

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

Srovnání tří metod pro vyhodnocení glomerulární filtrace

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.

Školitel: Prim. MUDr. RNDr. Pavel Neshyba, CSc.

Hradec Králové, 2010

Ivana Lukšíková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych touto formou poděkovala zaměstnancům oddělení klinické biochemie Kroměřížské nemocnice, a.s., především paní RNDr. Šárce Valčíkové za asistenci při realizaci práce a při stanovení analytů, panu Prof. MUDr. Jaroslavu Dršatovi, CSc. za odbornou pomoc a laskavost, a zejména patří dík za podporu a vedení panu Prim. MUDr. RNDr. Pavlu Neshybovi, CSc., který se podělil o své hluboké vědomosti a dlouholeté zkušenosti v oboru klinické biochemie.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 Morfologie močového ústrojí	8
2.1.1 Anatomie ledvin	8
2.1.2 Vývodné cesty močové	10
2.2 Fyziologie močového ústrojí	10
2.2.1 Funkce ledvin	10
2.3 Patofyziologie močového ústrojí	11
2.4 Funkční zkoušky ledvin	12
2.4.1 Kvantitativní stanovení glomerulární filtrace	12
2.4.2. Odvození vzorce pro výpočet glomerulární filtrace	12
2.5. Metody vyšetření glomerulární filtrace	13
2.5.1. Metody měření glomerulární filtrace se sběrem moči	13
2.5.1.1 Clearance inulinu	13
2.5.1.2 Renální clearance endogenního kreatininu	14
2.5.1.2.1 Výpočet clearance kreatininu	15
2.5.1.2.2 Hodnocení clearance kreatininu	15
2.5.1.2.3 Clearance kreatininu versus sérový kreatinin	16
2.5.2 Metody měření glomerulární filtrace bez sběru moči	16
2.5.2.1 Koncentrace Cystatinu C v séru	16
2.5.2.1.1 Odhad glomerulární filtrace	17
3. CÍL PRÁCE	18
4. METODICKÁ ČÁST	19
4.1 Kreatinin	19
4.2 Cystatin C	20
4.2.1 Tina-quant Cystatin C	20
4.2.2 Cystatin C Assay Kit	21

5. VÝSLEDKY A DISKUSE	23
6. ZÁVĚR	28
7. POUŽITÁ LITERATURA	29
8. SEZNAM ZKRATEK	30

ABSTRAKT

Chronické onemocnění ledvin je jedním s celosvětových problémů, který přináší značné riziko kardiovaskulární morbidity a smrti, proto je na jednotlivé laboratorní ukazatele selhání ledvin kladen značný důraz, zejména na jejich senzitivitu a specifčnost. V současnosti slouží klinikům k interpretaci onemocnění ledvin dva parametry. Jedná se o sérový kreatinin, který je nejběžněji používaným markerem pro stanovení glomerulární filtrace, a o Cystatin C, který nabývá dnes na významu nejen z hlediska nefrologie, ale i jako prognostický marker pro akutní selhání ledvin. Nás konkrétně zajímalo, zda hodnoty sérového kreatininu korelují s výsledky Cystatinu C.

Vyšetřili jsme 400 pacientů na Cystatin C, 200 pacientů na systému Cobas Integra 800 a 200 pacientů na systému Cobas Mira Plus. Na obou systémech jsme u vyšetřované skupiny pacientů našli neshodu v interpretacích závislosti koncentrace Cystatinu C na kreatininu. Na analyzátoru Cobas Integra 800 stanovovaného Cystatinu C soupravou firmy Roche, byla směrodatná odchylka 0,02 a variační koeficient 1,98%. Druhým analytickým systémem použitým ve studii byl otevřený systém Cobas Mira Plus, kterým jsme stanovovali Cystatin C soupravou firmy Diazyme, kde nám vyšla směrodatná odchylka 0,27 a variační koeficient 13,95%.

ABSTRACT

Chronic kidney disease is a worldwide health problem that carries a substantive risk for cardiovascular morbidity and death. GFR is the most frequently used criteria in the assessment of renal function. Serum creatinine is the most commonly used marker for estimation of GFR. However, it has become evident that the creatinine concentration is far from ideal because it is significantly changed by other factors such as muscle mass, diet, gender, age and tubular secretion. Cystatin C in plasma and serum has been proposed as a more sensitive marker for GFR, and several studies, as well as one meta analysis, have suggested that cystatin C is superior to serum creatinine for estimation of GFR. Additionally cystatin C has been discussed in recent literature as a prognostic marker for acute heart failure.

The serum concentrations of the marker Cystatin C were analysed by 400 patients on the two chosen systems, Cobas Integra 800 and Cobas Mira Plus(200:200). It was found out that those systems show the differences in the tested serum levels of Cystatin C and creatinine.

There were calculated standard deviation(SD)=0,02 and variation coefficient(CV)=1,98% for the parameter Cystatin C in case of Cobas Integra 800 and SD=0,27 and CV=13,95% in case of Cobas Mira Plus system. Finally, the advantages and the disadvantages of the calculation of glomerular filtration using Cystatine C and creatinine were compared.

1. ÚVOD

Udržení dynamické homeostázy vnitřního prostředí organismu je v podmínkách ne zcela přesně řízeného příjmu potravy závislé především na přesně řízeném vylučování těch látek, které v daném momentu homeostázu narušují. Jsou to a) již dále nevyužité zplodiny a zbytky metabolismu, b) látky pro organismus potřebné a využitelné, ale v daném momentu pro svoji koncentraci nadbytečné, c) nosiče vylučovaných látek a d) látky organismu cizorodé (léčiva, drogy, toxiny a jiné látky).

Všechny tyto látky jsou předmětem exkrece, která je funkcí různých orgánů a funkčních systémů. Exkrece může být funkcí primární, jak je tomu u ledvin, nebo funkcí sekundární, jako u dýchacího aparátu, kůže nebo trávicího ústrojí. V tomto smyslu jsou tedy ledviny hlavním efektoem dynamické homeostázy extracelulární tekutiny. Pro plnění této úlohy je u ledvin splněn základní předpoklad: mimořádný kontakt s extracelulární tekutinou (ECT) (1).

1. TEORETICKÁ ČÁST

2. 1. Morfologie močového ústrojí

System močový je složen z párových orgánů- ledvin a močovodů a z orgánů nepárových- močového měchýře a močové trubice.

2. 1. 1. Anatomie ledvin

Ledviny jsou uloženy retroperitoneálně po obou stranách páteře. Jsou oválného, fazolovitého tvaru, na mediální konkávní ploše ledviny je tvořen hilus, kde do ledviny vstupují a z ledviny vystupují krevní a lymfatické cévy, ledvinu tu opouští močovod.

Parenchym ledviny je obklopen vazivovým pouzdrém (capsula fibrosa renis), kolem ledviny se nachází masa tukové tkáně, která se nazývá capsula adiposa renis. Parenchym ledviny obklopuje dutinu- sinus renalis, kterou vyplňuje pánvička ledvinná (pelvis renalis), která ústí v hilu ledviny do močovodu. Na straně odvrácené od hilu se pánvička větví ve 2 nebo 3 kalichy ledvinné (calices maiores), které se dále větví v několik kalíšků ledvinných (calices minores). V parenchymu ledviny můžeme makroskopicky odlišit periferní část- kůru ledviny (cortex renalis) a vnitřní část- dřeň ledviny (medulla renalis). U člověka je dřeň ledviny složena z 10-18 ledvinných pyramid (pyramides renales), které tvoří hranici mezi kůrou a dřením, vrcholy pyramid směřují k hilu ledviny, nazývají se ledvinné papily (papillae renales), ke kterým jsou připojeny kalíšky ledvinné.

Ledvina se skládá z ledvinných kanálků. Soubor kanálků, které vytvářejí moč, se nazývá nefron, kanálky, které shromažďují moč a dále ji upravují, se nazývají sběrací kanálky. Nefron a příslušné sběrací kanálky představují funkční jednotku ledvin. Uspořádání ledvinných kanálků souvisí s uspořádáním krevních cév v ledvině. Nefron je tvořen ledvinovým tělískem (corpusculum renis), proximálním tubulem, Henleovou kličkou a distálním tubulem. Ledvinné tělísko obsahuje v Bowmanově pouzdře uložené klubičko kapilár, glomerulus, do kterého je krev přiváděna přívodnou arterií (vasa afferentia) a odváděna odvodnou arterií (vasa efferentia). Místo vstupu a výstupu cév je označováno jako vaskulární pól ledvinného tělíska. Bowmanovo pouzdro (capsula glomeruli) se skládá ze dvou listů zevní parietální list a vnitřní viscerální list. Mezi oběma listy Bowmanova pouzdra

je močový prostor, kam je filtrována primární glomerulární moč přes filtrační membránu. Primární moč proniká póry, které jsou vytvořeny v cytoplazmě endotelových buněk, komplexem splynulých bazálních lamin a dále filtračními štěrbinami přepaženými diafragmou, které jsou vytvořeny mezi pedikly podocytů. Úlohu filtru hraje komplex splynulých bazálních lamin. Výsledkem filtrace krve je primární moč, která představuje ultrafiltrát krevní plazmy.

Proximální tubulus je delší a má větší zevní průměr než tubulus distální. Skládá se ze dvou částí: části stočené (pars convoluta) a části přímé (pars recta). Výstelka proximálního tubulu navazuje na epitel vystýlající parietální list Bowmanova pouzdra. V proximálních tubulech jsou z ultrafiltrátu absorbovány proteiny, které v malém množství pronikly přes filtrační membránu, dále všechny aminokyseliny, glukóza, natriové ionty a voda. Henleova klička probíhá téměř celá ve dřeni ledviny. Má tvar velkého U, skládá se ze dvou ramének, sestupného a vzestupného. Podle charakteru výstelky rozeznáváme úzký a široký segment Henleovy kličky. Henleova klička je nezbytná pro retenci vody v organismu, vytváří v intersticiu ledvin osmotický gradient, který je nezbytný pro koncentraci moče při průtoku sběracími kanálky.

Distální tubulus se vyskytuje v kůře ledvin, je poměrně krátký, skládá se opět z části přímé (pars recta), která navazuje na vzestupné raménko Henleovy kličky, a z části stočené (pars convoluta). Kolem distálního tubulu je také vytvořena síť fenestrovaných kapilár, ve které se rozvětjuje vas efferens. Distální tubuly se významně podílí na udržování rovnováhy elektrolytů a acidobazické rovnováhy organismu. Distální kanálek ústí spojovacím segmentem do sběracího kanálku. Sběrací kanálky (tubuli colligentes) jsou vystlány buňkami, které jsou velmi citlivé na působení antidiuretického hormonu. V závislosti na množství tekutin v těle regulují množství a koncentraci vylučované moči. V oblasti kontaktu s distálním tubulem dochází také ke strukturálním změnám ve stěně vas afferens, někdy též ve stěně vas efferens. V arteriole mizí membrana elastica interna a v tunica media se objevují modifikované hladké svalové buňky- buňky juxtaglomerulární. Macula densa je specializovaná oblast v distálním tubulu a spolu s oblastí extraglomerulárních buněk a vas afferens, kde se vyskytují juxtaglomerulární buňky, tvoří juxtaglomerulární aparát. Juxtaglomerulární aparát produkuje renin, který přes systém angiotensinogen- angiotensin I- angiotensin II- aldosteron ovlivňuje objem plazmy a tím krevní tlak.

2. 1. 2. Vývodné cesty močové

Vývodné cesty močové tvoří pánvička ledvinná (pelvis renalis), kalichy a kalíšky ledvinné (calices renales maiores et minores), močovod (ureter), močový měchýř (vesica urinaria) a močová trubice (urethra). Ve vývodných cestách močových je moč vytvořená v ledvinách střádána a posléze vylučována z organismu. Vývodné cesty močové mají v zásadě jednotnou histologickou stavbu. Jejich stěna se skládá ze sliznice (tunica mucosa), z vrstvy hladké svaloviny (tunica muscularis) a z adventicie (tunica adventitia). Malou část močového měchýře kryje seróza (peritoneum).

Močová trubice odvádí moč z močového měchýře. Stavba uretry se liší u muže a ženy. U mužů je od ústí ductus ejaculatorii také vývodní cestou pohlavní. Mužská močová trubice-urethra maskulina je ve srovnání s ženskou uretrou delší a dělí se na 4 části. Pars intramuralis probíhá ve stěně močového měchýře, pars prostatica je obklopená prostatou, pars diaphragmatica probíhá v diaphragma urogenitale a pars spongiosa je umístěna v corpus spongiosum urethrae (2).

2. 2. Fyziologie močového ústrojí

2. 2. 1. Funkce ledvin

K základním funkcím ledvin patří:

- vylučování odpadních, nepotřebných, eventuálně toxických látek (urea, kreatinin, kyselina močová, metabolity hormonů, mnohé léky či jejich metabolity);
- udržování stability vnitřního prostředí, tj. osmotického tlaku, koncentrace základních minerálů a vodíkových iontů (pH);
- tvorba biologicky aktivních látek (renin, erythropoetin, kalcitriol);
- metabolická funkce- např.glukoneogeneze.

Většinu z těchto funkcí zajišťují ledviny tvorbou moči, jejíž složení se mění podle potřeby organismu.

Nízkomolekulární látky se dostávají do moči glomerulární filtrací, větší molekuly jsou zadrženy a v moči je nacházíme jen při poruchách glomerulu. Složení primární moči (glomerulárního filtrátu) je tedy podobné plazmě bez větších bílkovin. Při průchodu

proximálním a distálním tubulem a Henleho kličkou dochází k zahuštění moči, které je dané osmotickým gradientem mezi obsahem tubulů a intersticiální tekutinou v dřeni ledvin, zvětšujícím se směrem k papile ledvin. Řada látek potřebných pro organismus (glukóza, aminokyseliny) se vstřebává již v proximálním tubulu. V tubulárním systému dochází rovněž k resorpci a sekreci minerálů a dalších látek, aby byla zajištěna stabilita vnitřního prostředí. Tubuly se podílejí i na acidifikaci moči. Řada tubulárních dějů je pod kontrolou hormonů (adiuretin, aldosteron, parathormon aj.). Důležité je enzymové vybavení tubulárních buněk, např. obsah glutaminázy pro tvorbu amoniaku a vylučování H⁺; průkaz tubulárních enzymů v moči se využívá i diagnosticky (3).

2. 3. Patofyziologie močového ústrojí

U ledvinových nemocí dochází ve větší nebo menší míře k zadržování odpadních látek nebo k poruše vodní a elektrolytové rovnováhy. Ztráta funkce nefronů má dosti různorodou etiologii a patogenezi. V mnoha případech je to ztráta reverzibilní, ale jindy mohou být nefrony ztraceny trvale. Nefronů se zdá být v ledvině značný přebytek, s postupujícími ztrátami přežívající nefrony hypertrofují (nabývají na velikosti), takže mohou produkovat větší množství filtrátu. Hypertrofie však nemůže kompenzovat ztráty nefronů úplně a funkční zhoršování pokračuje, přičemž zaniklé nefrony jsou nahrazovány jizevnatou tkání. Funkční defekty ledviny mohou mít původně příčinu v poškození nefronu samotného, jindy ale v infekcích, které vznikají ve vývodných močových cestách, a pak se šíří do tkání ledvinné dřene. V obou případech může dojít k rychlé reparaci, jestliže však porucha přetrvává, může mít za následek trvalou ztrátu celých nefronů.

Důsledky glomerulárních poruch konvergují k vytvoření dvou klinických obrazů: nefrotického a nefritického syndromu. Nefrotický syndrom je typicky charakterizován výraznou glomerulární proteinurií (vylučováním bílkovin močí), způsobenou neschopností glomerulů zadržet bílkovinu. U nefritického syndromu je v klinickém obraze dominantní nález erytrocytů v moči (hematurie).

Poškození ledviny, ať už jakéhokoliv původu, vede dříve nebo později k příznakům ledvinného selhání, které může být akutní nebo chronické. Oba tyto stavy jsou spojeny s urémií, což je postupná ztráta ledvinných funkcí (4).

2. 4. Funkční zkoušky ledvin

K základním metodám funkčního vyšetření ledvin patří vyšetřování glomerulární filtrace (GF), kdy stupeň snížení GF slouží jako klasifikační marker stupně závažnosti poškození ledvin, vyšetření tubulární resorpce a frakční exkrece, koncentrační pokus, acidifikační a alkalizační test, případně ostatní (speciální) ukazatele funkce ledvin např. osmolální clearance, clearance bezsolutové vody a clearance bezelektrolytové vody.

V současné době užíváme ke stanovení GF metod přímých a metod výpočtových vycházející z hodnoty sérového kreatininu a dalších proměnných faktorů (věk, hmotnost, urea, albumin, pohlaví, rasa apod.)

2. 4. 1. Kvantitativní stanovení glomerulární filtrace

Velikost glomerulární filtrace je dána:

- filtračním tlakem (poměrem rozdílu tlaku ve vas afferens a efferens a tlaku v Bowmanově váčku);
- permeabilitou glomerulární membrány;
- velikostí filtrační plochy.

Nenastane-li větší hypotenze, je filtrační tlak udržován v poměrně úzkém rozmezí. Když vyloučíme výraznější změny v tloušťce a permeabilitě glomerulární membrány, je glomerulární filtrace úměrná počtu nefronů.

2. 4. 2. Odvození vzorce pro výpočet glomerulární filtrace

Vylučování látky x , která volně prochází glomerulem a v tubulech je buď resorbována, nebo secernována, můžeme popsat následující rovnicí: profiltrované množství korigované o změny v tubulech se rovná množství vyloučenému v definitivní moči za stejné časové období:

$$GF \times P \pm T = U \times V$$

GF = množství glomerulárního filtrátu v ml/s

P = koncentrace látky x v plazmě a v glomerulárním filtrátu (látka volně prochází glomerulem),

T = množství látky x secernované (+ T) nebo resorbované (- T) v tubulech,

U = koncentrace látky x v definitivní moči (ve stejných jednotkách jako v plazmě),

V = objem definitivní moči v ml/s

Chceme-li vypočítat glomerulární filtraci, musíme zvolit takovou látku, která se bez omezení filtruje v glomerulech a nepodléhá přitom tubulární sekreci ani resorpci, tedy pro niž $T = 0$.

Potom platí:

$$GF \times P = U \times V$$

a glomerulární filtraci vypočítáme podle vzorce:

$$GF = U \times V / P$$

Pro praktické účely je třeba připomenout, že koncentrace látky v moči (U) a plazmě či v séru (P) musí být ve stejných jednotkách a diuréza se uvádí v ml/s, tj. denní diurézu v ml je nutné vydělit počtem sekund za 24 h (86 400) (3).

2. 5. Metody vyšetření glomerulární filtrace

2. 5. 1. Metody měření glomerulární filtrace se sběrem moči

2. 5. 1. 1. Clearance inulinu

Nejpravdivější hodnotu glomerulární filtrace poskytuje inulin (ten se v glomerulech volně filtruje, při průchodu tubuly se jeho množství nemění). Měření renální clearance inulinu je založeno na principu přesného měření vyloučeného množství inulinu do moči za časovou jednotku za podmínek stabilizované plazmatické koncentrace. Je nutný přesný sběr moči a má následující nevýhody:

- je nutné zajistit stabilní koncentraci inulinu v plazmě dlouhodobou infuzí;
- vzhledem k obvykle jen několikahodinovému sběru moči je třeba počítat s nepříznivým vlivem event. většího reziduálního objemu moči v močovém měchýři;

- složitější je i stanovení koncentrace inulinu.

Z těchto důvodů je užití inulinu (event. syntetických polyfruktosanů) ponecháno pro stanovení glomerulární filtrace jen při vědeckých studiích. V praxi se odhaluje glomerulární filtrace podle clearance kreatininu (5).

2. 5. 1. 2. Renální clearance endogenního kreatininu

Asi 1-2 % tělesného kreatinu, obsaženého v mozku a především ve svalech, je denně přeměněno na kreatinin, který se jako odpadní látka vylučuje ledvinami. Dříve byl považován za látku, která volně prochází glomerulem a jejíž všechno profiltrované množství se vyloučí močí. Později se však ukázalo, že kreatinin se částečně vylučuje i tubulární sekrecí a množství secernované tubuly roste s jeho vzrůstající koncentrací v séru.

Při normální funkci ledvin tedy odpovídá clearance kreatininu glomerulární filtraci (clearanci inulinu), s pokračující renální insuficiencí však klesá clearance kreatininu pomaleji, než odpovídá skutečnému poklesu glomerulární filtrace. Dalším důvodem, proč clearance kreatininu neodpovídá zcela glomerulární filtraci, je skutečnost, že nejběžněji užívaná metoda stanovení – Jaffého reakce – není pro kreatinin specifická a stanovuje navíc množství tzv. Jaffé-pozitivních chromogenů. Jejich podíl na vzniklém zabarvení v séru a v moči je rozdílný a mění se při různých chorobných stavech (diabetes aj.).

Přes všechny tyto výhrady však zůstává stanovení clearance kreatininu nejužívanější rutinní metodou pro odhad glomerulární filtrace. Existují pro to dva důvody:

- kreatinin je látka vznikající v organismu a nemusí se přivádět v infúzi; jeho produkce velmi málo kolísá, vyloučíme-li nadměrný přívod masa a přílišnou fyzickou námahu;
- metoda stanovení kreatininu je levná a jednoduchá.

2. 5. 1. 2. 1. Výpočet clearance kreatininu

Clearance endogenního kreatininu se počítá podle následujícího vzorce (U_{kr} a P_{kr} jsou koncentrace kreatininu v moči a plazmě – séru, V pak diuréza v ml/s):

$$Cl_{kr} [\text{ml/s}] = U_{kr} \times V / P_{kr} = GF$$

Aby se vyloučil vliv nestejné velikosti těla, hmotnosti i a konstituce, přepočítává se tato hodnota (GF_{cor}) na ideální povrch těla, tj. $1,73 \text{ m}^2$. Skutečný povrch těla S (m^2) se odečítá z monogramu a existuje i řada vzorců, vycházejících z hmotnosti pacienta m (kg) a jeho výšky h (cm), např.:

$$GF_{cor} = GF / S \times 1,73$$

2. 5. 1. 2. 2. Hodnocení clearance kreatininu

Referenční rozmezí je $1,15\text{-}2,35 \text{ ml/s}/1,73 \text{ m}^2$. Protože však glomerulární filtrace, a tedy i clearance kreatininu klesá s rostoucím věkem, bere se někdy v úvahu i tato skutečnost. Pro závislost ideální clearance kreatininu (GF_{id}) na věku platí rovnice:

$$GF_{id} = -0,00946 \times \text{věk [roky]} + 2,118$$

Jako normální se pak považuje clearance kreatininu, pohybuje-li se její hodnota v rozmezí $GF_{id} \pm 30 \%$. Velmi snížená je kreatininová clearance menší než 25% hodnoty GF_{id} .

Při hodnocení dělené (frakcionované) clearance je fyziologická její značná variabilita v jednotlivých porcích. Je-li kolísání malé i při normální průměrné hodnotě, jde o poruchu funkce ledvin.

K nejčastějším chybám u tohoto častého vyšetření patří:

- neúplný sběr moči;
- nepromíchaná moč sbíraná do více nádob při polyurii;
- zaslání vzorku ranní moči místo moči sbírané za časové období;

- nesprávný výpočet povrchu těla u obézních osob a pacientů s velkou retencí tekutin;
- pacient sbírá moč kratší období (např. přes noc)- glomerulární filtrace jeví totiž cirkardiální rytmus s nejmenší hodnotou v noci.

2. 5. 1. 2. 3. Clearance kreatininu versus sérový kreatinin

Sérová koncentrace kreatininu velmi dobře koreluje s hodnotou glomerulární filtrace; vztah mezi těmito parametry je vyjádřen nepřímou úměrou. Při zvýšení sérového kreatininu (S_{kr}) lze odhadnout hodnotu clearance kreatininu; existuje více vzorců různých autorů, nejužívanější je asi vzorec Cockcroftův:

$$Cl_{kr} = (140 - \text{věk [roky]} \times \text{hmotnost [kg]} / 44,5 \times S_{kr} [\mu\text{mol/l}])$$

Uvedený vzorec platí pro muže, u žen očekáváme hodnotu clearance kreatininu asi o 15 % nižší, výsledek tedy musíme násobit faktorem 0.85. Větší nesouhlas mezi hodnotou změřenou a předpokládanou podle uvedeného vzorce bývá nejčastěji způsoben neúplným sběrem moče. Při větším poklesu glomerulární filtrace (pod hodnotu 0,8 ml/s) je tedy stanovení clearance kreatininu zbytečné a zcela vystačíme s hodnotou sérového kreatininu. Naproti tomu menší pokles glomerulární filtrace nelze podle sérového kreatininu rozpoznat a právě odhalení počátečních fází renálního onemocnění má stanovení clearance kreatininu největší význam.

2. 5. 2. Metody měření glomerulární filtrace bez sběru moči

2. 5. 2. 1. Koncentrace Cystatinu C v séru

Řada nízkomolekulárních proteinů či polypeptidů se při poklesu glomerulární filtrace hromadí v plazmě. Patří k nim i Cystatin C, který je produkován všemi buňkami s jádrem konstantní rychlostí a rychlost tvorby u lidí je pozoruhodně konstantní počas celého života. Jeho koncentrace v plazmě stoupá úměrně poklesu glomerulární filtrace. Je lepším ukazatelem funkce glomerulů než clearance kreatininu. Z toho důvodu je sérová koncentrace Cystatinu C nezávislá na svalové hmotě a pohlaví ve věkovém rozmezí 1 až 50 let např. u

pacientů se svalovou hypotrofií, majících nízkou hladinu kreatininu v séru, proto byl Cystatin C v plazmě a séru navržen jako více senzitivní marker pro GF.

Skupiny pacientů s největším užitkem jsou ty s mírným až středním onemocněním ledvin a rovněž ty s akutním selháním ledvin, u kterých musí být podávány léky, které jsou vylučovány glomerulární filtrací, obzvláště starší lidé (nad 50 let), děti, těhotné ženy s podezřením na preeklampsii, diabetici, lidé s onemocněním kosterních svalů a příjemci ledvinového transplantátu. Cystatin C byl navíc v současné literatuře projednáván jako prognostický marker pro akutní srdeční selhání.

Jako i pro kreatinin, bylo pro výpočet GF u dospělých a dětí publikováno několik rovnic, založených na Cystatinu C (5).

2. 5. 2. 1. 1. Odhad glomerulární filtrace

Cílem všech výpočtových metod je odhad glomerulární filtrace (GF). Tento odhad lze označit eGF. Pro výpočet eGF z hodnot Cystatinu C, měřených stanovením Roche, je doporučena následující rovnice (rovnice dle Grubba), s použitím pouze koncentrace Cystatinu C v mg/l a faktoru F:

$$eGF [\text{ v ml/min/1,73m}^2] = 1,4115 / \text{Cystatin C [v mg/l]}^{1,680} \times F$$

F....faktor: pro děti < 14 let F = 1,384

pro muže F = 1

pro ženy F = 0,948

Orientační referenční rozmezí eGF: 1,2 – 3,0 ml/s/1,73m² (6)

3. CÍL PRÁCE

Cílem práce je stanovení jednotlivých markerů glomerulární filtrace, srovnání stanovení Cystatinu C na dvou rozdílných měřicích systémech v porovnání s kreatininem, a to především s cílem upozornit na důležitost vhodného výběru měřicího systému s ohledem na pacienta a ověřením jeho přínosu pro klinickou praxi.

4. METODICKÁ ČÁST

4. 1. Kreatinin

Stanovení kreatininu v séru soupravou firmy ROCHE (Jaffeho metoda s kyselinou pikrovou) na analyzátoru Cobas Integra 800.

Princip: Kreatinin reaguje s kyselinou pikrovou v alkalickém roztoku za tvorby žlutočerveně zabarvené sloučeniny. Intenzita zabarvení je úměrná koncentraci kreatininu a měří se přírůstek absorbance při 512nm.

Znaky analytické metody:

Mez stanovitelnosti – do 1300 $\mu\text{mol/l}$

Mez detekce – 5,57 $\mu\text{mol/l}$

Analytická citlivost - 9×10^{-5} $\Delta\text{A}/\text{min}$ na 1 $\mu\text{mol/l}$ koncentrace kreatininu.

Interference:

Hemolýza – hladiny hemoglobinu > 800 g/l významně zvyšují naměřený výsledek koncentrace kreatininu. Není vhodné používat metodu Jaffé pro stanovení kreatininu v hemolytických vzorcích novorozenců, kojenců nebo dospělých s hladinou HbF > 60 g/l.

Ikterus – hladiny bilirubinu vyšší, než 85 $\mu\text{mol/l}$ významně měřenou koncentraci kreatininu snižují.

Lipémie – hladiny Intralipidu vyšší, než 250 g/l s testem interferují. Interference může být pozitivní i negativní.

Reagencie:

Činidlo R1:	Hydroxid sodný	900 mmol/l
	Fosforečnan	135 mmol/l
	pH	>13,5
Činidlo R2:	Kyselina pikrová	50 mmol/l
	pH	6,5

Referenční hodnoty:

fS kreatinin ($\mu\text{mol/l}$): ženy 44 – 80 muži 62 – 106 (7)

4. 2. Cystatin C

4. 2. 1. Tina – quant Cystatin C

Stanovení Cystatinu C v séru soupravou firmy ROCHE na analyzátoru Cobas Integra 800.

Princip: Částicemi usnadněné imunoturbidimetrické stanovení. Lidský Cystatin C aglutinuje s latexovými částicemi potaženými protilátkami proti Cystatinu C. Agregát je stanoven turbidimetricky při 552 nm.

Znaky analytické metody:

Rozsah měření – 0,4 – 8,0 mg/l

Spodní detekční limit - $\leq 0,3$ mg/l

Reagencie:

Činidlo R1: Roztok polymérů v MOPS- pufovaném fyz. roztoku, konzervans, stabilizátory

Činidlo R2: Latexové částice v glycinovém pufru potažené protilátkou proti Cystatinu C (králičí), konzervans, stabilizátory

Referenční hodnoty:

Pro jedince 20 – 70 let 0,47 – 1,09 mg/l (8)

4. 2. 2. Cystatin C Assay Kit

Stanovení Cystatinu C v séru soupravou firmy DIAZYME na analyzátoru Cobas Mira Plus.

Princip: Cystatin C se váže na specifickou anti-Cystatin C protilátku, která je navázána na latexových částicích. Přírůstek absorbance je přímoúměrný koncentraci Cystatinu C ve vzorku při 540 nm.

Znaky analytické metody:

Spodní limit detekce: 0,13 mg/l

Horní limit detekce: 8,0 mg/l

Interference:

Hemoglobin – nad 460 g/l

Bilirubin – nad 18,2 g/l

Kyselina askorbová – nad 50 g/l

Reagencie:

Činidlo R1: Pufr

Činidlo R2: Suspenze králičích polyklonálních protilátek Cystatinu C potažených na latexových částicích.

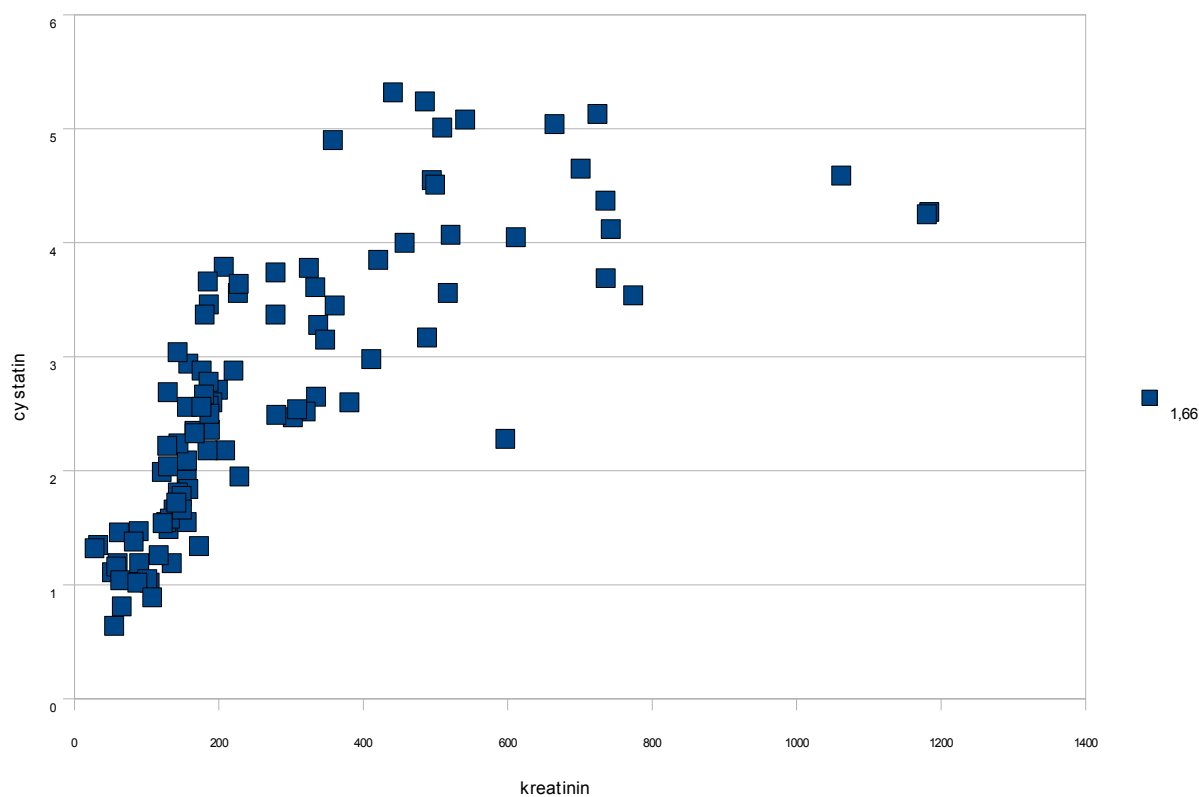
Referenční hodnoty:

0,5 – 1,03 mg/l (9)

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

V následující kapitole jsou uvedeny výsledky měření koncentrace Cystatinu C a kreatininu u skupiny mužů a žen vyšetřovaných na našem pracovišti, dále glomerulární filtrace(GF) jednotlivých markerů a analytické srovnání metody Cystatinu C na dvou rozdílných systémech s cílem upozornit na důležitost vhodného výběru měřicího systému s ohledem na pacienta.

Chronické onemocnění ledvin je jedním s celosvětových problémů, který přináší značné riziko kardiovaskulární morbidity a smrti, proto je na jednotlivé laboratorní ukazatele selhání ledvin kladen značný důraz, zejména na jejich senzitivitu a specifčnost (8). V současnosti slouží klinikům k interpretaci onemocnění ledvin dva parametry. Jedná se o sérový kreatinin, který je nejběžněji používaným markerem pro stanovení glomerulární filtrace, a o Cystatin C, který nabývá dnes na významu nejen z hlediska nefrologie, ale i jako prognostický marker pro akutní selhání ledvin. Nás konkrétně zajímalo, zda hodnoty sérového kreatininu korelují s výsledky Cystatinu C.



Graf č.1 Závislost koncentrace kreatininu na Cystatinu C v séru měřená na systému Cobas Integra 800

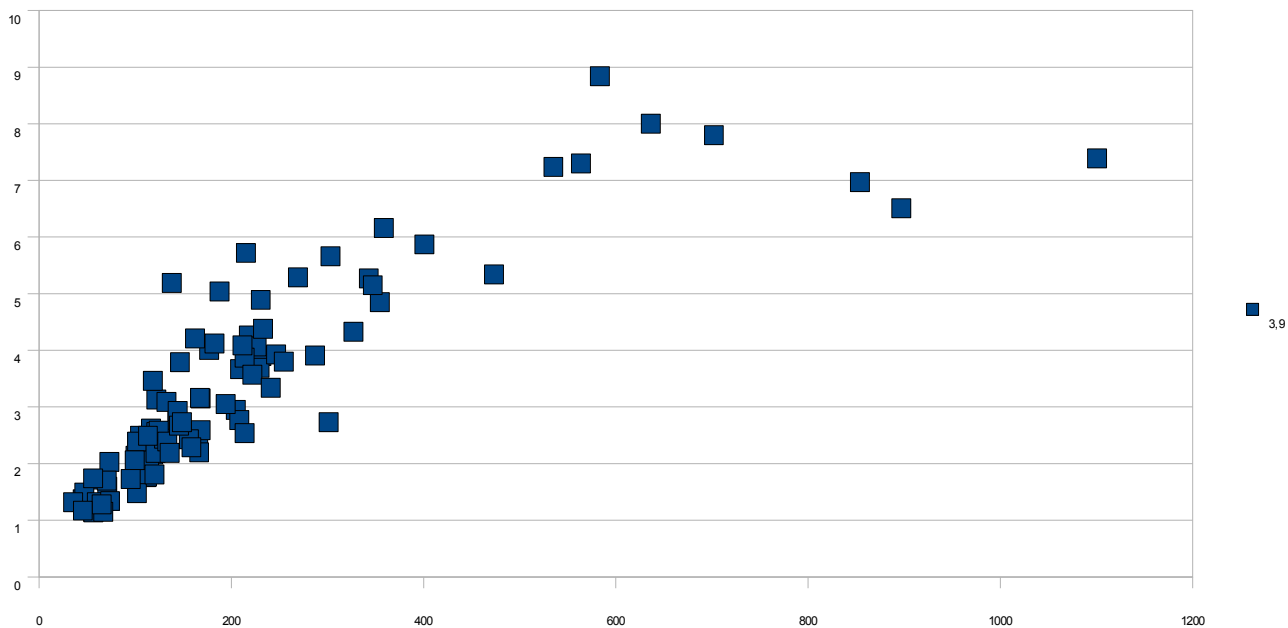
Zjišťování sérové koncentrace kreatininu není ideální z mnoha hledisek. Je totiž významně měněna faktory, jakými jsou pohlaví, věk, množství svalové hmoty, stravovací návyky, či tubulární sekrece. Pro kompenzaci těchto nedostatků bylo vytvořeno několik prediktivních rovnic, viz. teoretická část. Vzhledem k tomu, že nárůst koncentrace kreatininu v krvi je pozorovaný pouze při známkách poškození nefronů, není vhodný k detekování raného stádia onemocnění ledvin. Výrazně senzitivnější test a lepší odhad GF poskytuje test clearance kreatininu. Měření clearance kreatininu však provází obdobný problém, jelikož je endogenního původu a výše zmíněné faktory rovněž komplikují interpretaci.

Cystatin C je produkován všemi buňkami s jádrem konstantní rychlostí a rychlost tvorby u lidí je pozoruhodně konstantní počas celého života. Jeho eliminace z oběhu je téměř úplně skrze glomerulární filtraci a z tohoto důvodu je sérová koncentrace Cystatinu C nezávislá na svalové hmotě a pohlaví ve věkovém rozmezí 1 až 50 let. Proto byl navržen jako více senzitivní marker pro GF (8).

Ve výše uvedeném grafu je patrné, že závislost koncentrace kreatininu na Cystatinu C, je lineárního charakteru. Proložíme-li grafem přímkou, je patrné, že u pacientů, kteří mají vysokou koncentraci kreatininu v krvi, není nalezená koncentrace Cystatinu C v očekávaných mezích. Křivka je v těchto místech „ohlá“. Tento fakt si můžeme vysvětlit jednak tím, že při vysoké sérové koncentraci kreatininu stoupá jeho tubulární resorpce, a jednak tím, že séra těchto pacientů jsou silně lipemická a velikost lipémie slabě koreluje s výsledky Cystatinu C.

Výrobce Roche zaručuje linearitu stanovení Cystatinu C až do koncentrace 8 mg/l. Pro ověření správnosti a přesnosti měření na našem analytickém systému dodává v setu kontrolní materiál se dvěma koncentracemi Cystatinu C. Jedná se o koncentraci 1,02mg/l a koncentraci 4,36mg/l. Valná většina vzorků se pohybovala v tomto rozmezí s tím, že několik pacientů, zejména z dialyzačních jednotek, mělo hodnotu Cystatinu C vyšší, než je dodávaná druhá hladina. Denní kontrola kvality však vykazovala uspokojivé výsledky.

Druhým analytickým systémem použitým ve studii byl otevřený systém Cobas Mira Plus, kterým jsme stanovovali Cystatin C soupravou firmy Diazyme. V následujícím grafu jsou přiložené výsledky.



Graf č.2 Závislost koncentrace kreatininu na Cystatinu C v séru měřená na systému Cobas Mira Plus

Opět zde můžeme vidět lineární závislost koncentrace kreatininu na Cystatinu C. Od hodnoty 600 mmol/l kreatininu dochází k zakřivení přímky z důvodů již výše popsaných. Je ale patrné, že křivka je posunutá i u negativních hodnot kreatininů nad cut off hodnoty Cystatinu C. Zvolené stanovení představuje kromě pochopitelných úskalí otevřených systémů i podivení se nad příbalovými informacemi, které jsou se soupravou dodávány do laboratoří. Zaručují linearitu stanovení také do hodnoty koncentrace Cystatinu C 8 mg/l, ale přiložený kontrolní set obsahuje dvě hladiny koncentrací Cystatinu C blízko u sebe. První kontrola je 1,01mg/l a druhá pouze 2,5 mg/l. Z grafu je ale patrné, že valná většina výsledků je nad druhou kontrolní hladinou a my nemáme možnost si vyzkoušet přesnost a správnost měření na analytickém systému. Proto výsledky stanovené touto metodou musí být obezřetně interpretovány, protože nevíme, zda při vyšších hladinách Cystatinu C v séru je analytický systém kompatibilní se soupravou.

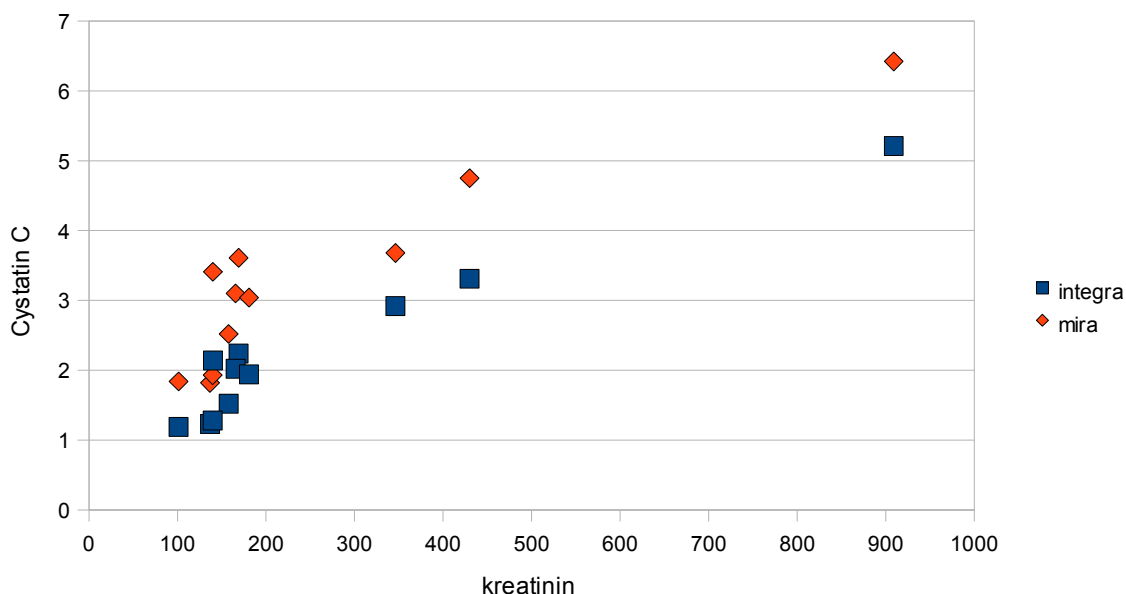
Pro zdravotnictví je důležité hodnotit nejenom senzitivitu a specifčnost, ale také ekonomiku stanovení, čas do vydání výsledku, stabilitu reagensů atd. V případě uzavřeného systému Cobas Integra 800 se můžeme spolehnout na jeho stabilitu, kalibrační interval je vyžadován po 90 dnech, nebo v případě, že to vyžaduje proces kontroly kvality, na

směrodatnou odchylku, respektive korelační koeficient i za cenu vyšších nákladů na jedno stanovení. Množství prokalibrovaného materiálu je v únosných mezích a v podstatě bohatě postačuje jedna šestibodová kalibrace na soupravu při jejím vložení do analyzátoru. Na otevřeném systému Cobas Mira Plus je třeba, aby byla kalibrace prováděna každých 14 dní, je opět šestibodová a vyžaduje delší časový interval na její provedení v porovnání s uzavřeným systémem. Přestože je souprava levnější, množství prokalibrovaného materiálu se dostává do ekonomicky podstatné roviny. Navíc nikdy nedosáhneme tak uspokojivých statistických srovnání jako v případě uzavřených systémů. Toto dokládá tabulka č.1.

Tab.č 1 Reprodukovatelnost Cystatinu C na dvou systémech (počet měření 21)

	průměr	směrodatná odchylka	variační koeficient
Integra 800	1,01	0,02	1,98%
Cobas Mira Plus	1,97	0,27	13,95%

Při stanovení Cystatinu na těchto dvou systémech nás zajímala i jejich vzájemná robustnost. Připravili jsme si séra pacientů, která jsme vyšetřili na obou systémech. Výsledky jsou naznačené v grafu č.3.



Graf č.3 Robustnost systémů Cobas Integra 800 a Cobas Mira Plus.

V grafu je patrné, že výsledky zpracované otevřeným systémem odpovídají při stejné hodnotě kreatininu vyšší koncentraci Cystatinu C v séru než v uzavřeném systému. I přesto, že denní kontrola kvality vycházela správně a přesně s ohledem na toleranci 2 SD, výsledky pacientů chodily výše, proto jsme vyhodnotily otevřený systém jako méně vhodný systém a v dnešní době, kdy je kladen důraz na správnost a přesnost, za nevyhovující.

6. ZÁVĚR

Po konzultaci s kliniky, zjištěných v této práci, vyplývají dva důležité výstupy pro analytickou a klinickou praxi.

1. Cystatin C je pro zjištění GF lepším markerem než sérový kreatinin. Největší užitek přináší pacientům s mírným až středním onemocněním ledvin a rovněž těm, kteří trpí akutním selháním ledvin. Velikost GF z hodnot Cystatinu C se koriguje pouze na ideální povrch 1,73 m². GF z hodnot kreatininu vyžaduje delší časové období, během něhož se musí sbírat moč pro stanovení kreatininu v moči (obvykle 24 hodin), proto je v urgentní medicíně obsolentním vyšetřením a je zatížen množstvím korekcí, a proto je méně přesný.

2. Stanovení Cystatinu C na otevřeném analytickém systému přináší řadu nesrovnalostí v interpretaci, proto jsme ho vyhodnotili za nevyhovující. Je důležité přihlédnout i ke stabilitě reagensů, senzitivitě, specifčnosti a v neposlední řadě také k ceně produktu.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- 1) Trojan, S.; Langmeier, M. (1994) Fyziologie vyučování. In.: Lékařská fyziologie, Praha. 241
- 2) Konrádová, V.; Vajner, L.; Uhlík, J. (2005) Močový systém. In.: Histologie, Praha. 113
- 3) Racek, J. (1999) Funkční zkoušky ledvin. In.: Klinická biochemie, Praha.211
- 4) Varga, J.; Šofranková, A. (1991) Patofyziológia obličiek a močových ciest. In.: Patofyziologický atlas, Osveta. 244
- 5) Zima, T.; Teplan, V.; Tesař, V.; Racek, J.; Schüick, O.; Janda, J.; Friedecký, B.; Kubíček, Z.; Kratochvíla, J. (2009) Metody vyšetření glomerulární filtrace. In.: Doporučení České nefrologické společnosti a České společnosti klinické biochemie ČLS JEP k vyšetřování glomerulární filtrace, Praha. 3
- 6) Neshyba, P.; et al. (1990) Možnosti a meze odhadu hodnoty glomerulární filtrace. In.: Biochem Clin, Bohemoslov. 37
- 7) Pracovní návod firmy Roche, Kreatinin
- 8) Pracovní návod firmy Roche, Tina-quant Cystatin C
- 9) Pracovní návod firmy Diazyme, Cystatin C Assay Kit

8. SEZNAM ZKRATEK

ECT - extracelulární tekutina

GN - glomerulonefritida

GF - glomerulární filtrace

SD - směrodatná odchylka