a stoupajícím trendem nekorigovaného NAG $75 \dots 200 \text{ nkat/l}$), u jednoho pacienta pouze v odběru T0 (ze souboru s $\text{eGF} < 1,2$), u čtyř pacientů pouze v odběru T4

(1 pacient ze souboru s $eGF < 1,2$; 3 pacienti ze souboru s $eGF \geq 1,2$) a u pěti pacientů pouze v odběru T24 (3 pacienti ze souboru s $eGF < 1,2$; 2 pacienti ze souboru s $eGF \geq 1,2$). Mezi močovými koncentracemi α -1-mikroglobulinu a NAG byl zjištěn významný korelační vztah ($r = 0,80$; $p < 0,05$).

Albuminurie stanovená imunoturbidimetrickou i HPLC metodou, stejně tak jako jejich poměry na kreatinin, se v závislosti na podání kontrastní látky s časem statisticky významně neměnily. Mezi těmito markery albuminurie IT vs. albuminurie HPLC a albuminurie IT/močový kreatinin vs. albuminurie HPLC/močový kreatinin byly zjištěny významné korelační vztahy ($r=0,999$; $p < 0,001$). V souboru pacientů s $eGF < 1,2$ vykazovali 4 pacienti vstupní hodnoty albuminurie oblasti A2 v případě imunoturbidimetrické metody a 6 pacientů v případě metody HPLC, u 1 pacienta byla zjištěna oběma metodami albuminurie oblasti A3. K více než dvojnásobnému zvýšení albuminurie (oběma metodami) došlo pouze u dvou pacientů (se vstupní albuminurií z oblasti A2), a to již mezi odběrem T0 a T4. V případě souboru s $eGF \geq 1,2$ byly nalezeny vstupní hodnoty albuminurie v oblasti A2 imunoturbidimetricky u 4 pacientů a HPLC u 10 pacientů. K více než dvojnásobnému vzestupu albuminurie (oběma metodami) došlo u 6 pacientů mezi odběry T0 a T24 (z nichž 5 z nich mělo vstupní albuminurii fyziologickou a v odběru T24 v oblasti A2, 6. pacient vykazoval vzestupy albuminurie v rámci oblasti A2).

Močový kreatinin se významně měnil v čase, k významnému vzestupu oproti vstupní hodnotě T0 a hodnotě v čase T4 došlo v časech T12 a T24 ($p < 0,01$). Byl zjištěn též významný rozdíl ($p=0,008$) mezi MDRD podsoubory: pacienti s $eGF \geq 1,2$ vykazovali vyšší hodnoty močového kreatininu ve všech odběrech. V časech T0 a T4 jsme našli vysoké procento zastoupení koncentrací kreatininu pod dolní hranicí referenčního rozmezí (v souboru s $eGF \geq 1,2$ to bylo 48 % případů a v souboru s $eGF < 1,2$ dokonce 58 % případů), nad horní hranicí referenčního rozmezí jsme ve stejných odběrech našli pouze 5 % výsledků ze souboru s $eGF \geq 1,2$. V časech T12 a T24 jsme našli naopak značné zastoupení močového kreatininu nad referenční rozmezí (15 % případů v souboru s $eGF < 1,2$ a 45 % případů v souboru s $eGF \geq 1,2$), nízký kreatinin byl v těchto odběrech u 15 % pacientů ze souboru s $eGF < 1,2$ a pouze 4 % pacientů ze souboru s $eGF \geq 1,2$.

Všechny sledované markery se chovaly v obou podsouborech (podle eGF_{MDRD}) obdobně mezi jednotlivými odběry (nebyly zjištěny statisticky významné difference v čase mezi podsoubory, viz poslední sloupec v tabulce 24).

Odběr	T0	T4	T24
S-kreat [μmol/l]	77,5 ± 24,5 (41,0; 73,0 ; 148,0)	80,1 ± 19,8 (43,0; 77,5 ; 142,0)	83,2 ± 27,4 (44,0; 75,3 ; 146,0)
eGF_{MDRD} [ml/s/1,73 m ²]	nelze spočítat* (0,67; ≥ 1,2 ; ≥1,2)	nelze spočítat* (0,69; ≥ 1,2 ; ≥1,2)	nelze spočítat* (0,55; ≥ 1,2 ; ≥1,2)
S-Cystatin C [mg/l]	1,16 ± 0,27 (0,65; 1,15 ; 2,04)	1,15 ± 0,30 (0,70; 1,09 ; 2,17)	1,16 ± 0,33 (0,67; 1,04 ; 2,12)
eGF_{Cyst} [ml/s/1,73 m ²]	1,24 ± 0,53 (0,43; 1,13 ; 2,91)	1,27 ± 0,54 (0,38; 1,23 ; 2,57)	1,29 ± 0,54 (0,40; 1,32 ; 2,77)

Tab. 18. Výsledky vyšetření sérových parametrů a eGF v souboru všech pacientů (N=41)
 Výsledky vyjádřeny jako průměry ± výběrové směrodatné odchylky, v závorkách minima, tučně mediány a maxima, odběry T0, T4, T24: 0, 4, 24 hodin po podání kontrastní látky,
 * vzhledem k nepřesnosti MDRD rovnice v oblasti $\geq 1,2$ ml/s/1,73 m² nad touto hodnotou neuváděno konkrétní číslo, ale $\geq 1,2$ ml/s/1,73 m², proto průměr ± SD nelze spočítat.

Odběr	T0	T4	T12	T24
U-kreat [mmol/l]	7,5 ± 5,3 (0,8; 6,4 ; 27,1)	6,2 ± 4,7 (0,9; 5,0 ; 29,2)	12,4 ± 6,4 (2,8; 10,2 ; 35,3)	15,3 ± 12,2 (0,9; 12,0 ; 54,6)
U-NGAL [μg/l]	36,5 ± 99,2 (2,1; 11,8 ; 635,9)	31,2 ± 47,5 (1,0; 8,1 ; 220,9)	54,6 ± 131,4 (1,6; 20,5 ; 811,4)	81,7 ± 234,6 (1,3; 27,7 ; 1500,0)
U-NGAL/U-kreat [μg/mmol]	5,08 ± 11,97 (0,42; 1,88 ; 76,6)	6,08 ± 12,68 (0,19; 1,72 ; 73,4)	5,75 ± 13,91 (0,34; 1,51 ; 76,5)	6,91 ± 19,51 (0,35; 2,19 ; 125,0)
U-NAG [nkat/l]	59,9 ± 48,5 (5,0; 42,2 ; 180,2)	50,5 ± 55,7 (5,0; 36,1 ; 268,5)	66,8 ± 64,3 (5,0; 50,9 ; 346,1)	118,1 ± 111,2 (5,0; 73,6 ; 525,9)
U-NAG/U-kreat [nkat/mmol]	9,34 ± 8,71 (2,04; 7,22 ; 49,4)	9,36 ± 8,67 (0,93; 7,78 ; 42,3)	6,66 ± 8,31 (0,61; 4,74 ; 44,4)	9,28 ± 7,67 (0,36; 7,20 ; 29,4)
U-α-1-m [mg/l]	37,9 ± 37,0 (5,4; 27,6 ; 215,1)	47,4 ± 43,8 (7,2; 37,9 ; 212,9)	67,4 ± 50,1 (11,2; 52,0 ; 253,8)	102,0 ± 150,9 (10,9; 64,9 ; 943,3)
U-α-1-m/U-kreat [mg/mmol]	6,07 ± 8,84 (2,04; 4,49 ; 59,7)	8,11 ± 5,45 (3,05; 7,12 ; 35,2)	5,98 ± 5,12 (1,93; 4,89 ; 32,5)	7,04 ± 7,71 (2,65; 5,34 ; 52,7)
AU_{IT} [mg/l]	54,0 ± 273,8 (3,0; 4,4 ; 1761,1)	40,9 ± 187,2 (3,0; 3,7 ; 1189,1)	48,0 ± 223,3 (3,0; 4,7 ; 1434,1)	132,7 ± 592,2 (3,0; 10,2 ; 3807,0)
AU_{IT}/U-kreat [mg/mmol]	14,0 ± 78,3 (0,24; 0,92 ; 503,2)	16,3 ± 89,2 (0,27; 0,90 ; 566,2)	10,5 ± 58,8 (0,10; 0,45 ; 377,4)	13,2 ± 68,0 (0,17; 1,25 ; 437,6)
AU_{HPLC} [mg/l]	66,7 ± 296,3 (7,8; 13,0 ; 1913,7)	50,6 ± 207,5 (7,8; 12,3 ; 1340,0)	82,3 ± 382,5 (7,8; 14,5 ; 2465,3)	145,3 ± 601,2 (7,8; 19,0 ; 3869,6)
AU_{HPLC}/U-kreat [mg/mmol]	16,9 ± 84,9 (0,66; 2,66 ; 546,8)	19,0 ± 99,2 (0,56; 2,46 ; 638,1)	18,0 ± 101,0 (0,26; 1,36 ; 648,8)	14,6 ± 69,0 (0,42; 2,40 ; 444,8)

Tab. 19. Výsledky vyšetření močových parametrů v souboru všech pacientů (N=41)
 Symbolika shodná s tab. 18.

Odběr	T0	T4	T24
S-kreat [μmol/l]	103,2 ± 22,0 (70,0; 100,0 ; 148,0)	100,9 ± 18,2 (77,0; 101,5 ; 142,0)	114,1 ± 21,8 (79,0; 113,0 ; 146,0)
eGF_{MDRD} [ml/s/1,73 m ²]	0,88 ± 0,13 (0,67; 0,88 ; 1,19)	0,88 ± 0,13 (0,69; 0,91 ; 1,07)	0,78 ± 0,13 (0,55; 0,77 ; 1,03)
S-Cystatin C [mg/l]	1,37 ± 0,27 (0,94; 1,40 ; 2,04)	1,40 ± 0,31 (0,97; 1,40 ; 2,17)	1,46 ± 0,37 (0,97; 1,41 ; 2,12)
eGF_{Cyst} [ml/s/1,73 m ²]	0,89 ± 0,28 (0,43; 0,80 ; 1,57)	0,87 ± 0,30 (0,38; 0,80 ; 1,49)	0,86 ± 0,38 (0,40; 0,79 ; 1,49)

Tab. 20. Výsledky vyšetření sérových parametrů a eGF v souboru pacientů s eGF_{MDRD} < 1,2 ml/s/1,73 m² (N=13)

Symbolika shodná s tab. 18.

Odběr	T0	T4	T12	T24
U-kreat [mmol/l]	5,5 ± 3,1 (0,8; 4,9 ; 12,5)	4,3 ± 2,0 (0,9; 4,8 ; 7,1)	10,2 ± 3,8 (3,8; 10,2 ; 17,1)	11,1 ± 12,1 (0,9; 8,0 ; 40,5)
U-NGAL [μg/l]	66,3 ± 172,4 (2,7; 11,6 ; 635,9)	44,4 ± 71,1 (1,1; 11,3 ; 220,9)	95,4 ± 217,2 (7,8; 26,7 ; 811,4)	149,9 ± 406,7 (1,3; 38,4 ; 1500,0)
U-NGAL/U-kreat [μg/mmol]	9,97 ± 20,62 (0,55; 2,56 ; 76,6)	12,30 ± 21,38 (1,18; 2,38 ; 73,4)	10,32 ± 20,56 (0,50; 2,81 ; 76,5)	14,68 ± 33,63 (0,85; 4,09 ; 125,0)
U-NAG [nkat/l]	56,9 ± 47,2 (11,1; 38,2 ; 180,2)	35,5 ± 23,6 (5,0; 33,9 ; 75,2)	58,0 ± 34,2 (11,1; 52,1 ; 131,7)	112,0 ± 94,3 (5,0; 67,5 ; 303,0)
U-NAG/U-kreat [nkat/mmol]	11,63 ± 8,12 (3,45; 10,6 ; 33,8)	10,31 ± 9,00 (1,00; 8,75 ; 35,8)	7,53 ± 8,79 (1,35; 4,91 ; 34,7)	12,76 ± 9,47 (2,08; 8,15 ; 28,8)
U-α-1-m [mg/l]	31,6 ± 31,7 (5,4; 21,3 ; 113,2)	31,8 ± 24,1 (7,2; 23,3 ; 93,9)	60,6 ± 37,3 (24,7; 45,4 ; 135,6)	57,6 ± 53,8 (10,9; 50,3 ; 178,5)
U-α-1-m/U-kreat [mg/mmol]	5,60 ± 3,04 (2,56; 4,84 ; 13,2)	7,76 ± 4,14 (3,05; 7,13 ; 19,6)	6,43 ± 4,19 (2,42; 5,13 ; 16,4)	6,59 ± 3,12 (3,08; 6,39 ; 14,4)
AU_{IT} [mg/l]	145,2 ± 485,8 (3,0; 5,4 ; 1761,1)	113,3 ± 339,7 (3,0; 4,3 ; 1189,1)	135,0 ± 392,5 (3,0; 7,6 ; 1434,1)	339,4 ± 1043,7 (3,0; 17,6 ; 3807,0)
AU_{IT}/U-kreat [mg/mmol]	40,7 ± 139,0 (0,63; 0,92 ; 503,2)	50,4 ± 162,5 (0,57; 1,95 ; 566,2)	31,4 ± 104,0 (0,27; 1,25 ; 377,4)	38,2 ± 120,1 (0,42; 3,33 ; 437,6)
AU_{HPLC} [mg/l]	165,5 ± 525,5 (11,0; 15,3 ; 1913,7)	122,4 ± 366,5 (7,8; 13,3 ; 1340,0)	224,2 ± 674,9 (9,2; 15,9 ; 2465,3)	357,4 ± 1057,7 (8,6; 27,3 ; 3869,6)
AU_{HPLC}/U-kreat [mg/mmol]	46,4 ± 150,4 (1,52; 3,07 ; 546,8)	53,7 ± 175,6 (1,88; 4,53 ; 638,1)	53,3 ± 179,0 (0,54; 2,61 ; 648,8)	40,9 ± 121,5 (0,71; 4,95 ; 444,8)

Tab. 21. Výsledky vyšetření močových parametrů v souboru pacientů s eGF_{MDRD} < 1,2 ml/s/1,73 m² (N=13)

Symbolika shodná s tab. 18.

Odběr	T0	T4	T24
S-kreat [μmol/l]	65,6 ± 14,6 (41,0; 65,0 ; 92,0)	71,1 ± 12,5 (43,0; 74,5 ; 92,0)	68,8 ± 14,9 (44,0; 69,0 ; 113,0)
eGF_{MDRD} [ml/s/1,73 m ²]	≥1,2 (≥1,2; ≥1,2 ; ≥1,2)	nelze spočítat* (1,04; ≥1,2 ; ≥1,2)	nelze spočítat* (0,94; ≥1,2 ; ≥1,2)
S-Cystatin C [mg/l]	1,06 ± 0,20 (0,65; 1,08 ; 1,46)	1,03 ± 0,21 (0,70; 1,03 ; 1,48)	1,02 ± 0,20 (0,67; 1,00 ; 1,51)
eGF_{Cyst} [ml/s/1,73 m ²]	1,41 ± 0,55 (0,75; 1,24 ; 2,91)	1,46 ± 0,53 (0,73; 1,34 ; 2,57)	1,47 ± 0,50 (0,71; 1,41 ; 2,77)

Tab. 22. Výsledky vyšetření sérových parametrů a eGF v souboru pacientů s eGF_{MDRD} ≥ 1,2 ml/s/1,73 m² (N=28)

Symbolika shodná s tab. 18.

Odběr	T0	T4	T12	T24
U-kreat [mmol/l]	8,5 ± 5,9 (1,0; 7,4 ; 27,1)	7,1 ± 5,4 (2,8; 5,4 ; 29,2)	13,4 ± 7,2 (2,8; 11,3 ; 35,3)	17,3 ± 11,9 (2,2; 17,6 ; 54,6)
U-NGAL [μg/l]	22,7 ± 27,1 (2,1; 12,0 ; 112,7)	25,0 ± 31,2 (1,0; 7,3 ; 104,9)	35,6 ± 58,5 (1,6; 18,6 ; 311,6)	50,0 ± 68,5 (2,5; 22,3 ; 309,6)
U-NGAL/U-kreat [μg/mmol]	2,82 ± 2,56 (0,42; 1,87 ; 10,4)	3,19 ± 2,82 (0,19; 1,55 ; 9,14)	3,64 ± 9,17 (0,34; 1,33 ; 49,5)	3,31 ± 4,31 (0,35; 1,72 ; 20,9)
U-NAG [nkat/l]	61,2 ± 49,9 (5,0; 44,9 ; 177,7)	57,5 ± 64,8 (5,0; 36,2 ; 268,5)	70,9 ± 74,6 (5,0; 49,4 ; 346,1)	121,0 ± 119,8 (5,0; 76,4 ; 525,9)
U-NAG/U-kreat [nkat/mmol]	8,27 ± 8,91 (2,04; 5,87 ; 49,4)	8,92 ± 8,65 (0,93; 5,94 ; 42,3)	6,27 ± 8,22 (0,61; 4,05 ; 44,4)	7,67 ± 6,22 (0,36; 6,39 ; 29,4)
U-α-1-m [mg/l]	40,8 ± 39,5 (6,5; 37,8 ; 215,1)	54,1 ± 48,7 (15,6; 39,4 ; 212,9)	70,5 ± 55,4 (11,2; 52,3 ; 253,8)	122,6 ± 176,2 (14,6; 85,9 ; 943,3)
U-α-1-m/U-kreat [mg/mmol]	6,30 ± 10,56 (2,04; 4,19 ; 59,7)	8,26 ± 5,99 (3,45; 6,78 ; 35,2)	5,77 ± 5,56 (1,93; 4,88 ; 32,5)	7,25 ± 9,15 (2,65; 5,06 ; 52,7)
AU_{IT} [mg/l]	11,7 ± 17,8 (3,0; 3,8 ; 83,0)	9,9 ± 17,0 (3,0; 3,5 ; 77,7)	7,6 ± 8,7 (3,0; 4,6 ; 46,3)	36,8 ± 73,7 (3,0; 9,0 ; 308,9)
AU_{IT}/U-kreat [mg/mmol]	1,62 ± 1,81 (0,24; 0,89 ; 7,90)	1,66 ± 2,43 (0,27; 0,69 ; 10,1)	0,75 ± 1,10 (0,10; 0,41 ; 6,01)	1,59 ± 2,21 (0,17; 0,85 ; 10,7)
AU_{HPLC} [mg/l]	20,8 ± 20,7 (7,8; 12,9 ; 100,8)	17,3 ± 20,9 (7,8; 10,8 ; 101,0)	16,4 ± 11,7 (7,8; 13,2 ; 66,6)	46,8 ± 80,8 (7,8; 17,6 ; 325,6)
AU_{HPLC}/U-kreat [mg/mmol]	3,24 ± 2,80 (0,66; 2,36 ; 11,5)	2,91 ± 3,02 (0,56; 1,89 ; 13,5)	1,56 ± 1,56 (0,26; 1,28 ; 8,64)	2,40 ± 2,56 (0,42; 1,52 ; 13,3)

Tab. 23. Výsledky vyšetření močových parametrů v souboru pacientů s eGF_{MDRD} ≥ 1,2 ml/s/1,73 m² (N=28)

Symbolika shodná s tab. 18.

Hodnoty p	Faktory porovnávání		
	Časy odběrů	MDRD podsoubory	Časy odběrů a MDRD podsoubory
S-kreat [μmol/l]	<i>0,261</i>	<0,001	<i>0,166</i>
eGF_{MDRD} [ml/s/1,73 m ²]	<i>0,402</i>	<0,001	<i>0,402</i>
S-Cystatin C [mg/l]	<i>0,890</i>	<0,001	<i>0,425</i>
eGF_{Cyst} [ml/s/1,73 m ²]	<i>0,779</i>	<0,001	<i>0,337</i>
U-kreat [mmol/l]	0,001	0,008	<i>0,274</i>
U-NGAL [μg/l]	0,033	<i>0,295</i>	<i>0,951</i>
U-NGAL/U-kreat [μg/mmol]	<i>0,825</i>	<i>0,249</i>	<i>0,802</i>
U-NAG [nkat/l]	<i>0,052</i>	<i>0,731</i>	<i>0,922</i>
U-NAG/U-kreat [nkat/mmol]	<i>0,064</i>	<i>0,237</i>	<i>0,573</i>
U-α-1-m [mg/l]	0,025	0,027	<i>0,555</i>
U-α-1-m/U-kreat [mg/mmol]	0,027	<i>0,705</i>	<i>0,896</i>
AU_{IT} [mg/l]	<i>0,640</i>	<i>0,704</i>	<i>0,853</i>
AU_{IT}/U-kreat [mg/mmol]	<i>0,781</i>	<i>0,295</i>	<i>0,710</i>
AU_{HPLC} [mg/l]	<i>0,626</i>	<i>0,614</i>	<i>0,991</i>
AU_{HPLC}/U-kreat [mg/mmol]	<i>0,243</i>	0,010	<i>0,371</i>

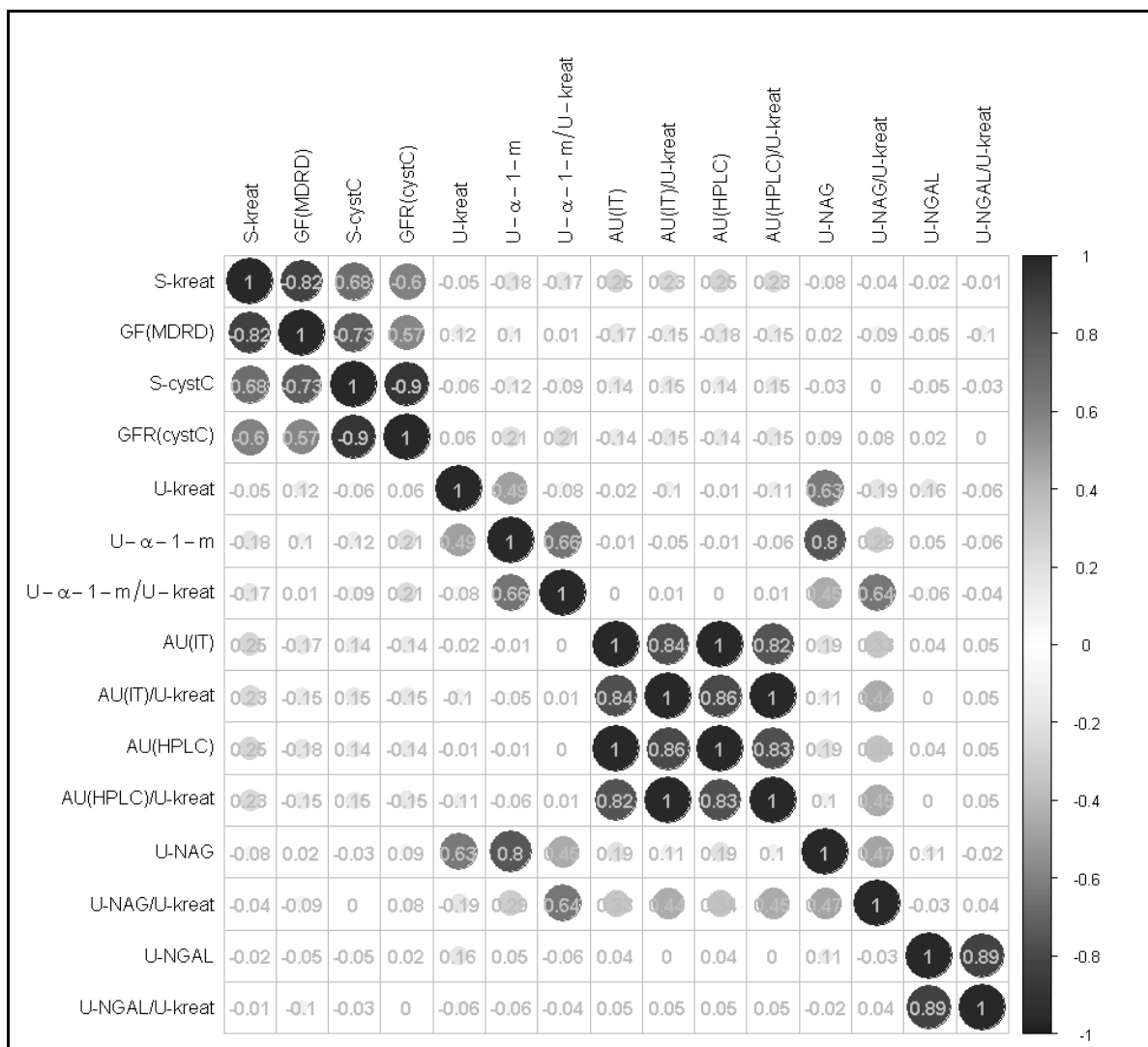
Tab. 24. Bootstrapovaná dvoucestná ANOVA

Faktor porovnávání „časy odběrů“: významnost změny jednotlivých markerů v čase v souboru všech pacientů (N=41)

Faktor porovnávání „MDRD podsoubory“: významnost rozdílů jednotlivých markerů (bez ohledu na faktor času) mezi podsoubory podle eGF_{MDRD}, tzn. s eGF ≥ 1,2 ml/s/1,73 m² (N=28) a s eGF < 1,2 ml/s/1,73 m² (N=13)

Faktor porovnávání „časy odběrů a MDRD podsoubory“: významnost rozdílnosti chování jednotlivých markerů v čase mezi MDRD podsoubory

Statisticky významné hodnoty „p“ jsou znázorněny tučně.



Obr. 34. Korelační matice stanovených markerů (ve všech odběrech) v souboru všech pacientů (N=41)

S-kreat: sérový kreatinin, GF(MDRD): glomerulární filtrace odhadnutá z MDRD rovnice, S-cystC: sérový cystatin, GFR(cystC) glomerulární filtrace odhadnutá z cystatinu C, U-kreat: močový kreatinin, U- α -1-m: močová koncentrace α -1-mikroglobulinu, U- α -1-m/U-kreat: poměr koncentrací močový α -1-mikroglobulin/močový kreatinin, AU(IT): albuminurie stanovená imunoturbidimetricky (IT), AU(IT)/U-kreat: poměr koncentrací močový albumin (IT)/močový kreatinin, AU(HPLC): albuminurie HPLC, AU(HPLC)/U-kreat poměr koncentrací močový albumin (HPLC)/močový kreatinin, U-NAG: močová N-acetyl- β -D-glukózáminidáza, U-NAG/U-kreat: poměr koncentrací močový NAG/močový kreatinin, U-NGAL: močový neutrofilní s gelatinázou asociovaný lipokalin, U-NGAL/U-kreat: poměr koncentrací močový NGAL /močový kreatinin

Stupně šedi korespondují s významností korelačních závislostí (viz též stupnice vedle korelační matice), v jednotlivých políčkách (resp. v krouzcích) jsou uvedeny hodnoty korelačních koeficientů

Z korelační matice je patrná významnost korelací mezi albuminurií stanovenou HPLC a IT (v korelační matici koeficient 1; bez zaokrouhlení 0,999), mezi poměry albumin/kreatinin v moči s HPLC vs. IT stanovenou albuminurií (v korelační matici koeficient 1; bez zaokrouhlení 0,999) a mezi močovými koncentracemi NAG a α -1-mikroglobulinu (koeficient 0,80).

5. DISKUZE

5.1. Stanovení albuminurie HPLC a sledování vztahu k diagnóze diabetes mellitus

Některé studie popisují, že HPLC metoda (a časnější detekce zvýšených koncentrací albuminu v moči ve srovnání s imunochemickými metodami) umožní diagnostikovat diabetickou nefropatii v průměru o 4 roky dříve u diabetiků 1. typu a o 2,5 roku u diabetiků 2. typu. Je schopna identifikovat jedince ve zvýšeném riziku morbidit a mortality (Comper W. D. et al., 2004; Clavant S. P. et al., 2006).

Sviridov, Shaik a další autoři diferenci mezi metodami vysvětlují interferencí některých bílkovin s albuminem při HPLC metodě (Sviridov D. et al., 2006; Shaikh A. et al., 2008). Námí vyvinutá HPLC metoda tuto teorii nepotvrdila, nenašli jsme analyticky ani klinicky významné interference. Hypotézu, že difference mezi metodami je zapříčiněna existencí imunonereaktivního albuminu, podporují i naše výsledky analýz experimentálních směsných močí. Ve směsné moči reálných vzorků se středně zvýšenou albuminurií jsme zjistili o 26 % vyšší albuminurii HPLC metodou ve srovnání s imunoturbidimetrickou metodou, zatímco ve směsné moči s arteficiálně přidaným standardem albuminu jsme změřili oběma metodami prakticky stejné koncentrace albuminurie.

V roce 2015 byly publikovány výsledky podobného experimentu (Jacobson B. E. et al., 2015). Autoři stanovovali albuminurii ve vzorcích nativních močí a ve vzorcích močí s arteficiálně přidaným standardem albuminu rutinními imunochemickými metodami a metodou LC-MS/MS. Zjistili významné hodnoty bias mezi metodami jak ve vzorcích močí se skutečnou albuminurií, tak ve vzorcích močí s přidaným albuminovým standardem (což je rozdílné zjištění ve srovnání s našimi výsledky). Společně s autory dalších studií (Graziani M. S. a Plebani M., 2015; Lieske J. C. et al., 2013) uzavírají, že původ diferencí mezi metodami by mohl souviset spíše s kalibračním procesem a zvolenými referenčními materiály (Jacobson B. E. et al., 2015). Oproti tomu, naše výsledky (kdy jsme zjistili stejné koncentrace standardu albuminu rozpuštěného v destilované vodě a albuminu v močích s arteficiálně přidaným albuminem při měření oběma metodami) potvrdily dostatečnou kvalitu námí použitého standardu a nasvědčují na přítomnost imunonereaktivního albuminu.

Důležitost aplikace návaznosti imunochemických metod na referenční systém vyplývá i ze studie Bachmanna z roku 2014, která popisuje významné difference mezi rutinními imunochemickými metodami 17 hlavních výrobců a metodou LC-MS/MS (-35 až +34 % u vzorků s albuminurií kolem 15 mg/l), nicméně tato studie nevyvrací existenci imunonereaktivního albuminu (Bachmann L. M. et al., 2014).

Studie Clavanta (obdobně jako naše studie) zpochybňuje, že by HPLC metodou zjištěný imunoreaktivní albumin byl pouze artefaktem vzniklým náhodnou koelucí některých bílkovin při chromatografické analýze společně s albuminem a rozdíl mezi HPLC a imunochemickými metodami vysvětluje přítomností imunoreaktivního albuminu (Clavant S. P. et al., 2006). Existence imunoreaktivního albuminu je popisována v mnoha studiích autorů Wayne Comper a Tanya Osicka (např. Comper W. D. et al., 2003; Comper W. D. et al., 2004; Osicka T. M. et al., 2000; Osicka T. M. a Comper W. D., 2004).

Jedna ze studií těchto autorů srovnává metody HPLC a RIA v souborech 97 diabetiků a 87 nediabetiků. U nediabetiků nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi metodami, zatímco 92 % diabetiků vykazovalo vyšší koncentrace albuminurie změřené metodou HPLC. 33 % močových vzorků diabetiků spadalo do oblasti fyziologické albuminurie (A1) při měření metodou RIA, avšak do oblasti středně zvýšené albuminurie (A2) při užití HPLC. V oblasti koncentrací s významně zvýšenou albuminurií (A3) nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi metodami. Imunoreaktivní albumin byl prokázán i v této studii dvourozměrnou elektroforézou a hmotnostní spektrometrií využívající desorpční ionizaci laserem za přítomnosti matrice, MALDI-MS (Comper W. D. et al., 2003).

V naší studii byl nalezen statisticky významný rozdíl mezi metodami, a to jak v souboru diabetiků, tak i v souboru nediabetiků. Do hodnoty imunoturbidimetricky (IT) stanovené albuminurie 15 mg/l byly hodnoty HPLC v průměru o 159 % vyšší (u diabetiků o 162 %, u nediabetiků o 154 %), mezi 15 až 29,9 mg/l byly HPLC výsledky průměrně o 53 % vyšší (bez významného rozdílu mezi diabetiky a nediabetiky). V těchto oblastech koncentrací (tj. do 29,9 mg/l IT stanovené albuminurie) vykazovali diabetici 1. typu statisticky významně vyšší rozdíly mezi metodami než diabetici 2. typu. Při koncentracích IT vyšších než 30 mg/l se již výsledky rozdílů metod u nediabetiků a diabetiků (ani u diabetiků 1. a 2. typu) významně nelišily, rozdíly mezi metodami se zmenšovaly, zůstávaly však statisticky významné, a i v oblasti IT stanovené albuminurie ≥ 300 mg/l byly průměrně 13 % (v souboru všech pacientů). V důsledku těchto rozdílů se 27 % pacientů s imunoturbidimetricky fyziologickou albuminurií hodnocenou poměrem močový albumin/močový kreatinin (21 % diabetiků a 40 % nediabetiků) posunulo do oblasti středně zvýšené albuminurie (A2) při vyhodnocení stejných vzorků metodou HPLC. V případě pacientů imunoturbidimetricky se středně zvýšenou albuminurií (A2) nastal posun do významně zvýšené albuminurie (A3) stanovené HPLC pouze u 8 % z nich (7 % diabetiků a 9 % nediabetiků).

Naše výsledky popisujeme v souladu s doporučením pracovní skupiny KDIGO CKD z roku 2012, která definovala rozdělení albuminurie stanovené rutinními imunochemickými

metodami do oblastí A1, A2 a A3 (viz dříve). V roce 2006 stanovil McQueen rozdílné cut-off hodnoty pro imunochemické metody (0,9 mg/mmol kreatininu) a pro HPLC (3,4 mg/mmol kreatininu) a zdůrazňoval důležitost těchto rozdílných cut-off hodnot. Obdobně uzavřeli svou studii v roce 2009 Zamora a Cubeddu. Podle nich existují podstatné důkazy o tom, že cut-off hodnota pro středně zvýšenou albuminurii (tzn. albuminurii oblasti A2, dříve mikroalbuminurii) by měla být 3 až 4krát snížena oproti stávající cut-off hodnotě (Zamora C. R. a Cubeddu L. X, 2009). Tato doporučení však nebyla zahrnuta v pozdějších guidelines z roku 2012. Vzhledem k významným rozdílům mezi metodami by bylo na místě užívat i rozdílné hodnoty cut-off. Nové (tzn. vyšší) cut-off hodnoty pro HPLC metodu však definovat nemůžeme, protože právě pacienti s fyziologickou albuminurií imunochemickými metodami, ale středně zvýšenou albuminurii HPLC, jsou ve zvýšeném riziku rozvoje různých nemocí (obdobně pacienti imunochemicky s albuminurií v oblasti A2 a HPLC v oblasti A3 jsou vysoce rizikováni). Snížení cut-off hodnot pro imunochemické metody není doporučováno, protože jsou definovány dle KDIGO 2012.

V naší studii byly zjištěny tři rozdílné lineární závislosti HPLC a imunoturbidimetricky stanovené albuminurie v závislosti na diagnóze diabetes mellitus, a to v souboru diabetiků 1. typu, v souboru diabetiků 2. typu a v souboru nediabetiků. Rozdílné koeficienty lineárních regresí souvisejí s většími rozdíly mezi metodami zejména v oblasti fyziologické albuminurie (menšími rozdíly v oblasti albuminurie A2 a nejmenšími v oblasti A3), intercept má relativně větší význam v oblastech s nižší albuminurií, jeho hodnota byla zjištěna vyšší u diabetiků než u nediabetiků. Hodnota směrnice je v souboru diabetiků 2. typu signifikantně nižší než v dalších dvou souborech (při hodnocení bootstrapovou regresí), hodnota interceptu je nejvyšší ze všech sledovaných souborů (při hodnocení jak bootstrapovou tak Demingovou regresí), což by mohlo nasvědčovat na odlišný původ imunochemicky nereaktivního albuminu u diabetiků 2. typu.

Samozřejmě máme na paměti, že konzistence metody může být často problémem a že vyvinuté rovnice konvertující výsledky imunochemické metody na výsledky HPLC by měly být potvrzeny opakovaným měřením s odstupem času. My se však domníváme, že naše výsledky jsou dostatečně vypovídající, protože v průběhu naší tříleté studie jsme použili minimálně 10 různých lotů imunoturbidimetrické metody a neshledali jsme významné „lot-to-lot“ difference (variační koeficienty i hodnoty bias byly maximálně 5 %). Ověření korekčních rovnic by mohlo být předmětem našeho dalšího výzkumu.

Většina studií porovnávající stanovení albuminurie HPLC s imunochemickými metodami nachází statisticky významný rozdíl mezi metodami u pacientů s diabetem (Comper

W. D. et al., 2003; Comper W. D. et al., 2004) nebo s kardiovaskulárními onemocněními (Hilliard L. M. et al., 2009; Russo L. M. et al., 2002). V naší studii tvořili pacienti se základní diagnózou hypertenze nebo jiná kardiovaskulární onemocnění 12 % pacientů v souboru pacientů nediabetiků (55 pacientů z celkového N= 456).

Imunochemicky nereaktivní charakter albuminové molekuly může být zapříčiněn změnou epitopů albuminu pro běžně používané protilátky imunochemických metod v důsledku neúplného zpracování albuminu v lyzosomech, což bylo zjištěno právě především u diabetiků a hyperteniků (Osicka T. M. et al., 2000; Burne M. J. et al., 1998), a nebo navázáním některých ligandů na molekulu albuminu, např. glukózy či mastných kyselin, což bývá typické opět pro diabetiky (Osicka T. M. a Comper W. D., 2004).

Rozdíl mezi metodami (imunochemické vs. HPLC) byl však zjištěn i u pacientů s jinými diagnózami, např. Szigetí popisuje HPLC stanovenou albuminurii (a nikoliv imunoturbidimetricky stanovenou) jako senzitivní marker aktivity Crohnovy choroby (Szigeti N. et al., 2009).

HPLC metoda zjistila vyšší hodnoty albuminurie ve srovnání s imunonefelometrií také u jedinců z obecné populace, zvláště v oblastech koncentrací menších než 20 mg/l, což rezultovalo ve vyšší prevalenci jedinců se středně zvýšenou albuminurií. Autoři této studie vyšetřovali 1312 vzorků z 24hodinového sběru moči, které byly sbírány v rámci studie PREVENT (Prevention of Renal and Vascular End-stage Disease). Pro imunonefelometrické měření byly použity vzorky čerstvé, pro HPLC měření vzorky rozmrazené (Brinkman J. W. et al., 2004).

Obdobně srovnávala albuminurii stanovenou imunonefelometricky a HPLC u jedinců z obecné populace studie Dianny Magliano z roku 2007. Jednalo se o longitudinální studii AusDiab (Australian Diabetes Obesity and Lifestyle) o 10 175 účastnících, která trvala přibližně 5 let a sledovala (krom jiného) souvislost zvýšené albuminurie s mortalitou. Během trvání studie 319 účastníků zemřelo. Bylo zjištěno, že zvýšená albuminurie zjištěná buď imunonefelometricky nebo HPLC je schopná predikovat mortalitu, avšak pouze HPLC metoda umožní identifikovat pacienty se zvýšeným rizikem mortality. I tato studie stanovovala albuminurii imunonefelometricky z čerstvých močí a HPLC z rozmrazených (Magliano D. J. et al., 2007).

I my jsme vyšetřovali objemnou skupinu pacientů (N=1092) a jedinečnost naší studie spatřujeme v tom, že jsme analyzovali vzorky čerstvých močí nebo uchovávaných maximálně 4 dny při teplotě 2 až 8 °C, a to oběma metodami – imunoturbidimetricky i HPLC. Pro vyšetření albuminurie se tento způsob skladování doporučuje za nejvhodnější (uvádí se

stabilita při 2 až 8 °C minimálně týden), zamrazování se nedoporučuje (Zima T. et al., 2014). Dřívější studie popisují, že ve skladovaných močích dochází s postupem času k degradaci albuminu a že výsledky analytických metod jsou snadno ovlivnitelné prodlouženým skladováním a mražením (např. Kania K. et al., 2010).

V současné době se doporučuje (dle pracovní skupiny IFCC pro standardizaci albuminu v moči) albuminurii vyšetřovat imunochemickými metodami užívajícími polyklonální protilátky proti albuminu, protože reagují s mnoha formami albuminu včetně modifikovaných (Speeckaert M. M. et al., 2011).

V naší studii jsme při imunoturbidimetrickém stanovení albuminurie užívali ovčí polyklonální protilátky proti lidskému sérovému albuminu, ale jak již bylo opakovaně zmíněno, výsledky nebyly srovnatelné s výsledky HPLC metody. Osicka a Comper testovali více než 30 různých polyklonálních a monoklonálních protilátek a nenašli žádné, které by byly schopny detekovat imunochemicky nereaktivní albumin (Osicka T. M. a Comper W. D., 2004). Možným vysvětlením by mohla být skutečnost, že protilátky byly vyvinuty proti sérovému a nikoliv močovému albuminu. Protilátky používané imunochemickými metodami reagují se svými epitopy v moči, avšak tyto epitopy nemusejí být asociované výhradně s intaktním albuminem (Osicka T. M. et al., 2000; Burne M. J. et al., 1998; Eppel G. A. et al., 2000). Polyklonální protilátky proti lidskému močovému albuminu dosud vyvinuty nebyly vzhledem k rozličnosti molekulových forem močového albuminu (Lieske J. C. et al., 2013; Osicka T. M. a Comper W. D., 2004).

Za referenční metodu se považuje tandemová kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií, které předchází tryptická digesce vzorku moči, vyvinutá na Mayo Clinic (Seegmiller J. C. et al., 2009). Avšak i tato metoda má svá úskalí. Tím, že v sobě zahrnuje krok digesce, je teoreticky možné, že by mohla měřit společně s močovým albuminem také jeho preexistující N a/nebo C-terminální fragmenty, což by znamenalo falešné zvýšení výsledků měření. Pozdější studie však tuto hypotézu nepotvrdila, endogenní fragmenty albuminu s měřením významně neinterferovaly (Lieske J. C. et al., 2013). Dalším úskalím metody by mohly být možné posttranslační modifikace analyzovaných peptidů odvozených od albuminu, které by mohly měnit hmotnost těchto peptidů a způsobit až jejich nedetekovatelnost, čímž by došlo k falešnému snížení výsledků. Modifikace albuminu, které by byly schopny inhibovat digesci trypsinem, by také mohly přispět k falešně nižším výsledkům. V současné době se však doporučuje zajistit návaznost imunochemických metod na tuto referenční LC-MS/MS metodu pro stanovení albuminurie, a to i přes výše uvedené výhrady (Graziani M. S. a Plebani M., 2015; Friedecký B., 2015).

V naší studii jsme nenalezli žádnou korelaci mezi hladinami glykovaného hemoglobinu HbA_{1c} a albuminurií (stanovenou imunoturbidimetricky a HPLC) ani mezi HbA_{1c} a parametry od albuminurie odvozenými (různé poměry a rozdíly HPLC a imunoturbidimetricky stanovené albuminurie, viz obrázek 13). Při testování těchto vztahů jsme vycházeli z hypotézy, že hladiny HbA_{1c} korespondují se sérovými koncentracemi glykovaného albuminu, jak potvrzují i studie japonských autorů: Yoshiuchi ve své studii popisuje velmi silnou korelaci mezi těmito markery jak u diabetiků prvního, tak i druhého typu (Yoshiuchi K. et al., 2008), Takahashi našel slabší, ale stále ještě signifikantní korelaci u diabetiků 2. typu (Takahashi S. et al., 2007). Močový glykovaný albumin by mohl být součástí imunonereaktivního albuminu v moči (Russo L. M. et al., 2002; Osicka T. M. a Comper W. D., 2004). Z těchto vztahů vyplývá, že koncentrace močového imunonereaktivního albuminu (rozdíl mezi HPLC a imunoturbidimetricky změřenou albuminurií) by mohla souviset s hladinami HbA_{1c} v krvi, a tedy i s kompenzací diabetu. Naše výsledky však tuto hypotézu nepotvrdily.

V roce 1984 popsal Wiseman významnou korelaci mezi HbA_{1c} a albuminurií ve skupině 28 diabetiků 1. typu se středně zvýšenou albuminurií (Wiseman M. et al., 1984). Oproti tomu, studie Saiedullaha z roku 2012 zjišťovala asociace HbA_{1c} a minoritních frakcí glykovaného hemoglobinu HbA_{1a} a HbA_{1b} s albuminurií u 150 diabetiků a korelace mezi HbA_{1c} a poměrem U-albumin/U-kreatinin nebyla nalezena, obdobně jako v naší studii (Saiedullah M. et al., 2012). Albuminurie a glykovaný hemoglobin HbA_{1c} jsou tedy nezávislými biomarkery pro monitoraci pacientů s diagnózou diabetes mellitus.

5.2. Stanovení močového NGAL u dětí po transplantaci ledviny

Vznik akutního poškození ledvin (AKI) je častou komplikací u dospělých i u dětských pacientů po transplantaci ledviny. AKI může být způsobeno akutní rejekcí transplantované ledviny nebo nerejekčními příčinami (např. dehydratací při volumové depleci, bakteriální nebo virovou infekcí, lékovou toxicitou, Mehrotra A. et al., 2012). Časné odhalení příčiny AKI může být klíčové pro rychlé zahájení vhodné terapie. Histologické vyšetření vzorků renální biopsie je zlatým standardem pro diagnózu akutní rejekce ledvinného štěpu, jedná se však o invazivní proceduru. NGAL je časným neinvazivním markerem AKI, u něhož bylo popsáno, že je schopný rozlišit mezi akutní rejekcí a nerejekčními příčinami vzniku AKI u dospělých pacientů po transplantaci ledviny (Heyne N. et al., 2012). V této studii bylo

vyšetřeno 182 pacientů po transplantaci ledviny a AKI bylo zjištěno u 44 z nich. U 9 pacientů byla příčinou AKI akutní rejekce. Medián U-NGAL u pacientů s akutní rejeckí byl 339 $\mu\text{g/l}$, u pacientů s jinou příčinou AKI 59,1 $\mu\text{g/l}$ a u pacientů se stabilizovanou funkcí transplantátu 7,8 $\mu\text{g/l}$ (Heyne N. et al., 2012). U dětských pacientů podobná studie publikovaná nebyla a právě naše studie je první publikovanou studií tohoto druhu (Seeman T. et al., 2017).

V této naší malé prospektivní studii u dětských pacientů (N=15) močové koncentrace NGAL nedokázaly rozlišit mezi rejekčními a nerejekčními příčinami akutního poškození transplantované ledviny. Děti s AKI z důvodu akutní rejekce měly podobné koncentrace močových NGAL jako děti s AKI z ostatních příčin (mediány 7,3 $\mu\text{g/l}$ vs. 8,6 $\mu\text{g/l}$, ns). Všechny naměřené koncentrace byly navíc pod definovanou cut-off hodnotou 131,7 $\mu\text{g/l}$, z čehož vyplývá, že u žádného z našich pacientů nebylo možné AKI diagnostikovat z koncentrace močového NGAL (na rozdíl od sérového kreatininu a eGF).

Tyto nálezy jsou v rozporu s nálezy výše zmíněné studie u dospělých transplantovaných pacientů (Heyne N. et al., 2012), avšak jsou v souladu se třemi recentnějšími studii (Ramirez-Sandoval J. C. et al., 2014; Mamatov E. et al., 2015; Telkes G. et al., 2015). Ramirez-Sandoval vyšetřoval 67 dospělých transplantovaných pacientů s AKI a nenašel rozdíly v močových koncentracích NGAL u pacientů s rejeckí ve srovnání s pacienty s dalšími příčinami AKI a cut-off hodnota poměru U-NGAL/U-kreatinin 59 $\mu\text{g/g}$ (neboli 6,7 $\mu\text{g}/\text{mmol}$) vykazovala nízkou senzitivitu (60 %) a specificitu (58 %) pro identifikaci pacientů s akutní rejeckí. Obdobně, studie Mamatova (N = 19) a Telkese (N= 27) demonstrují, že hladiny NGAL neposkytují dostatečné informace k diagnostice akutní rejekce transplantované ledviny u dospělých pacientů. Výsledky naší pediatrické studie a zmíněných třech studií u dospělých pacientů nasvědčují na to, že u dětí, stejně jako u dospělých, nedokáže močový NGAL rozlišit mezi rejekčními a nerejekčními příčinami AKI.

Hlavními limitacemi naší studie jsou: malý počet pacientů a nemožnost vyhodnotit poměr U-NGAL/U-kreatinin, protože koncentrace močového kreatininu nebyly měřeny. Soubor s akutní rejeckí tvořili pouze čtyři dětské pacienti vzhledem k nízké prevalenci transplantovaných dětí s akutní rejeckí na našem pracovišti v době, kdy naše studie probíhala. Koncentrace močových NGAL byly upřednostněny před hodnotami močových NGAL vztaženými na močový kreatinin nejen v naší studii, ale i ve zmíněných studiích u dospělých pacientů, vzhledem k tomu, že u pacientů s nízkou GF by mohly snížené koncentrace močového kreatininu poměr U-NGAL/U-kreatinin falešně zvyšovat.

I přes tyto limitace je naše studie první studií vyšetřující močové koncentrace NGAL u dětských pacientů po transplantaci ledviny s AKI a biopticky potvrzenou akutní rejeckí.

5.3. Stanovení močového NGAL u dětí s akutním nebo s chronickým onemocněním ledvin

Akutní poškození ledvin je závažné, rychle progredující onemocnění, je častou komplikací u ambulantních a hospitalizovaných pacientů a nezávisle předpovídá morbiditu a mortalitu (Brivet F. G. et al., 1996; Kaufman J. et al., 1991; Liaño F. a Pascual J., 1996). Především pro časně fáze je charakteristická reverzibilita renálních změn, proto je velká snaha definovat co nejčasnější a nespecifičtější marker AKI. Nejnadějnější se zdá být NGAL, který jsme vyšetřovali i v naší studii.

Pro chronické onemocnění ledvin je oproti tomu typické pozvolné snižování funkce ledvin, které zpravidla neprogreduje v průběhu hospitalizace. Prerenální azotémie, při které ještě nedochází ke strukturálním změnám v ledvinné tkáni, je čistě funkční a reverzibilní stav, pokud je vyvolávající příčina včas korigována, např. doplněním tekutin (Thadhani R. et al., 1996).

Při vyšetřování pacienta s onemocněním ledvin je proto velmi důležité odlišit akutní poškození ledvin od prerenální azotémie a chronického onemocnění ledvin, aby mohla být zahájena adekvátní terapie (úprava dávkování léků, vysazení nefrotoxických léků, úprava hemodynamického stavu atd.). Stanovení sérového kreatininu však tyto klinické jednotky odlišit nedokáže, navíc počáteční hodnoty sérového kreatininu neodrážejí rozsah poškození ledvin, protože akumulace kreatininu vždy zaostává za dobou působení škodlivého inzultu (Bonventre J. V. a Weinberg J. M., 2003; Lameire N. a Hoste E., 2004). Dokonce i velký pokles glomerulární filtrace se může projevit jako jen malá změna hladiny kreatininu v séru, zejména v počátečních 48 hodinách akutního poškození ledvin (Lameire N. a Hoste E., 2004; Star R. A., 1998). V současné době stanovení diagnózy AKI vyžaduje opakované měření sérového kreatininu a léčebné manévry jsou odkládány.

V naší studii jsme vyšetřovali NGAL u dětských pacientů s onemocněním ledvin různé etiologie a u kontrolního souboru zdravých dětí s cílem určit jeho užitečnost pro identifikaci pacientů s akutním poškozením ledvin.

Koncentrace močového NGAL nad hodnotou cut-off pro AKI 131,7 $\mu\text{g/l}$ byly zjištěny pouze u souboru pacientů s akutním poškozením ledvin (hodnoty cut-off byly překročeny minimálně 2,7krát). U žádného pacienta z dalších vyšetřovaných souborů (soubor pacientů s chronickým onemocněním ledvin, soubor s prerenální azotémií a kontrolní soubor zdravých dětí) nepřekročila hladina NGAL hodnotu cut-off.

V případě poměru NGAL/kreatinin v moči jsme jako cut-off definovali hodnotu 15 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ (Nickolas T. L. et al., 2008). Hodnoty tohoto poměru překročily hodnotu cut-off

u všech čtrnácti pacientů s AKI, ale též u dvou pacientů ze souboru pacientů s prerenální azotémií (z celkového N=3) a u tří pacientů ze souboru s CKD (z celkového N=11). U kontrolního souboru zdravých dětí hodnoty cut-off překročeny nebyly. Hodnota cut-off NGAL/kreatinin v moči byla u pacientů s prerenální azotémií a CKD překročena maximálně 2,5krát, oproti tomu, u pacientů s AKI minimálně 19krát a maximálně více než 8000krát.

Studie na myších (Mori K. a Nakao K., 2007) zjistila, že deplece objemu nebo diuretika nezvýšily močové koncentrace NGAL (nekorigované na močový kreatinin), což odráží specifickou NGAL pro probíhající tubulární poškození. Obdobně, ani my jsme u našich třech sledovaných pacientů s prerenální azotémií nezjistili zvýšené hodnoty močového NGAL. U dvou z nich jsme však zjistili zvýšené hodnoty močového NGAL vztaheného na močový kreatinin. Jak již bylo zmíněno výše, díky bootstrapovaným statistickým metodám jsme soubor s prerenální azotémií porovnávali se souborem s AKI (i s dalšími soubory). Limitace malého počtu pacientů jsme si však vědomi. Mezi soubory s AKI a s prerenální azotémií byl zjištěn statisticky významný rozdíl v koncentracích NGAL ($p < 0,001$) a ještě významnější v hodnotách poměrů NGAL v moči/kreatinin v moči ($p < 0,00001$). V případě pacientů s AKI byla hodnota cut-off močového NGAL překročena u všech pacientů, a to jak nekorigovaného, tak korigovaného. Naše výsledky tedy naznačují na vhodnost NGAL také jako biomarkeru k rozlišení prerenální a renální příčiny akutního poškození ledvin (i přesto, že byly vyšetřeny moče pouze tří pacientů s prerenální azotémií a že u nich byla překročena hodnota cut-off NGAL/kreatinin v moči).

Další autoři popisují, že NGAL je v moči vyjádřen v poměru ke stupni akutního poškození ledvin (studie u dětských pacientů, Mishra J. et al., 2005). To opět koresponduje s našimi výsledky. V souboru pacientů s AKI (N=14), jsme u čtyř z nich NGAL stanovovali opakovaně v průběhu onemocnění (u třech pacientů s hemolyticko-uremickým syndromem (HUS) a jednoho s ischemickým postižením ledvin) a hladiny NGAL odrážely průběh choroby a klinický stav pacientů. Průběh poměrů NGAL/kreatinin v moči se mírně lišil od průběhu nekorigovaného NGAL u dvou pacientů. U jednoho pacienta s HUS poměr NGAL/kreatinin v moči začal klesat dříve než močový NGAL a u pacienta s ischemickým postižením došlo naopak dříve k poklesu NGAL. K vyslovení obecnějších závěrů ze srovnávání korigovaného a nekorigovaného NGAL u různých diagnóz by však bylo třeba dalších sledování na větším počtu pacientů.

O NGAL se hovoří též jako o významném biomarkeru u pacientů s chronickým onemocněním ledvin. Studie z roku 2008 (Bolognino D. et al., 2008) vyšetřovala sérové a močové koncentrace NGAL v kohortě 69 dospělých pacientů s CKD a sledovala vztah

těchto markerů k závažnosti poškození ledvin. Tyto markery byly u pacientů s CKD významně zvýšeny (v porovnání se zdravými kontrolami) a navíc pozitivně korelovaly se sérovým kreatininem a negativně s reziduální glomerulární filtrací. Tato negativní korelace s GF byla dokonce významnější než mezi GF a sérovým kreatininem. Multivariantní analýza potvrdila korelace jako nezávislé, což potvrzuje, že u těchto pacientů byl NGAL lepší prediktor GF než sérový kreatinin.

Studie stejných autorů z roku 2009 (Bolignano D. et al., 2009) označila NGAL jako silný a nezávislý marker rizika progresu CKD. Sledovala opět NGAL v séru a v moči společně s dalšími potenciálními markery progresu CKD u 96 pacientů s renální insuficiencí různé etiologie a $eGF \geq 0,25 \text{ ml/s/1,73 m}^2$. Progrese CKD byla definovaná jako zdvojnásobení výchozího kreatininu v séru a/nebo nástup ESRD (End-Stage Renal Disease), a během trvání studie (medián 18,5 měsíců, v rozmezí 1 až 20 měsíců) jí dosáhlo 32 % pacientů. Univariantní a následně multivariantní Cox regresní analýza prokázala, že sérový i močový NGAL předpověděl progresi CKD, a to nezávisle na dalších potenciálních rizikových faktorech, včetně věku a eGF.

V roce 2013 byly publikovány výsledky obdobné, avšak daleko rozsáhlejší studie (Liu K. D. et al., 2013), která sledovala 3386 pacientů s CKD (s průměrnou $eGF 0,7 \text{ ml/s/1,73 m}^2$, s mediánem proteinurie 0,2 g/24 hodin a s mediánem koncentrace NGAL v moči 17,2 $\mu\text{g/l}$) v průběhu 3,2 let. NGAL byl i v této studii potvrzen nezávislým rizikovým markerem progresu CKD, avšak podstatně nezlepšil předpověď výsledného klinického stavu (ve srovnání se stávajícími markery jako např. eGF, proteinurie). Autoři proto uzavírají, že jeho zavedení do běžné klinické praxe u pacientů s CKD je sporné.

Tyto a další studie (Bolignano D. et al., 2009; Liu K. D. et al., 2013; Flo T. H. et al., 2004) popisují, že při chronickém onemocnění ledvin se zvýšený NGAL v moči vyskytuje u pacientů s progredujícím, ale nikoliv se stabilizovaným selháním ledvin. V naší studii bylo všech jedenáct vyšetřovaných pacientů s chronickým onemocněním ledvin ve stabilizované fázi onemocnění, u všech jsme zaznamenali koncentrace močových NGAL pod hodnotou cut-off 131,7 $\mu\text{g/l}$, hodnoty poměru NGAL/kreatinin v moči však hodnotu cut-off 15 $\mu\text{g/mmol}$ přesahovaly u třech pacientů z tohoto souboru. V souladu s výsledky studie Bogliana (Bolignano D. et al., 2008) jsme zaznamenali statisticky významně vyšší koncentrace močového NGAL u souboru pacientů s CKD (přestože byli ve stabilizované fázi onemocnění) ve srovnání s kontrolním souborem bez poškození ledvin ($p < 0,001$). Ještě významnější rozdíly mezi těmito soubory byly v případě poměru NGAL/kreatinin v moči ($p < 0,00001$). Z toho jednoznačně vyplývá, že hodnoty pod cut-off hodnotou nejsou fyziologické

a je otazné, zda by nebylo vhodné definovat hodnoty cut-off pro CKD event. pro další ledvinná onemocnění.

Studie Nickolase a spolupracovníků (Nickolas T. L. et al., 2008) porovnávala stejně jako naše studie močový NGAL mezi soubory pacientů s akutním postižením ledvin, s prerenální azotémií, se stabilním chronickým onemocněním ledvin a s normální funkcí ledvin a došla k obdobným závěrům jako my. Soubor tvořilo 635 dospělých pacientů (naše studie byla tvořena menším souborem, N=38 a vyšetřovali jsme dětské pacienty). Pacienti s AKI měli signifikantně zvýšené koncentrace NGAL/kreatinin v moči ($416 \pm 387 \mu\text{g/g}$, $p = 0,001$) v porovnání s ostatními soubory pacientů. Močové markery včetně NGAL však (oproti nám) byly hodnoceny pouze jako korigované na močový kreatinin. Kromě močového NGAL autoři vyšetřovali močové markery NAG, α -1-mikroglobulin a α -1-kyselý glykoprotein společně se sérovým kreatininem a frakční exkrecí sodíku. Močový NGAL (vztažený na močový kreatinin) byl z těchto markerů označen za jednoznačně nejlepší k odlišení AKI od ostatních onemocnění ledvin. Pro cut-off hodnotu $15 \mu\text{g/mmol}$ ($130 \mu\text{g/g}$) byla senzitivita detekce AKI 0,90 a specificita 0,995 (hodnoty NGAL/kreatinin v moči přesahující několikanásobně hodnotu cut-off byly kromě pacientů s AKI zjištěny i u 1 pacienta s prerenální azotémií (z N=88) a u 3 pacientů s CKD (z N=106)).

Uvádění pouze korigovaných močových markerů (vztažených na močový kreatinin) se v současné době u pacientů s onemocněním ledvin (s AKI, s CKD i s prerenální azotémií) nedoporučuje. Při používání těchto poměrů totiž může docházet k nadhodnocování stupně poškození ledvin vzhledem k nestabilním změnám (většinou sníženému vylučování) močového kreatininu u pacientů s renální insuficiencí (Waikar S. S. et al., 2010; Goldstein S. L., 2010). Většinou bývá doporučováno uvádět markery oba (jak nekorigovaný, tak korigovaný, Helmersson-Karlqvist J. et al., 2013).

I přes tuto limitaci (některé studie užívají pouze korigované hodnoty NGAL) většina studií (včetně naší) potvrzuje, že močový NGAL detekuje akutní poškození ledvin a stupeň jeho exprese pomůže rozlišit mezi akutním poškozením ledvin, prerenální azotémií, chronickým onemocněním ledvin a normální funkcí ledvin. Vzhledem k tomu, že NGAL je detekovatelný před akumulací sérového kreatininu (Mishra J. et al., 2003, Mishra J. et al., 2005, Wagener G. et al., 2006), může být použit též k časně diagnostice akutního poškození ledvin v době, kdy jsou hladiny sérového kreatininu ještě v normě.

5.4. Stanovení močového NGAL u dospělých pacientů po kardiochirurgických výkonech

Akutní renální poškození je jednou z nejzávažnějších komplikací u pacientů po kardiochirurgických výkonech až s 30 % incidencí. Hlavními příčinami jeho vzniku jsou: ischemicko-reperfuční trauma během mimotělního oběhu, nízký srdeční výdej, působení exotoxinů (antibiotika, diuretika) a endotoxinů (myoglobin), preexistující renální dysfunkce. Negativně působí hypotenze, hypotermie, hemodiluce, nepulzativní průtok a indukce zánětlivé odpovědi (Gerlichová M. et al., 2008).

Cílem naší studie (Fořtová M. et al., 2011) bylo vyšetření NGAL v moči právě u pacientů po kardiochirurgických výkonech a ověření jeho spolehlivosti v predikci renálního poškození.

U některých pacientů jsme zaznamenali vyšší koncentrace močového NGAL v úvodu operace (odběr T_{preop}) než v odstupu 1 hodiny od konce operace (odběr T_1), což lze vysvětlit předoperační restrikcí příjmu tekutin a s ní spojenou hypotenzí s relativní hypoperfuzí splachniku a/nebo výdejem menšího množství více koncentrované moči v důsledku restrikce tekutin (viz průběh hodnot pacienta 3 na obr. 30 a po přepočtu na kreatinin na obr. 31).

Dynamika vývoje koncentrace NGAL v moči nedosahovala v průměru ani dvojnásobných vzestupů oproti předchozím hodnotám. Oproti tomu, určité vývojové trendy můžeme sledovat v poměru koncentrací NGAL/kreatinin v moči. Ve všech souborech došlo k více než dvojnásobnému zvýšení průměru tohoto poměru mezi odběrem T_{preop} a T_1 , u pacientů s renálními komplikacemi navíc mezi odběrem T_5 a T_{10} (5 a 10 hodin po operaci). V tomto souboru však průměrná hodnota poměru narůstala pozvolněji než v souboru pacientů bez renálních komplikací. S podivem, právě u pacientů s renálními komplikacemi byly zjištěny všechny pooperační hodnoty průměrů i mediánů jak U-NGAL, tak i poměru U-NGAL/U-kreatinin nižší než v souboru bez renálních komplikací. Koncentrace sérového kreatininu byly naopak vyšší u pacientů s renálními komplikacemi.

Soubor pacientů s renálními postoperačními komplikacemi tvořili 4 pacienti – 3 z nich měli již předoperačně zvýšený kreatinin (2 mírně, 1 pacient měl diagnostikovanou chronickou renální insuficienci). Některé studie (McIlroy D. R. et al., 2010; Hogan M., 2010) popisují, že časný vzestup NGAL (za 2 až 6 hodin po ischemické či jiné zátěži ledvin) je patrný především u pacientů s normálními renálními parametry před působením inzultu. U pacientů s již preexistující renální insuficiencí (s $GF < 1 \text{ ml/s/1,73 m}^2$) se obvykle močový NGAL zvyšuje později než sérový kreatinin (za 20 a více hodin po působení inzultu). I u našeho pacienta s chronickou renální insuficiencí diagnostikovanou předoperačně (se vstupní

hodnotou sérového kreatininu 157 $\mu\text{mol/l}$) jsme zaznamenali nízké hladiny močového NGAL v průběhu celého sledování, ačkoliv hodnota kreatininu se zvýšila o více než 100 %.

U žádného ze sledovaných pacientů koncentrace NGAL v moči nepřesáhla cut-off hodnotu pro AKI – tzn. ani u pacientů s postoperačními renálními komplikacemi. Tento výsledek mohl být jistě ovlivněn malým počtem sledovaných pacientů. Nejvyšší naměřená koncentrace NGAL byla 48,6 $\mu\text{g/l}$ (pacient 2, odběr T10 na obrázku 30). U stejného pacienta byla překročena cut-off hodnota poměru NGAL/kreatinin v moči pro AKI 15 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ definovaná např. Nickolasem v roce 2008 (pacient 2, odběr T10, obr. 31). Pokud bychom užili přísnější hodnotu cut-off pro AKI 6,7 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ definovanou Ramirez-Sandovalem v roce 2014, pak by ji stejný pacient překročil i v odběru T5. Jednalo se o pacienta bez renálních, avšak s oběhovými komplikacemi. Renální komplikace se u tohoto pacienta nerozvinuly vzhledem k včasnému zaléčení oběhových komplikací, jednalo se však o velmi rizikového pacienta stran rozvoje AKI (v odběhu T10 jsme zaznamenali také již mírně zvýšený kreatinin, 106 $\mu\text{mol/l}$). V tomto případě měl vyšší výpovědní hodnotu močový NGAL korigovaný na močový kreatinin než močový NGAL nekorigovaný. Hodnoty poměrů močový NGAL/močový kreatinin u všech dalších pacientů ve všech odběrech dosahovaly maxima 3,7 $\mu\text{g}/\text{mmol}$.

Sérový kreatinin se zvýšil o $\geq 50\%$ (jak bývají v některých studiích definovány „renální komplikace“) u 2 pacientů, a to u opakovaně zmiňovaného pacienta s chronickou renální insuficiencí (u něhož byly zjištěny koncentrace U-NGAL i poměru U-NGAL/U-kreatinin velmi nízké) a dále u pacienta s předoperačně fyziologickým kreatininem, jehož vývoj hodnot NGAL i kreatininu je znázorněn na obr. 30–32, pacient je označen jako pacient 4 (s renálními komplikacemi). U tohoto pacienta jsou vývojové trendy vzestupů a poklesů nekorigovaného i korigovaného NGAL v moči obdobné, v odběru T5 však došlo k výraznějšímu vzestupu a v odběru T10 k pozvolnějšímu poklesu korigovaného močového NGAL. I zde má o něco vyšší výpovědní hodnotu korigovaný močový NGAL (než NGAL nekorigovaný), cut-off hodnoty těchto markerů však překročeny nebyly a nejvýznamnějším ze sledovaných biochemických markerů byl sérový kreatinin.

K obdobným zjištěním jako my došli i čeští autoři Gerlichová et al. (2008). Jejich studie sledovala 65 pacientů, jenž podstoupili kardiochirurgický výkon s mimotělním oběhem. Pooperační AKI bylo definováno jako vzestup sérového kreatininu na 1,5násobek výchozí hodnoty nebo pokles glomerulární filtrace o více než 25 % předoperační hodnoty. K pooperačnímu rozvoji AKI došlo u 21 nemocných (32 %), hladiny a kinetika močového NGAL nebyla významně odlišná od skupiny bez renálního poškození (no-AKI). U všech

nemocných došlo ke vzestupům U-NGAL ve 4. a 12. hodině od zahájení operace bez signifikantního rozdílu mezi skupinou AKI a no-AKI (po 4 hodinách byl nárůst hodnot cca 2 až 3násobný a hodnota mediánu byla vyšší dokonce ve skupině no-AKI, po 12 hodinách 6násobný, mediány byly v obou skupinách téměř shodné). Rozdíl v kinetice močového NGAL byl detekovatelný až po 24 hodinách, kdy ve skupině bez rozvoje AKI hladina klesla, zatímco u nemocných s AKI dále stoupala, tento rozdíl ale nebyl statisticky významný. Hodnota glomerulární filtrace (vypočtená podle rovnice MDRD) po 24 hodinách vykázala signifikantní pokles ve skupině s rozvojem AKI ve srovnání se skupinou nemocných bez AKI (Gerlichová M. et al, 2008).

V roce 2005 publikovali Mishra a spolupracovníci závěry jedné z prvních studií s NGAL u dětských kardiologických pacientů (N = 81, AKI definované zvýšením sérového kreatininu o ≥ 50 % se rozvinulo u 20 z nich). Zvýšení močového NGAL s odstupem 2 hodin po ukončení operace označili za spolehlivý marker renálního poškození (senzitivita/specifická 1,00/0,98; Mishra J. et al., 2005). I další studie u dětských pacientů dokumentuje statisticky významnou souvislost mezi elevací NGAL (v tomto případě však plazmatického) 2 hodiny po kardiologickém výkonu a rozvojem AKI (Dent C. L. et al., 2007).

Studie Bennetta z roku 2008 sledovala 196 dětských pacientů po kardiologické operaci a k vývoji AKI (vzestup sérového kreatininu o ≥ 50 %) došlo u 51 % z nich. Průměrná koncentrace močového NGAL se u této skupiny zvýšila již za 2 hodiny 15krát a za 4 až 6 hodin 25krát, u pacientů bez rozvoje AKI došlo pouze k 3,6násobnému vzestupu U-NGAL po 2 hodinách a 3,4násobnému vzestupu po 4 hodinách (ve srovnání s výchozí hodnotou). Po přepočtu na kreatinin došlo u skupiny s rozvojem AKI za 2 hodiny po operaci k 21násobnému a za 4 hodiny k 40násobnému vzestupu, u pacientů bez následného rozvoje AKI hodnoty NGAL/kreatinin v moči vykazovaly 4 resp. 6,5násobný vzestup (Bennett M. et al., 2008).

Též recentnější studie, např. studie čínských autorů z roku 2017 zjistila signifikantní zvýšení močového NGAL společně s L-FABP u dětských pacientů po kardiologickém výkonu v časných stádiích AKI (Tang R. et al., 2017).

Studie Wagenera vyšetřovala dospělé pacienty po kardiologických zákrocích (N=81) a AKI (opět definované zvýšením sérového kreatininu o ≥ 50 %) se vyvinulo u 20 % z nich. Již hodinu po operaci byly zjištěny statisticky významně vyšší hodnoty močového NGAL u pacientů s rozvojem AKI oproti pacientům bez renálního poškození ($4,2 \pm 6,5$ $\mu\text{g/l}$ vs. $1,1 \pm 2,1$ $\mu\text{g/l}$; $p < 0,01$). U pacientů s AKI koncentrace NGAL vzrůstaly i v následujících postoperačních hodinách (v časech 3 a 18 h po výkonu). Tato studie tedy došla ke stejným

závěrům jako studie sledující dětské pacienty, avšak hodnoty senzitivity a specifity NGAL v moči pro predikci AKI byly významně nižší (nejvyšší hodnoty senzitivity/specificity 0,73/0,78 v čase 18 h po výkonu; Wagener G. et al., 2006).

Ve studii stejných autorů z roku 2008 (426 dospělých pacientů po kardiochirurgických výkonech, rozvoj AKI u 20 % z nich) měl NGAL jen omezenou diagnostickou výpovědní hodnotu k predikci AKI, AUROC (Area under the receiver operating characteristic curve) dosáhla nejvyšší hodnoty 0,61; a to až v čase 18 hodin po výkonu; Wagener G. et al., 2008).

Také výsledky naší studie (Fořtová M. et al., 2011) naznačují, že použití U-NGAL jako markeru rozvoje AKI v kardiochirurgii dospělých nedosahuje spolehlivosti jako u dětských pacientů. Již citovaná česká studie Gerlichové (2008) přinesla obdobné závěry ve smyslu nižší spolehlivosti NGAL a delšího časového odstupu od kardiochirurgického výkonu; zhoršení renálních funkcí nejlépe predikovala hodnota močového NGAL za 24 hodin od zahájení operace (senzitivita/ specificita 0,57/0,68).

V roce 2015 byly publikovány dokonce výsledky metaanalýzy, ve které bylo vyhodnoceno 28 studií z let 1990 až 2015, jež sledovaly močové nebo plazmatické (či sérové) biomarkery AKI (NAG, cystatin C, NGAL, KIM-1, IL-18 a L-FABP) v průběhu nebo v prvních 24 hodinách po kardiochirurgických výkonech u dospělých pacientů. Metaanalýza opět uzavírá, že sledované markery mají pouze omezený potenciál v predikci AKI v tomto období. Byly zjišťovány AUROCs a jejich hodnoty se pohybovaly většinou $\leq 0,70$ (Ho J. et al., 2015).

Proti těmto závěrům stojí výsledky studie ze stejného roku, ve které byly vyšetřovány NGAL, L-FABP, KIM-1 v moči jednak u skupiny pacientů s akutním koronárním syndromem po koronarografii, ale také u skupiny pacientů po kardiochirurgickém výkonu. Nejvyšší senzitivitu i specificitu vykazoval v obou skupinách (tzn. i u pacientů po kardiochirurgickém výkonu) právě NGAL a AUC byly v obou případech $> 0,90$ (Torregrosa I. et al., 2015).

Další studie z roku 2015 doporučuje pro preoperační, perioperační či časně pooperační stratifikaci rizika AKI vyšetřovat plazmatické (či sérové) biomarkery. Diskriminační schopnost močových biomarkerů se v této studii zvýšila, pokud byly vztažené na kreatinin, ale i přesto měly nižší vypovídající hodnotu než plazmatické (sérové) biomarkery. Nejvyšší prediktivní hodnotu měl plazmatický NGAL 4 hodiny po výkonu (AUC 0,83), následoval cystatin C (0,76) a L-FABP (0,73). Preexistující chronické onemocnění ledvin limitovalo diagnostické využití těchto markerů (Schley G. et al, 2015).

5.5. Stanovení markerů poškození ledvin u dospělých pacientů po angiografii

Nefropatie způsobená podáním kontrastní látky (KL) je definována jako akutní poškození ledvin po podání KL při vyloučení jiné příčiny tohoto stavu. Konkrétní definice této nefropatie je však nejednotná (Moura E. L. B. et al., 2017): kontrastem indukované AKI (contrast induced AKI, CIAKI) bývá definováno jako relativní zvýšení sérového kreatininu alespoň o 50 % nebo jeho absolutní zvýšení alespoň o 26,5 $\mu\text{mol/l}$ v průběhu 48 hodin po podání KL (Metha R. L. et al., 2007; American College of Radiology, 2013 a podle Acute Kidney Injury Network), a kontrastem indukovaná nefropatie (contrast induced nephropathy, CIN) jako relativní zvýšení sérového kreatininu alespoň o 25 %, nebo v absolutních hodnotách alespoň o 44,2 $\mu\text{mol/l}$ v průběhu 48 resp. 72 hodin po podání KL (Mehran R. a Nikolsky E., 2006; Barrett B. J. a Parfrey P. S., 2006; Stacul F. et al., 2011; Mohammed N. M. A. et al., 2013; American College of Radiology, 2013 a podle European Society of Urogenital Radiology). V riziku vzniku této nefropatie (v dalším textu bude užívána pro nefropatii způsobenou KL pouze zkratka CIN, nezávisle na výše uvedených zpřesňujících kritériích) jsou pacienti s CKD, míru rizika pak ovlivňují další faktory jako stav hydratace, věk, užívání nefrotoxických léků (např. ACE inhibitory, nesteroidní antiflogistika), diabetes mellitus s obezitou a přítomnost srdečního selhání (Vachek J. et al., 2014).

Ačkoli se CIN obecně omezuje na přechodné snížení funkce ledvin, nejedná se o benigní komplikaci. Určitý stupeň zbytkového poškození ledvin byl zaznamenán u 30 % osob postižených CIN (Madyoon H. et al., 2001). CIN představuje třetí nejčastější příčinu akutního selhání ledvin u hospitalizovaných pacientů (po ischemickém poškození a poškození nefrotoxickými léky) a 10 % všech příčin selhání ledvin vzniklých během hospitalizace (Ling W. et al., 2008). Vzrůstající incidence je dána výrazným nárůstem prováděných diagnostických a intervenčních radiologických vyšetření s kontrastní látkou. U běžné populace se výskyt CIN udává do 2,5 %, u rizikových nemocných incidence stoupá na 20 až 38 % a u pacientů se vstupním kreatininem nad 440 $\mu\text{mol/l}$ až na 50 % (Lautin E. M. et al., 1991; Krausová D. et al., 2006; Svojanovský J. et al., 2011).

Limitací naší studie je nemožnost hodnotit vznik kontrastem indukované nefropatie, protože jsme neměli k dispozici vzorky za 48 resp. 72 hodin po podání kontrastu (většina pacientů byla v tuto dobu již z nemocnice propuštěna). Většina studií sleduje NGAL a další markery právě v závislosti na rozvoji CIN. I přesto je však i z našich výsledků patrné, že v časech 12 a 24 hodin po podání KL došlo k statisticky významnému vzestupu močových NGAL, α -1-mikroglobulinu a NAG; a že v čase do 24 hodin po podání KL nedošlo

k významným změnám koncentrací sérového kreatininu a cystatinu C, ani glomerulárních filtrací z těchto markerů odvozených. Stejně tak albuminurie stanovená imunoturbidimetrickou i HPLC metodou se v závislosti na podání KL s časem statisticky významně neměnila. I pokud by tedy u některých našich pacientů k rozvoji CIN došlo, vzestup močových NGAL, α -1-mikroglobulinu a NAG by velmi pravděpodobně předcházel vzestupu sérového kreatininu, cystatinu C a albuminurie.

Některé studie uvádějí významný korelační vztah vstupního plazmatického (resp. sérového) nebo močového NGAL (korigovaného nebo nekorigovaného na močový kreatinin) s věkem, sérovým kreatininem, glomerulární filtrací, stadiem CKD a někdy též se sérovým cystatinem C nebo s albuminurií (Bachorzewska-Gajewska H. et al., 2006; Shaker O. G. et al., 2010; Weber C. L. et al., 2011; McCullough P. A. et al., 2012; Akrawinthawong K. et al., 2015). Naše studie však při korelaci vstupních, postproceduálních, ani všech dat těchto markerů žádné ze zmíněných korelací nezjistila.

Úloha NGAL při včasné diagnostice CIN byla zkoumána u dětských i dospělých pacientů v celé řadě studií, jež většinou poukazují na jeho velmi dobrý prediktivní potenciál.

Studie sledující 91 dětských pacientů s městnanou srdeční vadou podstupující elektivní katetrizaci s podáním kontrastu označila močový i plazmatický NGAL jako excelentní prediktor CIN, a to již v čase 2 hodiny po výkonu (AUC-ROC 0,91-0,92; Hirsch R. et al., 2007).

Autoři pilotní studie u dospělých pacientů (Bachorzewska-Gajewska H. et al., 2006) zjistili významný vzestup sérového NGAL 2 a 4 hodiny po perkutánní koronární intervenci (PCI) a močového NGAL 4 a 12 hodiny po PCI. Sérový cystatin C se významně zvýšil až v čase 24 hodin po podání kontrastu. Žádný z těchto pacientů však nevyvinul CIN, protože sérový kreatinin zůstal po 48 hodinách nezměněný. Rozšíření stejné studie (Bachorzewska-Gajewska H. et al., 2007) na soubor 100 pacientů s normálním vstupním sérovým kreatininem podstupujících PCI tyto výsledky potvrdilo a odhalilo výskyt CIN u 11 % pacientů.

Studie čínských autorů sledující 150 dospělých pacientů s normální funkcí ledvin po koronarografii zjistila, že močový NGAL se významně zvýšil pouze u skupiny, jež rozvinula CIN (8,7 % případů). NGAL byl vyšetřován v časech před a 24 hodin po výkonu. ROC analýza prokázala dobrou výpovědní hodnotu v diagnostice CIN ve srovnání se sérovým kreatininem ($p < 0,05$; Ling W. et al., 2008).

Námi opakovaně citovaná studie z roku 2015 (Torregrosa I. et al., 2015), která stanovovala kromě močového NGAL další močové biomarkery (L-FABP a KIM-1) u skupiny

193 dospělých pacientů 12 hodin po koronarografii, zjistila nejvyšší senzitivitu i specifitu pro diagnostiku AKI právě u močového NGAL (AUC >0,90).

Zcela recentní studie (Connolly M. et al., 2018) vyšetřovala markery AKI (plazmatický NGAL, sérové L-FABP, KIM-1, IL-18, kreatinin a močové NGAL, cystatin C) po podání KL u pacientů s chronickým onemocněním ledvin. CIN nejlépe predikoval sérový L-FABP ve 4. hodině a plazmatický NGAL v 6. hodině po podání KL.

Metaanalýza 19 studií z 8 zemí sledující vznik CIN u dospělých i dětských pacientů (Haase M. et al., 2009) odhalila celkovou AUC-ROC močového i plazmatického NGAL pro predikci CIN po koronárních výkonech 0,894 (v čase do 6 hodin po podání KL).

V roce 2017 byly publikovány dvě studie, které význam vyšetření NGAL v predikci CIN zpochybňují. Ribitsch W. et al. sledovali 617 pacientů s CKD podstupujících arteriografii. Močový NGAL byl měřen 1 den před a 4 až 6 hodin po výkonu. U 10 pacientů (1,7 %) došlo k významnému zvýšení NGAL, incidence CIN byla 9,4 % (58 pacientů), z čehož vyplývá specifita 98,4 % a senzitivita pouze 1,72 % v diagnostice CIN. Rozhodovací meze pro významné zvýšení NGAL po podání KL však byly poměrně přísné: buď vzestup koncentrace nad 150 µg/l v případě vstupních hodnot < 75 µg/l nebo zdvojnásobení koncentrací v případě vstupních hodnot ≥ 75 µg/l (Ribitsch W. et al., 2017). Podle těchto kritérií by v případě naší studie došlo k významnému zvýšení NGAL u jednoho pacienta s eGF < 1,2 v čase 4 hodiny, u jednoho pacienta s eGF ≥ 1,2 v čase 12 hodin a u tří pacientů (1 z nich s eGF < 1,2) v čase 24 hodin po podání KL.

Cecchi E. et al. vyšetřovali NGAL v séru a moči u 43 pacientů před a 4 hodiny po PCI společně se sérovými cystatinem C a kreatininem. K rozvoji CIN došlo u 16 % pacientů a v čase 4 hodiny po PCI u nich byl zaznamenán významný vzestup cystatinu C (začal stoupat dříve než sérový kreatinin), zatímco k významným změnám NGAL v souvislosti s výkonem nedošlo (Cecchi E. et al., 2017).

Z uvedených i dalších studií vyplývá, že po podání KL dochází k významnému zvýšení močového NGAL, které však bývá popisováno ve velkém časovém rozpětí po podání KL (některé studie uvádějí čas vzestupu již za 2 hodiny, jiné až za 24 hodin). Studie zpochybňující význam NGAL v predikci CIN (Ribitsch W. et al., 2017; Cecchi E. et al., 2017) tento marker vyšetřovaly v čase 4 až 6 hodin po podání KL. V tomto čase nedošlo v naší ani v řadě dalších studií k významnému zvýšení močového NGAL (v naší studii jsme zaznamenali významný vzestup až v čase 12 hodin po výkonu).

Významný vzestup močového NGAL po podání KL bývá popisován u pacientů s normální funkcí ledvin i u pacientů s CKD. Akrawinthawong K. et al. (2015) popisují

závislost bazálních hodnot NGAL a i jeho vzestupu po podání kontrastu na stadiu CKD. Jak již bylo uvedeno, v naší studii jsme souvislost mezi močovým NGAL a eGF (resp. sérovým kreatininem či cystatinem C) vstupně ani po podání KL nenašli, určité odlišnosti v podsouborech podle eGF však vysledovat lze. V případě podsouboru s eGF < 1,2 došlo k více než dvojnásobnému vzestupu mediánu NGAL v čase 12 hodin a k více než trojnásobnému v čase 24 hodin po podání KL, v čase 24 hodin došlo i k téměř dvojnásobnému vzestupu poměru močový NGAL/močový kreatinin. V podsouboru s eGF ≥ 1,2 bylo zvýšení mediánů méně výrazné (nedošlo ani k dvojnásobnému vzestupu NGAL, korigovaný NGAL byl v průběhu celého sledování prakticky stejný). Subklinická CIN bývá v některých studiích definována více než dvojnásobným vzestupem koncentrací NGAL (bez vzestupu sérového kreatininu, Akrawinthawong K. et al., 2015). K němu došlo u 54 % pacientů s eGF < 1,2 a pouze u 35 % pacientů s eGF ≥ 1,2. Tento podrobnější rozbor naznačuje na vyšší náchylnost pacientů s CKD k rozvoji kontrastem indukované nefropatie, jsme si však vědomi skutečnosti, že statistická analýza rozdílnost vývoje tohoto markeru v čase mezi podsoubory nepotvrdila a že jsme v obou podsouborech pozorovali ve většině případů poměrně nízké hladiny NGAL.

Močový α -1-mikroglobulin vykazoval statisticky stejně významné změny v čase jako močový NGAL. Statisticky významné změny v čase vykazoval také korigovaný močový α -1-mikroglobulin (mezi vstupním odběrem a odběrem 4 hodiny po podání KL), jako jediný z korigovaných močových markerů na močový kreatinin. V případě močového NAG byl zjištěn statisticky hraniční vzestup jeho koncentrace v čase 24 hodin po podání KL. Albuminurie (stanovená oběma metodami), sérový cystatin C a kreatinin se s časem statisticky významně neměnily.

Vývoj koncentrací těchto markerů v čase 1, 2 a 3 dny po koronarografii a rozvoj CIN u pacientů s eGF_{MDRD} 30 až 59 ml/min/1,73 m² sledovala studie japonských autorů (Kato K. et al., 2008). K rozvoji CIN došlo u 42 % pacientů (u 13 z celkového N=31). V případě močových markerů α -1-mikroglobulinu, NAG a albuminu nebyly nalezeny statisticky významné změny s časem, ani rozdíly mezi skupinami pacientů s a bez rozvoje CIN, zatímco hladiny cystatinu C byly statisticky významně vyšší u skupiny s rozvojem CIN (a to i před podáním KL) a pouze u této skupiny významně vzrůstaly s časem. Při hodnotě cut-off 1,2 mg/l vykazoval cystatin C před podáním kontrastu 94,7 % senzitivitu a 84,8 % specificitu pro detekci CIN. Oproti tomu, cut-off hodnota sérového kreatininu 96,8 μ mol/l dosahovala pouze 63,2 % senzitivitu a 78,8 % specificitu. Autoři této studie zvažují vyšetřovat cystatin C jako marker predikce CIN, především u pacientů s hraničními hladinami sérového kreatininu. Je diskutována také hladina cut-off >1,2 mg/l s tím, že jiné studie stanovily hodnotu

>1,3 mg/l. Obě tyto cut-off hodnoty by se nacházely ještě v rámci referenčního rozmezí v případě stanovení cystatinu C v naší studii: 0,63 až 1,44 mg/l pro pacienty starší 50 let (referenční rozmezí cystatinu C studie japonských autorů bylo 0,51 až 0,98 mg/l). I v případě užití benevolentnější hodnoty cut-off 1,3 mg/l by bylo v naší studii ve vysokém riziku rozvoje CIN 69 % pacientů z podsouboru s eGF < 1,2 a 11 % pacientů z podsouboru s eGF ≥ 1,2. Vzhledem k nedostupnosti vzorků za 48 resp. 72 hodin vznik CIN nemůžeme hodnotit, avšak k významnému zvýšení cystatinu C v čase 24 hodin po podání KL nedošlo. Bylo však publikováno několik studií, které významné zvýšení v čase 24 hodin po podání KL popisují. Kromě již zmíněné studie (Kato K. et al., 2008), např. studie autorů Padhy M. et al., kdy vrchol vzestupu cystatinu C byl popsán právě v čase 24 hodin po podání KL, tito autoři uvádějí hodnotu cut-off pro tento čas dokonce ještě nižší; 0,99 mg/l (Padhy M. et al., 2014).

Některé z těchto markerů sledovala již v roce 1996 studie italských autorů: kromě sérového kreatininu byla u 121 pacientů s normální funkcí ledvin vyšetřována albuminurie a močové α -1-mikroglobulin a NAG před podáním, 1 hodinu a 24 hodin po podání KL. Výsledky korespondují s výsledky naší studie: sérový kreatinin a albuminurie zůstaly v závislosti na podání KL nezměněny, zatímco α -1-mikroglobulin a NAG vykazovaly statisticky významný vzestup (Carraro M. et al., 1996).

I další studie poukazují na užitečnost močových markerů NAG a α -1-mikroglobulinu. Např. pediatrická studie z roku 2006 (Niboshi A. et al., 2006) sledovala 98 dětí s kardiovaskulárním onemocněním. Autoři zaznamenali významný vzestup močových NAG a α -1-mikroglobulinu korigovaných na močový kreatinin v čase 12 hodin po podání KL, k vzestupu sérového kreatininu nedošlo. Další pediatrická studie byla publikována v roce 2016, sledovala 91 dětí po koronarografii a opět poukazuje na význam korigovaného močového NAG, k jehož vzestupu došlo v čase 6 hodin po podání KL a následnému poklesu v čase 12 a 24 hodin. V čase 24 hodin došlo ke zvýšení sérového cystatinu C, sérový kreatinin se nezměnil (Benzer M. et al., 2016). Studie u dospělých pacientů po koronarografii popisují statisticky významné zvýšení korigovaného i nekorigovaného močového NAG v čase 24 hodin po výkonu, jedna ze studií u pacientů s normální renální funkcí i s CKD (Usutani S., 2000), druhá studie pak pouze u pacientů, u nichž se rozvinula CIN (N=33, z celkového N=590; Ren L. et al., 2011).

U α -1-mikroglobulinu pro nás bylo velmi překvapujícím zjištěním, že 94 % všech výsledků (zahrnující i data před podáním KL) překročilo referenční meze a dále to, že jeho hodnoty (a to opět i vstupní) byly statisticky významně vyšší v podsouboru s eGF ≥ 1,2. V případě poměru močový α -1-mikroglobulin/močový kreatinin naše laboratoř referenční

meze neuvádí, v literatuře jsme našli definovanou horní hranici referenčního rozmezí jako 0,7 mg/mmol (Tencer J. et al., 1996), 0,83 mg/mmol (Gan S. L. et al., 1994) nebo 1,7 mg/mmol (Yu H. et al., 1983). Tyto hodnoty by v naší studii překročili hodnoty všech pacientů ve všech odběrech. Kdybychom horní hranici pro naši laboratoř odhadli a vydělili horní mez referenčního rozmezí močového α -1-mikroglobulinu dolní mezí referenčního rozmezí močového kreatininu, vyšla by nám hodnota 2,1 mg/mmol. I tuto „nejmírnější“ hodnotu by překročilo 99 % všech naměřených hodnot. V literatuře bývá popisováno, že hladiny α -1-mikroglobulinu významně narůstají s věkem (Gan S. L. et al., 1994). V naší studii jsme však významnou korelaci mezi vsupním nekorigovaným ani korigovaným α -1-mikroglobulinem a věkem nenašli. Předmětem našeho dalšího zájmu bude sledovat hladiny tohoto markeru u co největšího souboru pacientů různých věkových kategorií, jak bez poškození ledvin, tak s různým stupněm renální insuficience. Mezi α -1-mikroglobulinem a NAG byl zjištěn významný korelační vztah, obdobný vývoj těchto markerů při tubulární dysfunkci byl popsán již v roce 1983 (Yu H. et al., 1983).

Albuminurie stanovená imunoturbidimetrickou i HPLC metodou, stejně tak jako jejich poměry na kreatinin, se v závislosti na podání KL s časem statisticky významně neměnily, což koresponduje s výsledky zmíněných studií japonských (Kato K. et al., 2008) a italských (Carraro M. et al., 1996) autorů. Mezi těmito markery albuminurie IT vs. albuminurie HPLC a albuminurie IT/močový kreatinin vs. albuminurie HPLC/močový kreatinin byly zjištěny významné korelační vztahy ($r=0,999$; $p < 0,001$), čímž jsme potvrdili výsledky první studie této dizertační práce a dále z toho vyplývá, že po podání KL v ledvině nevzniká další imunonereaktivní albumin. V dostupné literatuře jsme již další studie sledující vývoj albuminurie po podání KL nenašli. Studie sledující albuminurii (resp. obecně proteinurii) v kontextu CIN spíše hodnotí vliv vstupní albuminurie před podáním KL na rozvoj CIN a ve většině případů zvýšenou albuminurii (resp. proteinurii) označují jako významný rizikový faktor rozvoje CIN (Yang J-q. et al., 2014; Mittal P. et al., 2014; Tao Y. et al., 2017).

Vyšetření močového kreatininu pro nás bylo důležité ze dvou důvodů: jednak jsme na jeho koncentraci vztahovali zmiňované močové markery, jednak nám sloužil jako marker hydratace pacientů a funkce ledvin. Pacienti z podsouboru s $eGF < 1,2$ vykazovali významně nižší hodnoty močového kreatininu ve všech odběrech, ve vstupním vyšetření a v čase 4 hodiny po podání KL jsme u nich našli 58 % zastoupení koncentrací kreatininu pod dolní hranici referenčního rozmezí (v podsouboru s $eGF \geq 1,2$ to bylo 48 %), ostatní vyšetření v těchto časech byly v rámci referenčního rozmezí. Tyto výsledky nasvědčují na dobrý stav hydratace (resp. až zvýšenou hydrataci) před výkonem v rámci přípravy před podáním KL,

což je v souladu s doporučením (např. Vachek J. et al., 2014). V časech 12 a 24 hodin po podání KL jsme našli naopak značné zastoupení močového kreatininu nad referenčním rozmezím, a to především v podsouboru s $eGF \geq 1,2$ (45 % případů vs. „pouze“ 15 % případů v podsouboru s $eGF < 1,2$). Výsledky nasvědčují tomu, že větší důraz na dostatečný stav hydratace byl kladen v rizikovém souboru pacientů s renální insuficiencí. Močový kreatinin v naší studii v některých případech zkorigoval močové markery tak, že jejich statisticky významný vzestup se stal po korekci nevýznamným. V souladu se závěry dalších studií (např. Helmersson-Karlqvist J. et al., 2013) doporučujeme i při hodnocení vzniku kontrastem indukované nefropatie vyšetřovat jak markery nekorigované, tak korigované na močový kreatinin.

6. ZÁVĚR

1. Zavedli jsme HPLC metodu pro stanovení albuminurie, která splnila požadavky úspěšné validace a verifikace. Výsledky svědčí pro vyšší diagnostickou senzitivitu HPLC metody pro zachycení patologické albuminurie ve srovnání s IT metodou. Nepotvrdili jsme nespecifičnost metody, výsledky naopak nasvědčují tomu, že imunonereaktivní albumin je hlavní příčinou diferencí mezi metodami. Celkovou albuminurii (imunochemicky reaktivní plus imunochemicky nereaktivní) je možné odhadnout z IT stanovené albuminurie (v případě použití automatického analyzátoru Cobas Integra 400, Roche Diagnostics) pomocí jedné ze tří korekčních rovnic v závislosti na diagnóze diabetes mellitus (diabetici 1. typu, 2. typu a nediabetici). Nejvýznamnější rozdíl mezi metodami byl zjištěn v oblasti fyziologické albuminurie, se zvyšující se albuminurií se rozdíl zmenšoval. Nebyla zjištěna korelace mezi glykovaným hemoglobinem HbA_{1c} a parametry vztahujícími se k albuminurii. Albuminurie a HbA_{1c} jsou nezávislými biomarkery při monitoraci pacientů s diagnózou diabetes mellitus.
2. Výsledky studie u dětských pacientů po transplantaci ledviny nasvědčují tomu, že močový NGAL nemůže být použit pro rozlišení akutní rejekce od nerejekčních příčin akutního poškození transplantované ledviny.
3. Koncentrace močového NGAL (nekorigovaného i korigovaného na močový kreatinin) dokázaly diagnostikovat dětské pacienty s AKI, u nichž mnohonásobně překročily hodnoty cut-off pro AKI. Tento soubor se statisticky významně odlišoval od souborů s prerenální azotémií, CKD a kontrolního souboru dětí bez poškození ledvin. V souboru s CKD byly zjištěny statisticky významně vyšší hodnoty močových NGAL ve srovnání s kontrolním souborem, které však nedosahovaly hodnot cut-off pro AKI.
4. U dospělé populace nemusí renální komplikace po kardiochirurgických výkonech vždy korespondovat se vzestupem močového NGAL. Vhodnějším iniciačním markerem byl močový NGAL korigovaný na močový kreatinin.
5. U dospělých pacientů po angiografii došlo v časech 12 a 24 hodin po podání kontrastní látky (KL) ke statisticky významnému vzestupu močových NGAL, α -1-mikroglobulinu a NAG; v čase do 24 hodin po podání KL nedošlo k významným změnám koncentrací sérového kreatininu a cystatinu C, ani GF z těchto markerů odvozených. Stejně tak albuminurie stanovená IT i HPLC metodou se v závislosti na podání KL s časem statisticky významně neměnila. I při hodnocení vzniku kontrastem indukované nefropatie doporučujeme vyšetřovat jak markery nekorigované, tak korigované na močový kreatinin.

7. SOUHRN

Cíle: Dizertační práce se věnuje biomarkerům časného poškození ledvin, a to především albuminurii a neutrofilnímu s gelatinázou asociovanému lipokalinu (NGAL). V případě albuminurie bylo naším cílem zavést HPLC metodu, porovnat ji s metodou imunoturbidimetrickou (IT) a sledovat vztah k diagnóze diabetes mellitus. Cílem vyšetření močového NGAL (a event. dalších markerů) bylo především ověřit jeho spolehlivost v predikci akutního poškození ledvin (AKI).

Metodika: Albuminurii jsme vyšetřovali ve vzorcích čerstvé moči v souboru 636 diabetiků a 456 nediabetiků zavedenou HPLC metodou (Agilent 1200, Agilent Technologies, USA) a imunoturbidimetricky (Cobas Integra 400, Roche Diagnostics); zjišťovali jsme korelační vztahy mezi albuminurií a glykovaným hemoglobinem HbA_{1c}. Močový NGAL jsme vyšetřovali chemiluminiscenční mikročásticovou imunoanalýzou (Architect i4000, Abbott) v souborech dětí: 1) po transplantaci ledvin (N=15), 2) s akutním nebo s chronickým onemocněním ledvin (N=28); a v souborech dospělých pacientů: 1) po kardiochirurgických výkonech (N=10) a 2) po angiografii (N=41).

Výsledky: Albuminurie stanovená HPLC byla statisticky významně vyšší než stanovená IT. Vyloučili jsme nespecifičnost HPLC metody, výsledky naopak nasvědčují tomu, že hlavní příčinou diferencí mezi metodami je přítomnost imunonereaktivního albuminu a ukazují na vyšší diagnostickou senzitivitu HPLC metody pro zachycení patologické albuminurie. Celkovou albuminurii je možné odhadnout z IT stanovené albuminurie pomocí jedné ze tří korekčních rovnic v závislosti na diagnóze diabetes mellitus (diabetici 1. typu, 2. typu a nediabetici). Nebyla zjištěna korelace mezi HbA_{1c} a parametry vztahujícími se k albuminurii. Koncentrace močového NGAL dokázaly diagnostikovat dětské pacienty s AKI, u nichž mnohonásobně překročily hodnoty cut-off pro AKI. U dětských pacientů po transplantaci ledviny močový NGAL nedokázal rozlišit akutní rejekci od nerejekčních příčin AKI. U dospělých pacientů po kardiochirurgických výkonech vznik renálních komplikací nekorespondoval se vzestupem močového NGAL, vhodnějším iniciálním markerem byl močový NGAL korigovaný na močový kreatinin. U dospělých pacientů po angiografii došlo ke statisticky významnému vzestupu močových NGAL, α -1-mikroglobulinu a NAG; nedošlo k významným změnám koncentrací sérového kreatininu a cystatinu C, ani albuminurii.

Závěr: Naše studie poukazují především na diskrepanci mezi IT a HPLC metodou stanovení albuminurie a na význam a možná úskalí vyšetření NGAL při diagnostice AKI.

SUMMARY

Aims: The thesis deals with the biomarkers of early renal injury, namely albuminuria and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). The aims in the case of albuminuria were the implementation of HPLC method, comparing HPLC with immunoturbidimetric (IT) method and monitoring the relationship to the diagnosis of diabetes mellitus. The aim of urinary NGAL (and eventually other markers) examination was to verify its reliability in the prediction of acute kidney injury (AKI).

Methods: We investigated albuminuria in fresh urine samples in the groups of 636 diabetics and 456 nondiabetics using the HPLC method (Agilent 1200, Agilent Technologies, USA) and immunoturbidimetrically (Cobas Integra 400, Roche Diagnostics); we studied the correlations and relationships between albuminuria and glycosylated hemoglobin HbA_{1c}. We investigated urinary NGAL by chemiluminescent microparticle immunoassay (Architect i4000, Abbott) in children's groups: 1) after renal transplantation (N = 15), 2) with acute or chronic kidney disease (N = 28); and in adult patient's groups: 1) after cardiac surgery (N = 10) and 2) post angiography (N = 41).

Results: Albuminuria determined by HPLC was statistically significantly higher than albuminuria determined by IT. We excluded nonspecificity of the HPLC method. Results indicate that the main cause of the differences between the methods is the presence of immunounreactive albumin and indicate a higher diagnostic sensitivity of the HPLC method for the detection of pathological albuminuria. Total albuminuria can be estimated from IT-determined albuminuria using one of three correction formulas, depending on the diagnosis of diabetes mellitus (diabetics type 1, type 2, and nondiabetics). There was no correlation between HbA_{1c} and albumin-related parameters. Urinary NGAL concentrations have been able to diagnose AKI infants who have exceeded the AKI cut-off values many times. In children after renal transplantation, urinary NGAL failed to distinguish acute rejection from non-rejection causes of AKI. In adult patients after cardiac surgery, renal complications did not correspond to the urinary NGAL increase, a more suitable initial marker was urinary NGAL corrected for urinary creatinine. In adult patients after angiography, there was a statistically significant increase in urinary NGAL, α -1-microglobulin and NAG; there were no significant changes in serum creatinine and cystatin C concentrations or albuminuria.

Conclusions: Our studies mainly highlight the discrepancy between the IT and HPLC method for the assessment of albuminuria and the significance and possible difficulties of NGAL examinations in the AKI diagnostics.

8. LITERATURA

1. Akcan-Arikan A., Zappitelli M., Loftis L. L., Wasburn K. K., Jefferson L. S., Goldstein S. L. Modified RIFLE criteria in critically ill children with acute kidney injury. *Kidney Int* 2007; 71(10): 1028–1035.
2. Akrawinthawong K., Ricci J., Cannon L., Dixon S., Kupfer K., Stivers D., Alexander P., David S., McCullough P. A. Subclinical and clinical contrast-induced acute kidney injury: data from a novel blood marker for determining the risk of developing contrast-induced nephropathy (ENCINO), a prospective study. *Ren Fail* 2015; 37(2): 187–191.
3. American College of Radiology. *ACR Manual on Contrast Media. Version 9*. 2013. Contrast-induced nephrotoxicity; pp. 33–42. Available at: <http://aegysgroup.com/wp-content/uploads/2014/03/170675431-2013-Contrast-Media-ACR-v-9>.
4. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 2013, 36(Suppl. 1): S11–S66.
5. Armitage P., Berry G., Matthews J. N. S. *Statistical methods in medical research* 4 ed. England: Oxford; Malden M. A.: Blackwell Science, 2002.
6. Arthur J. M., Hill E. G., Alge J. L., Lewis E. C., Neely B. A., Janech M. G., Tumlin J. A., Chawla L. S., Shaw A. D.; SAKInet Investigators. Evaluation of 32 urine biomarkers to predict the progression of acute kidney injury after cardiac surgery. *Kidney Int* 2014; 85(2): 431–438.
7. Asada T., Isshiki R., Hayase N., Sumida M., Inokuchi R., Noiri E., Nangaku M., Yahagi N., Doi K. Impact of clinical context on acute kidney injury biomarker performances: differences between neutrophil gelatinase-associated lipocalin and L-type fatty acid-binding protein. *Sci Rep* 2016; 6: 33077.
8. Au V., Feit J., Barasch J., Sladen R. N., Wagener G. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) distinguishes sustained from transient acute kidney injury after general surgery. *Kidney Int Rep* 2016; 1(1): 3–9.
9. Babic N., Larson T. S., Grebe S. K., Turner S. T., Kumar R., Singh R. J. Application of liquid chromatography-mass spectrometry technology for early detection of microalbuminuria in patients with kidney disease. *Clin Chem* 2006; 52(11): 2155–2157.
10. Bachmann L. M., Nilsson G., Bruns D. E., McQueen M. J., Lieske J. C., Zakowski J. J., Miller W. G. State of the art for measurement of urine albumin: comparison of routine measurement procedures to isotope dilution tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2014; 60(3): 471–480.
11. Bachorzewska-Gajewska H., Malyszko J., Sitniewska E., Malyszko J. S., Pawlak K., Mysliwiec M., Lawnicki S., Szmitkowski M., Dobrzycki S. Could neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and cystatin C predict the development of contrast-induced nephropathy after percutaneous coronary interventions in patients with stable angina and normal serum creatinine values? *Kidney Blood Press Res* 2007; 30(6): 408–415.
12. Bachorzewska-Gajewska H., Malyszko J., Sitniewska E., Malyszko J. S., Dobrzycki S. Neutrophil-gelatinase-associated lipocalin and renal function after percutaneous coronary interventions. *Am J Nephrol* 2006; 26(3): 287–292.
13. Bansal N., Carpenter M. A., Weiner D. E., Levey A. S., Pfeffer M., Kusek J. W., Cai J., Hunsicker L. G., Park M., Bennett M., Liu K. D., Hsu C. Y. Urine injury

- biomarkers and risk of adverse outcomes in recipients of prevalent kidney transplants: the folic acid for vascular outcome reduction in transplantation trial. *J Am Soc Nephrol* 2016; 27(7): 2109–2121.
14. Barrett B. J., Parfrey P. S. Clinical practice. Preventing nephropathy induced by contrast medium. *N Engl J Med* 2006; 354(4): 379–386.
 15. Beetham R., Dawney A., Ghany C., Dubrey S., Miles J. A radioimmunoassay for human urinary prealbumin. *Ann Clin Biochem* 1993; 30(4): 377–382.
 16. Bennett M., Dent C. L., Ma Q., Dastrala S., Grenier F., Workman R., Syed H., Ali S., Barasch J., Devarajan P. Urine NGAL predicts severity of acute kidney injury after cardiac surgery: a prospective study. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3(3): 665–673.
 17. Benzer M., Alpay H., Baykan Ö., Erdem A., Demir I. H. Serum NGAL, cystatin C and urinary NAG measurements for early diagnosis of contrast-induced nephropathy in children. *Ren Fail* 2016; 38(1): 27–34.
 18. Berger-Rosenthal S., Marggraf G., Hüsing J., Göring F., Pietruck F., Janssen O., Philipp T., Kribben A. Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney Int* 2004; 66(3): 1115–1122.
 19. Björk J., Bäck S. E., Sterner G., Carlson J., Lindstrom V., Bakoush O., Simonsson P., Grubb A., Nyman U. Prediction of relative glomerular filtration rate in adults: new improved equations based on Swedish caucasians and standardized plasma-creatinine assays. *Scand J Clin Lab Invest* 2007; 67(7): 678–695.
 20. Björk J., Bäck S. E., Ebert N., Evans M., Grubb A., Hansson M., Jones I., Lamb E. J., Martus P., Schaeffner E., Sjöström P., Nyman U. GFR estimation based on standardized creatinine and cystatin C: a European multicenter analysis in older adults. *Clin Chem Lab Med* 2018; 56(3): 422–435.
 21. Björk J., Grubb A., Sterner G., Nyman U. Revised equations for estimating glomerular filtration rate based on the Lund-Malmö Study cohort. *Scand J Clin Lab Invest* 2011; 71(3): 232–239.
 22. Bolignano D., Coppolino G., Campo S., Aloisi C., Nicocia G., Frisina N., Buemi M. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is associated with severity of renal disease in proteinuric patients. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23(1), 414–416.
 23. Bolignano D., Lacquaniti A., Coppolino G., Campo S., Arena A., Buemi M. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin reflects the severity of renal impairment in subjects affected by chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res* 2008; 31(4): 255–258.
 24. Bolignano D., Lacquaniti A., Coppolino G., Donato V., Campo S., Fazio M. R., 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.
 25. Bolignano D., Lacquaniti A., Coppolino G., Donato V., Fazio M. R., Nicocia G., Buemi M. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as an early biomarker of nephropathy in diabetic patients. *Kidney Blood Press Res* 2009; 32(2): 91–98.
 26. Bolisetty S., Agarwal A. Urine albumin as a biomarker in acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; 300(3): 626–627.

27. Bong J. J., Seol M. B., Kim H. H., Han O., Back K., Baik M. The 24p3 gene is induced during involution of the mammary gland and induces apoptosis of mammary epithelial cells. *Mol Cells* 2004; 17(1), 29–34.
28. Bonventre J. V., Weinberg J. M. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(8): 2199–2210.
29. Boord J. B., Fazio S., Linton M. F. Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: emerging roles in metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13(2): 141–147.
30. Brinkman J. W., Bakker S. J., Gansevoort R. T., Hillege H. L., Kema I. P., Gans R. O., De Jong P. E., De Zeeuw D. Which method for quantifying urinary albumin excretion gives what outcome? A comparison of immunonephelometry with HPLC. *Kidney Int* 2004; Suppl. 92: S69-S75.
31. Brivet F. G., Kleinknecht D. J., Loirat P., Landais P. J. Acute renal failure in intensive care units-causes, outcome, and prognostic factors of hospital mortality; a prospective, multicenter study. French Study Group on Acute Renal Failure. *Crit Care Med* 1996; 24(2): 192–198.
32. Brooks C. R., Yeung M. Y., Brooks Y. S., Chen H., Ichimura T., Henderson J. M., Bonventre J. V. KIM-1-/TIM-1-mediated phagocytosis links ATG5-/ULK1-dependent clearance of apoptotic cells to antigen presentation. *EMBO J* 2015; 34(19): 2441–2464.
33. Bu D. X., Hemdahl A. L., Gabrielsen A., Fuxe J., Zhu Ch., Ericsson P., Yan Z. Q. Induction of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in vascular injury via activation of nuclear factor-kappa B. *Am J Pathol* 2006; 169(6): 2245–2253.
34. Burne M. J., Panagiotopoulos S., Jerums G., Comper W. D. Alterations in renal degradation of albumin in early experimental diabetes in the rat: a new factor in the mechanism of albuminuria. *Clin Sci* 1998; 95(1): 67–72.
35. Cauty A., Ripley B. D. Boot: Bootstrap R (S-Plus) Functions, R package version 1.3-18, 2016.
36. Carpenter J., Bithell J. Bootstrap confidence intervals: when, which, what? A practical guide for medical statisticians. *Stat Med* 2000; 19(9): 1141–1164.
37. Carraro M., Mancini W., Artero M., Stacul F., Grotto M., Cova M., Faccini L. Dose effect of nitrendipine on urinary enzymes and microproteins following non-ionic radiocontrast administration. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11(3): 444–448.
38. Cecchi E., Avveduto G., D'Alfonso M. G., Terreni A., Gelera E., Caldini A., Giglioli C. Cystatin C, but not urinary or serum NGAL, may be associated with contrast induced nephropathy after percutaneous coronary invasive procedures: A single center experience on a limited number of patients. *Acta Med Acad* 2017; 46(1): 34–43.
39. Clavant S. P., Sastra S. A., Osicka T. M., Comper W. D. The analysis and characterisation of immuno-unreactive urinary albumin in healthy volunteers. *Clin Biochem* 2006; 39(2): 143–151.
40. Comper W. D., Jerums G., Osicka T. M. Differences in urinary albumin detected by four immunoassays and high-performance liquid chromatography. *Clin Biochem* 2004; 37(2): 105–111.
41. Comper W. D., Osicka T. M. Albumin-like material in urine. *Kidney Int* 2004; Suppl. 92: S65–S66.

42. Comper W. D., Osicka T. M., Clark M., MacIsaac R. J., Jerums G. Earlier detection of microalbuminuria in diabetic patients using a new urinary albumin assay. *Kidney Int* 2004; 65(5): 1850–1855.
43. Comper W. D., Osicka T. M., Jerums G. High prevalence of immuno-unreactive intact albumin in urine of diabetic patients. *Am J Kidney Dis* 2003; 41(2): 336–342.
44. Connolly M., Kinnin M., McEneaney D., Menown I., Kurth M., Lamont J., Morgan N., Harbinson M. Prediction of contrast induced acute kidney injury using novel biomarkers following contrast coronary angiography. *QJM* 2018; 111(2): 103–110.
45. Counahan R., Chantler C., Ghazali S., Kirkwood B., Rose F., Barratt T. M. Estimation of glomerular filtration rate from plasma creatinine concentration in children. *Arch Dis Child* 1976; 51(11): 875–878.
46. Cowland J. B., Borregaard N. Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. *Genomics* 1997; 45(1): 17–23.
47. Cowland J. B., Sørensen O. E., Sehested M., Borregaard N. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is up-regulated in human epithelial cells by IL-1 beta, but not by TNF-alpha. *J Immunol* 2003; 171(12): 6630–6639.
48. Cui L. Y., Zhu X., Yang S., Zhou J. S., Zhang H. X., Liu L., Zhang J. Prognostic value of levels of urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin and interleukin-18 in patients with delayed graft function after kidney transplantation. *Transplant Proc* 2015; 47(10): 2846–2851.
49. Davidson A. C., Hinkley D. V. Bootstrap methods and their application. 1997, Cambridge University Press, Cambridge. UK. ISBN 0-521-57391-2. Book DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/CBO9780511802843>.
50. Delanaye P., Ebert N., Melsom T., Gaspari F., Mariat Ch., Cavalier E., Björk J., Christensson A., Nyman U., Porrini E., Remuzzi G., Ruggenenti P., Schaeffner E., Soveri I., Sterner G., Eriksen B. O., Bäck S. E. Iohexol plasma clearance for measuring glomerular filtration rate in clinical practice and research: a review. Part 1: How to measure glomerular filtration rate with iohexol? *Clin Kidney J* 2016; 9(5): 682–699.
51. Dent C. L., Ma Q., Dastrala S., Bennett M., Mitsnefes M. M., Barasch J., Devarajan P. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin predicts acute kidney injury, morbidity and mortality after pediatric cardiac surgery: a prospective uncontrolled cohort study. *Crit Care* 2007; 11(6): 127–134.
52. Devarajan P. Emerging urinary biomarkers in the diagnosis of acute kidney injury. *Expert Opin Med Diag* 2008; 2(4): 387–398.
53. Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a promising biomarker for human acute kidney injury. *Biomark Med* 2010; 4(2): 265–280.
54. Devarajan P. Review: neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a troponin-like biomarker for human acute kidney injury. *Nephrology (Carlton)* 2010; 15(4): 419–428.
55. Devireddy L. R., Gazin C., Zhu X., Green M. R. A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell* 2005; 123(7): 1293–1305.
56. Devoto G., Gallo F., Marchello C., Racchi O., Garbarini R., Bonassi S., Albalustri G., Haupt E. Prealbumin serum concentrations as a useful tool in the assessment of malnutrition in hospitalized patients. *Clin Chem* 2006; 52(12): 2281–2285.

57. Ding H., He Y., Li K., Yang J., Li X., Lu R., Gao W. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is an early biomarker for renal tubulointerstitial injury in IgA nephropathy. *Clin Immunol* 2007; 123(2): 227–234.
58. Doi K., Noiri E., Sugaya T. Urinary L-type fatty acid-binding protein as a new renal biomarker in critical care. *Curr Opin Crit Care* 2010; 16(6): 545–549.
59. Draper D. W., Bethea H. N., He Y. W. Toll-like receptor 2-dependent and -independent activation of macrophages by group B streptococci. *Immunol Lett* 2006; 102(2): 202–214.
60. Edelstein Ch. L. Biomarkers of acute kidney injury. *Adv Chronic Kidney Dis* 2008; 15(3): 222–234.
61. Endre Z. H., Pickering J. W., Walker R. J., Devarajan P., Edelstein Ch. L., Bonventre J. V., Frampton Ch. M., Bennett M. R., Ma Q., Venkata S. Sabbiseti V. S., Vishal S., Vaidya V. S., Walcher A. M., Shaw G. M., Henderson S. J., Nejat M., Schollum J. B. W., Georgie P. M. Improved performance of urinary biomarkers of acute kidney injury in the critically ill by stratification for injury duration and baseline renal function. *Kidney Int* 2011; 79(10): 1119–1130.
62. Eppel G. A., Nagy S., Jenkins M. A., Tudball R. N., Daskalakis M., Balazs N. D. H., Comper W. D. Variability of standard clinical protein assays in the analysis of a model urine solution of fragmented albumin. *Clin Biochem* 2000; 33(6): 487–494.
63. Fernández C. A., Yan L., Louis G., Yang J., Kutok J. L., Moses M. A. The matrix metalloproteinase-9/ neutrophil gelatinase-associated lipocalin complex plays a role in breast tumor growth and is present in the urine of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005; 11(15): 5390–5395.
64. Field M., Dronavalli V., Mistry P., Drayson M., Ready A., Cobbold M., Inston N. Urinary biomarkers of acute kidney injury in deceased organ donors – kidney injury molecule-1 as an adjunct to predicting outcome. *Clin Transplant* 2014; 28: 808–815.
65. Flo T. H., Smith K. D., Sato S., Rodriguez D. J., Holmes M. A., Strong R. K., Akira S., Aderem A. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 2004; 432(7019): 917–921.
66. Flower D. R. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* 1996; 318(1): 1–14.
67. Flower D. R., North A. C., Attwood T. K. Structure and sequence relationships in the lipocalins and related proteins. *Protein Sci* 1993; 2(5): 753–761.
68. Folkesson M., Kazi M., Zhu C., Silveira A., Hemdahl A. L., Hamsten A., Hedin U., Swedenborg J., Eriksson P. Presence of NGAL/MMP-9 complexes in human abdominal aortic aneurysms. *Thromb Haemost* 2007; 98(2): 427–433.
69. Fořtová M., Klapková E., Průša R. Analytická úskalí při stanovení albuminurie vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. *Labor aktuell* 2010; 4: 24–27.
70. Fořtová M., Klapková E., Průša R. Stanovení albuminurie – porovnání imunoturbidimetrické metody a vysokoúčinné kapalinové chromatografie. *Klin Biochem Metab* 2012; 20(41): 216–221.
71. Fořtová M., Klapková E., Průša R., Dusilová Sulková S., Tesař V. Stanovení albuminurie vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií – ano či ne? *Aktual Nefrol* 2010; 16(1): 20–26.

72. Fořtová M., Lejsek J., Pechová M., Průša R. Vyšetření neutrofilního s gelatinázou asociovaného lipokalínu v moči po kardiochirurgických výkonech u dospělých pacientů. *Aktual Nefrol* 2011; 17(4): 136–141.
73. Friedecký B. Známé skutečný stav analytické kvality základních biochemických markerů? Albumin v moči a lipidy v krvi jako příklady. *Klin Biochem Metab* 2015; 23(4): 198–199.
74. Friedecký B., Buryška J., Franeková J., Jabor A., Pelikánová T., Škrha J., Vávrová J. Laboratorní diagnostika a sledování stavu diabetes mellitus. *Klin Biochem Metab* 2006; 1(11): 54–65.
75. Friedecký B., Kratochvíla J. Harmonizace laboratorních vyšetření u diabetu. Stav v roce 2016. *FONS* 2017; 27(1): 14–17.
76. Friedl A., Stoesz S. P., Buckley P., Gould M. N. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in normal and neoplastic human tissues. Cell type-specific pattern of expression. *Histochem J* 1999; 31(7): 433–441.
77. Gan S. L., Chia S. E., Chio L. F., Chan O. Y., Kwok S. F. Urinary beta 2- and alpha 1-microglobulin levels in normal subjects in Singapore. *Occup Med (Lond)* 1994; 44(4): 195–200.
78. Gerlichová M., Černý V., Dostál P., Živný P. Hodnocení spolehlivosti Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin jako markeru renální dysfunkce v kardiochirurgii dospělých – prospektivní studie. *Anest intenziv Med* 2008; 19(6): 297–303.
79. Glatz J. F., Van Der Vusse G. J. Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance. *Prog Lipid Res* 1996; 35(3): 243–282.
80. Goetz D. H., Holmes M. A., Borregaard N., Bluhm M. E., Raymond K. N., Strong R. K. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell* 2002; 10(5): 1033–1043.
81. Goldstein S. L. Urinary kidney injury biomarkers and urine creatinine normalization: a false premise or not? *Kidney Int* 2010; 78(5): 433–435.
82. Gracie J. A., Robertson S. E., McInnes I. B. Interleukin-18. *J Leukoc Biol* 2003; 73(2): 213–224.
83. Graziani M. S., Plebani M. The standardization of the urine albumin assays: no longer deferrable. *Clin Chem Lab Med* 2015; 53(11): 1657–1659.
84. Greenberg J. H., Zappitelli M., Jia Y., Thiessen-Philbrook H. R., De Fontnouvelle C. A., Wilson F. P., Coca S., Devarajan P., Parikh C. R. Biomarkers of AKI progression after pediatric cardiac surgery. *J Am Soc Nephrol* 2018; 29(5):1549–1556.
85. Greenland P., Alpert J. S., Beller G. A., Benjamin E. J., Budoff M. J., Fayad Z. A., Foster E., Hlatky M. A., Hodgson J. M., Kushner F. G., Lauer M. S., Shaw L. J., Smith S. C. Jr., Taylor A. J., Weintraub W. S., Wenger N. K., Jacobs A. K., Smith S. C. Jr., Anderson J. L., Albert N., Buller C. E., Creager M. A., Ettinger S. M., Guyton R. A., Halperin J. L., Hochman J. S., Kushner F. G., Nishimura R., Ohman E. M., Page R. L., Stevenson W. G., Tarkington L. G., Yancy C. W.; American College of Cardiology Foundation; American Heart Association. 2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2010; 56(25): e50–103.

86. Grubb A., Horio M., Hansson L. O., Björk J., Nyman U., Flodin M., Larsson A., Bökenkamp A., Yasuda Y., Blufpand H., Lindström V., Zegers I., Althaus H., Blirup-Jensen S., Itoh Y., Sjöström P., Nordin G., Christensson A., Klima H., Sunde K., Hjort-Christensen P., Armbruster D., Ferrero C. Generation of a new cystatin C-based estimating equation for glomerular filtration rate by use of 7 assays standardized to the international calibrator. *Clin Chem* 2014; 60(7): 974–986.
87. Haase M., Bellomo R., Devarajan P., Schlattmann P., Haase-Fielitz A.; the NGAL Meta-analysis Investigator Group. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 2009; 54(6): 1012–1024.
88. Haase M., Bellomo R., Story D., Davenport P., Haase-Fielitz A. Urinary interleukin-18 does not predict acute kidney injury after adult cardiac surgery: a prospective observational cohort study. *Crit Care* 2008; 12(4): R96.
89. Hall I. E., Yarlagadda S. G., Coca S. G., Wang Z., Doshi M., Devarajan P., Han W. K., Marcus R. J., Parikh C. R. IL-18 and urinary NGAL predict dialysis and graft recovery after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21(1): 189–197.
90. Hamed H. M., El-Sherbini S. A., Barakat N. A., Farid T. M., Rasheed E. A. Serum cystatin C is a poor biomarker for diagnosing acute kidney injury in critically-ill children. *Indian J Crit Care Med* 2013; 17(2): 92–98.
91. Han W. K., Bailly V., Abichandani R., Thadhani R., Bonventre J. V. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int* 2002; 62(1):237–244.
92. Han W. K., Wagener G., Zhu Y., Wang S., Lee H. T. Urinary biomarkers in the early detection of acute kidney injury after cardiac surgery. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4(5): 873–882.
93. Hazle M. A., Gajarski R. J., Aiyagari R., Yu S., Abraham A., Donohue J., Blatt N. B. Urinary biomarkers and renal near-infrared spectroscopy predict intensive care unit outcomes after cardiac surgery in infants younger than 6 months of age. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2013; 146(4): 861–867.
94. Hekerman P., Zeidler J., Korfmacher S., Bamberg-Lemper S., Knobelspies H., Zabeau L., Tavernier J., Becker W. Leptin induces inflammation-related genes in RINm5F insulinoma cells. *BMC Mol Biol* 2007; 8: 41.
95. Helmersson-Karlqvist J., Arnlöv J., Larsson A. Day-to-day variation of urinary NGAL and rational for creatinine correction. *Clin Biochem* 2013; 46(1–2): 70–72.
96. Hemdahl A. L., Gabrielsen A., Zhu C., Eriksson P., Hedin U., Kastrup J., Thorén P., Hansson G. K. Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in atherosclerosis and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26(1): 136–142.
97. Heyne N., Kemmner S., Schneider C., Nadalin S., Königsrainer A., Häring H. U. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin accurately detects acute allograft rejection among other causes of acute kidney injury in renal allograft recipients. *Transplantation* 2012; 93(12): 1252–1257.
98. Hilliard L. M., Russo L. M., Comper W. D. Hypertension-mediated albuminuria is associated with reduced lysosomal activity in the kidney and the heart. *Am J Nephrol* 2009; 29(5): 454–464.

99. Hilliard L. M., Osicka T. M., Clavant S. P., Robinson P. J., Nikolic-Paterson D. J., Comper W. D. Characterization of the urinary albumin degradation pathway in the isolated perfused rat kidney. *J Lab Clinical Med* 2006; 147(1): 36–44.
100. Hirsch R., Dent C., Pfriem H., Allen J., Beekman R. H. 3rd, Ma Q., Dastrala S., Bennett M., Mitsnefes M., Devarajan P. NGAL is an early predictive biomarker of contrast-induced nephropathy in children. *Pediatr Nephrol* 2007; 22(12): 2089–2095.
101. Hiruma T., Asada T., Yamamoto M., Inokuchi R., Matsubara T., Ishii T., Sumida M., Isshiki R., Mayumi K., Noiri E., Nangaku M., Yahagi N., Doi K. Mortality prediction by acute kidney injury biomarkers in comparison with serum creatinine. *Biomarkers* 2014; 19(8): 646–651.
102. Hishikari K., Hikita H., Nakamura S., Nakagama S., Mizusawa M., Yamamoto T., Doi J., Hayashi Y., Utsugi Y., Araki M., Sudo Y., Kimura S., Takahashi A., Ashikaga T., Isobe M. Urinary liver-type fatty acid-binding protein level as a predictive biomarker of acute kidney injury in patients with acute decompensated heart failure. *Cardiorenal Med* 2017; 7(4): 267–275.
103. Ho J., Tangri N., Komenda P., Kaushal A., Sood M., Brar R., Gill K., Walker S., MacDonald K., Hiebert B. M., Arora R. C., Rigatto C. Urinary, plasma, and serum biomarkers' utility for predicting acute kidney injury associated with cardiac surgery in adults: a meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 2015; 66(6): 993–1005.
104. Hofstra J. M., Deegens J. K., Steenbergen E. J., Wetzels J. F. Urinary excretion of fatty acid-binding proteins in idiopathic membranous nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23(10): 3160–3165.
105. Hogan M. NGAL's predictive performance varied with baseline kidney function in post-hoc analysis. *Nephrology Times* 2010; 3(3): 8–10.
106. Honore P. M., Joannes-Boyau O., Boer W. The early biomarker of acute kidney injury: in search of the Holy Grail. *Intensive Care Med* 2007; 33(11): 1866–1868.
107. Huo W., Zhang K., Nie Z., Li Q., Jin F. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a novel kidney-specific injury molecule playing potential double-edged functions in kidney injury. *Transplant Rev (Orlando)* 2010; 24(3): 143–146.
108. Hvidberg V., Jacobsen C., Strong R. K., Cowland J. B., Moestrup S. K., Borregaard N. The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Lett* 2005; 579(3): 773–777.
109. Chertow G. M., Burdick E., Honour M., Bonventre J. V., Bates D. W. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16(11): 3365–3370.
110. Chertow G. M., Soroko S. H., Paganini E. P., Cho K. C., Himmelfarb J., Ikizler T. A., Mehta R. L. Mortality after acute renal failure: models for prognostic stratification and risk adjustment. *Kidney Int* 2006; 70(6): 1120–1126.
111. Ichimura T., Bonventre J. V., Bailly V., Wei H., Hession C. A., Cate R. L., Sanicola M. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem* 1998; 273(7): 4135–4142.
112. Jabor A. Rovnice Lund-Malmö pro odhad glomerulární filtrace. *FONS* 2010; 20(2): 37–38.

113. Jabor A., Straka L., Franeková J. Několik poznámek k současnému pohledu na určování eGFR. *FONS* 2009; 19(3): 27–28.
114. Jacobson B. E., Secombe D. W., Katayev A., Levin A. A study examining the bias of albumin and albumin/creatinine ratio measurements in urine. *Clin Chem Lab Med* 2015; 53(11): 1737–1743.
115. Jayaraman A., Roberts K. A., Yoon J., Yarmush D. M., Duan X., Lee K., Yarmush M. L. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a discriminatory marker of the hepatocyte-secreted protein response to IL-1beta: a proteomic analysis. *Biotechnol Bioeng* 2005; 91(4): 502–515.
116. Jefferies J. L., Devarajan P. Early detection of acute kidney injury after pediatric cardiac surgery. *Prog Pediatr Cardiol* 2016; 41: 9–16.
117. Ji M., Lee Y. H., Hur M., Kim H., Cho H. I., Yang H. S., Navarin S., Di Somma S.; GREAT Network. Comparing results of five glomerular filtration rate-estimating equations in the Korean general population: MDRD Study, revised Lund-Malmö, and three CKD-EPI equations. *Ann Lab Med* 2016; 36(6): 521–528.
118. Jiang C., Qi C., Sun K., Xia L., Xue W., Huang Y. Diagnostic value of *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase for the early prediction of acute kidney injury after percutaneous nephrolithotripsy. *Exp Ther Med* 2013; 5(1): 197–200.
119. Kamijo A., Kimura K., Sugaya T., Yamanouchi M., Hikawa A., Hirano N., Hirata Y., Goto A., Omata M. Urinary fatty acid binding protein as a new clinical marker for the progression of chronic renal disease. *Trans Res* 2004; 143(1): 23–30.
120. Kania K., Byrnes E. A., Beilby J. P., Webb S. A., Strong K. J. Urinary proteases degrade albumin: implications for measurement of albuminuria in stored samples. *Ann Clin Biochem* 2010; 47(2): 151–157.
121. Katagiri D., Doi K., Honda K., Negishi K., Fujita T., Hisagi M., Ono M., Matsubara T., Yahagi N., Iwagami M., Ohtake T., Kobayashi S., Sugaya T., Noiri E. Combination of two urinary biomarkers predicts acute kidney injury after adult cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 2012; 93(2): 577–583.
122. Kato K., Sato N., Yamamoto T., Iwasaki Y. K., Tanaka K., Mizuno K. Valuable markers for contrast-induced nephropathy in patients undergoing cardiac catheterization. *Circ J* 2008; 72(9): 1499–1505.
123. Kaufman J., Dhakal M., Patel B., Hamburger R. Community-acquired acute renal failure. *Am J Kidney Dis* 1991; 17(2): 191–198.
124. Kawai A., Kusaka M., Kitagawa F., Ishii J., Fukami N., Maruyama T., Sasaki H., Shiroki R., Kurahashi H., Hoshinaga K. Serum liver-type fatty acid-binding protein predicts recovery of graft function after kidney transplantation from donors after cardiac death. *Clin Transplant* 2014; 28(6): 749–754.
125. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int* 2013; Suppl. 3: 1–150.
126. Kjeldsen L., Johnsen A. H., Sengeløv H., Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *Biol Chem* 1993; 268(14): 10425–10432.

127. Kjeldsen L., Sengeløv H., Lollike K., Nielsen M. H., Borregaard N. Isolation and characterization of gelatinase granules from human neutrophils. *Blood* 1994; 83(6): 1640–1649.
128. Klapkova E., Fortova M., Prusa R., Moravcova L., Kotaska K. Determination of urine albumin by new simple high-performance liquid chromatography method. *J Clin Lab Anal* 2016; 30(6): 1226–1231.
129. Kohei J., Ishida H., Tanabe K., Tsuchiya K., Nitta K. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a sensitive biomarker for the early diagnosis of acute rejection after living-donor kidney transplantation. *Int Urol Nephrol* 2013; 45(4): 1159–1167.
130. Koo T. Y., Jeong J. C., Lee Y., Ko K. P., Lee K. B., Lee S., Park S. J., Park J. B., Han M., Lim H. J., Ahn C., Yang J. Pre-transplant evaluation of donor urinary biomarkers can predict reduced graft function after deceased donor kidney transplantation. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95(11):e3076.
131. Koyner J. L., Garg A. X., Coca S. G., Sint K., Thiessen-Philbrook H., Patel U. D., Shlipak M. G., Parikh C. R.; TRIBE-AKI Consortium. Biomarkers predict progression of acute kidney injury after cardiac surgery. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23(5): 905–914.
132. Krawczeski C. D., Goldstein S. L., Woo J. G., Wang Y., Piyaphanee N., Ma Q., Bennett M., Devarajan P. Temporal relationship and predictive value of urinary acute kidney injury biomarkers after pediatric cardiopulmonary bypass. *J Am Coll Cardiol* 2011; 58(22): 2301–2309.
133. Krusová D., Ševela K. Kontrastní látkou indukovaná nefropatie. *Vnitř Lék* 2006; 52(9): 805–811.
134. Lamb E. J., Stevens P. E. Výpočet a měření glomerulární filtrace-metody měření a markery hodnocení. *Curr Opin Nephrol Hypertens/CZ* 2014; 8(2): 32–39.
135. Lameire N., Hoste E. Reflections on the definition, classification, and diagnostic evaluation of acute renal failure. *Curr Opin Crit Care* 2004; 10(6): 468–475.
136. Lautin E. M., Freeman N. J., Schoenfeld A. H., Bakal C. W., Haramati N., Friedman A. C., Lautin J. L., Braha S., Kadish E. G., Sprayregen S. Radiocontrast-associated renal dysfunction: Incidence and risk factors. *Am J Roentgenol* 1991; 157(1): 49–58.
137. Lee E. Y., Kim M. S., Park Y., Kim H. S. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin and interleukin-18 as predictive biomarkers for delayed graft function after kidney transplantation. *J Clin Lab Anal* 2012; 26(4): 295–301.
138. Levey A. S., Berg R. L., Gassman J. J., Hall P. M., Walker W. G. Creatinine filtration, secretion and excretion during progressive renal disease. Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study Group. *Kidney Int Suppl* 1989; 27: S73–S80.
139. Levey A. S., Stevens L. A., Schmid C. H., Zhang Y. L., Castro A. F. 3rd, Feldman H. I., Kusek J. W., Eggers P., Van Lente F., Greene T., Coresh J.; CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009; 150(9): 604–612.
140. Li Y., Zhu M., Xia Q., Wang S., Qian J., Lu R., Che M., Dai H., Wu Q., Ni Z., Lindholm B., Axelsson J., Yan Y. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and L-type fatty acid binding protein as diagnostic markers of early acute kidney injury after liver transplantation. *Biomarkers* 2012; 17(4): 336–342.
141. Liangos O., Tighiouart H., Perianayagam M. C., Kolyada A., Han W. K., Wald R., Bonventre J. V., Jaber B. L. Comparative analysis of urinary biomarkers for early

- detection of acute kidney injury following cardiopulmonary bypass. *Biomarkers* 2009; 14(6): 423–431.
142. Liaño F., Pascual J. Epidemiology of acute renal failure: a prospective, multi-center, community-based study. Madrid Acute Renal Failure Study Group. *Kidney Int* 1996; 50(3): 811–818.
 143. Lieske J. C., Bondar O., Miller W. G., Bachmann L. H., Narva A. S., Itoh Y., Zegers I., Schimmel H., Phinney K., Bunk D. M.; National Kidney Disease Education Program – IFCC Working Group on Standardization of Albumin in Urine (WG-SAU). A reference system for urinary albumin: current status. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51(5): 981–989.
 144. Ling W., Zhaohui N., Ben H., Leyi G., Jianping L., Huili D., Jiaqi Q. Urinary IL-18 and NGAL as early predictive biomarkers in contrast-induced nephropathy after coronary angiography. *Nephron Clin Pract* 2008; 108(3): 176–181.
 145. Liu K. D., Yang W., Anderson A. H., Feldman H. I., Demirjian S., Hamano T., He J., Lash J., Lustigova E., Rosa S. E., Simonson M. S., Tao K., Hsu Ch. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels do not improve risk prediction of progressive chronic kidney disease. *Kidney Int* 2013; 83(5): 909–914.
 146. Liu M., Prisco M., Drakas R., Searles D., Baserga R. 24p3 differentiation of myeloid cells. *J Cell Physiol* 2005; 205(2): 302–309.
 147. Liu Q., Ryon J., Nilsen-Hamilton M. Uterocalin: a mouse acute phase protein expressed in the uterus around birth. *Mol Reprod Dev* 1997; 46(4): 507–514.
 148. Lobato G. R., Lobato M. R., Thomé F. S., Veronese F. V. Performance of urinary kidney injury molecule-1, neutrophil gelatinase-associated lipocalin, and *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase to predict chronic kidney disease progression and adverse outcomes. *Braz J Med Biol Res* 2017; 50(5): e6106.
 149. Luo Q. H., Chen M. L., Sun F. J., Chen Z. L., Li M. Y., Zeng W., Gong L., Cheng A. C., Peng X., Fang J., Tang L., Geng Y. KIM-1 and NGAL as biomarkers of nephrotoxicity induced by gentamicin in rats. *Mol Cell Biochem* 2014; 397(1–2): 53–60.
 150. Madyoon H., Croushore L., Weaver D., Mathur V. Use of fenoldopam to prevent radiocontrast nephropathy in high-risk patients. *Catheter Cardiovasc Interv* 2001; 53(3): 341–345.
 151. Magliano D. J., Polkinghorne K. R., Barr E. L. M., Su Q., Chadban S. J., Zimmet P. Z., Shaw J. E., Atkins R. C. HPLC-detected albuminuria predicts mortality. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18(12): 3171–3176.
 152. Mallbris L., O'Brien K. P., Hulthén A., Sandstedt B., Cowland J. B., Borregaard N., Ståhle-Bäckdahl M. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a marker for dysregulated keratinocyte differentiation in human skin. *Exp Dermatol* 2002; 11(6): 584–591.
 153. Malyszko J., Lukaszuk E., Glowinska I., Durluk M. Biomarkers of delayed graft function as a form of acute kidney injury in kidney transplantation. *Sci Rep* 2015; 5 (11684): 1–9.
 154. Malyszko J., Koc-Zorawska E., Malyszko J. S., Mysliwiec M. Kidney injury molecule-1 correlates with kidney function in renal allograft recipients. *Transplant Proc* 2010; 42(10): 3957–3959.

155. Mamatov E., Kocaay A. F., Koc M. A., Celebi Z. K., Sengül S., Keven K., Tutkak H., Tuzuner A. Predictive role of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in donor-specific antibody-positive and donor-specific antibody-negative renal transplant patients. *Transplant Proc* 2015; 47(6): 1688–1691.
156. Marcus R. J., Baroody S. C., Joshua C., Sysak J. C., Sureshkumar K. K., Han W. K., Dai D., Nghiem D. D., Duran J. M., Brandys D. E., Oti I. U., Sabiha M., Carpenter B. J., Sandroni S. E. Utility of urinary biomarkers to predict delayed graft function after kidney transplantation [abstract]. *Am J Transplant* 2007; 7: 62.
157. Mårtensson J., Bellomo R. The rise and fall of NGAL in acute kidney injury. *Blood Purif* 2014; 37(4): 304–310.
158. Matsumoto K., Kanmatsuse K. Elevated interleukin-18 levels in the urine of nephrotic patients. *Nephron* 2001; 88(4): 334–339.
159. McCullough P. A., Williams F. J., Stivers D. N., Cannon L., Dixon S., Alexander P., Runyan D., David S. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel marker of contrast nephropathy risk. *Am J Nephrol* 2012; 35(6): 509–514.
160. McIlroy D. R., Wagener G., Lee H. T. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute kidney injury after cardiac surgery: the effect of baseline renal function on diagnostic performance. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5(2): 211–219.
161. McMahan G. M., Waikar S. S. Biomarkers in nephrology. *Am J Kidney Dis* 2013; 62(1): 165–178.
162. McQueen M. J., Gerstein H. C., Pogue J., Mann J. F. E., Yusuf S. Reevaluation by high-performance liquid chromatography: Clinical significance of microalbuminuria in individuals at high risk of cardiovascular disease in the Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study. *Am J Kidney Dis* 2006; 48(6): 889–896.
163. McWilliam S. J., Antoine D. J., Rosalind L., Smyth R. L., Pirmohamed M. Aminoglycoside-induced nephrotoxicity in children. *Pediatr Nephrol* 2017; 32(11): 2015–2025.
164. McWilliam S. J., Antoine D. J., Turner M., Sabbisetti V., Bonventre J. V., Park B. K., Smyth R. L., Pirmohamed M. Urinary KIM-1 as a biomarker of aminoglycoside-induced nephrotoxicity in premature neonates. *Pediatr Res* 2011; 70: 107.
165. Mehran R., Nikolsky E. Contrast-induced nephropathy: definition, epidemiology, and patients at risk. *Kidney Int Suppl* 2006; 100(69): S11–S15.
166. Mehrotra A., Rose C., Pannu N., Gill J., Tonelli M., Gill J. S. Incidence and consequences of acute kidney injury in kidney transplant recipients. *Am J Kidney Dis* 2012; 59(4): 558–565.
167. Mehta R. L., Kellum J. A., Shah S. V., Molitoris B. A., Ronco C., Warnock D. G., Levin A. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* 2007; 11(2): R31.
168. Melnikov V. Y., Ecder T., Fantuzzi G., Siegmund B., Lucia M. S., Dinarello C. A., Schrier R. W., Edelstein C. L. Impaired IL-18 processing protects caspase-1 deficient mice from ischemic acute renal failure. *J Clin Invest* 2001; 107(9): 1145–1152.

169. Miharada K., Hiroyama T., Sudo K., Nagasawa T., Nakamura Y. Lipocalin 2 functions as a negative regulator of red blood cell production in an autocrine fashion. *FASEB J* 2005; 19(13): 1881–1883.
170. Miller W. G., Bruns D. E. Laboratory issues in measuring and reporting urine albumin. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24(3): 717–718.
171. Miller W. G., Bruns D. E., Hortin G. L., Sandberg S., Aakre K. M., McQueen M. J., Itoh Y., Lieske J. C., Seccombe D. W., Jones G., Bunk D. M., Curhan G. C., Narva A. S. Current issues in measurement and reporting of urinary albumin excretion. *Clin Chem* 2009; 55(1): 24–38.
172. Mishra J., Dent C., Tarabishi R., Mitsnefes M. M., Ma Q., Kelly C., Ruff S. M., Zahedi K., Shao M., Bean J., Mori K., Barasch J., Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* 2005; 365(9466): 1231–1238.
173. Mishra J., Ma Q., Prada A., Mitsnefes M., Zahedi K., Yang J., Barasch J., Devarajan P. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(10): 2534–2543.
174. Mitch W. E., Collier V. U., Walser M. Creatinine metabolism in chronic renal failure. *Clin Sci (Lond)* 1980; 58: 327–335.
175. Mittal P., Varma C. M., Thakur R., Bhardwaz R. P. S., Ahmad M., Bansal R. K., Pandey U., Sinha S. K., Kumar P. Microalbuminuria as a risk factor for contrast-induced nephropathy. *Indian Heart J* 2014; 66, Suppl.2: S100.
176. Mohammed N. M. A., Mahfouz A., Achkar K., Rafie I. M., Hajar R. Contrast-induced Nephropathy. *Heart Views* 2013; 14(3): 106–116.
177. Mojtahedzadeh M., Etezadi F., Motaharinia J., Najafi Abrandabadi A. H., Mehraei A., Ziaie S., Spadat S. Predictive values of urinary interleukin 18 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin for delayed graft function diagnosis in kidney transplantation. *Iran J Pathol* 2016; 11(4): 391–398.
178. Monhart V. Diabetes mellitus, hypertenze a ledviny. *Vnitř Lék* 2008; 54(5): 499–507.
179. Mori K., Lee H. T., Rapoport D., Ian R., Drexler I. R., Foster K., Yang J., Schmidt-Ott K. M., Chen X., Li J. Y., Weiss S., Mishra J., Cheema F. H., Markowitz G., Suganami T., Sawai K., Mukoyama M., Kunis Ch., D'Agati V., Devarajan P., Barasch J. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest* 2005; 115(3): 610–621.
180. Mori K., Nakao K. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. *Kidney Int* 2007; 71(10): 967–970.
181. Moriyama T., Hagihara S., Shiramomo T., Nagaoka M., Iwakawa S., Kanmura Y. Comparison of three early biomarkers for acute kidney injury after cardiac surgery under cardiopulmonary bypass. *J Intensive Care* 2016; 4: 41.
182. Moura E. L. B., Amorim F. F., Huang W., Maia M. O. Contrast-induced acute kidney injury: the importance of diagnostic criteria for establishing prevalence and prognosis in the intensive care unit. *Rev Bras Ter Intensiva* 2017; 29(3): 303–309.
183. Murray P. T., Mehta R. L., Shaw A., Ronco C., Endre Z., Kellum J. A., Chabla L., Cruz D., Ince C., Okusa M. Current use of biomarkers in acute kidney injury: report and summary of recommendations from the 10th Acute dialysis quality initiative consensus conference. *Kidney Int* 2014; 85(3): 513–521.

184. Murty M. S. N., Sharma U. K., Pandey V. B., Kankare S. B. Serum cystatin C as a marker of renal function in detection of early acute kidney injury. *Indian J Nephrol* 2013; 23(3): 180–183.
185. Nejat M., Pickering J. W., Walker R. J., Westhuyzen J., Shaw G. M., Frampton Ch. M., Endre Z. H. Urinary cystatin C is diagnostic of acute kidney injury and sepsis, and predicts mortality in the intensive care unit. *Crit Care* 2010; 14(3): R85.
186. Niboshi A., Nishida M., Itoi T., Shiraishi I., Hamaoka K. Renal function and cardiac angiography. *Indian J Pediatr* 2006; 73(1): 49–53.
187. Nickolas T. L., Barasch J., Devarajan P. Biomarkers in acute and chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008; 17(2): 127–132.
188. Nickolas T. L., O'Rourke M. J., Yang J., Sise M. E., Canetta P. A., Barasch N., Buchen C., Khan F., Mori K., Giglio J., Devarajan P., Barasch J. Sensitivity and specificity of a single emergency department measurement of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin for diagnosing acute kidney injury. *Ann Intern Med* 2008; 148(11): 810–819.
189. Nielsen B. S., Borregaard N., Bundgaard J. R., Timshel S., Sehested M., Kjeldsen L. Induction of NGAL synthesis in epithelial cells of human colorectal neoplasia and inflammatory bowel diseases. *Gut* 1996; 38(3): 414–420.
190. Nogare A. L., Dalpiaz T., Veronese F. J. V., Gonçalves L. F., Manfro R. C. Noninvasive analyses of kidney injury molecule-1 messenger RNA in kidney transplant recipients with graft dysfunction. *Transplant Proc* 2012; 44(8): 2297–2299.
191. Nogare A. L., Veronese F. V., Carpio V. N., Montenegro R. M., Pedrosa J. A., Pegas K. L., Gonçalves L. F., Manfro R. C. Kidney injury molecule-1 expression in human kidney transplants with interstitial fibrosis and tubular atrophy. *BMC Nephrol* 2015; 16(19): 1–7.
192. Nozaki Y., Nikolic-Paterson D. J., Yagita H., Akiba H., Holdsworth S. R., Kitching A. R. Tim-1 promotes cisplatin nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; 301(5): 1098–1104.
193. Nyman U., Björk J., Lindström V., Grubb A. The Lund-Malmö creatinine-based glomerular filtration rate prediction equation for adults also performs well in children. *Scand J Clin Lab Invest* 2008; 68(7): 568–576.
194. Nyman U., Grubb A., Larsson A., Hansson L. O., Flodin M., Nordin G., Lindström V., Björk J. The revised Lund-Malmö GFR estimating equation outperforms MDRD and CKD-EPI across GFR, age and BMI intervals in a large Swedish population. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52(6): 815–824.
195. Nymo S. H., Hartford M., Ueland T., Yndestad A., Lorentzen E., Truvé K., Karlsson T., Ravn-Fischer A., Aukrust P., Caidahl K. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) concentration is independently associated with mortality in patients with acute coronary syndrome. *Int J Cardiol* 2018; 262: 79–84.
196. Obata Y., Kamijo-Ikemori A., Ichikawa D., Sugaya T., Kimura K., Shibagaki Y., Tateda T. Clinical usefulness of urinary liver-type fatty-acid-binding protein as a perioperative marker of acute kidney injury in patients undergoing endovascular or open-abdominal aortic aneurysm repair. *J Anesth* 2016; 30(1): 89–99.
197. Ockner R. K. Historic overview of studies on fatty acid-binding proteins. *Mol Cell Biochem* 1990; 98(1–2): 3–9.

198. Orenes-Piñero E., Manzano-Fernández S., López-Cuenca Á., Marín F., Valdés M., Januzzi J. L. β -Trace protein: from GFR marker to cardiovascular risk predictor. *Clin J Am Soc Nephrol* 2013; 8(5): 873–881.
199. Osicka T. M., Comper W. D. Characterization of immunochemically nonreactive urinary albumin. *Clin Chem* 2004; 50(12): 2286–2291.
200. Osicka T. M., Houlihan C. A., Chan J. G., Jerums G., Comper W. D. Albuminuria in patients with type 1 diabetes is directly linked to changes in the lysosome-mediated degradation of albumin during renal passage. *Diabetes* 2000; 49(9): 1579–1584.
201. Padhy M., Kaushik S., Girish M. P., Mohapatra S., Shah S., Koner B. C. Serum neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) and cystatin C as early predictors of contrast-induced acute kidney injury in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Clin Chim Acta* 2014; 435: 48–52.
202. Parikh C. R., Jani A., Melnikov V. Y., Faubel S., Edelstein C. L. Urinary interleukin-18 is a marker of human acute tubular necrosis. *Am J Kidney Dis* 2004; 43(3): 405–414.
203. Parikh C. R., Thiessen-Philbrook H., Garg A. X., Kadiyala D., Shlipak M. G., Koyner J. L., Edelstein Ch. L., Devarajan P., Patel U. D., Zappitelli M., Krawczeski C. D., Passik C. S., Steven G., Coca S. G.; TRIBE-AKI Consortium. Performance of kidney injury molecule-1 and liver fatty acid-binding protein and combined biomarkers of AKI after cardiac surgery. *Clin J Am Soc Nephrol* 2013; 8(7): 1079–1088.
204. Parikh C. R., Devarajan P., Zappitelli M., Sint K., Thiessen-Philbrook H., Li S., Kim R. W., Koyner J. L., Coca S. G., Edelstein C. L., Shlipak M. G., Garg A. X., Krawczeski C. D.; TRIBE-AKI Consortium. Postoperative biomarkers predict acute kidney injury and poor outcomes after pediatric cardiac surgery. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22(9): 1737–1747.
205. Parikh C. R., Hall I. E., Bhangoo R. S., Ficek J., Abt P. L., Thiessen-Philbrook H., Lin H., Bimali M., Murray P. T., Rao V., Schröppel B., Doshi M. D., Weng F. L., Reese P. P. Associations of perfusate biomarkers and pump parameters with delayed graft function and deceased donor kidney allograft function. *Am J Transplant* 2016; 16(5): 1526–1539.
206. Parikh C. R., Jani A., Mishra J., Ma Q., Kelly C., Barasch J., Edelstein C. L., Devarajan P. Urine NGAL and IL-18 are predictive biomarkers for delayed graft function following kidney transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6(7): 1639–1645.
207. Parikh C. R., Mishra J., Thiessen-Philbrook H., Dursun B., Ma Q., Kelly C., Dent C., Devarajan P., Edelstein C. L. Urinary IL-18 is an early predictive biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. *Kidney Int* 2006; 70(1): 199–203.
208. Parr S. K., Clark A. J., Bian A., Shintani A. K., Wickersham N. E., Ware L. B., Ikizler T. A., Siew E. D. Urinary L-FABP predicts poor outcomes in critically ill patients with early acute kidney injury. *Kidney Int* 2015; 87(3): 640–648.
209. Pelters M. M. Fatty acid-binding protein as marker for renal injury. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 2008; 241: 73–77.
210. Peters T. Jr. New form of urinary albumin in early diabetes. *Clin Chem* 2004; 50(12): 2238–2239.
211. Pitashny M., Schwarz N., Qing X., Hojaili B., Aranow C., Mackay M., Putterman C. Urinary lipocalin-2 is associated with renal disease activity in human lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56(6): 1894–1903.

212. Pottel H., Hoste L., Dubourg L., Ebert N., Schaeffner E., Eriksen B. O., Melsom T., Lamb E. J., Rule A. D., Turner S. T., Glasscock R. J., De Souza V., Selistre L., Mariat C., Martens F., Delanaye P. An estimated glomerular filtration rate equation for the full age spectrum. *Nephrol Dial Transplant* 2016; 31(5): 798–806.
213. Przybylowski P., Koc-Zorawska E., Malyszko J. S., Kozłowska S., Mysliwiec M., Malyszko J. Liver fatty-acid-binding protein in heart and kidney allograft recipients in relation to kidney function. *Transplant Proc* 2011; 43(8): 3064–3067.
214. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing, 2014, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
215. Ramirez-Sandoval J. C., Barrera-Chimal J., Simancas P. E., Correa-Rotter R., Bobadilla N. A., Morales-Buenrostro L. E. Tubular urinary biomarkers do not identify aetiology of acute kidney injury in kidney transplant recipients. *Nephrology (Carlton)* 2014; 19(6): 352–358.
216. Redon J. Measurement of microalbuminuria – what the nephrologist should know. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(3): 573–576.
217. Reese P. P., Hall I. E., Weng F. L., Schröppel B., Doshi M. D., Hasz R. D., Thiessen-Philbrook H., Ficek J., Rao V., Murray P., Lin H., Parikh C. R. Associations between deceased-donor urine injury biomarkers and kidney transplant outcomes. *J Am Soc Nephrol* 2016; 27(5): 1534–1543.
218. Ren L., Ji J., Fang Y., Jiang S. H., Lin Y. M., Bo J., Qian J. Y., Xu X. H., Ding X. Q. Assessment of urinary N-acetyl- β -glucosaminidase as an early marker of contrast-induced nephropathy. *J Int Med Res* 2011; 39(2): 647–653.
219. Ribitsch W., Schilcher G., Quehenberger F., Pilz S., Portugaller R. H., Truschnig-Wilders M., Zweiker R., Brodmann M., Stiegler P., Rosenkranz A. R., Pickering J. W., Horina J. H. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) fails as an early predictor of contrast induced nephropathy in chronic kidney disease (ANTI-CI-AKI study). *Sci Rep* 2017; 7: 41300.
220. Rule A. D., Larson T. S., Bergstralh E. J., Slezak J. M., Jacobsen S. J., Cosio F. G. Using serum creatinine to estimate glomerular filtration rate: accuracy in good health and in chronic kidney disease. *Ann Intern Med* 2004; 141(12): 929–937.
221. Russo L. M., Bakris G. L., Comper W. D. Renal handling of albumin: a critical review of basic concepts and perspective. *Am J Kidney Dis* 2002; 39(5): 899–919.
222. Russo L. M., Comper W. D., Osicka T. M. Mechanism of albuminuria associated with cardiovascular disease and kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2004; 92: S67–S68.
223. Russo L. M., Osicka T. M., Bonnet F., Jerums G., Comper W. D. Albuminuria in hypertension is linked to altered lysosomal activity and TGF- β 1 expression. *Hypertension* 2002; 39(2): 281–286.
224. Saiedullah M., Hayat S., Kamaluddin S. M., Begum S. Association of glycated minor hemoglobin fraction of A1 with microalbuminuria and glycemic status in diabetic subjects. *Diab Endocr J* 2012; 40(1): 14–16.
225. Salamzadeh J., Sahraee Z., Nafar M., Parvin M. Delayed graft function (DGF) after living donor kidney transplantation: a study of possible explanatory factors. *Ann Transplant* 2012; 17(3): 69–76.

226. Seegmiller J. C., Barnidge D. R., Burns B. E., Larson T. S., Lieske J. C., Kumar R., Quantification of urinary albumin by using protein cleavage and LC-MS/MS. *Clin Chem* 2009; 55(6): 1100–1107.
227. Seeman T., Vondrak K., Dusek J., Simankova N., Zieg J., Hacek J., Chadimova M., Sopko B., Fortova M. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin does not distinguish acute rejection from other causes of acute kidney injury in pediatric renal transplant recipients. *Clin Lab* 2017; 63(1): 111–114.
228. Séronie-Vivien S., Delanaye P., Piéroni L., Mariat C., Froissart M., Cristol J. P.; SFBC "Biology of renal function and renal failure" working group. Cystatin C: current position and future prospects. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46(12): 1664–1686.
229. Shaikh A., Seegmiller J. C., Borland T. M., Burns B. E., Ladwig P. M., Singh R. J., Kumar R., Larson T. S., Lieske J. C. Comparison between immunoturbidimetry, size-exclusion chromatography, and LC-MS to quantify urinary albumin. *Clin Chem* 2008; 54(9): 1504–1510.
230. Shaker O. G., El-Shehaby A., El-Khatib M. Early diagnostic markers for contrast nephropathy in patients undergoing coronary angiography. *Angiology* 2010; 61(8): 731–736.
231. Shi J., Zhang Y., Gu W., Cui B., Xu M., Yan Q., Wang W., Ning G., Hong J. Serum liver fatty acid binding protein levels correlate positively with obesity and insulin resistance in Chinese young adults. *PLOS One* 2012; 7(11): e48777.
232. Schaeffner E. S., Ebert N., Delanaye P., Frei U., Gaedeke J., Jakob O., Kuhlmann M. K., Schuchardt M., Tölle M., Ziebig R., Van Der Giet M., Martus P. Two novel equations to estimate kidney function in persons aged 70 years or older. *Ann Intern Med* 2012; 157(7): 471–481.
233. Schley G., Köberle C., Manuilova E., Rutz S., Forster C., Weyand M., Formentini I., Kientsch-Engel R., Eckardt K. U., Willam C. Comparison of plasma and urine biomarker performance in acute kidney injury. *PLOS One* 2015; 10(12): e0145042.
234. Schrezenmeier E. V., Barasch J., Budde K., Westhoff T., Schmidt-Ott K. M. Biomarkers in acute kidney injury-pathophysiological basis and clinical performance. *Acta Physiol (Oxf)* 2017; 219(3): 554–572.
235. Schück O., Engliš M., Horáčková M., Tesař V. Vyšetřovací metody. In: Tesař V., Schück O. a kolektiv. *Klinická nefrologie*. 1.vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2006. Kapitola 2, s. 63–104. ISBN 80-247-0503-6.
236. Schwartz G. J., Muñoz A., Schneider M. F., Mak R. H., Kaskel F., Warady B. A., Furth S. L. New equations to estimate GFR in children with CKD. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20(3): 629–637.
237. Siew E. D., Ikizler T. A., Gebretsadik T., Shintani A., Wickersham N., Bossert F., Peterson J. F., Parikh C. R., May A. K., Ware L. B. Elevated urinary IL-18 levels at the time of ICU admission predict adverse clinical outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5(8): 1497–1505.
238. Sis B., Mengel M., Haas M., Colvin R. B., Halloran P. F., Racusen L. C., Solez K., Baldwin W. M. 3rd, Bracamonte E. R., Broecker V., Cosio F., Demetris A. J., Drachenberg C., Einecke G., Gloor J., Glotz D., Kraus E., Legendre C., Liapis H., Mannon R. B., Nankivell B. J., Nicleleit V., Papadimitriou J. C., Randhawa P., Regele H., Renaudin K., Rodriguez E. R., Seron D., Seshan S., Suthanthiran M., Wasowska B. A., Zacharyn A., Zeevi A. Banff '09 meeting report: antibody mediated

- graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant* 2010; 10(3): 464–471.
239. Smathers R. L., Petersen D. R. The human fatty acid-binding protein family: evolutionary divergences and functions. *Human Genomics* 2011; 5(3): 170–191.
 240. Smith E. R., Zurakowski D., Saad A., Scott R. M., Moses M. A. Urinary biomarkers predict brain tumor presence and response to therapy. *Clin Cancer Res* 2008; 14(8): 2378–2386.
 241. Sørensen O. E., Cowland J. B., Theilgaard-Mönch K., Liu L., Ganz T., Borregaard N. Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J Immunol* 2003; 170(11): 5583–5589.
 242. Speeckaert M. M., Speeckaert R., Van De Voorde L., Delanghe J. R., Immunochemically unreactive albumin in urine: fiction or reality? *Crit Rev Clin Lab Sci* 2011; 48(2): 87–96.
 243. Speeckaert M. M., Wuyts B., Stove V., Walle J. V., Delanghe J. R. Compensating for the influence of total serum protein in the Schwartz formula. *Clin Chem Lab Med* 2012; 50(9): 1597–1600.
 244. Stacul F., Van Der Molen A. J., Reimer P., Webb J. A., Thomsen H. S., Morcos S. K., Almén T., Aspelin P., Bellin M. F., Clement O., Heinz-Peer G., Contrast Media Safety Committee of European Society of Urogenital Radiology (ESUR). Contrast induced nephropathy: updated ESUR Contrast Media Safety Committee guidelines. *Eur Radiol* 2011; 21(12): 2527–2541.
 245. Star R. A. Treatment of acute renal failure. *Kidney Int* 1998; 54(6): 1817–1831.
 246. Sunil V. R., Patel K. J., Nilsen-Hamilton M., Heck D. E., Laskin J. D., Laskin D. L. Acute endotoxemia is associated with upregulation of lipocalin 24p3/Lcn2 in lung and liver. *Exp Mol Pathol* 2007; 83(2): 177–187.
 247. Sviridov D., Meilinger B., Drake S. K., Hoehn G. T., Hortin G. L. Coelution of other proteins with albumin during size-exclusion HPLC: Implications for analysis of urinary albumin. *Clin Chem* 2006; 52(3): 389–397.
 248. Svojanovský J., Ševela K., Souček M. Kontrastní látkou indukovaná nefropatie. *Interní Med* 2011; 13(5): 205–208.
 249. Swaminathan R. Interpretation of biochemical tests. In: Swaminathan R. (ed) *Handbook of Clinical Biochemistry*. 2nd ed. Singapore. World Scientific Publishing, 2011, pp.1-22.
 250. Szigeti N., Marko L., Molnar G. A., Fabian G., Cseh J., Mohas M., Figler M., Kiraly A., Koszegi T., Wittmann I. Microalbuminuria in inflammatory bowel diseases using immunoturbidimetry and high-performance liquid chromatography. *Acta gastroenterol Belg* 2009; 72(4): 394–401.
 251. Takahashi S., Uchino H., Shimizu T., Kanazawa A., Tamura Y., Sakai K., Watada H., Hirose T., Kawamori R., Tanaka Y. Comparison of glycated albumin (GA) and glycated hemoglobin (HbA1c) in type 2 diabetic patients: usefulness of GA for evaluation of short-term changes in glycemic control. *Endocr J* 2007; 54(1): 139–144.
 252. Tang R., Ao X., Zhong Y., Wang R. L., Zhou Q. L. Values of combination of urinary L-FABP and NGAL in early diagnosis of acute kidney injury after cardiac surgery in children. *Chin J Contemp Pediatr* 2017; 19(7): 770–775.

253. Tao Y., Dong W., Li Z., Chen Y., Liang H., Li R., Mo L., Xu L., Liu S., Shi W., Zhang L., Liang X. Proteinuria as an independent risk factor for contrast-induced acute kidney injury and mortality in patients with stroke undergoing cerebral angiography. *J Neurointerv Surg* 2017; 9(5): 445–448.
254. Tekce B. K., Uyeturk U., Tekce H., Uyeturk U., Aktas G., Akkaya A. Does the kidney injury molecule-1 predict cisplatin-induced kidney injury in early stage? *Ann Clin Biochem* 2015; 52(1): 88–94.
255. Telkes G., Dallos G., Varga M. Can urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin predict acute rejection following deceased donor kidney transplantation? *Orv Hetil* 2015; 156(48): 1956–1959.
256. Tencer J., Thysell H., Grubb A. Analysis of proteinuria: reference limits for urine excretion of albumin, protein HC, immunoglobulin G, kappa- and lambda-immunoreactivity, orosomucoid and alpha 1-antitrypsin. *Scand J Clin Lab Invest* 1996; 56(8): 691–700.
257. Teplan V. Akutní selhání ledvin. In: Tesař V., Schüick O. a kolektiv. *Klinická nefrologie*. 1.vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2006. Kapitola 13, s. 451–476. ISBN 80-247-0503-6.
258. Teplan V. Chronické selhání ledvin. In: Tesař V. et al. *Nefrologie*. 1.vyd. Praha: Galén a Karolinum, 2003. Svazek IX, 130 s. ISBN 80-7262-209-9 (Galén), 80-246-0671-2 (Karolinum).
259. Teplan V. Metabolické funkce ledvin. In: Teplan V. a kolektiv. *Praktická nefrologie*. 2., zcela přepracované a doplněné vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2006. Kapitola 1.6, s.19–24. ISBN 80-247-1122-2.
260. Teplan V., Zima T. Posuzování renálních funkcí. I. Vyšetření glomerulární filtrace. *FONS* 2008; 18(4): 37–40.
261. Tesař V., Zima T., Racek J., Teplan V., Friedecký B., Kratochvíla J., Granátová J., Kubíček Z. Doporučení České nefrologické společnosti a České společnosti klinické biochemie ČLS JEP k vyšetřování proteinurie 2010. Dostupné na: www.eskb.cz.
262. Thadhani R., Pascual M., Bonventre J. V. Acute renal failure. *N Engl J Med* 1996; 334(22): 1448–1460.
263. Thuijls G., Van Wijck K., Grootjans J., Derikx J. P., Van Bijnen A. A., Heineman E., Dejong C. H., Buurman W. A., Poeze M. Early diagnosis of intestinal ischemia using urinary and plasma fatty acid binding proteins. *Ann Surg* 2011; 253(2): 303–308.
264. Tormey W. P., O'Brien P. A. Clinical associations of an increased transthyretin band in routine serum and urine protein electrophoresis. *Ann Clin Biochem* 1993; 30(6): 550–554.
265. Torregrosa I., Montoliu C., Urios A., Andrés-Costa M. J., Giménez-Garzó C., Juan I., Puchades M. J., Blasco M. L., Carratalá A., Sanjuán R., Miguel A. Urinary KIM-1, NGAL and L-FABP for the diagnosis of AKI in patients with acute coronary syndrome or heart failure undergoing coronary angiography. *Heart Vessels* 2015; 30(6): 703–711.
266. Turpeinen U., Kolvunen E., Stenman U. H. Liquid-chromatographic determination of b2- microglobulin, a1-acid glycoprotein, and albumin in urine. *Clin Chem* 1987; 33(10): 1756–1760.

267. Usutani S. Contrast nephropathy with a non-ionic iodide medium in patients with normal and mildly impaired renal function. *Nihon Jinzo Gakkai Shi* 2000; 42(4): 338–345.
268. Vachek J., Zakiyanov O., Bandúr Š., Tesař V. Akutní poškození ledvin. *Kardiol Rev Int Med* 2014; 16(1): 57–61.
269. Vachek J., Zakiyanov O., Tesař V. Chronické onemocnění ledvin. *Interní Med* 2012; 14(3): 107–110.
270. Van Biesen W., Vanholder R., Lameire N. Defining acute renal failure: RIFLE and beyond. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; 1(6): 1314–1319.
271. Van Timmeren M. M., Van Den Heuvel M. C., Bailly V., Bakker S. J., Van Goor H., Stegeman C. A. Tubular kidney injury molecule-1 (KIM-1) in human renal disease. *J Pathol* 2007; 212(2): 209–217.
272. Vergani L., Fanin M., Martinuzzi A., Galassi A., Appi A., Carrozzo R., Rosa M., Angelini C. Liver fatty acid-binding protein in two cases of human lipid storage. *Mol Cell Biochem* 1990; 98 (1–2): 225–230.
273. Viklický O. Chronické onemocnění ledvin. In: Tesař V., Viklický O., editoři. *Klinická nefrologie. 2., zcela přepracované a doplněné vyd.* Praha: Grada Publishing, a.s., 2015. Kapitola 15.1, s. 357–366. ISBN 978-80-247-4367-7.
274. Viklický O. Chronické selhání ledvin a uremický syndrom. In: Tesař V., Schück O. a kolektiv. *Klinická nefrologie. 1.vyd.* Praha: Grada Publishing, a. s., 2006. Kapitola 14, s. 477–512. ISBN 80-247-0503-6.
275. Wagener G., Jan M., Kim M., Mori K., Barasch J. M., Sladen R. N., Lee H. T. Association between increases in urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute renal dysfunction after adult cardiac surgery. *Anesthesiology* 2006; 105(3): 485–491.
276. Wagener G., Gubitosa G., Wang S., Borregaard N., Kim M., Lee H. T. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute kidney injury after cardiac surgery. *Am J Kidney Dis* 2008; 52(3): 425–433.
277. Waikar S. S., Bonventre J. V. Biomarkers for the diagnosis of acute kidney injury. *Nephron Clin Pract* 2008; 109: c192–c197.
278. Waikar S. S., Sabbisetti V. S., Bonventre J. V. Normalization of urinary biomarkers to creatinine during changes in glomerular filtration rate. *Kidney Int* 2010; 78(5), 486–494.
279. Waikar S. S., Liu K. D., Chertow G. M. Diagnosis, epidemiology and outcomes of acute kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3(3): 844–861.
280. Wang G., Bonkovsky H. L., De Lemos A., Burczynski F. J. Recent insights into the biological functions of liver fatty acid binding protein 1. *J Lipid Res* 2015; 56(12): 2238–2247.
281. Wang L., Xue J., Chen C., Zhang Z., Deng Z., Sun Z., Xing C. Urinary liver-type fatty acid-binding protein predicts recovery from acute kidney injury. *Clin Nephrol* 2015; 84(5): 255–261.
282. Wang Y., Lam K. S., Kraegen E. W., Sweeney G., Zhang J., Tso A. W., Chow W, S., Wat N. M., Xu J. Y., Hoo R. L., Xu A. Lipocalin-2 is an inflammatory marker closely associated with obesity, insulin resistance, and hyperglycemia in humans. *Clin Chem* 2007; 53(1): 34–41.

283. Weber C. L., Bennett M., Er L., Bennett M. T., Levin A. Urinary NGAL levels before and after coronary angiography: a complex story. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26(10): 3207–3211.
284. White I. R., Thompson S. G. Choice of test for comparing two groups, with particular application to skewed outcomes. *Stat Med* 2003; 22(8): 1205–1215.
285. Wiseman M., Viberti G., Mackintosh D., Jarrett R. J., Keen H. Glycaemia, arterial pressure and micro-albuminuria in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1984; 26(6): 401–405.
286. Wybraniec M. T., Chudek J., Bożentowicz-Wikarek M., Mizia-Stec K. Prediction of contrast-induced acute kidney injury by early post-procedural analysis of urinary biomarkers and intra-renal Doppler flow indices in patients undergoing coronary angiography. *J Interv Cardiol* 2017; 30(5): 465–472.
287. Xu Y., Xie Y., Shao X., Ni Z., Mou S. L-FABP: A novel biomarker of kidney disease. *Clin Chim Acta* 2015; 445: 85–90.
288. Yan L., Borregaard N., Kjeldsen L., Moses M. A. The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *J Biol Chem* 2001; 276(40): 37258–37265.
289. Yan Q. W., Yang Q., Mody N., Graham T. E., Hsu C. H., Xu Z., Houstis N. E., Kahn B. B., Rosen E. D. The adipokine lipocalin 2 is regulated by obesity and promotes insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56(10): 2533–2540.
290. Yang J., Goetz D., Li J. Y., Wang W., Mori K., Setlik D., Du T., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Strong R., Barasch J. An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol Cell* 2002; 10(5): 1045–1056.
291. Yang J., Choi H. M., Seo M. Y., Lee J. Y., Kim K., Jun H., Jung C. W., Park K. T., Kim M. G., Jo S. K., Cho W., Kim H. K. Urine liver-type fatty acid-binding protein predicts graft outcome up to 2 years after kidney transplantation. *Transplant Proc* 2014; 46(2): 376–380.
292. Yang J-q., Ran P., Chen J-y., He Y-t., Li L-w., Tan N., Li G., Sun S., Liu Y., Zhan J-x., Zheng J-y., Zhou Y-l. Development of contrast-induced acute kidney injury after elective contrast media exposure in patients with type 2 diabetes mellitus: effect of albuminuria. *PLOS One* 2014; 9(9): e106454.
293. Yang L., Brooks C. R., Xiao S., Sabbisetti V., Yeung M. Y., Hsiao L. L., Ichimura T., Kuchroo V., Bonventre J. V. KIM-1-mediated phagocytosis reduces acute injury to the kidney. *J Clin Invest* 2015; 125(4): 1620–1636.
294. Yoshiuchi K., Matsuhisa M., Katakami N., Nakatani Y., Sakamoto K., Matsuoka T., Umayahara Y., Kosugi K., Kaneto H., Yamasaki Y., Hori M. Glycated albumin is a better indicator for glucose excursion than glycated hemoglobin in type 1 and type 2 diabetes. *Endocr J* 2008; 55(3): 503–507.
295. Yu H., Yanagisawa Y., Forbes M. A., Cooper E. H., Crockson R. A., MacLennan I. C. Alpha-1-microglobulin: an indicator protein for renal tubular function. *J Clin Pathol* 1983; 36(3): 253–259.
296. Zakiyanov O., Vachek J., Tesař V. Chronické onemocnění ledvin – novinky v klasifikaci a terapii. *Kardiolog Rev Int Med* 2014; 16(1): 49–52.

297. Zamora C. R., Cubeddu L. X. Microalbuminuria: do we need a new threshold? *J Hum Hypertens* 2009; 23(2): 146–149.
298. Zand F., Sabetian G., Abbasi G., Rezaianzadeh A., Salehi A., Khosravi A., Geramizadeh B., Taregh S. U., Javadpour S. Early acute kidney injury based on serum creatinine or cystatin C in intensive care unit after major trauma. *Iran J Med Sci* 2015; 40(6): 485–492.
299. Zaoral T. Akutní selhání a poškození ledvin u dětí. *Pediatr praxi* 2016; 17(1): 32–36.
300. Zappitelli M., Washburn K. K., Arikian A. A., Loftis L., Ma Q., Devarajan P., Parikh C. R., Goldstein S. L. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin is an early marker of acute kidney injury in critically ill children: a prospective cohort study. *Crit Care* 2007; 11(4): R84.
301. Zeng X. F., Li J. M., Tan Y., Wang Z. F., He Y., Chang J., Zhang H., Zhao H., Bai X., Xie F., Sun J., Zhang Y. Performance of urinary NGAL and L-FABP in predicting acute kidney injury and subsequent renal recovery: a cohort study based on major surgeries. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52(5): 671–678.
302. Zhang P. L., Rothblum L. I., Han W. K., Blasick T. M., Potdar S., Bonventre J. V. Kidney injury molecule-1 expression in transplant biopsies is a sensitive measure of cell injury. *Kidney Int* 2008; 73(5): 608–614.
303. Zheng J., Xiao Y., Yao Y., Xu G., Li C., Zhang Q., Li H., Han L. Comparison of urinary biomarkers for early detection of acute kidney injury after cardiopulmonary bypass surgery in infants and young children. *Pediatr Cardiol* 2013; 34(4): 880–886.
304. Zima T., Racek J., Tesař V., Viklický O., Teplan V., Schück O., Janda J., Friedecký B., Kubíček Z., Kratochvíla J., Rajdl D., Šálek T., Kalousová M., Granátová J. Doporučení k diagnostice chronického onemocnění ledvin (odhad glomerulární filtrace a vyšetřování proteinurie) České nefrologické společnosti ČLS JEP a České společnosti klinické biochemie ČLS JEP. *Klin Biochem Metab* 2014; 22(43): 138–152.
305. Zima T., Teplan V., Tesař V., Racek J., Schück O., Janda J., Friedecký B., Kubíček Z., Kratochvíla J. Doporučení České nefrologické společnosti a České společnosti klinické biochemie ČLS JEP k vyšetřování glomerulární filtrace. *Aktual nefrol* 2009; 15(3): 129–139.

9. SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obr. 1. Biomarkery akutního poškození ledvin, jejich lokalizace v nefronu a diagnostický význam.....	34
Obr. 2. Vlastnosti a zdroje NGAL v plazmě a moči při akutním poškození ledvin.....	47
Obr. 3. Vyšetřovací algoritmus L-FABP a NGAL jako biomarkerů predikce AKI.....	51
Obr. 4. Účinná separace transferinu od albuminu, analýza standardních vzorků.....	57
Obr. 5. Koeluce transferinu s albuminem, analýza standardních vzorků.....	57
Obr. 6. Analýzy standardních vzorků albuminu a transferinu v čase 0 a s časovým odstupem 3 a 5,5 hodin po uložení do zásobníku vzorků kapalinového chromatografu.....	58
Obr. 7. Příklad analýzy patientské moči s účinnou separací albuminu od transferinu.....	59
Obr. 8. Příklad analýzy patientské moči s neúčinnou separací albuminu od transferinu.....	60
Obr. 9. Příklad analýzy patientské moči s neúčinnou separací albuminu od dalších proteinů.....	60
Obr. 10. Úprava standardního vzorku albuminu extrakcí na pevné fázi.....	61
Obr. 11. Úprava vzorku patientské moči extrakcí na pevné fázi.....	61
Obr. 12. Analýza standardního vzorku albuminu.....	63
Obr. 13. Analýza směsného vzorku standardů albuminu, α -1-kyselého glykoproteinu, transferinu, hemopexinu, α -1-antitrypsinu a α -1-antichymotrypsinu.....	64
Obr. 14. Analýza standardního vzorku prealbuminu.....	65
Obr. 15. Analýza směsného vzorku standardů albuminu a prealbuminu.....	65
Obr. 16. Analýza vzorku patientské moči.....	77
Obr. 17. Analýza vzorku patientské moči se štěpením píku albuminu.....	78
Obr. 18. HPLC analýza experimentálního směsného vzorku 1 s arteficiálně středně zvýšenou albuminurií.....	79
Obr. 19. HPLC analýza experimentálního směsného vzorku 2 s reálnou středně zvýšenou albuminurií.....	79
Obr. 20. Albuminurie stanovená imunoturbidimetricky a HPLC v souboru diabetiků 1. typu, diabetiků 2. typu a nediabetiků.....	80
Obr. 21. Bootstrapovaná korelační matice stanovených markerů v souboru všech pacientů.....	82
Obr. 22. Poměr albumin/kreatinin v moči u pacientů s imunoturbidimetricky stanovenou fyziologickou albuminurií.....	83
Obr. 23. Lineární závislost HPLC a imunoturbidimetricky stanovené albuminurie u diabetiků 1. typu, 2. typu a u nediabetiků.....	84
Obr. 24. Močové koncentrace NGAL u dětských pacientů s rejekční příčinou a jinými příčinami akutního poškození transplantované ledviny.....	86
Obr. 25. Negativní korelační vztah mezi močovými koncentracemi NGAL a odhadnutou glomerulární filtrací v souboru všech dětských pacientů s AKI.....	87
Obr. 26. Výsledky vyšetření močového NGAL v souborech pacientů s akutním poškozením ledvin, prerenální azotémií, chronickým onemocněním ledvin a u kontrolního souboru zdravých dětí.....	88
Obr. 27. Výsledky vyšetření močového NGAL vztaženého na močový kreatinin v souborech pacientů s akutním poškozením ledvin, prerenální azotémií, chronickým onemocněním ledvin a u kontrolního souboru zdravých dětí.....	90
Obr. 28. Průběh koncentrací NGAL v moči v čase u čtyř pacientů s akutním poškozením ledvin.....	91
Obr. 29. Průběh poměru koncentrací NGAL/kreatinin v moči v čase u čtyř pacientů s akutním poškozením ledvin.....	91

Obr. 30. Průběh koncentrací NGAL v moči u čtyř pacientů podstupujících kardiochirurgický výkon.....	94
Obr. 31. Průběh poměru koncentrací NGAL/kreatinin v moči u čtyř pacientů podstupujících kardiochirurgický výkon.....	94
Obr. 32. Průběh koncentrací sérového kreatininu u čtyř pacientů podstupujících kardiochirurgický výkon.....	95
Obr. 33. Korelace U-NGAL/U-kreatinin s věkem pacientů u vzorků močí odebraných preoperačně.....	95
Obr. 34. Korelační matice stanovených markerů (ve všech odběrech) v souboru všech pacientů	103
Tab. 1. Kategorie CKD podle glomerulární filtrace.....	12
Tab. 2. Kategorie CKD podle albuminurie a porovnání s proteinurií.....	12
Tab. 3. Rovnice MDRD (1999) a její modifikace pro stanovení kreatininu standardizovanou metodou (2005).....	17
Tab. 4. Rovnice CKD-EPI z roku 2009.....	17
Tab. 5. Faktor F Schwartzovy rovnice vycházející ze sérového kreatininu stanoveného Jaffého metodou a enzymaticky.....	19
Tab. 6. Rovnice CKD-EPI (cystatin C) z roku 2012.....	21
Tab. 7. Kombinovaná rovnice CKD-EPI z roku 2012.....	22
Tab. 8. Kritéria RIFLE a stadia akutního poškození ledvin (AKI).....	32
Tab. 9. Laboratorní nálezy při diferenciální diagnóze prerenální a renální formy akutního poškození ledvin.....	32
Tab. 10. Složení mobilní fáze v průběhu gradientové eluce.....	62
Tab. 11. Procentuální rozdíl mezi HPLC a imunoturbidimetricky (IT) stanovenou albuminurií v souborech pacientů v závislosti na IT stanovené albuminurii.....	81
Tab. 12. Koncentrace glykovaného hemoglobinu HbA _{1c} v souboru nediabetiků, v souboru diabetiků a po jeho rozdělení na soubory diabetiků 1. a 2. typu.....	81
Tab. 13. Parametry bootstrapované lineární regrese a Demingovy lineární regrese při porovnání albuminurie stanovené HPLC a imunoturbidimetricky u nediabetiků, diabetiků 1. typu a diabetiků 2. typu.....	85
Tab. 14. Bootstrapovaná ANOVA v souboru všech pacientů.....	85
Tab. 15. Soubor všech pacientů po kardiochirurgických výkonech.....	92
Tab. 16. Soubor pacientů s postoperačními renálními komplikacemi.....	92
Tab. 17. Soubor pacientů bez postoperačních renálních komplikací.....	92
Tab. 18. Výsledky vyšetření sérových parametrů a eGF v souboru všech pacientů.....	99
Tab. 19. Výsledky vyšetření močových parametrů v souboru všech pacientů.....	99
Tab. 20. Výsledky vyšetření sérových parametrů a eGF v souboru pacientů s eGF _{MDRD} < 1,2 ml/s/1,73 m ²	100
Tab. 21. Výsledky vyšetření močových parametrů v souboru pacientů s eGF _{MDRD} < 1,2 ml/s/1,73 m ²	100
Tab. 22. Výsledky vyšetření sérových parametrů a eGF v souboru pacientů s eGF _{MDRD} ≥ 1,2 ml/s/1,73 m ²	101
Tab. 23. Výsledky vyšetření močových parametrů v souboru pacientů s eGF _{MDRD} ≥ 1,2 ml/s/1,73 m ²	101
Tab. 24. Bootstrapovaná dvoucestná ANOVA.....	102

10. SEZNAM PUBLIKACÍ

Publikace, které jsou podkladem dizertační práce

A) s IF

1. **Fortova M.**, Klapkova E., Sopko B., Prusa R. Estimated total albumin in fresh urine samples based on correlation between the Roche immunoturbidimetric and an in-house HPLC methods. *Clin Lab* 2018 (v tisku) **IF 0,848**
2. Seeman T., Vondrak K., Dusek J., Simankova N., Zieg J., Hacek J., Chadimova M., Sopko B., **Fortova M.** Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin does not distinguish acute rejection from other causes of acute kidney injury in pediatric renal transplant recipients. *Clin Lab* 2017; 63(1): 111–114. **IF 0,848**
3. Klapkova E., **Fortova M.**, Prusa R., Moravcova L., Kotaska K. Determination of urine albumin by new simple high-performance liquid chromatography method. *J Clin Lab Anal* 2016; 30(6): 1226–1231. **IF 1,303**

B) bez IF

1. **Fořtová M.**, Průša R., Vajtr D. Struktura, funkce a medicínský význam lipokalinů. *Klin Biochem Metab* 2013; 21(42): 112–121.
2. **Fořtová M.**, Klapková E., Průša R. Stanovení albuminurie – porovnání imunoturbidimetrické metody a vysokoúčinné kapalinové chromatografie. *Klin Biochem Metab* 2012; 20(41): 216–221.
3. **Fořtová M.**, Lejsek J., Pechová M., Průša R. Vyšetření neutrofilního s gelatinázou asociovaného lipokalinu v moči po kardiochirurgických výkonech u dospělých pacientů. *Aktual Nefrol* 2011; 17(4): 136–141.
4. **Fořtová M.**, Klapková E., Průša R. Analytická úskalí při stanovení albuminurie vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. *Labor Aktuell* 2010; 4: 24–27.
5. **Fořtová M.**, Klapková E., Průša R., Dusilová Sulková S., Tesař V. Stanovení albuminurie vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií – ano či ne? *Aktual Nefrol* 2010; 16(1): 20–25.

Publikace bez vztahu k tématu dizertační práce

A) s IF

1. Seeman T., **Fořtová M.**, Sopko B., Průša R., Pohl M., John U. Hypomagnesaemia is absent in children with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Ann Clin Biochem* 2018 Jan 1. doi: 10.1177/0004563218785190 (v tisku) **IF 1,983**
2. Horáček J., Dusilová Sulková S., **Fořtová M.**, Lopot F., Kalousová M., Sobotka L., Chaloupka J., Tesař V., Žák A., Zima T. Resting energy expenditure and thermal balance during isothermic and thermoneutral haemodialysis – heat production does not explain increased body temperature during haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22(12): 3553–3560. **IF 3,167**

3. Kalousová M., Sulková S., Fialová L., Soukupová J., Malbohan I.M., Špaček P., Braun M., Mikulíková L., **Fořtová M.**, Hořejší M., Tesař V., Zima T. Glycoxidation and inflammation in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18(12): 2577–2581. **IF 2,607**
4. Kalousová M., Sulková S., Zima T., Deppisch R., Beck W., Bednářová V., **Fořtová M.**, Tesař V. Advanced glycation end products in hemodialysed patients with diabetes mellitus correlate with leptin and leptin/body fat ratio. *Renal Fail* 2003; 25(2): 277–286. **IF 0,694**

B) bez IF

1. **Fořtová M.**, Průša R., Zima T. Arrestiny a jejich role v regulaci buněčných dějů. *Klin Biochem Metab* 2009; 17(38): 5–16.
2. Dusilová Sulková S., **Fořtová M.** Biochemické vyšetření poruch kostního metabolismu při chronickém selhání ledvin – základní přehled a význam pro klinickou praxi. *Pokroky v oboru nefrologie* 2008; 2(2): 23–35.
3. Uhrová J., **Fořtová M.**, Zima T. Biochemické markery kostního metabolismu u pacientů se sníženou funkcí ledvin. In S. Dusilová Sulková a kol.: Renální osteopatie. 1.vyd., Maxdorf 2007, s.67–79. ISBN: 978-80-7345-119-6.
4. **Fořtová M.**, Dusilová Sulková S., Horáček J., Lopot F., Zima T., Bláha J., Bednářová V. Klidový energetický výdej při hemodialýze. *Vnitř Lék* 2006; 52(1): 26–33.
5. Sulková S., **Fořtová M.**, Uhrová J., Zima T. Význam stanovení metabolitů vitamínu D u pacientů se sníženou funkcí ledvin. *Vnitř Lék* 2004; 50(7): 510–518.
6. Sulková S., Švára F., **Fořtová M.**, Válek M. Nové směry k hyperfosfatémii při selhání ledvin. *Osteol Bull* 2003; 8(2): 47–51.
7. Sulková S., **Fořtová M.**, Válek M., Švára F. Renální kostní choroba. *Vnitř Lék* 2003; 49(5): 403–408.
8. **Fořtová M.**, Sulková S., Uhrová J., Zima T., Schneiderka P. Parametry kostního metabolismu u pacientů s různým stupněm poškození funkce ledvin. *Čas Lék čes* 2003; 142(2): 112–116.
9. Lopot F., Sulková S., **Fořtová M.**, Nejedlý B. Temperature and thermal balance monitoring and control in dialysis. *Hemodial Int* 2003; 7(2): 177–183.
10. Sulková S., Schestauberová E., Švára F., **Fořtová M.**, Uhrová J., Zima T. Možnosti úpravy deficitu kalcitriolu u dialyzovaných pacientů. *Osteol Bull* 2002; 7(1): 26–29.