

**Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Lékařská fakulta v Hradci Králové**

Doktorský studijní program  
**Klinická biochemie**

**Laboratorní vyšetření funkce ledvin**

**Laboratory diagnostics of kidney function**

**MUDr. Tomáš ŠÁLEK**

Školitel: Prof. MUDr. Vladimír Palička, CSc., Dr. h. c.

Školitel konzultant: RNDr. Bedřich Friedecký, Ph. D.

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové, květen 2014

## Poděkování:

Chtěl bych poděkovat za opakované konzultace k problematice glomerulární filtrace a konkrétním, později publikovaným článkům Prof. MUDr. Vladimíru Paličkovi, CSc, Dr. h. c.,

RNDr. Bedřichu Friedeckému, PhD. a Doc. MUDr. Pavlu Živnému, CSc.

Děkuji také prof. MUDr. Antonínu Jaborovi, CSc za spolupráci při spojení dat diabetiků ze Zlína a pracoviště IKEM.

Poděkování patří také RNDr. Svatavě Vaňkové za opakované diskuze o této disertační práci.

# Obsah

Použité zkratky.....	6
1 Úvod.....	8
2 Metody odhadu a měření glomerulární filtrace – Vývoj a současný stav vědomostí.....	9
2.1 Anatomie a histologie ledvin.....	9
2.1.1 Anatomie ledvin.....	9
2.1.2 Makroskopie ledvin.....	9
2.1.3 Cévy ledviny:.....	9
2.1.4 Nefron.....	10
2.1.5 Juxtaglomerulární aparát.....	11
2.1.6 Extrarenální močové cesty.....	11
Tvoří:.....	11
2.2 Funkce ledvin.....	12
2.2.1 Vylučovací.....	12
2.2.2 Endokrinní.....	12
2.2.3 Regulační.....	13
2.3 Glomerulární filtrace.....	15
2.3.1 Fyziologie glomerulární filtrace.....	15
2.3.2 Jednotky glomerulární filtrace.....	15
2.3.3 Klinická potřeba znalosti GFR.....	16
2.3.4 Ideální marker glomerulární filtrace.....	16
2.3.5 Rozdělení metod měření a odhadu GFR.....	17
2.3.6 Referenční metody stanovení glomerulární filtrace.....	18
2.3.7 Metody výpočtu a odhadu GFR založené na měření kreatininu.....	21
2.3.8 Metody odhadu GFR založené na měření cystatinu C.....	30
2.4 Chronické onemocnění ledvin.....	34
2.4.1 Globální doporučení, koncepční model a definice chronického onemocnění ledvin.....	34
2.4.2 Klasifikace chronického onemocnění ledvin.....	38
2.4.3 Prevalence CKD.....	38
2.4.4 Prognóza pacientů s CKD.....	40
2.4.5 Diagnostický algoritmus pro stanovení diagnózy CKD na základě eGFR a mGFR.....	43
2.4.6 Rizikové faktory chronického onemocnění ledvin.....	44
2.5 Akutní poškození ledvin.....	45
2.5.1 Globální doporučení, koncepční model a definice akutního poškození ledvin.....	45
3 Cíle disertační práce.....	46
4 Soubor nemocných.....	47
4.1 Pacienti s monoklonální gamapatií neurčeného významu (MGUS).....	47
4.2 Pacienti intoxikovaní metanolem.....	47
4.3 Pacienti s diabetem mellitus.....	47

4.4	Pacienti s chronickým onemocněním ledvin.....	47
5	Metody měření a odhadu glomerulární filtrace, další použité laboratorní testy .....	48
5.1	Stanovení kreatininu .....	48
5.2	eGFR <sub>creatinine</sub> .....	48
5.3	Creatininová clearance .....	49
5.4	Stanovení cystatinu C .....	49
5.5	eGFR <sub>cystatinC</sub> .....	50
5.6	eGFR <sub>creatinine +cystatinC</sub> .....	51
5.7	Další laboratorní testy .....	52
6	Statistické testy .....	53
6.1	Pacienti s MGUS .....	53
6.2	Pacienti intoxikovaní metanolem .....	53
6.3	Pacienti s diabetem mellitus .....	53
6.4	Pacienti s chronickým onemocněním ledvin.....	53
7	Vlastní výsledky.....	54
7.1	Pacienti s MGUS .....	54
7.2	Pacienti intoxikovaní metanolem .....	57
7.3	Pacienti s diabetem mellitus .....	60
7.4	Pacienti s chronickým onemocněním ledvin.....	65
8	Diskuze.....	67
8.1	Pacienti s MGUS .....	67
8.2	Pacienti intoxikovaní metanolem .....	68
8.3	Pacienti s diabetem mellitus .....	69
8.4	Pacienti s chronickým onemocněním ledvin.....	72
9	Závěry .....	73
9.1	Pacienti s MGUS .....	73
9.2	Pacienti intoxikovaní metanolem .....	73
9.3	Pacienti s diabetem mellitus .....	74
9.4	Pacienti s chronickým onemocněním ledvin.....	74
9.5	Dosažení cílů: .....	74
10	Použitá literatura .....	75
11	Přílohy.....	81
11.1	Seznam publikované literatury v recenzovaných a impaktovaných časopisech .....	81
11.2	Naskenované vybrané publikované články .....	82

## Použité zkratky

ACE	angiotensin konvertující enzym
ADH	antidiuretický hormon
AKI	acute kidney Indry
ARIC	The Atherosclerosis Risk in Communities Study
ATP	adenosintrifosfát
Biclonal	biklonální paraprotein
CKD	chronic kidney disease
CKD-EPI	Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration
CrCl	Creatininová clearance
Cut-off	rozhodovací mez
cys	sérový cystatin C
ČNS	Česká nefrologická společnost
ČSKB	Česká společnost klinické biochemie
DTPA	diethyltriaminopentaoctová kyselina
FLC	free light chains
GFR	glomerulární filtrace
eGFR	glomerulární filtrace odhadovaná
eGFR <sub>creatinine</sub>	odhadovaná glomerulární filtrace ze sérového kreatininu
eGFR <sub>cystatinC</sub>	odhadovaná glomerulární filtrace ze sérového cystatinu C
eGFR <sub>creatinine+cystatinC</sub>	odhadovaná glomerulární filtrace ze sérového kreatininu a cystatinu C
EKG	elektrokardiografie
ERM	European Reference Material
HOPE	Heart Outcomes and Prevention Evaluation study
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and laboratory medicine
IgA κ	paraprotein třídy IgA kappa
IgA λ	paraprotein třídy IgA lambda
IgG κ	paraprotein třídy IgG kappa
IgG λ	paraprotein třídy IgG lambda
IgM κ	paraprotein třídy IgM kappa
IgM λ	paraprotein třídy IgM lambda
IKEM	Institut Klinické a Experimentální Medicíny v Praze
Index P <sub>30</sub>	Procento pacientů s odhadovanou glomerulární filtrací, kteří se liší proti měřené hodnotě do 30%.

$\kappa$ FLC	volné lehké řetězce kappa
$\kappa / \lambda$	poměr volných lehkých řetězců kappa a lambda
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes
kr	sérový kreatinin
LBM	lean body mass
LWG	Laboratory Working Group
$\lambda$ FLC	volné lehké řetězce lambda
MDRD	The Modification of Diet in Renal Disease
mGFR	měřená glomerulární filtrace
MGUS	monoclonal gammopathy of undetermined significance
MIg	monoklonální imunoglobulin
MLM	mixed linear model
$^{99m}\text{Tc}$	radionuklid technecia
NHANES	National Health and Nutrition Examination Surveys
NHANES III	Third National Health and Nutrition Examination Survey
NIDDK	National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases
NIST	National Institute of Standards and Technology
NKDEP	National Kidney Disease Education Program
NKF	National Kidney Foundation
PENIA	particle enhanced immunonefelometric assay
PETIA	particle enhanced immunoturbidimetric assai
SRM	standard reference material
Sv	sievert
TAT	turnaround time



# 1 Úvod

Ledviny plní v organismu mnoho funkcí. Existuje celá řada laboratorních testů a zobrazovacích metod, které měří jednotlivé funkce ledvin. Výsadní postavení mezi funkcemi ledvin má glomerulární filtrace.

Důvodů pro toto mimořádné postavení je několik:

- Je asociována s morbiditou a mortalitou, čím nižší glomerulární filtrace, tím větší riziko
- S poklesem glomerulární filtrace klesají také další renální funkce
- Mnoho léků je z těla vylučováno mechanismem glomerulární filtrace

Z těchto důvodů je velká klinická potřeba znalosti glomerulární filtrace. Při poklesu glomerulární filtrace se nasazuje nefroprotektivní terapie a snižuje se terapeutická dávka léků s farmakokinetikou renálního vylučování.

Teoretická část práce popisuje vývoj standardizace měření sérového kreatininu a cystatinu C, což jsou dvě nejčastější metody v klinické praxi, které se používají jako ukazatele glomerulární filtrace. Je popsán vývoj a validace rovnic pro odhad glomerulární filtrace ze sérového kreatininu a cystatinu C. Experimentální část si dala za cíl porovnat odhady glomerulární filtrace ze sérového kreatininu a cystatinu C u čtyř podskupin pacientů:

- Pacienti s monoklonální gamapatií neurčeného významu (101 pacientů)
- Pacienti intoxikovaní metanolem (13 pacientů)
- Pacienti s diabetem mellitus (1515 pacientů) a
- Pacienti s chronickým onemocněním ledvin (352 pacientů)

Dále byl studován vliv odhadů glomerulární filtrace ze sérového kreatininu a cystatinu C na klasifikaci chronického onemocnění ledvin.

Výsledky byly publikovány v pěti původních vědeckých pracích v recenzovaných nebo impaktovaných časopisech. (viz kapitola 11.1 Seznam publikované literatury v recenzovaných a impaktovaných časopisech naskenované vybrané publikované články).

## 2 Metody odhadu a měření glomerulární filtrace – Vývoj a současný stav vědomostí

### 2.1 Anatomie a histologie ledvin

#### 2.1.1 Anatomie ledvin

Ledviny jsou párový, pro život nezbytný, orgán uložený retroperitoneálně podél bederní páteře od dvanáctého hrudního po třetí bederní obratel. Pravá ledvina je uložena níže než levá.

Jsou fazolovitého tvaru a červenohnědé barvy. Ledvina je 10–12 centimetrů dlouhá, 5-6 centimetrů široká a tloušťka je 3–4 centimetry. Anatomicky se na ledvině rozlišuje přední strana (facies anterior), zadní strana (facies posterior), horní pól (extermatas superior), dolní pól (extermatas inferior), zevní okraj ledviny (margo lateralis), vnitřní okraj ledviny (margo medialis) a ledvinová branka (hilum renale), která je místem, kde do ledviny vstupují a vystupují renální cévy, nervy, lymfatické cévy a močové cesty.

Na povrchu ledvin je pouzdro capsula fibrosa.

Prostřednictvím renálních tepen jsou napojeny na aortu.

**Obaly ledviny:** Ledviny jsou uzavřeny mezi dvěma listy fascie:

- **Lamina praerenalis**
- **Lamina retrorenalis**

Mezi oběma listy je ledvina, nadledvina a tukový polštář ledviny: capsula adiposa.

#### 2.1.2 Makroskopie ledvin

**Makroskopicky na frontálním řezu ledvinou** se rozlišuje:

- Kůra ledviny – je jemně zrnitá s tečkami, které tvoří glomeruly
- Dřeň ledviny – je žíhaná a skládá se z 1-20 pyramid. Širší strana pyramidy (baze) je obrácená ke kůře.

Každá z pyramid s přilehlou vrstvou kůry tvoří lalok.

#### 2.1.3 Cévy ledviny:

Do každé ledviny vstupuje arteria renalis, větev aorty. Před vstupem do ledviny se dělí na 2-3 větve. Uvnitř ledviny se dále dělí na arteriae interlobares, probíhají po stranách pyramid a na jejich bazích vytváří arteriae arcuatae. Jejich větve arteriae interlobulares pronikají kůrou a vysílají aferentní arterie glomerulů.

Žilní odtok krve začíná prostřednictvím venulae stellatae, dále vznikají venae interlobulares, venae

arcuatae, ústí do venae interlobares a nakonec vzniká vena renalis.

#### 2.1.4 Nefron

Je základní stavební a funkční jednotkou ledvin. V každé ledvině je jich asi 1 milion.

Podle polohy se nefrony dělí na kortikální a juxtamedulární.

Každý nefron se skládá z glomerulu a tubulu.

- **Glomerulus**

Je tvořen Bowmanovým pouzdrem a kapilárními kličkami, které vznikají postupným větvením renálních arterií (arteriae renales).

**Glomerulární kapilára** se skládá ze tří vrstev:

- **Fenestrováný endotel:** Na povrchu endotelu jsou makromolekuly sialoglykoproteinů, které vytváří elektronegativní náboj.

- **Bazální membrána extracelulární:** Na ultrastruktuře bazální membrány se podílí pět základních složek:

Kolagen IV - tvoří jej monomery, dimery, trimery a tetramery kolagenu IV. Jejich vzájemným propojením vzniká prostorová síť s vnitřními póry o velikosti 8-14 nm.

Laminin - tvoří kříže na které se váže kolagen IV.

Heparan-sulfát proteoglykan - podílí se největší měrou na elektronegativním náboji glomerulární membrány

Endactin – glykoprotein s vysokým obsahem karboxylových skupin aminokyselin a kyseliny sialové

Fibronectin- glykoprotein s vysokým obsahem karboxylových skupin aminokyselin a kyseliny sialové.

- **Viscerální epitel tvořený podocyty** – pokrývá zevní do Bowmanova prostoru přivrácené povrchy glomerulárních kapilár. Tvar buněk bývá přirovnáván k tělu chobotnice[1].

V glomerulu dochází především k filtraci plazmy z krevního oběhu, čímž vzniká takzvaná primární moč, které u zdravého člověka vznikne asi 180 litrů za den.

- **Tubulus**

Tubulus tvoří proximální tubulus, Henleova klička, distální tubulus a sběrací kanálek. V tubulech dochází ke dvěma základním dějům:

#### Reabsorpce

V tubulu dochází k reabsorpci vody, iontů, glukózy, aminokyselin a dalších látek dle potřeby organismu.

## Sekrece

Příkladem je sekrece nepotřebného kreatininu v proximálním tubulu.

Nakonec vznikne z primární moče takzvaná definitivní moč, které je asi 1,5–2 litry za den.

Moč je z ledvin odváděna extrarenálními močovými cestami

### 2.1.5 Juxtaglomerulární aparát

Je tvořen místem, kde jsou v těsném kontaktu buňky začátku distálního tubulu, aferentní arteriola, eferentní arteriola a mezangiální buňky. Buňky v této oblasti jsou specializované.

- Buňky **aferentní arterioly** obsahují granula, ve kterých je hormon renin a jeho prekurzor. Proto se nazývají **granulární buňky**. Tyto buňky jsou inervovány **sympatickými nervovými zakončeními**.
- Buňky distálního tubulu tvoří takzvanou **makula denza**. Je to chemoreceptor, který registruje množství sodíku protékající distálním tubulem.
- **Mezangiální buňky** obsahují kontraktilní proteiny. Buňky jsou nepravidelného tvaru a vyplňují prostor mezi aferentní arteriolou, eferentní arteriolou, kapilárami a distálním tubulem.

Celá tato juxtaglomerulární oblast je klíčová pro udržení krevního objemu.

### 2.1.6 Extrarenální močové cesty

Tvoří:

- **Ledvinové kalichy**
- **Ledvinové pánvičky**
- **Močovody**
- **Močový měchýř**
- **Močová trubice**

## 2.2 Funkce ledvin

Ledviny plní pro lidský organismus nepostradatelné funkce. Bez ledvin není dlouhodobě život možný.

Hlavní funkcí ledvin je udržovat krevní objem a vnitřní prostředí v konstantním stavu.

Funkce se dělí na vylučovací, endokrinní a regulační.

### 2.2.1 Vylučovací

Ledviny vylučují:

- **Látky odpadní**

Látkami odpadními jsou konečné produkty metabolismu. Odpadními produkty metabolismu jsou neproteinové dusíkaté sloučeniny jako urea, kreatin a kyselina močová. Dalšími odpadními produkty jsou organické kyseliny, včetně aminokyselin.

- **Látky, které má tělo v nadbytku.**

Strava a tekutiny obsahují v nadbytku ionty sodíku, draslíku, chloridů, fosfát, hořečnaté ionty, a sulfát.

Voda může být přijímána také v nadbytku.

### 2.2.2 Endokrinní

Ledviny tvoří tyto hormony:

- **Renin**

Je klíčový hormon pro udržení krevního objemu (tlaku).

Renin je proteáza, která působí na angiotenzinogen, tvořený v játrech, za vzniku angiotensinu I. Je součástí hormonálního systému renin-angiotenzin-aldosteron.

Renin produkují granulární buňky = juxtaglomerulární buňky aferentních arteriol, které jsou baroreceptorem.

Stimulem pro tvorbu reninu jsou:

- pokles krevního objemu v aferentní arteriole
- pokles obsahu sodíku v tubulech v oblasti makula denza
- stimulace nervových zakončení sympatiku. (Granulární buňky mají také beta-1 receptory, nervové zakončení sympatiku je stimulují prostřednictvím reflexu z baroreceptorů aorty a karotického sinu při poklesu krevního tlaku.)
- renálními prostaglandiny
- **Erytropoetin**

Erytropoetin stimuluje v kostní dřeni tvorbu erytrocytů. Stimulem pro jeho tvorbu je hypoxie tkání.

- **1,25 hydroxy vitamin D**

1,25 hydroxy vitamin D stimuluje ve střevě resorpci vápníku při hypokalcémii. Dnes se ukazuje, že kromě metabolismu kalcia má klíčové účinky na všechny orgánové systémy organismu. Má například imunomodulační a antiproliferační účinky.

Na tvorbě definitivního hormonu se podílí tři orgány:

**Kůže** - U člověka začíná většina tvorby vitaminu D v kůži působením ultrafialového elektromagnetického záření slunečního svitu. Vzniká tak cholekalciferol.

**Játra** - V játrech dochází k hydroxylaci v poloze 25, čímž vzniká zásobní forma organismu: 25-hydroxyvitamin D (kalcidiol).

**Ledviny** – Působením alfa1-hydroxylázy v ledvinách vzniká definitivní hormon 1,25 hydroxy vitamin D (kalcitriol).

### 2.2.3 Regulační

- **Regulace krevního objemu a tlaku**

Ledviny regulují krevní objem a tlak. Regulace je dvoustupňová. V prvním stupni se uplatňuje **systém renin-angiotenzin-aldosteron**.

Při poklesu tlaku, který je registrovaný baroreceptory v tepenném řečišti produkují granulární buňky aferentních arteriol renin, který je prvním článkem systému renin-angiotenzin-aldosteron. Renin je proteáza, která působí na angiotenzinogen, který produkují především játra. Vzniká angiotensin I, který ještě není biologicky aktivní. Angiotenzin I je pomocí angiotensin konvertujícího enzymu (ACE) přeměňován na angiotensin II. Ten stimuluje produkci aldosteronu v kůře nadledvin a má silné vazokonstrikční účinky. Aldosteron způsobuje retenci sodíku a vody.

V druhém stupni se uplatňuje **Antidiuretický hormon**. Při větším poklesu krevního objemu se vylučuje ADH, který působí zadržování vody v distálním tubulu ledvin.

- **Regulace osmolality**

Při vzestupu efektivní osmolality se v zadním laloku hypofýzy vyloučí vazopresin = antidiuretický hormon, který způsobí v distálním tubulu ledvin retenci vody.

- **Regulace iontové rovnováhy**

Ledviny regulují iontovou rovnováhu, pokud byla tato narušena jiným orgánem než ledvinami. Například při hypokalémii, která je způsobena ztrátami gastrointestinálním traktem ledviny draslíkem šetří.

- **Regulace acidobazické rovnováhy**

Regulace probíhá v kooperaci s játry. Při acidóze játra produkují více glutaminu. V proximálním

tubulu je při acidóze zvýšená aktivita glutaminázy. Proton se vyloučí do moče jako  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

Ledviny kompenzují respirační poruchy acidobazické rovnováhy.

Například při respirační acidóze dochází ke kompenzační renální metabolické alkalóze se zvýšeným vylučováním chloridů.

- **Regulace metabolismu glukózy**

Glukoneogeneze probíhá pouze v játrech a ledvinách. Proces glukoneogeneze je pro organismus významný při hladovění.

## 2.3 Glomerulární filtrace

### 2.3.1 Fyziologie glomerulární filtrace

Glomerulární filtrace je hlavním globálním ukazatelem funkce ledvin. Je to množství plazmy, kterou ledviny profiltrují za jednotku času.

Ledvinami proteče za minutu asi 20-25% krve ze srdečního výdeje, tedy 1200 ml.

Vztaženo na 1 gram tkáně je to asi 50 krát více než v kterémkoliv jiném orgánu. Při průměrném hematokritu 0,45 se jedná asi o 660 ml krevní plazmy za minutu. Z tohoto množství se asi 20% glomeruly profiltruje, což je asi 125 ml ultrafiltrátu za minutu, tedy 180 litrů plazmy za den[1].

Glomerulární filtrace je dána:

- Početem fungujících nefronů – v obou ledvinách je jich fyziologicky dohromady asi 2 miliony
- Permeabilitou glomerulární kapiláry - stěna glomerulární kapiláry se skládá ze tří vrstev: fenestrování endotelu, extracelulární bazální membrány a epitelu tvořeného podocyty.
- Filtračním tlakem - je dán rozdíl hydrostatických a onkotických tlaků v glomerulární kapiláře a Bowmanově pouzdře. Při hypoproteinémiích proto dochází ke zvýšení filtrační frakce a při hyperproteinémiích (plazmocytom) naopak ke snížení filtrační frakce.

### 2.3.2 Jednotky glomerulární filtrace

Nejčastěji se udává v mililitrech za sekundu (ml/s). Dále se glomerulární filtrace vyjadřuje jako standardizovaná na ideální tělesný povrch  $1,73 \text{ m}^2$ . Jednotkou je potom  $\text{ml/s}/1,73\text{m}^2$ .

Fyziologická glomerulární filtrace je asi  $2,08 \text{ ml/s}/1,73\text{m}^2$  u mladých dospělých lidí[2].

S věkem glomerulární filtrace klesá. Na poklesu se podílí kombinace fyziologických a patofyziologických dějů provázejících stárnutí. Jedná se zejména o glomerulosklerózu, expanzi mezangia, renální vaskulární změny a změny tubulo-intersticiální složky[3].

Tělesný povrch významně ovlivňuje velikost glomerulární filtrace. Lidé s větším tělesným povrchem mají větší glomerulární filtraci. Pro dávkování léků se musí používat GFR daného člověka vyjádřená v ml/s, a ne standardizovaná GFR.



### 2.3.3 Klinická potřeba znalosti GFR

Znalost glomerulární filtrace je pro klinickou praxi nutná především pro:

- Diagnostiku a staging (stupeň postižení) chronického onemocnění ledvin
- Diagnostiku akutního poškození ledvin
- Odhad vývoje onemocnění a prognózy pacienta
- Terapeutické monitorování hladin léčiv vylučovaných ledvinami

### 2.3.4 Ideální marker glomerulární filtrace

Ideální marker glomerulární filtrace by měl splnit následující podmínky:

- Je endogenní
- Jeho produkce je konstantní
- Není pro tělo toxický
- Není radioaktivní
- Neváže se na plazmatické bílkoviny
- Je volně filtrován glomeruly
- Není přítomna tubulární sekrece
- Není přítomna tubulární resorpce
- Měření markeru je standardizované
- Test je dostupný
- Nízké ekonomické náklady
- Není nutný sběr moče

Zatím nebyl nalezen marker, který by splnil všechny uvedené podmínky.

Této skutečnosti se nejvíce blíží clearance inulinu[4]. Inulin je marker exogenní a je nutné ho podávat nitrožilně.

Pro pacienta by bylo ideální, kdyby byl marker endogenní a ke stanovení glomerulární filtrace nebylo potřeba žádného invazivního postupu s infuzemi a opakovanými odběry. Tento endogenní marker by měl být produkován konstantní rychlostí.

Z pohledu laboratorní medicíny by měl být ideální marker analyzován standardizovaným postupem s návazností měření na vyšší referenční materiál, metoda by měla být rychlá a automatizovaná s rychlým časem odezvy s dostupností v nepřetržitém provozu.

### 2.3.5 Rozdělení metod měření a odhadu GFR

Metody stanovení GFR z pohledu sbírání moče rozdělujeme:

- **metody se sběrem moče**

Je logické, že obecným trendem je sběru moče se vyhnout.

Moč, na rozdíl od plazmy, je z hlediska stálosti koncentrace přítomných látek velmi nestabilní prostředí.

V závislosti na příjmu tekutin se může koncentrace přítomných látek poměrně rychle až stokrát zvýšit nebo snížit. Proto je nutné koncentraci měřené látky k něčemu vztáhnout.

První možností je vztáhnutí měřené látky k časovému období = moč se sbírá nejčastěji 24 hodin.

Praktickým problémem je, že velká část sběrů moče je neúplných.

Druhou možností je dát měřenou látku do poměru k jinému analytu, který je vylučován relativně konstantní rychlostí. Tím je nejčastěji močový kreatinin. Když vyšetřovaná osoba pije málo, jsou měřená látka i kreatinin zahuštěny, když pije moc, jsou obě látky zase naředěny, ale jejich poměr je stále stejný. Tímto způsobem se rutinně vyšetřuje například poměr albumin/kreatinin v jednorázové moči. Na základě studií jsou definované rozhodovací meze tohoto poměru. Pro pacienta je výhodou, že nemusí investovat spoustu času do celodenního sběru moči a pro zdravotnický personál odpadá složité vysvětlování, jak se moč sbírá, což není jednoduchá záležitost zvláště u starších nemocných s poruchami paměti. Prospěch z tohoto způsobu vyšetření má tedy především pacient a v neposlední řadě i zdravotnický personál

- **metody bez sběru moče**

Jednoznačným trendem je odhadovat glomerulární filtraci (eGFR) ze sérových koncentrací kreatininu ( $eGFR_{\text{kreatinin}}$ ) a/nebo cystatinu C ( $eGFR_{\text{cystatinC}}$ ) pomocí rovnic, ve kterých bývá zakomponovaná koncentrace markeru glomerulární filtrace, věk, etnicita vyšetřovaného a pohlaví.

V některých klinických situacích se využívá i referenčních metod měřené glomerulární filtrace (mGFR), nejčastěji DTPA izotopového vyšetření ledvin.

### 2.3.6 Referenční metody stanovení glomerulární filtrace

Nejpravdivější metodu stanovení glomerulární filtrace představuje clearance inulinu pomocí kontinuální infuze.

Dalšími možnostmi ve vědeckých studiích jsou clearance iothalamátu nebo iohexolu.

V klinické praxi se z referenčních metod nejvíce používá DTPA izotopové vyšetření ledvin.

- **Clearance inulinu**

Inulin je polysacharid fruktózy. Jedná se tedy o exogenní marker GFR. Termín clearance znamená množství plazmy očištěné od určité látky za jednotku času. Nejčastěji se vyjadřuje v mililitrech za sekundu.

Výhodou tohoto markeru je, že je volně filtrovaný glomeruly a nepodléhá ani tubulární sekreci ani resorpci.

Metoda se považuje za nejpravdivější měření glomerulární filtrace.

Postup: Pomocí kontinuální infuze je nutné zajistit konstantní plazmatickou koncentraci inulinu.

Vhodné je také provést katetrizaci močového měchýře. Metoda je tedy invazivní a časově náročná.

Jsou nutné opakované odběry krve.

Pro tyto značné nevýhody se v klinické praxi téměř nepoužívá a využití je převážně experimentální.

Mimořádné obtíže metody clearance inulinu s kontinuální infuzí vedly k vývoji více akceptovatelné jednobolusové injekční metodě bez sběru moče. Bylo analyzováno několik modelů s odběrem dvou až 4 vzorků po podání. Poslední odběr krve byl vždy 240 minut po podání. Velmi praktický se jevil přístup s odběrem v 90 a 240 minutě po aplikaci[5]. Nicméně ani tato metoda se nepoužívá v rutinní klinické praxi.

- **DTPA izotopové vyšetření ledvin**

Vyšetření se provádí na oddělení nukleární medicíny.

Radioizotopem, **radionuklidem**, při tomto vyšetření je technecium  $^{99m}\text{Tc}$ . Vyzařuje vysokoenergetické elektromagnetické záření gama pocházející z jádra atomu. Je to elektromagnetické záření s nejkratší vlnovou délkou.  $^{99m}\text{Tc}$  je nejčastěji používaný radionuklid v medicíně. Je pro organismus chemicky netoxický. Poločas rozpadu radionuklidu  $^{99m}\text{Tc}$  je 6 hodin. Tato doba je z klinického pohledu optimální. Je dost dlouhá na to, aby se radiofarmakum akumulovalo v orgánu, kde potřebujeme (v našem případě v ledvinách). Delší poločas rozpadu by znamenal větší radiační zátěž pro pacienta, případně i pro jeho okolí. Z hlediska bezpečnosti pacienta je důležitá radiační zátěž, kterou byl ozářen, udává se v jednotkách sievert (Sv). U DTPA izotopového vyšetření se jedná pouze o dávku: 1mSv. Pro srovnání je to desetkrát menší zátěž než u CT vyšetření břicha.

Jako vyšetřovací látka (**farmakum**) se používá diethyltriaminopentaocetová kyselina (DTPA).

Dohromady  $^{99m}\text{Tc}$  a DTPA tvoří **radiofarmakum**.

**Vlastnosti  $^{99m}\text{TcDTPA}$  radiofarmaka:**

- $^{99m}\text{TcDTPA}$  se váže minimálně na plazmatické bílkoviny (1-2% aplikované dávky).
- Látka je nerozpustná v tucích a má negativní náboj, proto nedifunduje do buněk.
- Nebyla prokázána tubulární sekrece ani resorpce
- neprochází neporušenou hematoencefalickou bariérou.

**Princip scintigrafie:** Radiofarmakum se nejčastěji pacientovi aplikuje nitrožilně ve formě bolusu. Pacient se tedy stane zářičem. Na rozdíl od klasického rentgenu, kde je zdrojem záření rentgenová výbojka. Gama záření, které radionuklid  $^{99m}\text{Tc}$  vyzařuje, zaznamenává detektor gama kamery.

Detektor se skládá ze tří částí:

- Scintilátoru – je to látka, která po excitaci gama zářením vysílá světelné záření
- světlovodu
- fotonásobiče.

Výsledkem je vytvoření scintigrafických obrazů.

**Příprava pacienta:** Pacient musí být před vyšetřením dostatečně hydratován. Během půl hodiny před aplikací radiofarmaka se doporučuje vypít asi 100 mililitrů tekutin na 10 kilogramů hmotnosti.

**Vlastní provedení:** Radiofarmakum se nejčastěji pacientovi aplikuje nitrožilně ve formě bolusu. Dynamická scintigrafie se provádí již v době aplikace radiofarmaka (při vyšetření některých jiných orgánů se čeká i několik hodin, než dojde k akumulaci radiofarmaka v cílovém orgánu).

Pacient leží asi dvacet minut nad nebo pod scintilační kamerou, která postupně zaznamenává impulzy, tak jak je radiofarmakum filtrováno ledvinovými glomeruly a vylučováno močovými cestami.

Ze vzniklých scintigrafických obrazů, po korekci na celotělové pozadí, se vytvářejí takzvané nefrografické křivky obou ledvin, které zobrazují průtok radiofarmaka ledvinami a také odtok radiofarmaka z ledvin horními močovými cestami.

Z každé nefrografické křivky (nefrogramu) lze vypočítat následující parametry:

- podíl dané ledviny na celkové funkci ledvin
- čas dosažení maxima
- poločas vylučování
- maximální tranzitní čas

Metoda tedy určí velikost celkové GFR a také podíl levé a pravé ledviny na glomerulární filtraci[6]<sup>1</sup>. Jedná se o aktuální GFR daného pacienta, ze které lze vypočítat GFR standardizovanou na ideální tělesný povrch.

V klinické praxi se DTPA izotopové vyšetření nejvíce využívá v onkologii, kde je nutné pro dávkování

---

<sup>1</sup> [6] s. 5-10

cytostatik nutné znát pravdivou hodnotu glomerulární filtrace.

**Nevýhody metody:**

- malá dostupnost, protože je vázaná pouze na specializovaná pracoviště
- nutnost nitrožilně aplikovat radioaktivní látku
- nezbytnost ležet v nehybné poloze asi půl hodiny. Nutnost relativně delší dobu ležet je složité pro menší děti, které musí často zdravotní sestra v této poloze držet a také pro starší pacienty s bolestmi pohybového aparátu.

### 2.3.7 Metody výpočtu a odhadu GFR založené na měření kreatininu

#### **Metabolismus kreatininu:**

##### **Syntéza kreatinu a kreatininu:**

Kreatinin vzniká ve svalech neenzymatickou dehydratací kreatinu. Je to cyklický anhydrid kreatinu. Na syntéze kreatinu se podílejí ledviny, pankreas a játra. K syntéze jsou potřeba tři aminokyseliny: glycin, arginin a methionin.

Syntéza probíhá ve dvou reakcích. Na glycin se připojuje guanidylová skupina z argininu za vzniku guanindinacetátu. V druhé reakci se připojí methylová skupina pocházející z methioninu.

##### **Transport kreatinu a kreatininu v krvi**

Krevní cestou se kreatin dostává do svalů a mozku kde je využíván. Ve svalech funguje jako donor energie pro svalovou kontrakci ve formě kreatinfosfátu. Kreatinin vzniklý dehydratací a ztrátou fosfátu je uvolňován do krve a následně je vylučován ledvinami.

##### **Vylučování kreatininu**

Vylučuje se glomerulární filtrací a tubulární sekrecí především v proximálním tubulu. Vylučování kreatininu ledvinami probíhá relativně konstantní rychlostí. To je důvod, proč byly sérový kreatinin a jeho vylučování močí prostřednictvím výpočtu clearance kreatininu po dlouhá desetiletí využívány jako hlavní markery GFR.

##### **Činitelé ovlivňující sérovou koncentraci kreatininu:**

**Svalová hmota** významně ovlivňuje sérovou koncentraci kreatininu[7]. Pacienti s různými chronickými onemocněními – například nádory, ale také stárnutím svalovou hmotu ztrácejí.

**Dieta** ovlivňuje sérovou koncentraci kreatininu. Vegetariáni bez příjmu masa mají nižší sérovou koncentraci sérového kreatininu než lidé s příjmem masa.

**Tubulární sekrece kreatininu** způsobuje, že clearance kreatininu falešně nadhodnocuje skutečnou GFR. U zdravých jedinců s normální GFR je toto nadhodnocení asi 10-20%, ale s poklesem GFR se výrazně zvyšuje. Navíc některá léčiva ovlivňují tubulární sekreci kreatininu. Například trimethoprim a cimetidin snižují tubulární sekreci kreatininu. Sekundárně se zvyšuje sérový kreatinin.

**Stav funkce jater** ovlivňuje sérovou koncentraci kreatininu. Kreatin se tvoří v játrech. Při pokročilých onemocněních jater se tvoří méně kreatinu a sekundárně kreatininu ve svalech.

Tyto skutečnosti ukazují na to, že kreatinin není ideálním ukazatelem glomerulární filtrace. Znalost GFR je nezbytná pro dávkování některých léčiv, to je důvodem, proč jsou hledány lepší markery glomerulární filtrace.

## Analytické metody stanovení kreatininu

### **Jaffého reakce**

Od roku 1886 se ke stanovení kreatininu používá Jaffého reakce, při které se tvoří Janovského komplex. Je to reakce kreatininu s kyselinou pikrovou v alkalickém prostředí za vzniku oranžového Janovského komplexu (český vědec), jehož absorbance se měří. Hlavní nevýhodou Jaffého reakce je nízká analytická specifita. Kromě kreatininu reagují také jiné látky, které se někdy nazývají **Jaffé pozitivní chromogeny**. K těm patří:

- Ketony
- Bílkoviny
- Kyselina askorbová,
- Glukóza,
- Kyselina močová,
- Pyruvát,
- Oxalacetát,
- Hemoglobin F
- Guanidin
- Cefalosporiny

Výsledkem je pozitivní bias metody. V oblasti do koncentrace kreatininu 130  $\mu\text{mol/l}$  se pozitivní bias pohybuje v rozmezí asi 15-25%. Bias je ovšem u každého pacienta jiný, proto nelze od výsledku odečíst proporcionálně určitý podíl.

Navíc Jaffého reakci ovlivňuje také bilirubin, který vykazuje negativní interferenci.

V roce 2000 National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK) založil National Kidney Disease Education Program (NKDEP) k edukaci pro poskytovatelů zdravotní péče a veřejnosti o CKD. Cílem programu je zlepšit identifikaci pacientů s CKD.

V roce 2002 NKDEP vytvořil Laboratory Working Group (LWG) s cílem standardizovat stanovení sérového kreatininu a podpořit automatické vydávání eGFR klinickými laboratořemi.

V roce 2006 byl pracovníky NKDEP vytvořen plán pro zlepšení laboratorního stanovení kreatininu se zajištěním metrologické návaznosti na referenční metodu, kterou je hmotnostní spektrometrie s izotopovou dilucí. Bylo doporučeno enzymatické stanovení. Hlavním cílem bylo redukovat pozitivní bias Jaffého metody[8].

## **Enzymatické stanovení kreatininu s návazností měření**

Výhodou enzymatického stanovení kreatininu je lepší analytická specifická.

### **Princip enzymatické metody použité u všech našich pacientů:**

V prvním kroku je kreatinin hydrolyzován kreatininázou na kreatin. Poté je kreatin hydrolyzován působením kreatinázy na sarkosin a ureu. Sarkosin je dále oxidován působením sarkosin oxidázy na glycin + formaldehyd + peroxid vodíku. Peroxid vodíku reaguje s 4-aminoantipyrinem a N-ethyl-N-sulfopropyl-m-toluidinem za vzniku zbarvení, které zvyšuje absorbanční při 548 nm. Absorbance při 548 nm je přímo úměrná koncentraci kreatininu ve vzorku.

### **Kalibrace:**

Aby byl co nejmenší bias stanovení vůči referenční metodě, musí být realizována metrologická návaznost měření na certifikovaný referenční materiál. National Institute of Standards and Technology (NIST) vyvinul standard reference material (SRM) 967[9]. Po zavedení enzymatického stanovení s návazností měření bylo prokázáno, že tyto metody skutečně poskytují minimální bias oproti Jaffého reakci. Jaffého metody by měly být postupně opuštěny[10].

### **Analytické parametry metody:**

Česká společnost klinické biochemie a Česká nefrologická společnost doporučují následující analytické parametry metody ve svých guidelines z roku 2014[11]:

**Mezilehlá preciznost měření** by měla splňovat  $CV \leq 2,2 \%$ , která je blízká odhadu potřebné přesnosti z biologické variability -proměnlivosti (2,7 %).

**Bias** pro interval koncentrací 80 až 133  $\mu\text{mol/l}$  je doporučen 4,4  $\mu\text{mol/l}$ . To odpovídá hodnotě  $b = 5,5 \%$  (pro koncentraci 80  $\mu\text{mol/l}$ ) a  $b = 3,3 \%$  (pro koncentraci 133  $\mu\text{mol/l}$ ).

Za těchto podmínek nepřesáhne odhad nejistoty výpočtu eGFR hodnotu 10 % ( $u_c < 10 \%$ )[11].

**Vydávání výsledků měření** sérové nebo plazmatické koncentrace kreatininu je doporučeno vydávat v  $\mu\text{mol/l}$  se zaokrouhlením na celé číslice.

**Referenční meze** - Po zavedení standardizace stanovení sérového kreatininu byly vytvořeny referenční meze pro dospělé muže 64-104  $\mu\text{mol/l}$  a pro dospělé ženy 49-90  $\mu\text{mol/l}$ [12].



## **Sérová koncentrace kreatininu jako ukazatel glomerulární filtrace**

Sérová koncentrace kreatininu není dobrý ukazatel glomerulární filtrace. Důvodem je, že vztah mezi sérovou koncentrací kreatininu a glomerulární filtrací vyjadřuje hyperbola. To znamená, že malé zvýšení sérové koncentrace kreatininu znamená velký pokles glomerulární filtrace.

Sérovou koncentraci kreatininu ovlivňuje:

- Věk
- Pohlaví
- Svalová hmota
- Cvičení
- Nutriční stav
- Některé léky – například cimetidin, trimethoprim.

Sérová koncentrace kreatininu je falešně nižší než by odpovídalo glomerulární filtraci u těchto stavů:

- Ztráta svalové hmoty (amputace, ležící pacienti, chronické nemoci)
- U vegetariánů (malý příjem masa)
- Jaterní nemoci (snížená produkce kreatinu)

Sérová koncentrace kreatininu je falešně vyšší než by odpovídalo GFR:

- Abnormálně vyšší svalová hmota (kulturisté)
- Velký příjem masa v jídle
- Užívání léků – např. cimetidin, trimethoprim

Samotná sérová koncentrace kreatininu by neměla být užívána k posouzení funkce ledvin[13].

## **Clearance endogenního kreatininu**

Byla v klinické praxi po dlouhá desetiletí rutinně využívanou metodou výpočtu glomerulární filtrace. Metoda využívá skutečnosti, že denně je přeměněno 1-2% svalového kreatinu na kreatinin. Kreatinin je konečný odpadní produkt energetického metabolismu svalů a je vylučován močí. Kreatinin je ovšem kromě glomerulární filtrace vylučován také tubulární sekrecí. Při této metodě dochází tedy k nadhodnocení skutečné glomerulární filtrace (= pozitivní bias metody). U zdravých jedinců je tento bias 10-20%<sup>2</sup>. V MDRD studii u pacientů s chronickým onemocněním ledvin byl bias clearance kreatininu 19%.

Clearance kreatininu se vypočítá podle vzorce:

Clearance kreatininu = kreatinin v moči x objem moče/ kreatinin v séru x 86 400 (ml/s)

## **Nevýhody clearance kreatininu:**

---

<sup>2</sup> [14]p.234

- Hlavním důvodem, proč se opouští clearance kreatininu je tubulární sekrece kreatininu a nutnost sběru moče, který je v klinické praxi často neúplný.
- Dlouhý čas odezvy = turn around time (TAT) je také nevýhodný. V komplexním pohledu je nutné si uvědomit, že pokud chce lékař na základě glomerulární filtrace upřesnit dávku léku, tak při stanovení clearance kreatininu se dozví výsledek o 24 hodin později než při odhadech glomerulární filtrace ze sérového kreatininu.
- Pozitivní bias metody

### **Odhad clearance kreatininu podle Cocrofta a Gaulta**

Na základě studie 249 dospělých pacientů byla vypracovaná rovnice pro odhad clearance kreatininu ze sérové koncentrace kreatininu[15]. Dnes je tato rovnice považována za obsolentní.

### **eGFR podle MDRD rovnice**

Rovnice byla vytvořena v rámci studie pacientů s chronickým onemocněním ledvin, která měla název The Modification of Diet in Renal Disease (MDRD). Studie se účastnilo 1628 pacientů. Výsledky byly publikovány v roce 1999. Hlavním problémem této studie bylo nestandardizované stanovení kreatininu bez návaznosti měření na principu Jaffého reakce.

Jako referenční metoda byla v této studii clearance <sup>125</sup>I-Iothalamátu.

Na základě multivariantní regresní analýzy MDRD studie publikována MDRD rovnice se 4 proměnnými. Ty jsou kreatinin, pohlaví, věk a etnicita.

**Před standardizací kreatininu měla MDRD rovnice následující tvar[16]:**

$$eGFR = 547,1535x kr^{-1,154} x věk^{-0,203} x 0,742 (\text{ženy}) x 1,21(\text{černá populace}) [\text{ml/s/1,73 m}^2]$$

Měřená clearance kreatininu v této studii nadhodnocovala GFR o 19% a odhad kreatininové clearance podle Cocrofta-Gaulta nadhodnocoval GFR o 16%.

V průměru MDRD rovnice poskytuje pravdivější výsledky odhadu GFR než clearance kreatininu a odhad podle Cocrofta a Gaulta[16].

**Po zavedení standardizovaného enzymatického stanovení kreatininu s návazností měření na NIST SRM 967 byla v roce 2007 vytvořena stejnými autory vylepšená MDRD rovnice[17]:**

$$eGFR = 514,15x kr^{-1,154} x věk^{-0,203} x 0,742 (\text{ženy})x1,21 (\text{černá populace}) [\text{ml/s/1,73 m}^2]$$

Po všeobecném vydávání MDRD odhadu glomerulární filtrace laboratořemi společně se sérovou koncentrací kreatininu vznikla otázka, jestli tento nový přístup laboratoří má nějaký klinický dopad. Výzkumníci z kanadské provincie Alberta se pustili do řešení tohoto problému. Položili si otázku, jestli automatické vydávání eGFR laboratořemi pomocí MDRD rovnice vedlo ke zvýšení počtu nefrologických vyšetření a zda došlo ke zvýšení preskripce inhibitorů angiotensin konvertujícího enzymu a blokátorů receptoru pro angiotensin II. Závěrem studie bylo, že došlo ke zvýšenému počtu pacientů, kteří byli poprvé odesláni k nefrologovi. Jednalo se především o ženy, účastníky ve věku od

46 do 65 let, 86 let a starší a pacienty s diagnózami diabetes mellitus a hypertenze. Zvýšená preskripce blokátorů angiotensin konvertujícího enzymu nebo blokátorů receptorů pro angiotensin II. prokázána nebyla[18]. Další studie jsou nutné k prokázání přínosu eGFR pro upřesnění dávkování léčiv, která jsou vylučována ledvinami[19].

**Limitace MDRD rovnice:** Není validována pro děti do 18 let, nad 70 let a pro těhotné. Studie, podle které byla vytvořena, zahrnovala pouze pacienty s CKD a ne všeobecnou populaci. Není validována pro pacienty s normální funkcí ledvin, kteří jsou v riziku vzniku chronického onemocnění ledvin a zdravé jedince. Navíc studie nezahrnovala všechny etnické skupiny. Je validována pouze na kavkazskou populaci včetně diabetiků a transplantovaných pacientů a pro afro-americkou populaci bez diabetiků. Rovnice z roku 1999 byla vytvořena s kreatininem měřeným bez návaznosti na certifikovaný referenční materiál. Rovnice není validována pro akutní stavy, kdy dochází k rychlým změnám glomerulární filtrace[16].

### **Odhad GFR podle CKD-EPI rovnice z roku 2009**

Limitací MDRD studie bylo, že zahrnovala pouze pacienty s chronickým onemocněním ledvin. Rovnice odvozená z této studie podhodnocovala glomerulární filtraci v oblasti nad 1,0 ml/s/1,73m<sup>2</sup>. The Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) je výzkumná skupina vytvořená National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases (NIDDK) a má mezinárodní charakter. Tato pracovní skupina se rozhodla vytvořit novou rovnici pro odhad GFR ze sérového kreatininu. CKD-EPI skupina analyzovala data z bibliografické biomedicínské databáze Medline týkající se GFR. Hlavním kritériem výběru studií pro tvorbu nové rovnice bylo použití exogenního markeru pro měření GFR a použití kalibrovaného, standardizovaného enzymatického kreatininu. Pro vytvoření rovnice bylo nakonec použito 10 studií s 8254 účastníky a na validaci rovnice bylo použito 16 studií s 3896 účastníky. Jako exogenní marker mGFR byl použit iothalamát, ve validačních studiích byly použity i jiné exogenní markery. V CKD-EPI rovnici byly použity stejné proměnné jako v MDRD rovnici, to znamená věk, pohlaví a etnikum.

Nakonec byly vytvořeny následující rovnice[20]:

Ženy	kr ≤ 62 umol/L	$eGFR=2,4 \times (kr/61,9)^{-0.329} \times 0.993^{\text{věk}} \times 1,159$ (pro černochoy)[ml.s <sup>-1</sup> .1,73m <sup>-2</sup> ]
	kr >62 umol/L	$eGFR=2,4 \times (kr/61,9)^{-1.209} \times 0.993^{\text{věk}} \times 1,159$ (pro černochoy)[ml.s <sup>-1</sup> .1,73m <sup>-2</sup> ]
Muži	kr ≤ 80 umol/L	$eGFR=2,35 \times (kr/79,6)^{-0.411} \times 0.993^{\text{věk}} \times 1,159$ (pro černochoy)[ml.s <sup>-1</sup> .1,73m <sup>-2</sup> ]
	kr >80 umol/L	$eGFR=2,35 \times (kr/79,6)^{-1.209} \times 0.993^{\text{věk}} \times 1,159$ (pro černochoy)[ml.s <sup>-1</sup> .1,73m <sup>-2</sup> ]

Výsledkem jsou následující parametry rovnic:

**Bias:** Bias CKD-EPI rovnice byl menší než u MDRD rovnice. Byl vyjádřen jako rozdíl mediánů oproti referenční metodě. U CKD-EPI rovnice byl rozdíl  $0,042 \text{ ml/s/1,73m}^2$ , u MDRD rovnice  $0,092 \text{ ml/s/1,73m}^2$ .

**Přesnost:** Byla u obou rovnic vyjádřena jako interkvartilové rozmezí rozdílů proti referenční metodě. CKD-EPI rovnice je přesnější než MDRD rovnice, ale její velikost je pořád neuspokojivá. Interkvartilové rozmezí bylo u MDRD rovnice  $0,305 \text{ ml/s/1,73m}^2$  a u CKD-EPI rovnice  $0,277 \text{ ml/s/1,73m}^2$ .

**Index  $P_{30}$ :** udává kolik odhadů GFR se vejde do oblasti  $\pm 30\%$  měřené GFR.  $P_{30}$  byl pro CKD-EPI rovnici  $84,1\%$  a pro MDRD rovnici  $80,6\%$ .

**Vliv CKD-EPI rovnice na staging CKD:** Prevalence CKD ( GFR pod  $1,0 \text{ ml/s/1,73m}^2$ ) byla podle CKD-EPI rovnice  $11,5\%$ , zatímco podle MDRD rovnice  $13,1\%$ . Nová rovnice tedy detekovala nižší prevalenci CKD.

**Limitace rovnice:** Je nepravděpodobné, že by CKD-EPI rovnice fungovala stejně u různých podskupin pacientů. Studovaná populace optimálně neodráží všeobecnou populaci. Je v ní relativně malý podíl účastníků nad 70 let. U některých účastníků byla nekompletní data ohledně typu diabetu, chyběla měřítka množství svalové hmoty. Rovnice samozřejmě nemůže překonat hlavní limitaci kreatininu, kterou je závislost na množství svalové hmoty[20].

### **Odhad GFR podle rovnice Lund- Malmö z roku 2007**

Rovnice Lund-Malmö byla primárně vytvořena pro dospělou populaci v roce 2007 Björkem. Vychází ze standardizovaného enzymatického stanovení kreatininu. Jako referenční metoda byla ve studii použita iohexolová clearance. Je platná do 85 let věku. Rovnice zahrnuje sérovou koncentraci kreatininu, pohlaví a věk. Byla vytvořena také varianta s korekcí na takzvanou lean body mass (LBM)[21].

V roce 2008 byla provedena studie s použitím stejné referenční metody clearance iohexolu, která ukázala také možnost použití pro pediatrické pacienty, u kterých měla MDRD rovnice medián biasu 96% [22]. Rovnici lze používat od 1 roku věku.

#### **Rovnice Lund-Malmö bez korekce na lean body mass má následující tvar[23]:**

Pro sérový kreatinin < 150 µmol/l:

$$eGFR = \text{EXP}((4,62-0,0112*kr)-0,0124*v\check{e}k+0,339*(\text{LN}(v\check{e}k)) - 0,226*pohlav\check{i})/60$$

Pro sérový kreatinin ≥ 150 umol/l:

$$eGFR = \text{EXP}((8,17+0,0005*kr-1,07*\text{LN}(kr))-0,0124*v\check{e}k+0,339*(\text{LN}(v\check{e}k))-0,226*pohlav\check{i})/60$$

EXP je základ přirozeného logaritmu umocněný na dané číslo

LN je přirozený logaritmus. Pohlaví je 0 pro muže, 1 pro ženy

#### **S korekcí na LBM byly vytvořeny následující rovnice:**

Pro sérový kreatinin < 150 µmol/l:

$$eGFR = \text{EXP}((4,95-0,011*kr)-0,00587*v\check{e}k+0,00977*LBM)/60$$

Pro sérový kreatinin ≥ 150 umol/l:

$$eGFR = \text{EXP}((8,58+0,0005*kr-1,08*\text{LN}(kr))-0,00587*v\check{e}k+0,00977*LBM))/60$$

Výpočet LBM podle Jamese:

$$\text{LBM ženy} = 1,07*hmotnost-148*(hmotnost/v\check{y}ška)^2$$

$$\text{LBM muži} = 1,1*hmotnost-120*(hmotnost/v\check{y}ška)^2$$

Výpočet odhadu GFR podle rovnice Lund-Malmö, která je odvozena na evropské populaci, platí pro široké pásmo věku a kreatininu a dobře koreluje se standardní metodou měření GFR. Může být vítanou alternativou pro dosud používané metody výpočtu eGFR, které jsou v literatuře z řady důvodů kritizovány[23].

### **Odhad GFR u dětí podle rovnice dle Schwartz**

U dětí do 18 let doporučuje Česká nefrologická společnost a Česká společnost klinické biochemie používat výpočet podle Schwartz[11]:

$$eGFR = F \times \text{výška} / \text{kr} \quad [\text{ml/s/1,73 m}^2]$$

Kde F je faktor podle věku a pohlaví:

Děti do 1 roku narozené v termínu: 0,663

Děti do 1 roku předčasně narozené: 0,487

Dívky od 1 do 18 let: 0,810

Chlapci od 1 do 12 let: 0,810

Chlapci od 12 do 18 let: 0,959

Výška je v centimetrech a sérový kreatinin v  $\mu\text{mol/l}$ .

## 2.3.8 Metody odhadu GFR založené na měření cystatinu C

### 2.3.8.1 Metabolismus cystatinu C:

Cystatin C je neglykosylovaný kationický polypeptid. Tvoří ho 120 aminokyselin. Patří do skupiny inhibitorů cysteinových proteáz.

**Syntéza:** Je produkován všemi jadernými buňkami konstantní rychlostí. Je volně filtrován renálními glomeruly.

**Katabolismus:** Cystatin C je filtraci glomerulem vychytáván v proximálním tubulu, kde je katabolizován.

**Jiní činitelé než GFR měnící sérovou koncentraci cystatinu C:** Falešně zvýšená koncentrace cystatinu C bývá při užívání kortikoidů[24]. Další situací, kdy nelze využít cystatin C jako marker glomerulární filtrace jsou poruchy funkce štítné žlázy. U hypotyreózy je sérová koncentrace cystatinu C snížena, u pacientů s hypertyreózou zase zvýšena[25].

Cystatin C je tedy alternativním markerem glomerulární filtrace a jeho přednost by se měla uplatňovat především v situacích, kdy se nemůžeme spolehnout na sérový kreatinin. Jedná se především o pacienty, kteří ztratili svalovou hmotu.

### 2.3.8.2 Analytické metody stanovení cystatinu C:

**Analytické metody:** Cystatin C se stanovuje imunoturbidimetricky s využitím polyklonálních protilátek na latexových částicích (PETIA = particle enhanced immunoturbidimetric assay) nebo imunonefelometricky na latexových částicích (PENIA = particle enhanced immunonefelometric assay).

#### **Analytické parametry metody:**

Česká společnost klinické biochemie a Česká nefrologická společnost doporučují následující analytické parametry metody ve svých guidelines z roku 2014[11]:

**Mezilehlá preciznost měření:** Při měření koncentrací kolem 1 mg/l se hodnota CV(%) má pohybovat mezi 3 až 5,6 %. Při měření koncentrací v intervalu 2 až 3 mg/l má být hodnota CV = 1,1 až 3,5 %.

#### **Kalibrace:**

Před globální standardizací se podle výrobců reagensů rozlišovaly dva druhy kalibrace: DAKO a SIEMENS.

Měření používající kalibraci SIEMENS se provádělo PENIA metodou. Měření používající kalibraci DAKO se provádělo PETIA metodou. Laboratoře Mayo Clinic porovnal tyto dva způsoby měření. PENIA stanovení dávalo v celém rozsahu měření nižší výsledky než PETIA, s hodnotou bias -23%. Tento negativní bias PENIA metody pracovníci Mayo Clinic později potvrdili také změřením

certifikovaného referenčního materiálu ERM DA 471/IFCC[26]. Tento první certifikovaný referenční materiál ERM DA 471/IFCC byl vytvořen v roce 2010[27].

**Vydávání výsledků:** Výsledky sérové nebo plazmatické koncentrace cystatinu C se vydávají v mg/l s přesností na dvě desetinná místa.

**Dostupnost výsledků:** Výhodou stanovení PETIA je možnost provádění na automatizovaných biochemických analyzátoch, čímž se umožní rychlý čas odezvy = turnaround time (TAT) a test může být k dispozici v nepřetržitém provozu.

### 2.3.8.3 eGFR<sub>cystatinC</sub> podle Grubba

Rovnice byla vytvořena na základě studie provedené profesorem Grubbem. Studie trvala od 6. února 2003 do 14. Října 2003. Studie se účastnilo 536 po sobě jdoucích pacientů ve věku od 0,3 do 96 let, jednalo se o 262 žen a 274 mužů, z univerzitní nemocnice v Lundu, kteří přišli ke změření glomerulární filtrace iohexolovou clearancí. Důvodem požadavku tohoto testu byla manifestní nebo suspektní diabetická nefropatie, intersticiální nefritida, glomerulonefritida, nefrotický syndrom, hematurie, proteinurie, refluxní nefropatie, mnohočetný myelom, vaskulitida, zvažování zahájení dialýzy, zjištění glomerulární filtrace po transplantaci a upřesnění dávky léku, který je vylučován ledvinami. Plazmatický iohexol byl stanovený metodou HPLC. Ve stejný čas bylo pacientům odebráno sérum na stanovení kreatininu a cystatinu C se zjištěním demografických parametrů nutných k výpočtu eGFR. Kreatinin byl stanoven enzymaticky. K odhadu glomerulární filtrace byla použita čtyřparametrová MDRD rovnice platná před standardizací kreatininu:

$$eGFR = 547,1535 \times kr^{-1,154} \times věk^{-0,203} \times 0,742 (\text{ženy}) \times 1,21 (\text{černa populace}) [\text{ml} \cdot \text{s}^{-1} \cdot 1,73 \text{ m}^{-2}]$$

Cystatin C byl stanoven imunoturbidimetry na latexových částicích s použitím kalibrace a reagentů výrobce DakoCytomation.

Byla vytvořena následující rovnice odhadu glomerulární filtrace ze sérového cystatinu C:

$$eGFR = 1,4115 \times cys^{-1,680} \times F [\text{ml/s/1,73 m}^2]$$

Kde je: cys – koncentrace cystatinu C v séru v mg/l;

F – koeficient (děti do 14 let F = 1,384; muži F = 1; ženy F = 0,948).

Tento výpočet je vhodné používat pro pacienty s GFR > 0,3 ml/s.

Výsledkem jsou následující parametry rovnice:

**Bias u dospělých pacientů:** vyjádřený jako medián rozdílů mezi měřenou a odhadovanou glomerulární filtrací v procentech byl u dospělých 1,95%.

**Index P<sub>30</sub> u dospělých pacientů:** 80%.

**Bias u dětí:** -1,95%

**Index P<sub>30</sub> u dětí:** 77,6%.



MDRD rovnice v této studii nadhodnocovala glomerulární filtraci. Pravděpodobně je to tím, že MDRD rovnice byla vytvořena měřením kreatininu Jaffého metodou a v této studii byl měřen kreatinin enzymaticky. Výsledky měření sérového kreatininu byly tedy nižší a odhadovaná glomerulární filtrace vyšší[28].

#### 2.3.8.4 **eGFR<sub>cystatinC</sub> a eGFR<sub>creatinine+cystatinC</sub> podle CKD-EPI rovnic z roku 2012**

Rovnice byly vytvořeny na základě průřezové studie, kterou provedla pracovní skupina CKD-EPI se spolupracujícím souhlasem NIDDK. Byla provedena analýzy dat z 13 studií (celkem 5352 účastníků) ve kterých byla měřena glomerulární filtrace pomocí exogenního markeru. K externí validaci bylo použito dalších 1119 účastníků z 5 dalších studií, kde bylo také provedeno měření glomerulární filtrace. Celkem se tedy analyzovalo 18 studií.

Studie si dala za cíl vytvořit samostatnou rovnici eGFR ze sérového cystatinu C a kombinovanou rovnici ze sérového kreatininu a cystatinu C.

Kreatinin byl stanovován enzymaticky s návazností měření na NIST SRM 967.

Cystatin C byl stanoven metodou PENIA s návazností na DA ERM 471.

Byly vytvořeny následující rovnice:

**eGFR<sub>cystatin C</sub> CKD-EPI z roku 2012[29]:**

$$\text{cys} \leq 0.8 \text{ mg/L} \quad \text{eGFR} = 2,217 \times (\text{cys}/0,8)^{-0.499} \times 0.996^{\text{věk}} [\text{x}0.932 \text{ pro ženy}]$$

$$\text{cys} > 0.8 \text{ mg/L} \quad \text{eGFR} = 2,217 \times (\text{cys}/0,8)^{-1.328} \times 0.996^{\text{věk}} [\text{x}0.932 \text{ pro ženy}]$$

**eGFR creatinine +cystatin C CKD-EPI z roku 2012[29]:**

Ženy	kr ≤ 62umol/l	a	eGFR=2,17x (kr/61,9) <sup>-0.248</sup> x (cys /0.8) <sup>-0.375</sup> x 0.995 <sup>věk</sup>
	cys ≤ 0.8 mg/l		(x 1,08 pro černochoy)
	kr ≤ 62umol/l	a	eGFR=2,17x (Skr/61,9) <sup>-0.248</sup> x (cys/0.8) <sup>-0.711</sup> x 0.995 <sup>věk</sup>
	cys > 0.8 mg/l		(x 1,08 pro černochoy)
	kr > 62umol/l	a	eGFR=2,17x (Skr/61,9) <sup>-0.601</sup> x (cys/0.8) <sup>-0.375</sup> x 0.995 <sup>věk</sup>
	cys ≤ 0.8 mg/l		(x 1,08 pro černochoy)
	kr > 62umol/l	a	eGFR=2,17 x (kr/61,9) <sup>-0.601</sup> x (cys/0.8) <sup>-0.711</sup> x 0.995 <sup>věk</sup>
	cys ≥ 0.8 mg/l		(x 1,08 pro černochoy)
Muži	kr ≤ 80umol/l	a	eGFR=2,25 x (kr/0.79,6) <sup>-0.207</sup> x (cys/0.8) <sup>-0.375</sup> x 0.995 <sup>věk</sup>
	cyst ≤ 0.8 mg/l		(x 1,08 pro černochoy)
	kr ≤ 80umol/l	a	eGFR=2,25 x (kr/0.79,6) <sup>-0.207</sup> x (cys/0.8) <sup>-0.711</sup> x 0.995 <sup>věk</sup>
	cyst > 0.8 mg/l		(x 1,08 pro černochoy)
	kr > 80umol/l	a	eGFR=2,25 x (kr/0.79,6) <sup>-0.601</sup> x (cys/0.8) <sup>-0.375</sup> x 0.995 <sup>věk</sup>
	cys ≤ 0.8 mg/l		(x 1,08 pro černochoy)
	kr > 80 umol/l	a	eGFR=2,25 x (kr/79,6) <sup>-0.601</sup> x (cys/0.8) <sup>-0.711</sup> x 0.995 <sup>věk</sup>
	cys > 0.8 mg/l		(x 1,08 pro černochoy)

V současné době se tedy používají 3 CKD-EPI rovnice:

CKD-EPI rovnice z roku 2009 pro eGFR<sub>creatinine</sub>

CKD-EPI rovnice z roku 2012 pro eGFR<sub>cystatinC</sub>

a kombinovaná CKD-EPI rovnice z roku 2012 pro eGFR<sub>creatinine+cystatinC</sub>

Ve všech třech rovnicích bylo použito standardizované měření kreatininu a/nebo cystatinu C.

Jejich srovnání je následující:

**BIAS** – počítaný jako rozdíl mediánů odhadované a měřené GFR

Byl u všech rovnic podobný - 3.9 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> pro kombinovanou rovnici,

3.7 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> pro eGFR<sub>creatinine</sub> a 3.4 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> pro eGFR<sub>cystatinC</sub>.

**Přesnost:** počítaná jako mezikvartilové rozpětí rozdílů proti referenční metodě

Byla nejlepší u kombinované rovnice - 13.4 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>, následovala eGFR<sub>creatinine</sub> 15.4

ml/min/1.73 m<sup>2</sup> a nakonec eGFR<sub>cystatinC</sub> 16.4 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>.

**Index P<sub>30</sub>** - počítaný jako odchylka do 30% od referenční metody

Kombinovaná rovnice 91,5%, eGFR<sub>creatinine</sub> 87,2% eGFR<sub>cystatinC</sub> 85,9%

Závěrem této studie lze říct, že kombinovaná rovnice eGFR<sub>creatinine+cystatinC</sub> dává nejsprávnější výsledky[29].

## 2.4 Chronické onemocnění ledvin

### 2.4.1 Globální doporučení, koncepční model a definice chronického onemocnění ledvin

Chronické onemocnění ledvin = chronic kidney disease (CKD) bylo poprvé definováno americkou National Kidney Foundation (NKF) v roce 2002, která vydala tuto definici jako součást doporučení nazvaného **Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification**[30]. V odborném týmu NKF byli i zahraniční odborníci. Toto doporučení znamenalo ve své době revoluci v celém pojetí chronického onemocnění ledvin. Vzniklo systematickým zhodnocením dosavadních důkazů dané problematiky. Byla zde popsána stadia CKD, prevalence CKD i socio-ekonomická závažnost celé problematiky.

Z dokumentu o 318 stranách vyplynula nutnost řešit danou problematiku nejen ve Spojených Státech, ale celosvětově, globálně.

Proto v roce 2003 vznikla mezinárodní nezisková organizace Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO). Organizace KDIGO má svoji webovou stránku [www.kdigo.org](http://www.kdigo.org). Na této webové stránce jsou detailní informace o organizaci, pracovních skupinách a všech doposud publikovaných doporučeních, které by měly mít celosvětový dopad.

Hlavním cílem KDIGO je zlepšení péče a výsledků u pacientů s onemocněním ledvin v celosvětovém měřítku. Organizace KDIGO vytvořila následující globální doporučení pro klinickou praxi.

Došlo ke zpracování následujících globálních doporučení pro klinickou praxi:

- Clinical practice guidelines for evaluation and management of chronic kidney disease[2]
- Blood pressure in CKD
- Glomerulonephritis
- Acute kidney Injury[40]
- Anemia in CKD
- Mineral and bone disorder
- Care of the kidney transplant recipient
- Hepatitis C in CKD

Organizace KDIGO vydává v roce 2012 doporučení nazvané **Clinical practice guidelines for evaluation and management of chronic kidney disease**[2]. Toto doporučení vzniklo na základě zhodnocení nových důkazů publikovaných během posledních 10 let od předchozího doporučení vydaného NKF. Důležitý je mezinárodní rozměr KDIGO, který by měl umožnit implementovat doporučení v celoplanetárním rozměru. Cílem tohoto doporučení je vyjasnit definici a klasifikaci chronického onemocnění ledvin a vyvinout návod jak léčit pacienty s CKD. Dále by mělo doporučení zrychlit a rozšířit výzkum v této oblasti.

Organizace KDIGO do tohoto doporučení zahrnula koncepční model diagnostiky CKD a definici CKD.

Časná stadia chronického onemocnění ledvin probíhají bezpříznakově a léčba může vývoj onemocnění zastavit, proto byl vypracován **koncepční model CKD** pro vývoj, progresi a komplikace CKD. Riziko pro rozvoj CKD může být rozděleno na sociodemografické faktory, genetické faktory a rizikové faktory iniciující onemocnění ledvin. Je snaha zaměřit se především na ovlivnitelné rizikové faktory. Abnormality ve struktuře ledvin (= poškození ledvin) obvykle předchází poklesu funkce ledvin. Chronické onemocnění ledvin může jednat do dalších stadií CKD a/nebo způsobuje komplikace, především kardiovaskulární. Progrese CKD a komplikace můžou nakonec způsobit úmrtí pacienta. Komplikace chronického onemocnění ledvin ovlivňují všechny orgánové systémy. Navíc chronické onemocnění ledvin je asociováno se zvýšeným rizikem nežádoucích účinků léků, včetně kontrastních zobrazovacích látek v radiologii. Když je CKD zachyceno v časných stadiích lze léčbou progresi CKD a vznik komplikací zpomalit nebo dokonce zastavit. Nejvíce silných důkazů je o zpomalení progresi CKD u pacientů s albuminurií, u kterých bylo dosaženo ke zpomalení progresi CKD podáváním léků blokujících systém renin-angiotensin-aldosteron.

Celý koncepční model vzniku, progresi a rozvoje komplikací CKD má následující fáze[2]:

1. Stav normality
2. Riziko (= přítomny rizikové faktory CKD)
3. Poškození ledvin
4. Pokles GFR
5. Selhání ledvin = stadium 5 CKD
6. Smrt

Primární prevence je definována jako prevence vzniku CKD. Sekundární a terciární prevence se snaží zlepšit výsledky pacientů již nemocných CKD.

Nová **definice CKD z roku 2012** navazuje na předchozí definici NKF, je s ní také do značné míry shodná a užívá stejnou terminologii. Přidán byl pouze bod 4.

**Chronické onemocnění ledvin je definováno jako:**

- 1. Pokles glomerulární filtrace pod 1,0 ml/s/1,73m<sup>2</sup> a/nebo**
- 2. Přítomnost markeru poškození ledvin**
- 3. Stav trvající alespoň 3 měsíce**
- 4. Tento stav má dopad na celkové zdraví**

Jedná se tedy o postižení struktury a/nebo funkce trvající alespoň 3 měsíce s dopadem na zdraví pacienta.

**Ad 1 Glomerulární filtrace** je jen jedna komponenta exkreční funkce ledvin. Přesto je považována za nejlepší celkový ukazatel funkce ledvin. Důvodem je, že při poklesu GFR dochází většinou k poklesu všech dalších endokrinních a regulačních (metabolických) funkcí. Hodnota cut off 1,0 ml/s/1,73m<sup>2</sup> odpovídá méně než polovině fyziologické glomerulární filtrace mladé zdravé populace.

**Ad 2 Přítomnost markeru poškození ledvin**

Za markery poškození ledvin jsou považovány:

- **Albuminurie  $\geq 30$ mg/24 hodin nebo v jednorázové moči  $\geq 3$ mg/mmol**

Dříve se uváděla jako hlavní marker poškození ledvin proteinurie neboli celková bílkovina v moči.

Celková bílkovina může být tvořena různými proteiny: Prerenální proteiny, jejichž reprezentantem jsou například volné monoklonální lehké řetězce u pacientů s monoklonální gamapatií – takzvaná overflow proteinurie.

Albumin – ten je kvantitativně hlavním proteinem séra a je součástí většiny proteinurií.

Proteiny o nízké molekulové hmotnosti - jako je například alfa1 mikroglobulin ukazují na poškození renálních tubulů.

Postrenální proteiny – jedná se hlavně o alfa2 makroglobulin, který se může dostat do moče až ve vývodných močových cestách, protože glomerulem neprojde ani při jeho poškození pro velkou molekulovou hmotnost.

Albumin je v doporučení hlavním markerem poškození ledvin u dospělých, protože je součástí většiny proteinurií a je asociován s kardiovaskulárním rizikem na základě četných studií.

Za fyziologickou albuminurii je považována albuminurie do 1,0 mg/mmol v jednorázovém vzorku moče[2].

- **Abnormality v močovém sedimentu** (např. mikroskopická hematurie, dysmorfní erytrocyty, erytrocytární válce, leukocytární válce, granulované válce, voskové válce, nález mikroorganismů – nejčastěji bakterií)

- **Elektrolytové a jiné abnormality způsobené renálními tubulárními poruchami** - například:
  - Renální tubulární acidóza – Je to metabolická acidóza, kdy ledviny nedokážou acidifikovat moč. Moč má alkalické pH a plazma zůstává kyselá. Příčinou může být porucha v distálním nebo proximálním tubulu. V distálním tubulu se jedná o poruchu sekrece protonů alfa interkalárními buňkami. Je-li příčinou acidózy proximální tubulus, jedná se o poruchu resorpce hydrogenuhličitanových aniontů.
  - Nefrogenní diabetes insipidus – Jedná se o poruchu působení antidiuretického hormonu v distálním tubulu. Antidiuretický hormon (ADH) je uvolňován ze zadního laloku hypofýzy při vzestupu osmolarity plazmy. V distálním tubulu působí retenci vody. Pokud jsou renální tubuly poškozené a nereagují adekvátně na ADH, pak dochází k polyurii. Dalším klinickým projevem můžou být kolapsové stavy.
  - Renální ztráty draslíku - Dochází k hypokalémii s rizikem srdečních arytmií.
  - Renální ztráty kalcia - Tento stav se může klinicky projevovat urolitiázou.
  - Renální ztráty magnézia - Dochází k hypomagnezémii s rizikem srdečních arytmií.
  - Cystinurie - Je to genetická porucha transportu cystinu a dibazických aminokyselin lysinu, argininu a ornitinu přes membránu epitelových buněk. V renálních tubulech dochází ke vzniku klasických šestibokých krystalů cystinu, které především za kyselého pH agregují a tvoří často recidivující močové kameny.
  - Fanconiho syndrom - Je to geneticky daná nebo získaná komplexní porucha proximálního tubulu s glykosurií, aminoacidurií, ztrátami fosforu, draslíku, sodíku, bikarbonátu, vápníku. Dochází k metabolické acidóze.
- **Abnormality zjištěné biopsií** (např. glomerulonefritidy, tubulointersticiální nefritidy)
- **Abnormality zjištěné zobrazovacími metodami** - například nález polycystických ledvin, suspektních nádorů.
- **Anamnéza transplantace ledvin**

### **Ad 3 Doba trvání 3 měsíce**

Doba trvání je důležitá především pro odlišení od akutního poškození ledvin = Acute Kidney Injury (AKI).

### **Ad 4 Dopad na celkové zdraví pacienta**

Zdůrazňuje skutečnost, že CKD je asociováno s poškozením všech orgánových systémů, především jsou pokročilejší stadia CKD asociována s rostoucím kardiovaskulárním rizikem.

## 2.4.2 Klasifikace chronického onemocnění ledvin

Chronické onemocnění ledvin by mělo být klasifikováno podle příčiny, GFR a albuminurie<sup>1</sup>.

### 2.4.2.1 Klasifikace podle příčiny

Podle příčiny by se měly uvádět následující kategorie CKD:

- Glomerulární onemocnění
- Tubulointersticiální onemocnění
- Vaskulární onemocnění
- Cystické a kongenitální onemocnění

### 2.4.2.2 Klasifikace podle GFR

Podle GFR by se měly uvádět následující stadia CKD<sup>1</sup>:

**G1**  $\geq 1,5$  ml/s/1,73m<sup>2</sup>

**G2** 1,0 – 1,49 ml/s/1,73m<sup>2</sup>

**G3a** 0,75 – 0,99 ml/s/1,73m<sup>2</sup>

**G3b** 0,5 – 0,74 ml/s/1,73m<sup>2</sup>

**G4** 0,25 – 0,49 ml/s/1,73m<sup>2</sup>

**G5**  $< 0,25$  ml/s/1,73m<sup>2</sup>

### 2.4.2.3 Klasifikace podle albuminurie

Podle albuminurie by se měly uvádět následující stadia CKD<sup>1</sup>:

**A1**  $< 30$  mg/24 hodin

**A2** 30-300 mg/24 hodin

**A3**  $> 300$  mg/24 hodin

## 2.4.3 Prevalence CKD

CKD je závažným medicínským, sociálním i ekonomickým celospolečenským problémem.

V Kanadě byla provedena národní studie Canadian Health Measures Survey, která zjišťovala prevalenci CKD v letech 2007-2009. Důvodem pro provedení této studie byla skutečnost, že CKD je asociováno s kardiovaskulární nemocností a úmrtností. Byla zjištěna prevalence chronického onemocnění ledvin 12,5%[31].

Ve Spojených Státech Amerických se dlouhodobě monitoruje prevalence CKD. Bylo k tomu využíváno národních studií pojmenovaných National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES 1988-1994 a NHANES 1999-2004). Průřezovou analýzou těchto studií byl nalezen výrazný vzestup počtu pacientů s CKD. Při porovnání období 1988-1994 a období 1999-2004 došlo ke zvýšení prevalence z 10% na 13,1%. Toto zvýšení bylo částečně vysvětleno zvýšením prevalence hypertenze a diabetu v americké populaci. Tyto výsledky vyvolávají výrazné obavy ohledně možného budoucího

vzestupu incidence pacientů se selháním ledvin[32].

Pracovní skupina CKD-EPI, která v roce 2009 vytvořila CKD-EPI rovnici pro odhad GFR ze sérového kreatininu zpracovala studii, ve které zjistila prevalenci CKD 11,5%. Této studii se zúčastnilo 8 254 účastníků, obyvatel Spojených Států. Prevalence CKD přes 10% byla zjištěna také v dalších západoevropských zemích. V České republice nemáme přesná data o prevalenci CKD[33].

V České republice existuje statistická ročenka dialyzační péče. Ve statistické ročence z roku 2012 jsou následující data. V České republice bylo 102 dialyzačních center s 1268 dialyzačními lůžky.

Hemodialýzou bylo celkem léčeno 6261 pacientů, ke konci roku 2011 mělo 3900 pacientů funkční štěp po transplantaci. V programu náhradní funkce ledvin bylo tedy přes 10 000 pacientů. Tuto péči zajišťovalo 1749 zaměstnanců, z toho 289 lékařů. 65% dialyzovaných pacientů mělo hypertenzi, 41% mělo diabetes mellitus, 71% pacientů bylo starších 60 let[34].



#### 2.4.4 Prognóza pacientů s CKD

Existuje spousta studií předkládajících důkazy, že pacienti s kardiovaskulárním onemocněním, diabetici i všeobecná populace má větší kardiovaskulární nemocnost a úmrtnost je-li přítomna albuminurie a/nebo pokles GFR.

K odhadu GFR lze použít sérový kreatinin a nebo cystatin C. Přibývá studií porovnávající tyto dva odhady GFR z diagnostického a také prognostického hlediska.

Další velké množství studií existuje o tom, že léky blokující systém renin-angiotenzin-aldosteron zpomalují progresi renálního onemocnění a snižují kardiovaskulární úmrtnost.

Významnou studií zabývající se prognózou pacientů s CKD je Third National Health and Nutrition Examination Survey (**NHANES III**). Studie zahrnovala data z 13 letého sledování (v letech 1988-2000) 14586 dospělých američanů všeobecné populace.

Kreatinin byl stanovován Jaffého reakcí, GFR byla odhadovaná podle MDRD rovnice.

eGFR byla hodnocena jednak jako kontinuální proměnná a byla také rozdělena do tří kategorií: 0,25-0,99 ml/s/1,73m<sup>2</sup>, 1,0 – 1,49 ml/s/1,73m<sup>2</sup> a 1,5 a více ml/s/1,73m<sup>2</sup>.

Během let 1988 a 2000 zemřelo 2 054 (14,1%) účastníků studie. Diagnózy úmrtí byly definovány podle tehdejší aktuální mezinárodní klasifikace nemocí.

##### Závěry NHANES III studie:

Pacienti s nižší eGFR<sub>creatinine</sub> a/nebo albuminurií měli větší pravděpodobnost úmrtí z kardiovaskulárních příčin a také ze všech příčin úmrtnosti než pacienti s vyšší GFR a menší albuminurií. Výsledky byly podobné jak u diabetiků, tak u nediabetiků.

Snížení eGFR<sub>creatinine</sub> a albuminurie jsou nezávislé rizikové faktory kardiovaskulární úmrtnosti.

Studie podporuje doporučení, aby bylo riziko pacientů stratifikováno jak podle albuminurie, tak podle GFR[35].

K odhadu glomerulární filtrace se v praxi používá sérový kreatinin a cystatin C. Je proto logické, že vznikají studie, které si kladou otázku, který z markerů má větší prognostický význam z pohledu kardiovaskulární nemocnosti a úmrtnosti.

Jednou z takových studií je studie nazvaná The Atherosclerosis Risk in Communities (**ARIC**) Study zkoumající kohortu obyvatel středního věku ve 4 amerických komunitách: oblast Washingtonu, Jakson, Forsyth a Mineapolis.

10 403 účastníků studie bylo sledováno s mediánem sledování 10,2 roku. Průměrný věk byl 63 let, žen bylo 56%. Účastníci byli sledováni do konce roku 2007. Byla sledována celková úmrtnost, incidence ischemické choroby srdeční a srdečního selhání.

Jako referenční zdravá populace byla populace s GFR 1,5-2,08 ml/s/1,73m<sup>2</sup> (= stadium G1) a populace

s albuminurií, měřenou jako poměr albumin/kreatinin v jednorázové moči pod 10 mg/g (stadium A1). Bylo definováno 5 stadií GFR (G1-G5) a 3 stadia stupně albuminurie (A1-A3) ve shodě s doporučením KDIGO z roku 2012.

Cystatin C byl měřen imunonefelometricky s návazností měření na mezinárodní referenční materiál DA ERM 471 reagensii firmy Siemens. Měření bylo provedeno v roce 2008 s použitím zamražených vzorků.

Albumin v moči ze zamražených vzorků byl měřen nefelometricky reagensii výrobců Dade Behring Inc. nebo Beckman Coulter Inc.

Limitací studie je, že cystatin C a albuminurie byla měřena jen jednou.

#### Výsledky studie ARIC:

Už účastníci s nejmenším poklesem GFR ve stadiu G2 a vzestupem albuminurie na stadium A2 měli zvýšené riziko celkové úmrtnosti. V těchto kategoriích bylo již zvýšené riziko vzniku ischemické choroby srdeční a srdečního selhání.

Riziko celkové úmrtnosti, incidence ischemické choroby srdeční a incidence srdečního selhání rostlo s vyšším stupněm poklesu GFR a rostoucí kategorií albuminurie.

Kombinace obou těchto markerů významně zlepšuje klasifikaci rizika úmrtí, ischemické choroby srdeční a srdečního selhání.

Podle ARIC studie má  $eGFR_{cystatinC}$  větší prognostický význam než  $eGFR_{creatinine}$  [36]

Jednou z klíčových celosvětových studií zabývajících se vývojem albuminurie a efektem ACE inhibitoru ramiprilu na vývoj albuminurie a manifestní proteinurie byla studie Heart Outcomes and Prevention Evaluation study (**HOPE**).

Studie zahrnovala 7674 účastníků z 267 center splňujících vstupní kritéria do studie, ve věku 55 a více let. Průměrný věk byl 66 let, 27% účastníků tvořily ženy.

Účastník studie musel trpět kardiovaskulárním onemocněním nebo být diabetik, k tomu musel být přítomný alespoň jeden z následujících rizikových faktorů: kouření, dyslipidémie, hypertenze nebo albuminurie. Vylučovací kritéria byly: srdeční selhání, dekompenzovaná hypertenze, intolerance inhibitorů angiotensin konvertujícího enzymu (ACE), kreatinin nad 200  $\mu\text{mol/l}$  a pozitivní proteinurie testacím papírkem. 80% účastníků mělo ischemickou chorobu srdeční, 53% bylo po infarktu myokardu, 11% mělo cévní mozkovou příhodu, 44% mělo ischemickou chorobu dolních končetin, 38% bylo diabetiků a 47% účastníků mělo vysoký krevní tlak. Albuminurii mělo 21% pacientů.

Pacienti užívali následující kardiovaskulární léky: 76% procent mělo antiagregační terapii, 47% mělo betablokátory, 15% blokátoř kalciového kanálu, 15% Diuretika a 29% hypolipidemika.

Pacienti byli randomizováni do tří skupin: ramipril 2,5mg, vitamin E a placebo. Studie byla dvojitě zaslepená. Medián sledování byl 4,5 roku.

Albuminurie byla měřena jako poměr albumin/kreatinin na začátku randomizace a na konci sledování všem účastníkům. Pozitivní výsledek byl definován jako koncentrace albuminu v jednorázové moči  $\geq 2$  mg/mmol.

Progrese albuminurie byla definovaná jako nově vzniklá albuminurie a nově vzniklá manifestní proteinurie.

Studie HOPE přinesla tyto hlavní závěry:

ACE inhibice ramipilem efektivně snížila progresi albuminurie u všech účastníků, včetně podskupin diabetici a nediabetici. Léčba ramipilem snížila krevní tlak o 2 -3mmHg. Multivariační analýza ukázala, že zpomalení progrese albuminurie bylo nezávisle způsobeno jak poklesem krevního tlaku, tak renoprotektivním působením ramiprilu[37].

## 2.4.5 Diagnostický algoritmus pro stanovení diagnózy CKD na základě eGFR a mGFR

Pro iniciální posouzení glomerulární filtrace KDIGO doporučuje  $eGFR_{\text{creatinine}}$ . Kreatinin by se měl stanovovat enzymaticky s návazností kalibrace na certifikovaný referenční materiál NIST SRM 967, aby byl co nejmenší bias vůči referenční metodě, kterou je izotopová diluce s hmotnostní spektrometrií. Pokud vyjde glomerulární filtrace pod  $1,0 \text{ ml/s/1,73m}^2$  a není přítomen marker poškození ledvin (nejčastěji albuminurie), doporučuje se potvrdit diagnózu chronického onemocnění ledvin pomocí  $eGFR_{\text{cystatinC}}$  a  $eGFR_{\text{creatinine+cystatinC}}$ . Cystatin C by měl být stanoven metodou s návazností kalibrace na referenční materiál DA ERM 471. Vyjde-li těmito rovnicemi eGFR pod  $1,0 \text{ ml/s/1,73m}^2$ , pak je diagnóza CKD potvrzena. V opačném případě diagnóza CKD potvrzena není. Lékař si musí být vědom situací, kdy může  $eGFR_{\text{creatinine}}$  být méně správná. Jedná se především o stavy, kdy pacient z jakékoliv příčiny ztratil část svalové hmoty.  $eGFR_{\text{creatinine}}$  by měla být odhadovaná podle CKD-EPI rovnice z roku 2009.  $eGFR_{\text{cystatinC}}$  a  $eGFR_{\text{creatinine+cystatinC}}$  by měly být odhadovány podle rovnic CKD-EPI z roku 2012. Při odhadu GFR ze sérové koncentrace cystatinu C je nutné také povědomí o limitacích této metody. Jedná se například o stavy s dysfunkcí štítné žlázy a při užívání kortikoidů.

Referenční metodu s exogenním markerem použít v případě dárcovství orgánů a dávkování toxických léků[38].

## 2.4.6 Rizikové faktory chronického onemocnění ledvin

Jsou popsány tyto rizikové faktory iniciace vzniku chronického onemocnění ledvin[39]:

- Věk
- Rodinná anamnéza CKD
- Hereditární nefropatie
- Etnicita
- Pohlaví
- Diabetes mellitus
- Hyperfiltrace
- Snížení počtu nefronů
- Krevní tlak  $\geq 125/75$  mmHg
- Obezita
- Vysoký příjem proteinů
- Albuminurie
- Dyslipidémie
- Nefrotoxiny
- Nesteroidní antirevmatika
- Antibiotika/antivirotika
- Volné lehké řetězce
- Primární onemocnění ledvin
- Urologické onemocnění ledvin
- Obstrukce vylučovacího systému
- Opakované močové infekce
- Kardiovaskulární onemocnění

## 2.5 Akutní poškození ledvin

### 2.5.1 Globální doporučení, koncepční model a definice akutního poškození ledvin

Mezinárodní organizace KDIGO v doporučení nazvaném Akutní poškození ledvin = acute kidney injury (AKI) vytvořila koncepční model a definici akutního poškození ledvin[40]:

**Koncepční model** vzniku, progresu a rozvoje komplikací AKI má stejné fáze jako CKD:

1. Stav normality
2. Riziko (= přítomny rizikové faktory CKD)
3. Poškození ledvin
4. Pokles GFR
5. Selhání ledvin = stadium 5 CKD
6. Smrt

**Definice:** Akutní poškození ledvin je definováno jako:

- Vzestup sérového kreatininu o  $\geq 26,5$   $\mu\text{mol/l}$  nebo
- sérový kreatinin  $\geq 1,5$  násobku základní hladiny během posledních 7 dní nebo
- Močový objem  $< 0,5$  ml/kg/h po dobu 6 hodin

Rozlišují se 3 stadia AKI:

1. 1,5–1,9 násobek bazální hladiny kreatininu nebo vzestup kreatininu o  $\geq 26,5$   $\mu\text{mol/l}$  nebo Močový objem  $< 0,5$  ml/kg/h po dobu 6-12 hodin
2. Sérový kreatinin 2,0-2,9 násobek základní koncentrace nebo Močový objem  $< 0,5$  ml/kg/h po dobu  $\geq 12$  hodin
3. Sérový kreatinin 3,0 násobek základní koncentrace nebo vzestup sérové koncentrace kreatininu na  $\geq 353,6$   $\mu\text{mol/l}$  nebo začátek dialýzy nebo u pacientů do 18 let pokles eGFR  $< 0,58$  ml/s/1,73m<sup>2</sup> nebo objem moče  $< 0,3$  ml/kg/h po dobu  $\geq 24$  hodin nebo anurie  $\geq 12$  hodin.

Vždy, pokud je to možné, by se měla zjistit příčina AKI[40].

### **3 Cíle disertační práce**

- Porovnat odhady glomerulární filtrace ze sérového kreatininu a cystatinu C u různých skupin pacientů.
- Zhodnotit dopad těchto odhadů glomerulární filtrace na diagnostiku CKD (stadium GFR 3a).

## **4 Soubor nemocných**

### **4.1 Pacienti s monoklonální gamapatií neurčeného významu (MGUS)**

Studie zahrnovala 101 po sobě jdoucích pacientů z hematologické ambulance Krajské nemocnice Tomáše Bati ve Zlíně s MGUS od ledna 2009 do června 2011. Tato skupina obsahovala 35 mužů a 66 žen s věkovým rozsahem od 43 do 95 let. Vytvořili jsme tři věkové skupiny: 40-59 let, 60-79 let, 80-99 let. 32 pacientů mělo diabetes mellitus. Všichni pacienti měli intaktní monoklonální imunoglobulin. Pacienti s MGUS tvořeným jen monoklonálními lehkými řetězci nebyli v této kohortě.

### **4.2 Pacienti intoxikovaní metanolem**

Studie zahrnovala 13 pacientů intoxikovaných metanolem, hospitalizovaných v Krajské nemocnici Tomáše Bati a. s. ve Zlíně v roce 2012. Jednalo se o 7 mužů a 6 žen. Věk postižených byl od 28 do 79 roků, s průměrem 53 roků. Všichni pacienti intoxikaci přežili.

Při přijetí měli čtyři pacienti poruchu vědomí: žena ve věku 35 let, muž ve věku 48 let, žena ve věku 58 let s pH při přijetí 7,09 a muž ve věku 58 let.

Tato skupina pacientů byla analyzována nešťastnou náhodou, že v naší nemocnici bylo hospitalizováno 13 pacientů intoxikovaných metanolem.

### **4.3 Pacienti s diabetem mellitus**

První skupinu diabetiků tvoří 565 po sobě jdoucích pacientů z diabetologické ambulance Krajské nemocnice Tomáše Bati a. s. ve Zlíně. Věkový rozsah byl od 19 do 86 let. Bylo zde 268 žen s věkovým průměrem  $59 \pm 14$  roků a 297 mužů s věkovým průměrem  $57 \pm 13$  roků.

Druhou skupinu tvoří 950 výsledků diabetiků pracoviště Institutu Klinické a Experimentální Medicíny v Praze (IKEM). Druhá skupina zahrnuje obecně pacienty v těžším stavu s nižšími hodnotami GFR než jsou pacienti ve Zlíně. Někteří pacienti z IKEM byli analyzováni dvakrát. Bylo vyloučeno 6 pacientů s kreatininem pod 40  $\mu\text{mol/l}$ .

Celkem bylo tedy analyzováno 1515 hodnot.

### **4.4 Pacienti s chronickým onemocněním ledvin**

Průřezová retrospektivní studie zahrnovala 352 pacientů z nefrologické ambulance Krajské nemocnice Tomáše Bati a. s. ve Zlíně od ledna do prosince 2013. Jednalo se o 174 mužů a 178 žen. Věkový rozsah byl od 20 do 88 let. Medián věku byl 54 roků (41-66). Pacienti v chronickém dialyzačním programu ve studii nebyli. Jednalo se o pacienty ve stadiu G1-G4 a pacienty před zahájením dialýzy.



## 5 Metody měření a odhadu glomerulární filtrace, další použité laboratorní testy

### 5.1 Stanovení kreatininu

**Analytický princip enzymatické metody na stanovení kreatininu v séru a moči:**

V prvním kroku je kreatinin hydrolyzován kreatininázou na kreatin. Poté je kreatin hydrolyzován působením kreatinázy na sarkosin a ureu. Sarkosin je dále oxidován působením sarkosin oxidázy na glycin + formaldehyd + peroxid vodíku. Peroxid vodíku reaguje s 4-aminoantipyrinem a N-ethyl-N-sulfopropyl-m-toluidinem za vzniku zbarvení, které zvyšuje absorbanční při 548 nm. Absorbance při 548 nm je přímo úměrná koncentraci kreatininu ve vzorku.

**Výrobce reagentů:** Byly použity reagenty firmy Abbott.

**Kalibrace:** Kreatinin v séru byl stanoven s návazností pracovního kalibrátoru na certifikovaný referenční materiál NIST SRM 967.

**Analyzátor:** Stanovení se provádělo na analyzátoru Architect firmy Abbott.

**Stabilita kreatininu:** Kreatinin je v séru, plazmě i moči stabilní při teplotě 20-25 °C po dobu 7 dní.

**Test byl použit u všech 4 skupin pacientů:** MGUS, intoxikovaní metanolem, diabetici a pacienti s CKD.

### 5.2 eGFR<sub>creatinine</sub>

- MDRD rovnice

**Rovnice:** Byla použita MDRD rovnice pro enzymaticky standardizovaný kreatinin[17]:

$$eGFR = 514,15 \times kr^{-1,154} \cdot věk^{-0,203} \cdot 0,742 \text{ (ženy) [ml/s/1,73 m}^2\text{]}$$

Rovnice byla použita u skupiny pacientů s MGUS. V době analýzy této skupiny pacientů se jednalo o nejaktuálnější rovnici doporučovanou NKF i českým doporučením.

- Lund Malmö rovnice

**Rovnice:** Byla použita Lund Malmö pro enzymaticky standardizovaný kreatinin bez korekce na lean body mas[21,23]:

Pro sérový kreatinin < 150 μmol/l:

$$eGFR = \text{EXP}((4,62 - 0,0112 \cdot kr) - 0,0124 \cdot věk + 0,339 \cdot (\text{LN}(věk)) - 0,226 \cdot \text{pohlaví}) / 60$$

Pro sérový kreatinin ≥ 150 μmol/l:

$$eGFR = \text{EXP}((8,17 + 0,0005 \cdot kr) - 1,07 \cdot \text{LN}(SKrea)) - 0,0124 \cdot věk + 0,339 \cdot (\text{LN}(věk)) - 0,226 \cdot \text{pohlaví}) / 60$$

EXP je základ přirozeného logaritmu umocněný na dané číslo

LN je přirozený logaritmus

Pohlaví je 0 pro muže, 1 pro ženy

Rovnice byla použita u skupiny pacientů intoxikovaných metanolem. V době analýzy této skupiny pacientů byla tato rovnice k dispozici jako jedna z rovnic nahrazující dřívější MDRD rovnici.

- CKD EPI rovnice

**Rovnice:** Byla použita rovnice pro enzymatický standardizovaný kreatinin z roku 2009[20]:

Ženy	kr ≤ 62 umol/l	eGFR	$=2,4 \times (\text{kr}/61,9)^{-0.329} \times 0.993^{\text{věk}}$	$[\text{ml}\cdot\text{s}^{-1}\cdot 1,73\text{m}^{-2}]$
	kr >62 umol/l	eGFR	$=2,4 \times (\text{kr}/61,9)^{-1.209} \times 0.993^{\text{věk}}$	$[\text{ml}\cdot\text{s}^{-1}\cdot 1,73\text{m}^{-2}]$
Muži	kr ≤ 80 umol/l	eGFR	$=2,35 \times (\text{kr}/79,6)^{-0.411} \times 0.993^{\text{věk}}$	$[\text{ml}\cdot\text{s}^{-1}\cdot 1,73\text{m}^{-2}]$
	kr >80 umol/l	eGFR	$=2,35 \times (\text{kr}/79,6)^{-1.209} \times 0.993^{\text{věk}}$	$[\text{ml}\cdot\text{s}^{-1}\cdot 1,73\text{m}^{-2}]$

Rovnice byla použita u skupin pacientů s diabetem a u pacientů s CKD. Tyto CKD-EPI rovnice jsou v současnosti hlavní doporučované rovnice podle KDIGO doporučení i společného doporučení ČSKB a ČNS.

### 5.3 Creatininová clearance

Creatininová clearance (CrCl) byla vypočítána podle rovnice:

$\text{CrCl} = \text{kreatinin v moči} \times \text{objem moče za 24 hodin} / \text{sérový kreatinin}$

Následně byl výsledek korigován na ideální tělesný povrch ( $\text{ml}/\text{s}/1,73\text{m}^2$ ).

Creatininová clearance byla počítána u skupiny pacientů a CKD.

### 5.4 Stanovení cystatinu C

#### Analytický princip:

Cystatin C byl stanoven imunoturbidimetrickým měřením na latexových částicích = particle enhanced immunoturbidimetric assay (PETIA).

**Výrobce reagensů:** Byly použity reagensie a kalibrátor firmy Dako cytometry (MGUS pacienti).

U ostatních 3 skupin pacientů byly použity reagensie a kalibrátor firmy Abbott laboratories. (Pacienti intoxikovaní metanolem, diabetici, pacienti s CKD)

**Kalibrace:** Byl použit kalibrátor firmy Dako cytometry. Kalibrace ještě nebyla navázaná na certifikovaný referenční materiál ERM DA 471/IFCC. (MGUS pacienti)

U ostatních 3 skupin pacientů byl použit kalibrátor s návazností na certifikovaný referenční materiál ERM DA 471/IFCC (intoxikovaní metanolem, diabetici, pacienti s CKD).

**Analyzátor:** Stanovení se provádělo na analyzátoru Architect firmy Abbott.

**Stabilita cystatinu C:** Stabilita při +20 až 25 °C stupňů Celsia je 24 hodin, při +4 až +8 °C je 7 dnů

## 5.5 eGFR<sub>cystatinC</sub>

- Grubbova rovnice

**Rovnice:** Byla použita následující rovnice, před zavedením návaznosti měření pro cystatin C[28]:

$$eGFR = 1,4115 \times cys^{-1,680} \times F \text{ [ml/s/1,73 m}^2\text{]}$$

Kde je: Scyst – koncentrace cystatinu C v séru v mg/l;

F – koeficient (děti do 14 let F = 1,384; u mužů F = 1; u žen F = 0,948).

Rovnice byla použita u pacientů s MGUS. V době analýzy této skupiny pacientů, před standardizací cystatinu C, se jednalo o nejaktuálnější rovnici doporučovanou NKF i českým doporučením.

- Rovnice podle doporučení výrobce Abbott

**Rovnice:** Byla použita rovnice pro standardizovaný cystatin C:

$$eGFR = 81,8 / cys^{1,28} \text{ (ml/s/1,73 m}^2\text{)}$$

koncentrace cystatinu C je v mg/l.

Rovnici jsme použili u pacientů intoxikovaných metanolem. Rovnici jsme v té době zavedli jako první dostupnou po zavedení standardizace cystatinu C.

- CKD-EPI rovnice z roku 2012

**Rovnice:** Byla použita rovnice pro standardizovaný cystatin C z roku 2012[29]:

$$cys \leq 0,8 \text{ mg/L} \quad eGFR = 2,217 \times (cys/0,8)^{-0,499} \times 0,996^{\text{věk}} \text{ [x0,932 pro ženy]}$$

$$cys > 0,8 \text{ mg/L} \quad eGFR = 2,217 \times (cys/0,8)^{-1,328} \times 0,996^{\text{věk}} \text{ [x0,932 pro ženy]}$$

Rovnice byla použita u skupin pacientů s diabetem a CKD. Tyto CKD-EPI rovnice jsou v současnosti hlavní doporučované rovnice podle KDIGO doporučení i společným doporučením ČSKB a ČNS, a proto ji nyní používáme k eGFR.

## 5.6 eGFR<sub>creatinine+cystatinC</sub>

**Rovnice:** Byla použita rovnice pro enzymatický standardizovaný kreatinin a cystatin C z roku 2012[29]:

Ženy	kr ≤ 62umol/L a eGFR=2,17x (kr/61,9) <sup>-0.248</sup> x (cys/0.8) <sup>-0.375</sup> x 0.995 <sup>věk</sup> cys ≤ 0.8 mg/L
	kr ≤ 62umol/L a eGFR=2,17 x (kr/61,9) <sup>-0.248</sup> x (cys/0.8) <sup>-0.711</sup> x 0.995 <sup>věk</sup> cys > 0.8 mg/L
	kr > 62umol/l a eGFR=2,17 x (kr/61,9) <sup>-0.601</sup> x (Scys/0.8) <sup>-0.375</sup> x 0.995 <sup>věk</sup> cys ≤ 0.8 mg/L
	kr >62umol/L a eGFR=2,17 x (kr/61,9) <sup>-0.601</sup> x (cys/0.8) <sup>-0.711</sup> x 0.995 <sup>věk</sup> cys ≥ 0.8 mg/L
Muži	kr ≤80umol/L a eGFR=2,25 x (kr/79,6) <sup>-0.207</sup> x (cys/0.8) <sup>-0.375</sup> x 0.995 <sup>věk</sup> cys ≤ 0.8 mg/L
	kr ≤ 80umol/L a eGFR=2,25 x (kr/79,6) <sup>-0.207</sup> x (cys/0.8) <sup>-0.711</sup> x 0.995 <sup>věk</sup> cys > 0.8 mg/L
	kr > 80umol/L a eGFR=2,25 x (kr/79,6) <sup>-0.601</sup> x (cys/0.8) <sup>-0.375</sup> x 0.995 <sup>věk</sup> cys ≤ 0.8 mg/L
	kr > 80 umol/L a eGFR=2,25 x (kr/79,6) <sup>-0.601</sup> x (cys/0.8) <sup>-0.711</sup> x 0.995 <sup>věk</sup> cys > 0.8 mg/L

Rovnice byly použity u skupin pacientů s diabetem a CKD. Tyto CKD-EPI rovnice jsou v současnosti hlavní doporučované rovnice podle KDIGO doporučení i společného doporučení ČSKB a ČNS.

## 5.7 Další laboratorní testy

- **$\beta$ 2mikroglobulin** v séru byl stanoven metodou imunofluoresce reagensii firmy Abbott na analyzátoru Axsym, (MGUS pacienti).
- **Monoklonální immunoglobulin v séru** kvantitativně byl stanoven denzitometricky z elektroforegramu provedeném na přístroji firmy Sebia a výpočtem z celkové bílkoviny (MGUS pacienti).
- **Celková bílkovina v séru** byla stanovena biuretovou reakcí s reagensii firmy Abbott (MGUS pacienti)
- **$\kappa$  and  $\lambda$  volné lehké řetězce v séru** = free light chains (FLC) byly stanoveny imunoturbidimetrií na latexových částicích (souprava Freelite; výrobce The Binding Site, Birmingham, UK) na analyzátoru Olympus(MGUS pacienti).
- **Troponin I v séru** (nesplňující kritéria pro high sensitive troponin) byl stanoven reagensii firmy Abbott chemiluniscenční imunoanalýzou na analyzátoru Architect (Intoxikování metanolem).
- **Alaninaminotransferáza v séru** - katalytická koncentrace byla stanovena enzymatickým fotometrickým testem s pyridoxalfosfátem, reagensii firmy Abbott na analyzátoru Architect
- **pH v plazmě** bylo stanoveno elektrochemicky na analyzátoru firmy Radiometr (Intoxikování metanolem).
- **Osmolalita v séru** byla stanovena metodou kryoskopické osmometrie na analyzátoru Osmostation OM-6050 výrobce Arkray (Intoxikování metanolem).
- **Etanol v séru** byl stanoven enzymatickým fotometrickým testem výrobce Abbott na analyzátoru Architect c8000(Intoxikování metanolem).
- **Metanol v séru** byl stanoven metodou plynové chromatografie (Intoxikování metanolem).
- **Celková bílkovina v moči** byla stanovena fotometricky s využitím reakce celkové bílkoviny s benzethoniumchloridem reagensii firmy Abbott na analyzátoru Architect (Pacienti s CKD).
- **Albumin v moči** byl stanoven imunoturbidimetricky metodou navázanou na sérový certifikovaný referenční materiál CRM 470. Byly použity reagenty firmy Abbott na analyzátoru Architect (pacienti s CKD).

## 6 Statistické testy

### 6.1 Pacienti s MGUS

**Spearmanův korelační koeficient** byl použit k posouzení korelace mezi následujícími parametry: cystatin C, kreatinin, koncentrace monoklonálního imunoglobulinu, volných lehkých řetězců  $\kappa$  a  $\lambda$ , poměru  $\kappa/\lambda$ ,  $\beta$ 2microglobulinu, pohlaví a věku.

**Mixed linear model (MLM)** hodnotil vliv třídy monoklonálního imunoglobulinu na GFR.

### 6.2 Pacienti intoxikovaní metanolem

**Párový Studentův T test** – studoval rozdíly mezi průměrnou koncentrací laboratorních markerů,  $eGFR_{\text{creatinine}}$  a  $eGFR_{\text{cystatinC}}$  při přijetí a před propuštěním pacienta domů po intoxikaci metanolem.

**Korelační analýza** – studovala asociaci mezi osmolalitou, pH, koncentrací laktátu a koncentrací metanolu nebo věkem.

**Parciální korelační analýza** hodnotila samostatně vliv metanolu a věku na osmolalitu, pH a koncentraci laktátu.

**Lineární regrese** – kvantitativně hodnotila asociaci mezi vzestupem metanolu a vzestupem osmolality.

### 6.3 Pacienti s diabetem mellitus

**Studentův t-Test** byl použit k porovnání průměrů metod

**Párový t-Test** byl použit k posouzení významnosti rozdílů  $eGFR$  mezi metodami v rozdílných oblastech glomerulární filtrace.

**Blandův-Altmanův rozdílový graf:** Slouží k porovnání dvou metod. Na ose X jsou zobrazeny průměry párových výsledků, na ose Y jsou zobrazeny rozdíly metod.

**Spearmanův korelační koeficient** byl použit k posouzení korelací mezi  $eGFR_{\text{creatinine}}$ ,  $eGFR_{\text{cystatinC}}$  a  $eGFR_{\text{creatinine+cystatin C}}$

### 6.4 Pacienti s chronickým onemocněním ledvin

**D'Agostino-Pearsonův test** byl použit pro posouzení normálního rozložení

**Friedmanův test** byl použit pro porovnání mediánů CrCl a všech  $eGFR$ .

**Blandův-Altmanův rozdílový graf:** Slouží k porovnání dvou metod. Na ose X jsou zobrazeny průměry párových výsledků, na ose Y jsou zobrazeny rozdíly metod.

**Spearmanův korelační koeficient** byl použit k posouzení korelace mezi CrCl, všemi  $eGFR$ , celkovou proteinurií a albuminurií.

## 7 Vlastní výsledky

### 7.1 Pacienti s MGUS

U studované populace nebyl prokázán rozdíl mezi průměrnou  $eGFR_{cystatinC}$   $1.23 \pm 0.60$  ml/s/1.73m<sup>2</sup> a průměrnou  $eGFR_{creatinine}$   $1.16 \pm 0.37$  ml/s/1.73m<sup>2</sup> ( $p > 0.05$ ).

Výsledky odhadů GFR ukazují, že podle  $eGFR_{cystatinC}$  mělo 62 pacientů GFR nad limitem 1.0 ml/s/1.73m<sup>2</sup> a 39 pacientů mělo chronické onemocnění ledvin. Z toho 29 mělo stadium 3, stadium 4 mělo 8 pacientů a stadium 5 měli 2 pacienti.

Podle  $eGFR_{creatinine}$  bylo 66 pacientů nad limitem 1.0 ml/s/1.73m<sup>2</sup> a 35 pacientů mělo chronické onemocnění ledvin (stadium 3 mělo 34 pacientů, stadium 4 měl 1 pacient a nikdo neměl stadium 5). Diskrepance byly nalezeny u 14 případů.

9 pacientů mělo  $eGFR_{cystatinC}$  v oblasti chronického onemocnění ledvin, zatímco  $eGFR_{creatinine}$  byl nad limitem 1.0 ml/s/ 1.73m<sup>2</sup>.

5 pacientů mělo  $eGFR_{cystatinC}$  nad limitem 1.0 ml/s/1.73m<sup>2</sup>, zatímco  $eGFR_{creatinine}$  byl v oblasti CKD. Celkově u více než 1/3 pacientů bylo zjištěno CKD buďto oběma metodami nebo alespoň jednou z nich.

U souboru pacientů MGUS byly kromě parametrů GFR měřeny i markery monoklonálních gamapatií a sledována jejich vzájemná korelace. Výsledky jsou přehledně zpracovány v Tab. 1. Vzájemná asociace jednotlivých proměnných byla vypočtena pomocí Spearmanova korelačního koeficientu.

**Tabulka 1.** Spearmanovy korelační koeficienty mezi proměnnými

	Cystatin C	$eGFR_{cystatinC}$	Creatinine	$eGFR_{creatinine}$	MIg concentration	Class of paraprotein	$\kappa$ FLC	$\lambda$ FLC	$\kappa / \lambda$	$\beta$ 2mikro-globulin	Gender	Age
Cystatine C		-0.84*	0.79*	-0.70*	0.19	0.06	0.20*	0.24*	0.03	0.90*	-0.02	0.43*
$eGFR_{cystatinC}$	-0.84*		-0.66*	0.70*	-0.15	-0.02	-0.22*	-0.20*	-0.08	-0.69*	0.01	-0.47*
Creatinine	0.79*	-0.66*		-0.83*	0.10	-0.02	0.23*	0.17	0.04	0.70*	-0.23*	0.32*
$eGFR_{creatinine}$	-0.70*	0.70*	-0.83*		-0.10	-0.03	-0.15	-0.11	-0.03	-0.60*	-0.20*	-0.36*
MIg concentration	0.19	-0.15	0.10	-0.10		0.02	0.25*	0.12	0.36*	0.24*	0.05	0.08
Class of paraprotein	0.06	-0.02	-0.02	-0.03	0.02		-0.18	-0.02	-0.07	-0.02	0.13	0.10
$\kappa$ FLC	0.20*	-0.22*	0.23*	-0.15	0.25*	-0.18		0.24*	0.45*	0.22*	-0.23*	0.12
$\lambda$ FLC	0.24*	-0.20*	0.17	-0.11	0.12	-0.02	0.24*		-0.15	0.34*	0.01	0.06
$\kappa / \lambda$	0.03	-0.08	0.04	-0.03	0.36*	-0.07	0.45*	-0.15		-0.02	-0.12	0.08
$\beta$ 2mikroglobulin	0.90*	-0.69*	0.70*	-0.60*	0.24*	-0.02	0.22*	0.34*	-0.02		-0.01	0.40*
Gender	-0.02	0.01	-0.23*	-0.20*	0.05	0.13	-0.23*	0.01	-0.12	-0.01		-0.05
Age	0.43*	-0.47*	0.32*	-0.36*	0.08	0.10	0.12	0.06	0.08	0.40*	-0.05	

Note: Marked correlation are significant on level of probability  $P \leq 0.05$  (\*).

Je vidět, že  $\beta$ 2mikroglobulin má největší počet signifikantních korelací: cystatin C (0.90),  $eGFR_{cystatinC}$  (-0.69), creatinine (0.70),  $eGFR_{creatinine}$  (- 0.60), MIg concentration (0.24),  $\kappa$  FLC (0.22)  $\lambda$  FLC (0.34) a age (0.40).

Spearmanův korelační koeficient mezi poměrem  $\kappa/\lambda$  a  $eGFR_{cystatinC}$  and  $eGFR_{creatinine}$  se blíží nule. Poměr  $\kappa/\lambda$  FLC měl signifikantní korelaci jen ve dvou případech: s MIg concentration (0.36) a s  $\kappa$  FLC (0.45).

MIg concentration měla jen signifikantní korelaci s  $\kappa$  FLC a  $\beta$ 2mikroglobulinem.

Dále byly sledovány rozdíly v hodnotách GFR mezi třídami paraproteinů. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 2.

**Tabulka 2.** Rozdíly v hodnotách eGFR mezi třídami paraproteinů

	Biclonal	IgA $\kappa$	IgA $\lambda$	IgG $\kappa$	IgG $\lambda$	IgM $\kappa$	IgM $\lambda$
$eGFR_{cystatinC}$ ml/s/1,73m <sup>2</sup>	<b>0.92 ± 0.19<sup>a</sup></b>	1.30 ± 0.20	<b>1.60 ± 0.24<sup>b,*</sup></b>	1.22 ± 0.1	<b>1.13 ± 0.11<sup>**</sup></b>	1.20 ± 0.19	1.43 ± 0.32
$eGFR_{creatinine}$ ml/s/1,73m <sup>2</sup>	1,06 ± 0,12	1,15 ± 0,13	1,25 ± 0,16	1,17 ± 0,06	1,15 ± 0,07	1,12 ± 0,12	1,29 ± 0,21

Note: Values with different superscripts show significance level within rows:  $P \leq 0.05$  (<sup>a/b</sup>);  $P \leq 0.1$  (<sup>\*/\*\*</sup>)

$eGFR_{cystatinC}$  je signifikantně nižší u biklonální monoklonální gamapatie než u IgA  $\lambda$ . Zdá se tedy, že třída paraproteinu může tedy mít vliv na  $eGFR_{cystatinC}$ , ale na  $eGFR_{creatinine}$  nebyl tento vliv zjištěn.

Analýzu výsledků eGFR podle pohlaví ukazuje následující tabulka 3:

**Tabulka 3.** Rozdíly v hodnotách eGFR podle pohlaví

	Male	Female
$eGFR_{cystatinC}$ ml/s/1,73m <sup>2</sup>	1.27 ± 0.11	1.24 ± 0.09
$eGFR_{creatinine}$ ml/s/1,73m <sup>2</sup>	<b>1.26 ± 0.07<sup>a</sup></b>	<b>1.08 ± 0.06<sup>b</sup></b>

Note: Values with different superscripts show significance level within row  $P \leq 0.05$  (<sup>a/b</sup>).

$eGFR_{creatinine}$  dává vyšší výsledky u mužů než u žen.



Analýzu GFR v různých věkových skupinách ukazuje tabulka 4.

**Tabulka 4.** Rozdíly v hodnotách eGFR podle věku

	1 (43 – 59 years)	2 (60 – 79 years)	3 (80 – 95 years)
eGFR <sub>cystatinC</sub> ml/s/1,73m <sup>2</sup>	<b>1.71 ± 0.15<sup>B, a</sup></b>	<b>1.34 ± 0.09<sup>B, b</sup></b>	<b>0.72 ± 0.14<sup>A</sup></b>
eGFR <sub>creatinine</sub> ml/s/1,73m <sup>2</sup>	<b>1.39 ± 0.1<sup>B, *</sup></b>	<b>1.22 ± 0.06<sup>B, **</sup></b>	<b>0.91 ± 0.09<sup>A</sup></b>

Note: Values with different superscripts show significance level within rows:  $P \leq 0.01$  (<sup>A/B</sup>);  $P \leq 0.05$  (<sup>a/b</sup>);  $P \leq 0.1$  (<sup>\*/\*\*</sup>).

Pokles glomerulární filtrace s rostoucím věkem byl patrný z obou eGFR.

Analýzu diabetiků a nediabetiků podle eGFR ukazuje tabulka 5.

**Tabulka 5.** Rozdíly v hodnotách eGFR podle přítomnosti diabetu

	Diabetics	Nondiabetitics
eGFR <sub>cystatinC</sub> ml/s/1,73m <sup>2</sup>	1,13 ± 0,11	1,28 ± 0,08
eGFR <sub>creatinine</sub> ml/s/1,73m <sup>2</sup>	1,13 ± 0,07	1,16 ± 0,06

Nebyl nalezen rozdíl v eGFR v odhadu ani z kreatininu ani z cystatinu C.

## 7.2 Pacienti intoxikovaní metanolem

Výsledky pacientů při přijetí a před propuštěním udává následující tabulka 6:

**Tabulka 6.** Výsledky pacientů při přijetí a před propuštěním

Sex	Age	Methanol (mmol/l)	Cystatin C (mg/l)		Creatinine ( $\mu$ mol/l)		Osmolality (mmol/kg)		Lactate (mmol/l)		pH		Urine output (ml/kg/h (1 <sup>st</sup> day))	Dialysis
			adm.	dis.	adm.	dis.	adm.	dis.	adm.	dis.	adm.	dis.		
M	69	5	0.95	0.98	68	72	294	288			7.39	7.42	2.27	No
F	58	76	0.77	0.90	71	58	390	281	-	-	7.11	7.47	1.72	YES
F	63	55	1.12	0.92	79	56	373	288	0.9	1.4	7.09	7.41	4.67	YES
M	42	12	0.66	0.63	73	75	303	-	1.5		7.30	7.40	1.56	YES
F	35	33	1.27	1.25	77	55	348	290	8.3		7.08	7.42	0.57	YES
M	48	62	1.68	0.62	167	44	374	280	7.6		6.82	7.50	2.76	YES
M	79	10	1.55	0.94	80	61	310	282	4.4	0.9	7.33	7.49	2.3	YES
F	58	38	0.80	0.72	84	58	378	286	5.1	1.8	7.09	7.46	5	YES
M	42	63	0.70	0.70	68	80	409	-	1.4	-	7.41	7.41	1.43	YES
F	62	30	1.01	0.90	76	60	311	291	2.0	1.0	7.18	7.45	4.05	YES
M	58	61	1.63	1.19	124	74	383	287	12.8	1.7	6.76	7.51	1.25	YES
F	52	138	0.92	0.86	44	45	463	284	1.5	1.4	7.22	7.45	4.38	YES
M	28	12	0.79	0.79	73	86	300	283	0.9	1.0	7.33	7.36	-	No
Mean $\pm$ SD	53.38 $\pm$ 14.15	45.76 $\pm$ 36.50	1.06 $\pm$ 0.35	0.88 $\pm$ 0.19	83.38 $\pm$ 30.50	63.38 $\pm$ 12.98	356.61 $\pm$ 51.01	285.45 $\pm$ $\pm$ 3.70	4.21 $\pm$ 3.90	1.31 $\pm$ 0.36	7.16 $\pm$ 0.20	7.44 $\pm$ 0.04	2.66 $\pm$ 1.50	

Note: adm. is the marker level at the admission time; dis. is the marker level at the recovery time = discharge.

Statisticky významný rozdíl mezi hodnotami při přijetí a před propuštěním byl nalezen u osmolality, séra, pH plazmy a laktátu.

Usledovaných markerů byly vypočteny průměrné difference mezi hodnotami při přijetí a před propuštěním a pomocí Studentova párového t-testu vypočteny statisticky významné změny. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 7.

**Tabulka 7.** Výsledky Studentova párového t-testu

Cystatin C (mg/l)	Creatinine ( $\mu$ mol/l)	Osmolality (mmol/kg)	Lactate (mmol/l)	pH	ALT	eGFR Cystatin C	eGFR Creatinine
0.18 $\pm$ 0.09	20.00 $\pm$ 9.88	71.27 $\pm$ 15.56**	3.24 $\pm$ 1.20*	-0.28 $\pm$ 0.06**	0.77 $\pm$ 0.71	-0.26 $\pm$ 0.14	-0.23 $\pm$ 0,13

ALT is alanine aminotransferase; eGFR is estimated glomerular filtration rate. \*  $P \leq 0,05$  \*\*  $P \leq 0,01$ .

Signifikantní změna byla nalezena u osmolality, pH a laktátu mezi přijetím a propuštěním pacienta ( $P \leq 0,01$ ;  $P \leq 0,01$  a  $P \leq 0,05$ ).

U  $eGFR_{\text{creatinine}}$  ani u  $eGFR_{\text{cystatinC}}$  nebyl nalezen statistický rozdíl mezi přijetím a při propuštěním.

Dále byla provedena korelační analýza mezi jednotlivými markery a věkem nebo hladinou metanolu. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 8.

**Tabulka 8.** Korelační analýza jednotlivých markerů a věku nebo hladiny metanolu

	Osmolality (mmol/kg)	Lactate (mmol/l)	pH
$r_{\text{age}}$	-0.43	-0.35	0.06
$r_{\text{met}}$	0.95**	0.01	-0.27

$r_{\text{age}}$  is the Pearson correlation coefficient between age and marker  $r_{\text{met}}$  is the Pearson correlation coefficient between methanol level and marker. \*\*  $P \leq 0,01$  by testing for the significance of the correlation coefficient.

Korelace mezi osmolalitou a metanolem byla potvrzena mnohonásobnou korelační analýzou, kterou zobrazuje následující tabulka 9.

**Tabulka 9.** Korelační analýza osmolality a metanolu

	Osmolality (mmol/kg)	Lactate (mmol/l)	pH
$r_{\text{met/age}}$	0.97**	0.36	0.27

$r_{\text{met/age}}$  is the multiple correlation coefficient between age and methanol level as independent variables and marker as dependent variable. \*\*  $P \leq 0,01$  by testing for the significance of the multiple correlation coefficient.

Malý vliv věku na koncentraci metanolu byl prokázán parciální korelační analýzou, což je zobrazeno v následující tabulce 10.

**Tabulka 10.** Parciální korelační analýza mezi markery a věkem nebo metanolem

	Osmolality	Lactate	pH
$R_{\text{parc}_{\text{age}}}$	-0.622	-0.361	-0.010
$R_{\text{parc}_{\text{met}}}$	0.964*	-0.083	-0.267

$R_{\text{parc}_{\text{age}}}$  is partial correlation between marker and age (effect of methanol level is removed).  $R_{\text{parc}_{\text{met}}}$  is partial correlation between marker and methanol level (effect of age is removed). \*  $P \leq 0,05$  by testing for the significance of the partial correlation coefficient.

Na základě lineární regrese lze říct, že vzestup hladiny metanolu o 10 mmol/l způsobí vzestup osmolality o  $13.0 \pm 1.4$  mmol/l.

Byl nalezen zvýšený troponin I nad 99 percentilem zdravé populace u čtyř pacientů (muž 58 let, ženy 58, 35 a 58 let). Žádný z pacientů neměl klinické známky akutního koronárního syndromu ani změny na elektrokardiografii (EKG).

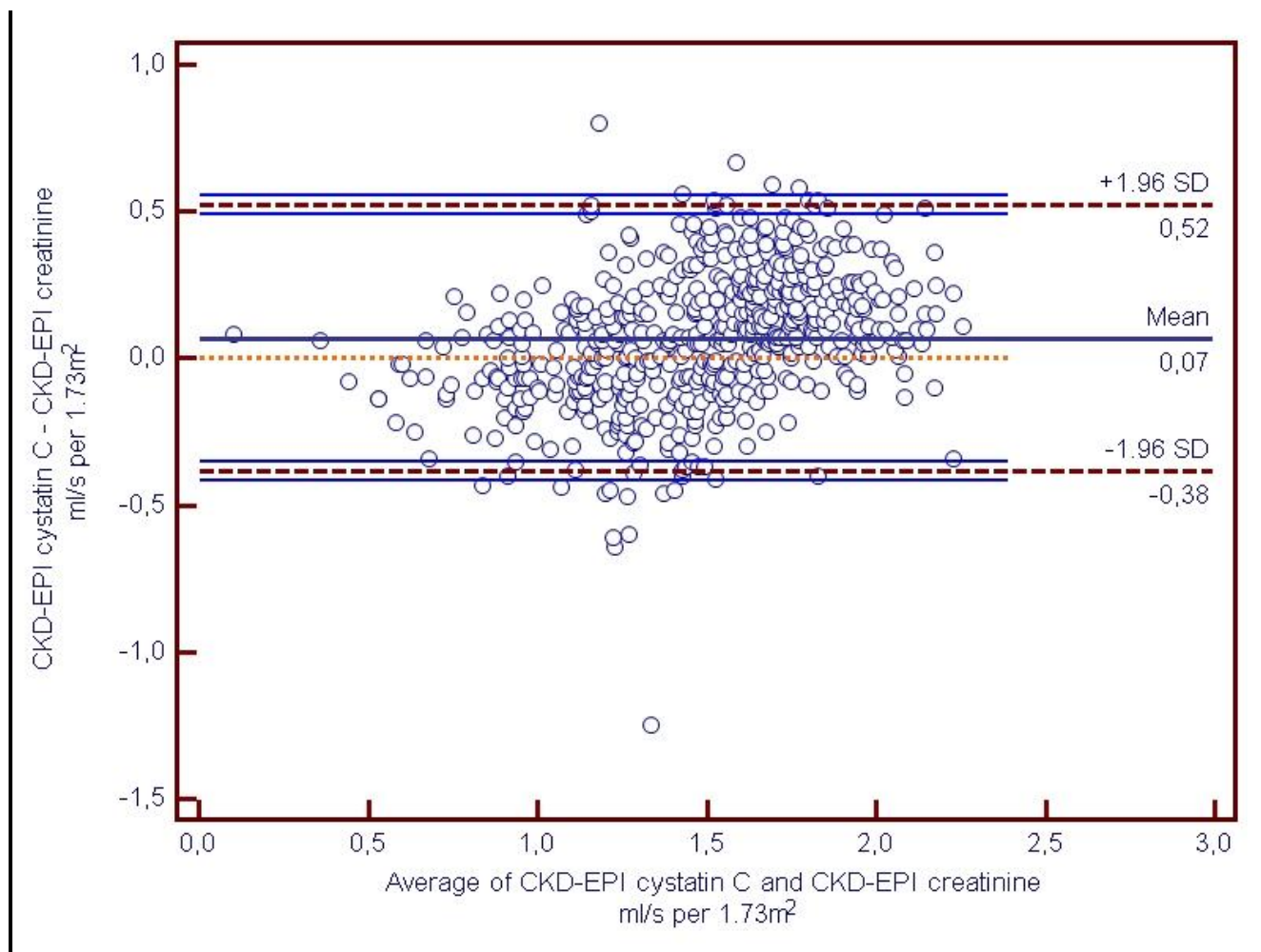
Dva pacienti měli AKI podle vzestupu sérového kreatininu, ale ne podle kritéria močového objemu.

Jeden pacient, 48 letý muž, měl problémy se zrakem. Magnetická rezonance odhalila otok bílé hmoty semioválního centra v mozečku. Většina poškození byla v centru corona radiata v subkortikální okcipitální oblasti. Krvácející nekrózy byly v bazálních gangliích, hlavně v oblasti putamen a globus pallidus.

### 7.3 Pacienti s diabetem mellitus

U pacientů byla průměrná  $eGFR_{\text{creatinine}}$  ( $1.443 \pm 0.014$ ) ml/s/1.73m<sup>2</sup> nižší než  $eGFR_{\text{cystatinC}}$  ( $1.512 \pm 0.017$ ) ml/s/1.73m<sup>2</sup>, ( $p < 0.002$ ).

Všechny naměřené výsledky jsou zpracovány v Blandově - Altmanově rozdílovém grafu (Obrázek 1). Je evidentní, že v oblasti  $GFR < 1.0$  ml/s/1.73m<sup>2</sup>, je GFR odhadovaná z cystatinu C nižší než odhady z kreatininu. Průměrný rozdíl GFR v oblasti pod 1.0 ml/s/1.73m<sup>2</sup> ( $eGFR_{\text{cystatinC}} - eGFR_{\text{creatinine}}$ ) je ( $-0,067 \pm 0,019$ ) ml/s/1.73m<sup>2</sup> ( $p = 0,0007$ ). Naopak v oblasti nad 1.5 ml/s/1.73m<sup>2</sup> je průměrný rozdíl mezi  $eGFR_{\text{cystatinC}}$  a  $eGFR_{\text{creatinine}}$  ( $0.156 \pm 0.011$ ) ml/s/1.73m<sup>2</sup>.



**Obrázek 1.** Blandův-Altmanův rozdílový graf mezi  $eGFR$  CKD-EPI 2012 (cystatin C) and CKD-EPI 2009(creatinine)

42 pacientů z celkového počtu 565 pacientů mělo jak  $eGFR_{\text{cystatin C}}$ , tak  $eGFR_{\text{creatinine}}$  nižší než 1 ml/s/1.73m<sup>2</sup>. Celkem 11 pacientů mělo  $eGFR_{\text{cystatin C}} \geq 1$  ml/s/1.73m<sup>2</sup> a  $eGFR_{\text{creatinine}} < 1$  ml/s/1.73m<sup>2</sup>. 27 pacientů mělo  $eGFR_{\text{cystatin C}} < 1$  ml/s/1.73m<sup>2</sup> a  $eGFR_{\text{creatinine}} \geq 1$  ml/s/1.73m<sup>2</sup>.

Rozpor byl nalezen u 38 pacientů. Počty pacientů v jednotlivých stadiích GFR zobrazuje tabulka 11.

**Tabulka 11.** Počty pacientů v jednotlivých stadiích GFR

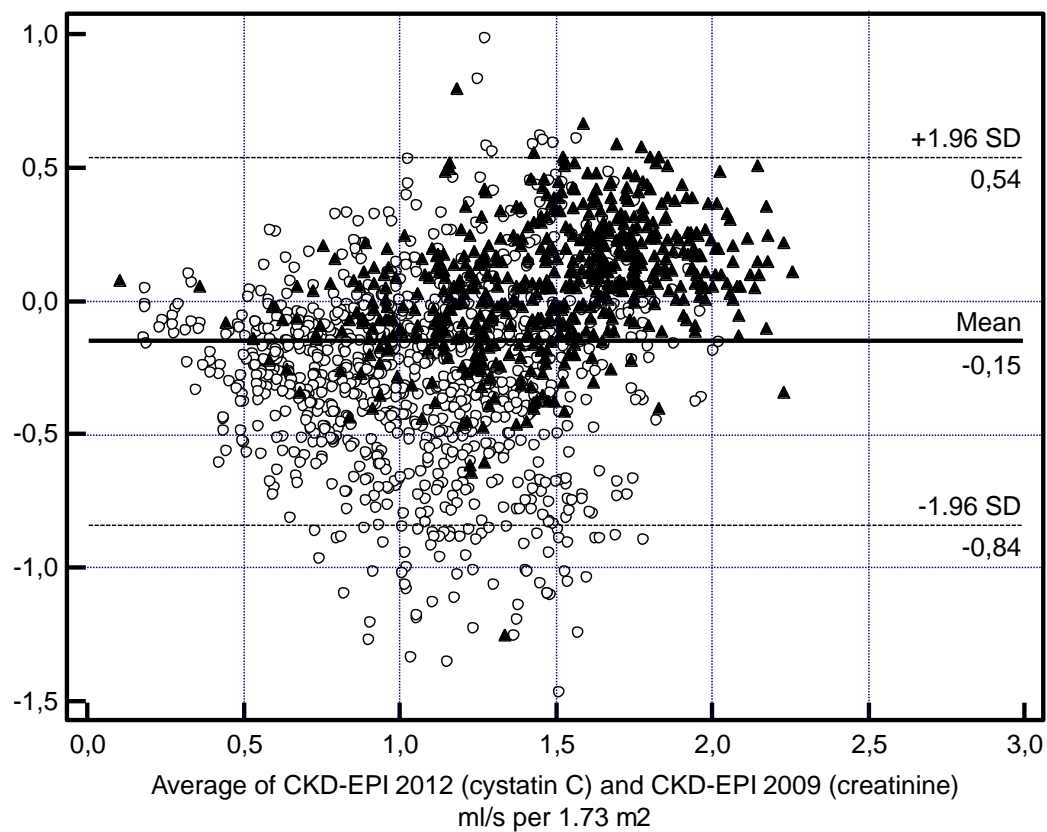
eGFR stage	G5	G4	G3b	G3a	G2	G1
$eGFR_{\text{cystatinC}}$	1	5	16	46	192	305
$eGFR_{\text{creatinine}}$	1	2	12	37	232	281
$eGFR_{\text{creatinine+cystatinC}}$	1	2	14	45	207	296

Výsledky pacientů skupiny IKEM jsou v tabulce 12:

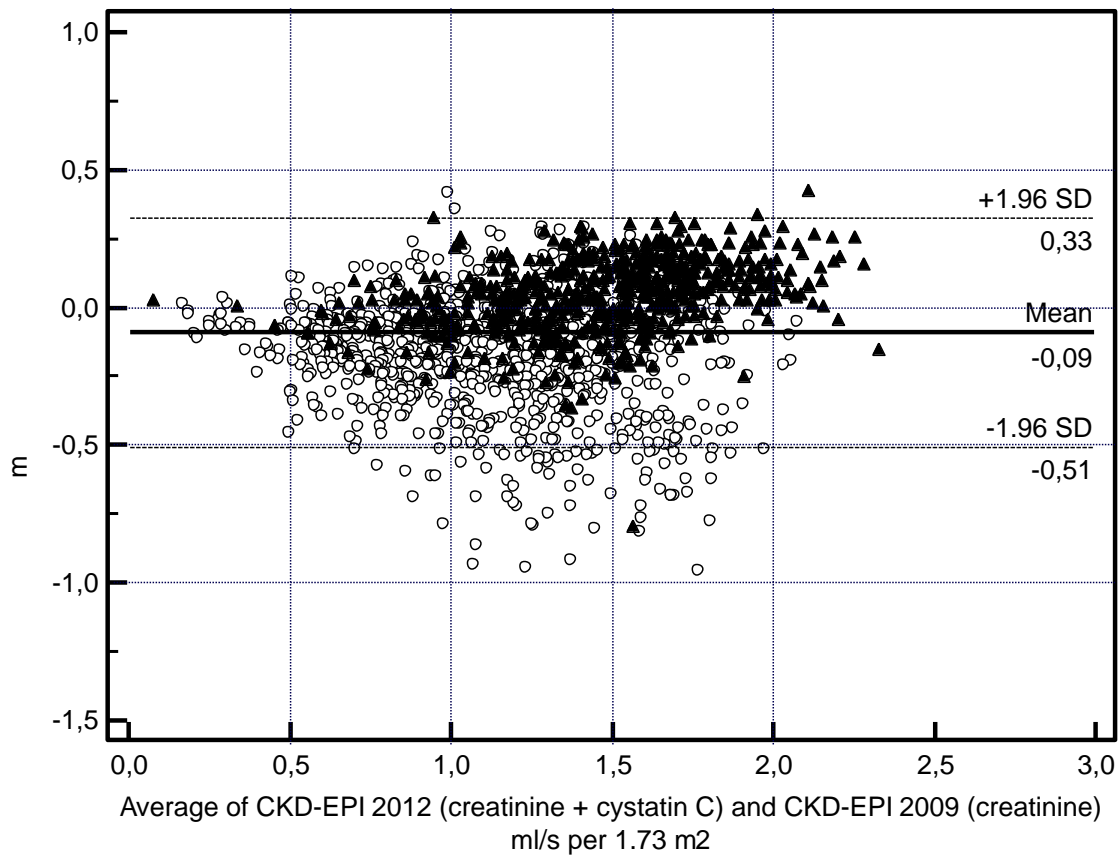
**Tabulka12.** Výsledky pacientů skupiny IKEM

	Men (N=721)		Women (N=229)	
	Median	Interquartile range	Median	Interquartile range
Serum creatinine (μmol/l)	100.8	84.2 – 124.1	79.0	67.8 – 107.3
Serum cystatin C (mg/l)	1.36	1.15 – 1.74	1.20	0.93 – 1.67
Age (years)	59.3	50.8 – 62.7	51.2	39.0 – 63.6
$eGFR_{\text{creatinine}}$ ; (ml/s per 1.73 m <sup>2</sup> )	1.185	0.916 - 1,512	1.230	0.869 – 1.454
$eGFR_{\text{cystatinC}}$ ; (ml/s per 1.73 m <sup>2</sup> )	0.880	0.620 – 1.118	0.971	0.619 – 1.370
$eGFR_{\text{creatinine+cystatinC}}$ ; (ml/s per 1.73 m <sup>2</sup> )	1.001	0.750 – 1.281	1.056	0.711 – 1.409

V následujících Blandových-Altmanových grafech jsou dohromady zobrazeny výsledky ze Zlína a IKEM (n=1515), (obrázek 2, obrázek 3 a obrázek 4).

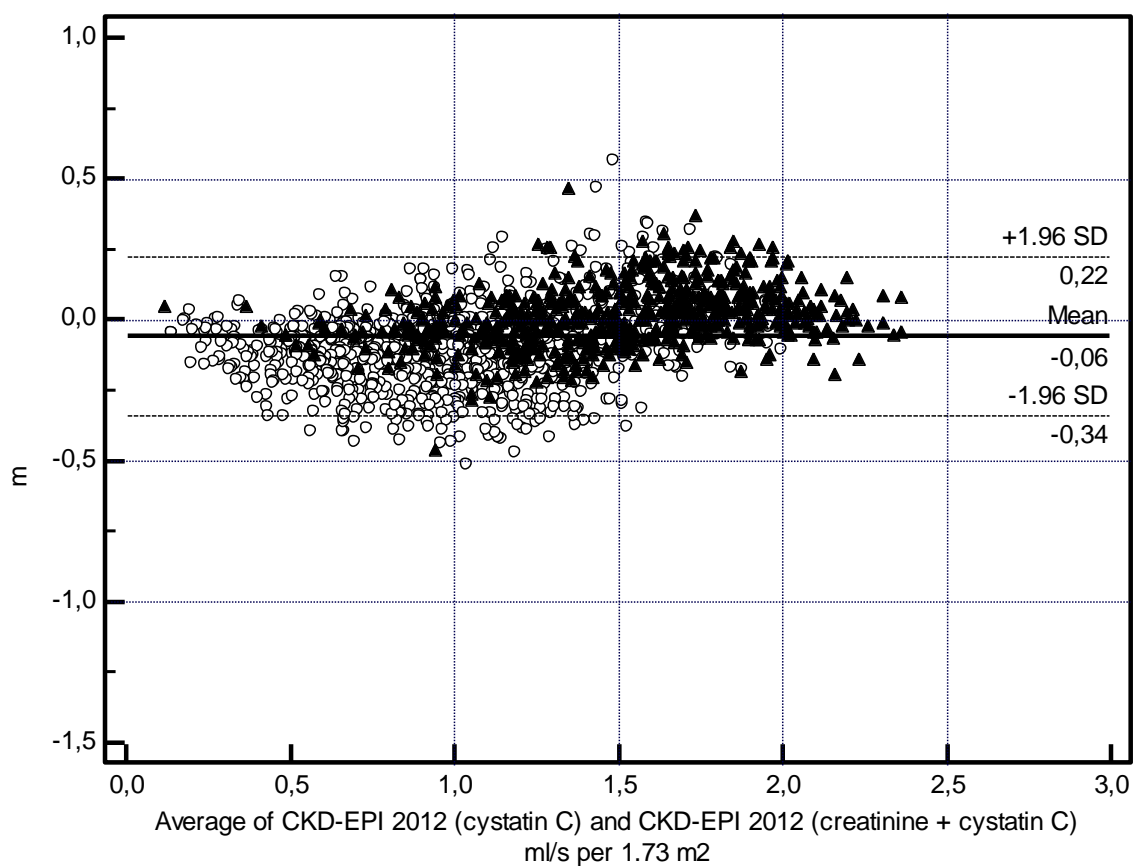


**Obrázek 2.** Relationship between eGFR calculated by CKD-EPI 2012 (cystatin C) and CKD-EPI 2009 (creatinine), described by Bland-Altman difference plot. Triangle – Hospital Zlín, open circle – IKEM Praha:



**Obrázek 3.** Relationship between eGFR calculated by CKD-EPI 2012 (creatinine + cystatin C) and CKD-EPI 2009 (creatinine), described by Bland-Altman difference plot. Triangle – Hospital Zlín, open circle – IKEM Praha





**Obrázek 4.** Relationship between eGFR calculated by CKD-EPI 2012 (cystatin C) and CKD-EPI 2012 (creatinine + cystatin C), described by Bland-Altman difference plot. Triangle – Hospital Zlín, open circle – IKEM Praha

V následující tabulce 13 jsou uvedeny výsledky korelační analýzy mezi třemi použitými rovnicemi.

**Tabulka 13.** Korelační analýza tří použitých CKD-EPI rovnic

Correlation	R (Spearman)	p
CKD-EPI 2012 (creatinine + cystatin C) vs. CKD-EPI 2012 (cystatin C)	0.960	<0.0001
CKD-EPI 2012 (creatinine + cystatin C) vs. CKD-EPI 2009 (creatinine)	0.868	<0.0001
CKD-EPI 2009 (creatinine) vs. CKD-EPI 2012 (cystatin C)	0.705	<0.0001

## 7.4 Pacienti s chronickým onemocněním ledvin

D'Agostino-Pearsonův test zamítl normální rozložení CrCl a všech eGFR ( $p < 0.0001$ ).

Medián (mezikvartilové rozpětí) kreatininové clearance byl  $1.21 \text{ ml/s/1.73m}^2$  (0.76-1.72).

Všechny eGFR dávaly nižší výsledky,  $\text{eGFR}_{\text{creatinine}} 1.01 \text{ ml/s/1.73m}^2$  (0.63-1.42) ( $p < 0.05$ ),

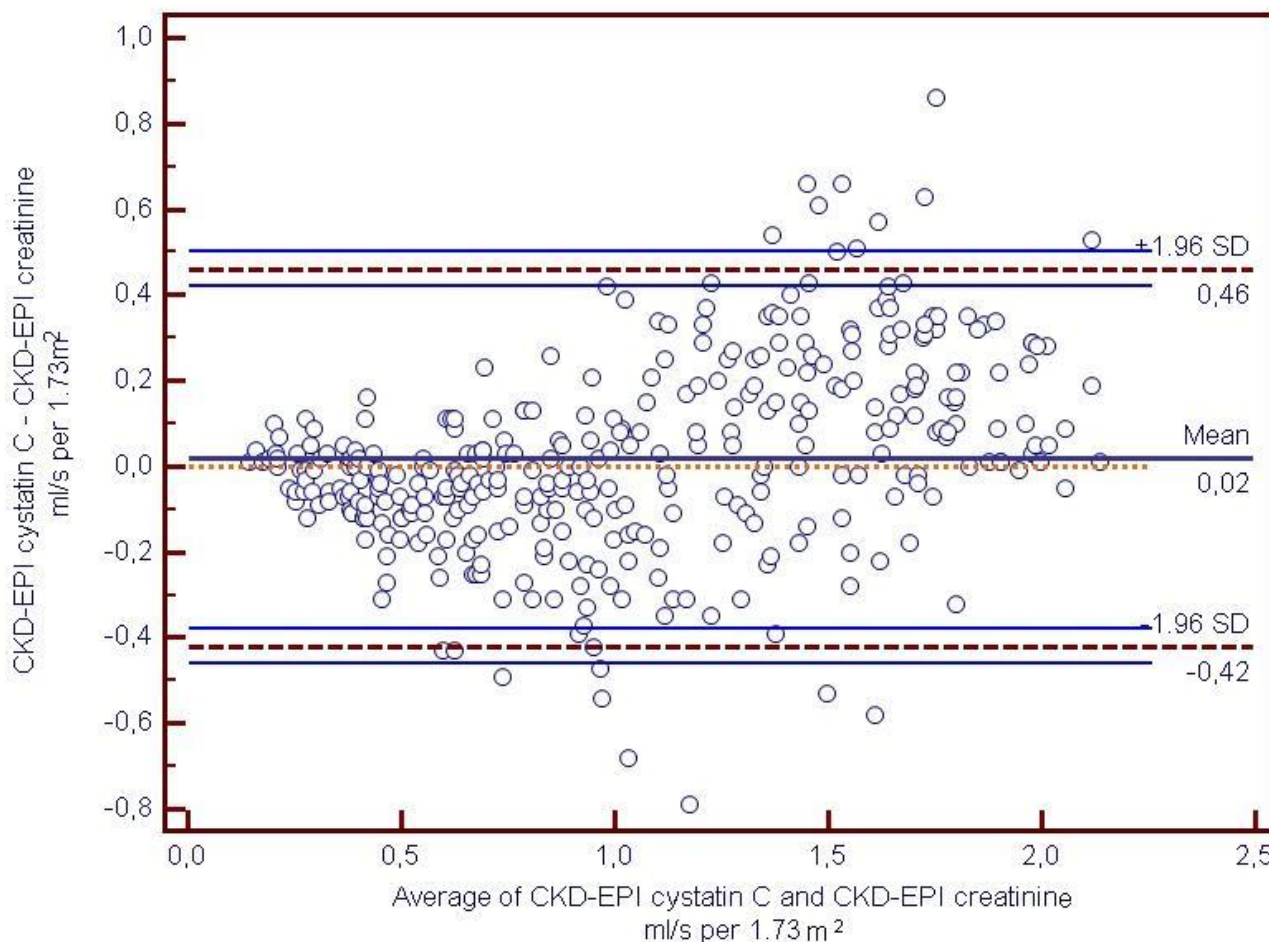
$\text{eGFR}_{\text{cystatinC}} 0.93 \text{ ml/s/1.73m}^2$  (0.55-1.59) ( $p < 0.05$ ),  $\text{eGFR}_{\text{creatinine+cystatinC}} 0.96 \text{ ml/s/1.73m}^2$  (0.90-1.05) ( $p < 0.05$ ).

Nebyl nalezen rozdíl mezi mediány  $\text{eGFR}_{\text{creatinine}}$ ,  $\text{eGFR}_{\text{cystatinC}}$  a  $\text{eGFR}_{\text{creatinine+cystatinC}}$  ( $p > 0.05$ ).

Bland-Altmanův graf (obrázek 5) ukazuje rozdíly mezi  $\text{eGFR}_{\text{cystatinC}}$  a  $\text{eGFR}_{\text{creatinine}}$ .

Můžeme vidět, že v oblasti GFR pod  $1.0 \text{ ml/s/1.73m}^2$  jsou výsledky  $\text{eGFR}_{\text{creatinine}}$  vyšší než

$\text{eGFR}_{\text{cystatinC}}$  ( $p < 0.0001$ ).  $\text{eGFR}_{\text{cystatinC}}$  odhaduje vyšší výsledky v oblasti GFR nad  $1.0 \text{ ml/s/1.73m}^2$  ( $p < 0.0001$ ).



**Obrázek 5.** Blandův-Altmanův rozdílový graf mezi CKD-EPI 2009 (creatinine) and CKD-EPI 2012 (cystatin C)

CrCl identifikovala stadium 3a CKD podle kritéria GFR u 130 pacientů,  $\text{eGFR}_{\text{creatinine}}$  u 173 pacientů,

eGFR<sub>cystatinC</sub> u 189 pacientů a eGFR<sub>creatinine+cystatinC</sub> u 185 pacientů.

U 148 pacientů, kde byly k dispozici výsledky 24 hodinového sběru moče, byla provedena korelační analýza. Její výsledky jsou uvedeny v tabulce 14.

Vidíme významnější korelace mezi všemi eGFR navzájem, zatímco korelace mezi CrCl a kteroukoliv eGFR je nižší.

Albuminurie a celková proteinurie nekorelovaly s CrCl ( $p > 0.05$ ).

**Tabulka 14.** Spearmanovy korelační koeficienty mezi proměnnými

Correlation (Spearman)			R (95CI)	p
CrCl	vs.	eGFR <sub>creatinine</sub>	0.727(0.641 to 0.795)	<0.001
CrCl	vs.	eGFR <sub>cystatinC</sub>	0.701(0.609 to 0.775)	<0.001
CrCl	vs.	eGFR <sub>creatinine+cystatinC</sub>	0.728(0.642 to 0.796)	<0.001
CrCl	vs.	Albumin / 24h	-0.104 (-0.261 to 0.059)	0.210
CrCl	vs.	Total protein / 24h	-0.028(-0.188 to 0.134)	0.736
eGFR <sub>creatinine</sub>	vs.	eGFR <sub>cystatin C</sub>	0.919(0.89 to 0.941)	<0.001
eGFR <sub>creatinine</sub>	vs.	eGFR <sub>creatinine+cystatinC</sub>	0.971(0.961 to 0.979)	<0.001
eGFR <sub>creatinine</sub>	vs.	Albumin / 24h	-0.172(-0.324 to -0.011)	0.037
eGFR <sub>creatinine</sub>	vs.	Total protein / 24h	-0.147(-0.301 to 0.015)	0.075
eGFR <sub>cystatin C</sub>	vs.	eGFR <sub>creatinine+cystatinC</sub>	0.983(0.977 to 0.988)	<0.001
eGFR <sub>cystatin C</sub>	vs.	Albumin / 24h	-0.223(-0.371 to -0,064)	0.007
eGFR <sub>cystatin C</sub>	vs.	Total protein / 24h	-0.175(-0.327 to -0.014)	0.033
eGFR <sub>creatinine+cystatin C</sub>	vs.	Albumin / 24h	-0.200(-0.350 to -0.04)	0.015
eGFR <sub>creatinine+cystatin C</sub>	vs.	Total protein / 24h	-0.168(-0.320 to -0.007)	0.042
Albumin / 24h	vs.	Total protein / 24h	0.832(0.774 to 0.876)	<0.001

## 8 Diskuze

### 8.1 Pacienti s MGUS

Nejčastější vazby (včetně signifikantních korelací)  $\beta$ 2microglobulinu s ostatními parametry může vysvětlit fakt, že  $\beta$ 2microglobulin odráží jak množství maligních buněk, tak renální funkce[41].

Větší korelace  $\beta$ 2microglobulinu s cystatinem C ve srovnání s kreatininem může být zdůvodněna poklesem svalové hmoty u starších pacientů, kteří ve studii dominují.

To, že se Spearmanův korelační koeficient mezi  $\kappa/\lambda$  FLC ratio and  $eGFR_{\text{cystatinC}}$  and  $eGFR_{\text{creatinine}}$  se blíží nule lze vysvětlit tím, že většina našich pacientů měla fyziologický poměr  $\kappa/\lambda$  FLC.

Korelaci mezi koncentrací monoklonálního imunoglobulinu a  $\beta$ 2microglobulinu lze pravděpodobně vysvětlit tím, že  $\beta$ 2microglobulin odráží množství nádorové masy v kostní dřeni.

Naše výsledky neumožňují vysvětlit, proč třída imunoglobulinu může mít vliv na  $eGFR_{\text{cystatinC}}$  a nemá vliv na  $eGFR_{\text{creatinine}}$ .

Tabulka č. 4 ukazující velikost  $eGFR$  v závislosti na věkových skupinách potvrzuje obecně známý fakt, že s věkem klesá glomerulární filtrace[3]. Tuto skutečnost potvrdily statisticky významně jak odhady ze sérového kreatininu, tak cystatinu C. Strmější byl pokles  $GFR$  při odhadu ze sérového cystatinu C, může to být úbytkem svalové hmoty věkem.

## 8.2 Pacienti intoxikovaní metanolem

Porovnali jsme vybrané metabolické parametry a eGFR při přijetí a při propuštění. U většiny pacientů byla při přijetí zjištěna zvýšená osmolalita a byla přítomna metabolická acidóza. Tento fakt byl u pacientů intoxikovaných metanolem opakovaně publikován[42],[43]. V rozvoji metabolické acidózy se nejprve uplatňuje kyselina mravenčí, která přímo inhibuje cytochrom c oxidázu a tak blokuje buněčnou respiraci, čímž klesá produkce adenosintrifosfátu (ATP), později je důvodem acidózy zvýšený podíl anaerobního metabolismu s produkcí laktátu[44]. Diferenciální diagnostika intoxikace alkoholem zahrnuje etanol, etylenglykol, metanol a isopropyl alkohol[45].

Nebyla prokázána změna v eGFR. Problémem je také malý počet pacientů, který nedovoluje prokázat drobné změny.

Dva pacienti splnili kritérium AKI podle vzestupu sérového kreatininu. Příčinou pravděpodobně nebyly neurotoxické léky, sepse ani multiorgánové selhání. Akutní selhání ledvin je u pacientů intoxikovaných metanolem popisováno[46].

Formiát je obzvlášť toxický pro optický nerv. Tento nerv potřebuje velké množství energie, protože má velmi dlouhé axony. Velká senzitivita optického nervu k poškození při intoxikaci metanolem byla dobře dokumentována při rozsáhlých problémech s metanolem na Kubě[47].

Všichni naši pacienti byli vyšetřeni oftalmologem. Jeden pacient měl zrakové problémy. Magnetická rezonance odhalila otok bílé hmoty centrum semiovale v mozečku. Většina poškození byla v centru corona radiata v subkortikální mozečkové oblasti. Byla také nalezena hemoragická nekróza bazálních ganglií, především putamen a globus pallidus. Podobné nálezy jsou popisovány v literatuře[48].

Čtyři pacienti měli zvýšený troponin I nad 99. percentil zdravé populace. V databázi PubMed doposud nebyla informace o zvýšení troponiu při intoxikaci metanolem.

Naše studie potvrdila dobře známou skutečnost, že intoxikace metanolem způsobuje vzestup plazmatické osmolality a metabolickou acidózu. Novým zjištěním je zvýšení troponinu I u některých pacientů.

Hlavní limitací této studie je malý počet pacientů a skutečnost, že nebyla měřena kyselina mravenčí.

### 8.3 Pacienti s diabetem mellitus

Průměrná  $eGFR_{\text{creatinine}}$  ( $1.443 \pm 0.014$ ) ml/s/1.73m<sup>2</sup> byla menší než  $eGFR_{\text{cystatinC}}$  ( $1.512 \pm 0.017$ ) ml/s/1.73m<sup>2</sup>, ( $p < 0.002$ ).

Podobné výsledky negativního bias  $eGFR_{\text{creatinine}}$  byly publikovány v práci Sebastjan Bevc[49]. Autoři použili jako zlatý standard mGFR izotopovou clearanci značenou izotopem <sup>51</sup>CrEDTA. Byl nalezen vysoký negativní bias pro metodu  $eGFR_{\text{creatinine}}$ . Kreatinin v této studii nebyl stanoven standardizovanou enzymatickou metodou, ale méně specifickou Jaffého reakcí. Pro  $eGFR_{\text{cystatinC}}$  byla použita standardizovaná metoda s návazností měření.  $eGFR_{\text{cystatinC}}$  dávala systematicky vyšší výsledky než  $eGFR_{\text{creatinine}}$ . Výsledky jsou podobné jako v naší práci, ale byla použita jiná rovnice pro  $eGFR_{\text{cystatinC}}$ .

Také Silverio ve své práci uvádí systematicky nižší odhad  $eGFR_{\text{creatinine}}$  podle CKD-EPI rovnice[50]. Jako referenční metoda byla použita <sup>51</sup>Cr-EDTA clearance. Kreatinin v této studii byl stanoven Jaffého metodou.

Třetí práci se stejným trendem bias mezi inulinovou měřenou clearancí a CKD-EPI  $eGFR_{\text{creatinine}}$  publikoval Nicolas Rognant[51]. V této studii byl kreatinin stanoven Jaffého reakcí.

Negativní bias  $eGFR_{\text{creatinine}}$  je větší u diabetiků než u zdravých jedinců[52]. Kreatinin v této studii byl stanoven Jaffého reakcí.

Hlavní výhodou naší práce je, že obě laboratorní metody jsou standardizované. Standardizace měření kreatininu a cystatinu C jsou klíčové body k získání pravdivých výsledků. Standardizované stanovení cystatinu C je k dispozici od roku 2011. Při použití standardizovaných metod lze získat porovnatelné výsledky v různém místě a čase. Nové CKD-EPI rovnice byly validovány v roce 2012.

Hlavním rozhodovacím bodem při posuzování GFR je hodnota 1.0 ml/s/1.73m<sup>2</sup>. Lidé s GFR pod 1.0 ml/s/1.73m<sup>2</sup> jsou označeni jako pacienti mající CKD. To znamená, že nejdůležitějším úkolem  $eGFR$  je identifikace pacienta ve stadiu 3a. Když se podíváme na schopnost  $eGFR_{\text{creatinine}}$  a  $eGFR_{\text{cystatinC}}$  identifikovat stadia 2 a 3a, můžeme vidět, že velké množství pacientů je identifikováno pouze jednou metodou. Může být proto užitečné provádět současně  $eGFR_{\text{cystatinC}}$  u pacientů s  $eGFR_{\text{creatinine}}$  ve stadiích 2 a 3a. Druhý marker GFR není potřeba pro potvrzení CKD u pacientů se zvýšenou albuminurií nebo přítomností jiného markeru poškození ledvin, protože tyto pacienti již splňují kritéria CKD. Albuminurie obvykle předpovídá budoucí pokles GFR[53].

Překryv je také mezi stadii 1 a 2, ale ten není klinicky významný.

Potřeba používání dvou markerů GFR blízko rozhodovacího bodu 1.0 ml/s/1.73m<sup>2</sup> může být podpořeno faktem, že každý sérový marker má svoji vlastní biologickou variabilitu[54] a analytické limity s

nejistotami měření[55]. Analytické charakteristiky stanovení kreatininu a jejich dopad na eGFR jsou popsány v práci z Mayo Clinic. Malé analytické změny ve stanovení kreatininu vedou k velkým změnám v eGFR[56]. Stejná problematika se týká také cystatinu C.

Kreatinin a cystatin C jsou dva markery GFR v klinické praxi. Klíčové je zvažovat, který z těchto testů má větší prognostický význam.

eGFR<sub>cystatinC</sub> má větší prognostický význam než eGFR<sub>creatinine</sub>. Prognostický význam cystatinu C pro kardiovaskulární a celkovou mortalitu byl nalezen ve studii The Atherosclerosis Risk in Communities Study[36]. Jakýkoliv pokles eGFR<sub>cystatinC</sub> nebo jakýkoliv stupeň albuminurie je asociován se zvýšenou celkovou úmrtností, incidencí ischemické choroby srdeční a rizikem hospitalizace pro první srdeční selhání. Výsledky eGFR<sub>cystatinC</sub> v této studii byly přepočítány na novou kalibraci podle ERM DA 471. CKD-EPI rovnice pro odhad GFR byla použita v této studii. Standardizace umožňuje použít tuto prognostickou informaci i u našich pacientů.

Kohorta 1153 diabetiků ze studie ESTHER byla použita k posouzení schopnosti eGFR<sub>creatinine</sub> a eGFR<sub>cystatinC</sub> předpovědět kardiovaskulární událost. Závěr autorů byl, že pouze eGFR<sub>cystatinC</sub> byl nezávislým prediktorem pro kardiovaskulární události[57].

Když vezmeme v úvahu, že jen malý podíl pacientů ve stadiu CKD 3a byl identifikován současně eGFR<sub>creatinine</sub> a eGFR<sub>cystatin C</sub>, biologickou variabilitu kreatininu a cystatinu C, nejistotu měření těchto testů a větší prognostický význam cystatinu C, lze podpořit užívání eGFR<sub>cystatin C</sub> a eGFR<sub>creatinine+cystatinC</sub> u diabetiků bez přítomnosti markeru poškození ledvin ve stadiích CKD 2 a 3a podle eGFR<sub>creatinine</sub>.

Externí kontrola kvality je klíčová pro mezilaboratorní porovnatelnost testů funkce ledvin. Provedli jsme mezilaboratorní porovnání mezi pracovištěm klinické biochemie Krajské nemocnice T. Bati a. s. a pracovištěm Úseku laboratorních metod IKEM. Byly použity stejné standardizované testy a vlastní laboratorní stanovení bylo provedeno na stejných analyzátoch. U obou pracovišť byl nalezen stejný trend výsledků. V oblasti GFR pod 1.0 ml/s/1.73m<sup>2</sup> poskytuje eGFR<sub>creatinine</sub> vyšší výsledky než eGFR<sub>cystatin C</sub>. V oblasti nad 1.0 ml/s/1.73m<sup>2</sup> je tomu obráceně. Výsledky jsou znázorněny na kumulovaných Bland-Altmanových grafech z obou pracovišť.

Z rozdílových grafů je zřetelné, že nejlepší je shoda mezi rovnicemi eGFR<sub>cystatin C</sub> a eGFR<sub>creatinine+cystatinC</sub>.

Jednotlivé rovnice ale poskytují rozdílné výsledky a pro řadu situací se bude možná nejlépe přiklonit ke kombinované rovnici. Není úplně jasný důvod pro rozdílnost odhadů GFR v různých pásmech glomerulární filtrace.

Limitací těchto dvou studií s diabetickými pacienty je neprovedení měřené GFR. Stejná je ale obvyklá situace v klinické praxi. Dále nebyly zohledněny možné lékové analytické interference enzymatického stanovení kreatininu. Jedná se především o pacienty z IKEM, kteří byli v celkově těžším klinickém stavu a s větší pravděpodobností interference léků.



## 8.4 Pacienti s chronickým onemocněním ledvin

Výsledky CrCl byly v této studii vyšší než všechny eGFR.

Podobné výsledky popisuje v literatuře celá řada autorů. Kumar et al.[58] uvádí podobné výsledky u skupiny transplantovaných pacientů, v jiné studii byly popsány u pacientů před transplantací kostní dřeně[59]. Také studie, které porovnávaly CrCl se zlatým standardem prokázaly, že CrCl nadhodnocuje skutečnou GFR[60]. Jedno z možných vysvětlení těchto výsledků je tubulární sekrece kreatininu.

Mnoho léků je vylučováno pomocí GFR a dávky by měly být sníženy při poklesu GFR pod 1.0 ml/s/1.73m<sup>2</sup>. Jedná se například o aminoglykosidová antibiotika podle KDIGO doporučení.

Podle výsledků naší studie 352 pacientů, CrCl by podle výsledků snížila dávku neurotoxického léku podle kritéria GFR u 130 pacientů, eGFR<sub>creatinine</sub> u 173 pacientů, eGFR<sub>cystatinC</sub> u 189 pacientů a eGFR<sub>creatinine+cystatinC</sub> u 185 pacientů. Je zřejmé, že CrCl by redukci léku doporučila v nejmenším počtu případů, což by mohlo snížit bezpečnost pacientů.

CrCl nekorelovala s albuminurií. Byla nalezena slabá korelace mezi albuminurií a testy eGFR. Albuminurie obvykle předchází budoucímu poklesu GFR. Toto zjištění potvrzuje potřebu jak markeru poklesu GFR, tak markeru poškození ledvin pro detekci CKD, což je v souladu s doporučením KDIGO.

Při porovnání výsledků eGFR<sub>creatinine</sub> a eGFR<sub>cystatinC</sub> v Bland-Altmanově rozdílovém grafu byl zjištěn podobný trend výsledků jako u skupiny diabetických pacientů[61],[62].

Můžeme vidět, že v oblasti GFR pod 1.0 ml/s/1.73m<sup>2</sup> jsou výsledky eGFR<sub>creatinine</sub> vyšší než eGFR<sub>cystatinC</sub> (p<0.0001). eGFR<sub>cystatinC</sub> dává vyšší výsledky v oblasti GFR nad 1.0 ml/s/1.73m<sup>2</sup> (p<0.0001). Podobný trend výsledků byl nalezen v práci Delanaye. V této práci byly použity stejné standardizované metody pro stanovení kreatininu a cystatinu C a stejné tři CKD-EPI rovnice[63].

Hlavní limitací této práce bylo, že jsme nepoužili zlatý standard pro mGFR jako je inulinová clearance nebo isotopové vyšetření. Tyto metody jsou omezeny na specializovaná pracoviště a v běžné klinické praxi nejsou dostupné.

Další limitací práce je, že nebyly k dispozici přesné klinické diagnózy CKD pomocí biopsie ledvin, které nebyly provedeny z etických důvodů. Přínos biopsie by byl pro většinu pacientů zanedbatelný za cenu podstupování invazivního vyšetření.

## 9 Závěry

### 9.1 Pacienti s MGUS

U studované populace nebyl prokázán rozdíl mezi průměrnou  $eGFR_{cystatinC}$   $1.23 \pm 0.60$  ml/s/1.73m<sup>2</sup> a průměrnou  $eGFR_{creatinine}$   $1.16 \pm 0.37$  ml/s/1.73m<sup>2</sup> ( $p > 0.05$ ).

38,6% pacientů mělo CKD podle  $eGFR_{cystatinC}$  a 34,6% podle  $eGFR_{creatinine}$ .

$\beta$ 2mikroglobulin má největší počet signifikantních korelací: cystatin C (0.90),  $eGFR_{cystatinC}$  (-0.69), creatinine (0.70),  $eGFR_{creatinine}$  (- 0.60), MIg concentration (0.24),  $\kappa$  FLC (0.22)  $\lambda$  FLC (0.34) a věk (0.40). Největší počet signifikantních korelací  $\beta$ 2mikroglobulin může vysvětlit fakt, že  $\beta$ 2mikroglobulin odráží jak množství maligních buněk, tak renální funkce.

Třída paraproteinu může ovlivnit  $eGFR_{cystatinC}$ , ale nemá vliv na  $eGFR_{creatinine}$ .

Diabetici neměli nižší GFR než osoby bez diabetu.

### 9.2 Pacienti intoxikovaní metanolem

Nebyl nalezen rozdíl v  $eGFR_{creatinine}$  a  $eGFR_{cystatinC}$  mezi přijetím a po zotavení u pacientů intoxikovaných metanolem.

Dva pacienti měli AKI podle vzestupu sérového kreatininu, ale ne podle kritéria močového objemu.

Byl nalezen signifikantní rozdíl v sérové osmolalitě, pH, a koncentraci laktátu v séru mezi přijetím a po zotavení u pacientů intoxikovaných metanolem.

Nalezli jsme zvýšení troponinu I nad 99. percentil u 4 pacientů.

Jeden pacient měl zrakové problémy pro poškození okcipitálních laloků mozku. Tyto skutečnosti je třeba brát v úvahu při léčbě pacientů, kteří požili metanol.

### 9.3 Pacienti s diabetem mellitus

U pacientů ze Zlína byla průměrná  $eGFR_{\text{creatinine}}$  ( $1.443 \pm 0.014$ ) ml/s/1.73m<sup>2</sup> nižší než  $eGFR_{\text{cystatinC}}$  ( $1.512 \pm 0.017$ ) ml/s/1.73m<sup>2</sup>, ( $p < 0.002$ ).

Průměrný rozdíl GFR v oblasti pod 1.0 ml/s/1.73m<sup>2</sup> ( $eGFR_{\text{cystatin C}} - eGFR_{\text{creatinine}}$ ) je ( $-0,067 \pm 0,019$ ) ml/s/1.73m<sup>2</sup> ( $p = 0,0007$ ). Naopak v oblasti nad 1.5 ml/s/1.73m<sup>2</sup> je průměrný rozdíl mezi  $eGFR_{\text{cystatinC}}$  a  $eGFR_{\text{creatinine}}$  ( $0.156 \pm 0.011$ ) ml/s/1.73m<sup>2</sup>

Příčiny těchto rozdílů v různých pásmech GFR nejsou známy.

Relativně velké množství pacientů ve stadiu 3a je detekováno pouze jednou metodou, což má dopad na identifikaci pacientů s CKD (stadium GFR 3a)

Naše výsledky podporují používání rovnic  $eGFR_{\text{cystatin C}}$  a  $eGFR_{\text{creatinine+cystatin C}}$  u pacientů s diabetes mellitus, bez albuminurie či přítomnosti jiného markeru poškození ledvin, ve stadiích 2 a 3a CKD podle  $eGFR_{\text{creatinine}}$ .

### 9.4 Pacienti s chronickým onemocněním ledvin

Medián (mezikvartilové rozpětí) kreatininové clearance byl 1.21 ml/s/1.73m<sup>2</sup> (0.76-1.72). Všechny  $eGFR$  dávaly nižší výsledky,  $eGFR_{\text{creatinine}}$  1.01 ml/s/1.73m<sup>2</sup> (0.63-1.42) ( $p < 0.05$ ),  $eGFR_{\text{cystatinC}}$  0.93 ml/s/1.73m<sup>2</sup> (0.55-1.59) ( $p < 0.05$ ),  $eGFR_{\text{creatinine+cystatinC}}$  0.96 ml/s/1.73m<sup>2</sup> (0.90-1.05) ( $p < 0.05$ ).

To má přímo dopad na detekci CKD (stadium GFR 3a) a následně potenciální dávkování léků.

$eGFR_{\text{creatinine}}$  a  $eGFR_{\text{cystatinC}}$  mají jinou asociaci podle oblasti GFR, ve stejném smyslu jako u diabetiků.

Albuminurie nekorelovala CrCl.

### 9.5 Dosažení cílů:

- U všech čtyř skupin pacientů byly porovnány  $eGFR_{\text{creatinine}}$  a  $eGFR_{\text{cystatinC}}$
- U pacientů s MGUS, CKD a diabetiků byl hodnocen dopad  $eGFR_{\text{creatinine}}$  a  $eGFR_{\text{cystatinC}}$  pro diagnostiku CKD (stadium GFR 3a). U pacientů intoxikovaných metanolem se detekcí CKD nešlo zabývat, protože se jedná o akutní stav. Dva pacienti měli AKI.

## 10 Použitá literatura

- [1] ENGLIŠ, Miroslav. *Proteinurie*. Pardubice: STAPRO, spol. s.r.o., nedatováno.
- [2] KIDNEY DISEASE: IMPROVING GLOBAL OUTCOMES (KDIGO) CKD WORK GROUP. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney International*. 2013, roč. 3, s. 1–163.
- [3] MUSSO, Carlos G. a Dimitrios G. OREOPOULOS. Aging and Physiological Changes of the Kidneys Including Changes in Glomerular Filtration Rate. *Nephron Physiology* [online]. 2011, roč. 119, č. s1, s. p1–p5 [vid. 26. září 2013]. ISSN 1660-2137, 1660-2137. Dostupné z: doi:10.1159/000328010
- [4] STEVENS, Lesley A a Andrew S LEVEY. Measured GFR as a confirmatory test for estimated GFR. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* [online]. 2009, roč. 20, č. 11, s. 2305–2313. ISSN 1533-3450. Dostupné z: doi:10.1681/ASN.2009020171
- [5] ROSSUM, Lyonne K. van, Ron A. A. MATHOT, Karlien CRANSBERG a Arnold G. VULTO. Optimal Sampling Strategies to Assess Inulin Clearance in Children by the Inulin Single-Injection Method. *Clinical Chemistry* [online]. 2003, roč. 49, č. 7, s. 1170–1179 [vid. 22. duben 2014]. ISSN 0009-9147, 1530-8561. Dostupné z: doi:10.1373/49.7.1170
- [6] VÍŽĎA, Jaroslav, Ján LEPEJ, Hana KRÍŽOVÁ a Elen URBANOVÁ. *Atlas scintigrafie ledvin*. Praha: Agentura Pankrác spol. s. r. o., nedatováno. ISBN 80-902873-60.
- [7] BAXMANN, Alessandra Calabria, Marion Souza AHMED, Natalia Cristina MARQUES, Viviane Barcellos MENON, Aparecido Bernardo PEREIRA, Gianna Mastroianni KIRSZTAJN a Ita Pfeferman HEILBERG. Influence of Muscle Mass and Physical Activity on Serum and Urinary Creatinine and Serum Cystatin C. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* □: *CJASN* [online]. 2008, roč. 3, č. 2, s. 348–354 [vid. 6. srpen 2013]. ISSN 1555-9041. Dostupné z: doi:10.2215/CJN.02870707
- [8] FRIEDECKY, Bedřich, Tomáš ZIMA a P. SEDLÁK. Stanovisko ČSKB k současnému stavu standardizace stanovení kreatininu v séru/plazmě. *Klinická biochemie a metabolismus*. nedatováno, roč. 20(41), č. 1, s. 44–45.
- [9] DODDER, Nathan G., Susan S.-C. TAI, Lorna T. SNIEGOSKI, Nien F. ZHANG a Michael J. WELCH. Certification of Creatinine in a Human Serum Reference Material by GC-MS and LC-MS. *Clinical Chemistry* [online]. 2007, roč. 53, č. 9, s. 1694–1699 [vid. 9. červen 2013]. ISSN 0009-9147, 1530-8561. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2007.090027
- [10] DRION, Iefke, Christa COBBAERT, Klaas H GROENIER, Cas WEYKAMP, Henk JG BILO, Jack FM WETZELS a Nanne KLEEFSTRA. Clinical evaluation of analytical variations in serum creatinine measurements: why laboratories should abandon Jaffe techniques. *BMC Nephrology* [online]. 2012, roč. 13, č. 1, s. 133 [vid. 12. květen 2013]. ISSN 1471-2369. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2369-13-133
- [11] ZIMA, Tomáš, Jaroslav RACEK, Vladimír TESAŘ, Omdřej VIKLICKÝ, Vladimír TEPLAN, Otto SCHUCK, Jan JANDA, Bedřich FRIEDECKÝ, Zdeněk KUBÍČEK, Josef KRATOCHVÍLA, Daniel RAJDL L, Tomáš ŠÁLEK, Marta KALOUSOVÁ a Jana GRANÁTOVÁ. *Česká nefrologická společnost ČLS JEP a Česká společnost klinické biochemie ČLS JEP Doporučení k diagnostice chronického onemocnění ledvin (odhad glomerulární filtrace a vyšetřování proteinurie)* [online]. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/zapisy->

- [12] FLEGAR-MEŠTRIĆ, Zlata, Sonja PERKOV, Barbara ŠIMONOVIĆ a Dubravka JURETIĆ. Applicability of common reference intervals for serum creatinine concentrations to the Croatian population. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* [online]. 2010, roč. 48, č. 2 [vid. 30. září 2013]. ISSN 1437-4331, 1434-6621. Dostupné z: doi:10.1515/ccm.2010.054
- [13] FRIEDECKÝ, Bedřich. Kreatinin a odhad glomerulární filtrace. *Klinická biochemie a metabolismus*. nedatováno, roč. 2007, č. 3, s. 164–167.
- [14] JABOR, Antonín, ed. *Vnitřní prostředí*. B.m.: Grada Publishing a.s., 2008. ISBN 9788024712215.
- [15] COCKCROFT, D W a M H GAULT. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron*. 1976, roč. 16, č. 1, s. 31–41. ISSN 0028-2766.
- [16] LEVEY, A S, J P BOSCH, J B LEWIS, T GREENE, N ROGERS a D ROTH. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Annals of internal medicine*. 1999, roč. 130, č. 6, s. 461–470. ISSN 0003-4819.
- [17] LEVEY, Andrew S, Josef CORESH, Tom GREENE, Jane MARSH, Lesley A STEVENS, John W KUSEK, Frederick VAN LENTE a CHRONIC KIDNEY DISEASE EPIDEMIOLOGY COLLABORATION. Expressing the Modification of Diet in Renal Disease Study equation for estimating glomerular filtration rate with standardized serum creatinine values. *Clinical chemistry* [online]. 2007, roč. 53, č. 4, s. 766–772. ISSN 0009-9147. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2006.077180
- [18] HEMMELGARN, Brenda R, Jianguo ZHANG, Braden J MANNS, Matthew T JAMES, Robert R QUINN, Pietro RAVANI, Scott W KLARENBACH, Bruce F CULLETON, Richard KRAUSE, Laurel THORLACIUS, Arsh K JAIN, Marcello TONELLI a ALBERTA KIDNEY DISEASE NETWORK. Nephrology visits and health care resource use before and after reporting estimated glomerular filtration rate. *JAMA: the journal of the American Medical Association* [online]. 2010, roč. 303, č. 12, s. 1151–1158. ISSN 1538-3598. Dostupné z: doi:10.1001/jama.2010.303
- [19] HOSTETTER, Thomas H, Andrew S LEVEY a Lesley A STEVENS. Clinical impact of reporting estimated glomerular filtration rates. *Clinical chemistry* [online]. 2010, roč. 56, č. 9, s. 1381–1383. ISSN 1530-8561. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2010.147827
- [20] LEVEY, Andrew S, Lesley A STEVENS, Christopher H SCHMID, Yaping Lucy ZHANG, Alejandro F CASTRO 3rd, Harold I FELDMAN, John W KUSEK, Paul EGGERS, Frederick VAN LENTE, Tom GREENE, Josef CORESH a CKD-EPI (CHRONIC KIDNEY DISEASE EPIDEMIOLOGY COLLABORATION). A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Annals of internal medicine*. 2009, roč. 150, č. 9, s. 604–612. ISSN 1539-3704.
- [21] BJÖRK, J, S-E BÄCK, G STERNER, J CARLSON, V LINDSTROM, O BAKOUSH, P SIMONSSON, A GRUBB a U NYMAN. Prediction of relative glomerular filtration rate in adults: new improved equations based on Swedish Caucasians and standardized plasma-creatinine assays. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* [online]. 2007, roč. 67, č. 7, s. 678–695. ISSN 0036-5513. Dostupné z: doi:10.1080/00365510701326891
- [22] NYMAN, Ulf, Jonas BJÖRK, Veronica LINDSTRÖM a Anders GRUBB. The Lund-Malmö

creatinine-based glomerular filtration rate prediction equation for adults also performs well in children. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* [online]. 2008, roč. 68, č. 7, s. 568–576. ISSN 0036-5513. Dostupné z: doi:10.1080/00365510801915163

- [23] JABOR, Antonín. Rovnice Lund-Malmö pro odhad glomerulární filtrace. *Fons*. nedatováno, roč. 2010, č. 20(2), s. s. 37–38.
- [24] BÖKENKAMP, Arend, Cèleste A. R. C. LAARMAN, Katja I. BRAAM, Joanna A. E. van WIJK, Wijnanda A. KORS, Marijke KOOL, Janneke de VALK, Anna A. BOUMAN, Marieke D. SPREEUWENBERG a Birgit STOFFEL-WAGNER. Effect of Corticosteroid Therapy on Low-Molecular-Weight Protein Markers of Kidney Function. *Clinical Chemistry* [online]. 2007, roč. 53, č. 12, s. 2219–2221 [vid. 6. srpen 2013]. ISSN 0009-9147, 1530-8561. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2007.094946
- [25] HOLLANDER, Jan G. den, Raymond W. WULKAN, Mart J. MANTEL a Arie BERGHOUT. Is Cystatin C a Marker of Glomerular Filtration Rate in Thyroid Dysfunction? *Clinical Chemistry* [online]. 2003, roč. 49, č. 9, s. 1558–1559 [vid. 6. srpen 2013]. ISSN 0009-9147, 1530-8561. Dostupné z: doi:10.1373/49.9.1558
- [26] JOHN LIESKE. Serum Cystatin C for Renal Function Assessment: A new Particle-Enhanced Tuebidimetric Assay. *Communiqué*. nedatováno, roč. 2011, č. 4.
- [27] GRUBB, Anders, Søren BLIRUP-JENSEN, Veronica LINDSTRÖM, Camilla SCHMIDT, Harald ALTHAUS, Ingrid ZEGERS a IFCC WORKING GROUP ON STANDARDISATION OF CYSTATIN C (WG-SCC). First certified reference material for cystatin C in human serum ERM-DA471/IFCC. *Clinical chemistry and laboratory medicine: CCLM / FESCC* [online]. 2010, roč. 48, č. 11, s. 1619–1621. ISSN 1434-6621. Dostupné z: doi:10.1515/CCLM.2010.318
- [28] GRUBB, Anders, Ulf NYMAN, Jonas BJÖRK, Veronica LINDSTRÖM, Bengt RIPPE, Gunnar STERNER a Anders CHRISTENSSON. Simple Cystatin C-Based Prediction Equations for Glomerular Filtration Rate Compared with the Modification of Diet in Renal Disease Prediction Equation for Adults and the Schwartz and the Counahan–Barratt Prediction Equations for Children. *Clinical Chemistry* [online]. 2005, roč. 51, č. 8, s. 1420–1431 [vid. 15. říjen 2013]. ISSN 0009-9147, 1530-8561. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2005.051557
- [29] INKER, Lesley A., Christopher H. SCHMID, Hocine TIGHIOUART, John H. ECKFELDT, Harold I. FELDMAN, Tom GREENE, John W. KUSEK, Jane MANZI, Frederick VAN LENTE, Yaping Lucy ZHANG, Josef CORESH a Andrew S. LEVEY. Estimating Glomerular Filtration Rate from Serum Creatinine and Cystatin C. *New England Journal of Medicine* [online]. 2012, roč. 367, č. 1, s. 20–29 [vid. 14. květen 2013]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa1114248
- [30] LEVEY, Andrew S, Josef CORESH, Ethan BALK, Annamaria T KAUSZ, Adeera LEVIN, Michael W STEFFES, Ronald J HOGG, Ronald D PERRONE, Joseph LAU, Garabed EKNOYAN a NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Annals of internal medicine*. 2003, roč. 139, č. 2, s. 137–147. ISSN 1539-3704.
- [31] ARORA, Paul, Priya VASA, Darren BRENNER, Karl IGLAR, Phil MCFARLANE, Howard MORRISON a Alaa BADAWI. Prevalence estimates of chronic kidney disease in Canada: results of a nationally representative survey. *CMAJ* [online]. 2013, roč. 185, č. 9, s. E417–E423 [vid. 28. říjen 2013]. ISSN 0820-3946. Dostupné z: doi:10.1503/cmaj.120833

- [32] CORESH, Josef, Elizabeth SELVIN, Lesley A STEVENS, Jane MANZI, John W KUSEK, Paul EGGERS, Frederick VAN LENTE a Andrew S LEVEY. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA: the journal of the American Medical Association* [online]. 2007, roč. 298, č. 17, s. 2038–2047. ISSN 1538-3598. Dostupné z: doi:10.1001/jama.298.17.2038
- [33] TESAŘ, Vladimír. *Chronické onemocnění ledvin – časté a prognosticky závažné - Urologie - ZDN* [online]. [vid. 28. říjen 2013]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/chronicke-onemocneni-ledvin-caste-a-prognosticky-zavazne-413040>
- [34] RYCHLÍK, Iyan a FRANTIŠEK LOPOT. *Statistická ročenka dialyzační péče v České republice 2012*. B.m.: Česká nefrologická společnost. 00000
- [35] ASTOR, Brad C, Stein I HALLAN, Edgar R MILLER 3rd, Edwina YEUNG a Josef CORESH. Glomerular filtration rate, albuminuria, and risk of cardiovascular and all-cause mortality in the US population. *American journal of epidemiology* [online]. 2008, roč. 167, č. 10, s. 1226–1234. ISSN 1476-6256. Dostupné z: doi:10.1093/aje/kwn033
- [36] WAHEED, Salman, Kunihiro MATSUSHITA, Yingying SANG, Ron HOOGEVEEN, Christie BALLANTYNE, Josef CORESH a Brad C ASTOR. Combined association of albuminuria and cystatin C-based estimated GFR with mortality, coronary heart disease, and heart failure outcomes: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation* [online]. 2012, roč. 60, č. 2, s. 207–216. ISSN 1523-6838. Dostupné z: doi:10.1053/j.ajkd.2012.03.011
- [37] MANN, Johannes F E, Hertzfel C GERSTEIN, Qi-Long YI, Eva M LONN, Byron J HOOGWERT, Andrew RASHKOW a Salim YUSUF. Development of renal disease in people at high cardiovascular risk: results of the HOPE randomized study. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 2003, roč. 14, č. 3, s. 641–647. ISSN 1046-6673.
- [38] Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney International Supplements* [online]. 2013, roč. 3, č. 1, s. 19–62 [vid. 11. květen 2013]. ISSN 2157-1724. Dostupné z: doi:10.1038/kisup.2012.64
- [39] TAAL, M. W. a B. M. BRENNER. Predicting initiation and progression of chronic kidney disease: Developing renal risk scores. *Kidney International* [online]. 2006, roč. 70, č. 10, s. 1694–1705 [vid. 13. listopad 2013]. ISSN 0085-2538. Dostupné z: doi:10.1038/sj.ki.5001794
- [40] KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute kidney injury. *Kidney inter., Suppl.* 2012, roč. 2, č. 1, s. 1–138. ISSN 2157-1724.
- [41] DELANGHE, Joris R. GFR-Where are we now? In: *New trends in classification, diagnosis and management of renal diseases*. Zagreb: Medicinska naklada, nedatováno.
- [42] MEATHERALL, R. a J. KRAHN. Excess serum osmolality gap after ingestion of methanol. *Clinical Chemistry*. 1990, roč. 36, č. 11, s. 2004–2007. ISSN 0009-9147, 1530-8561.
- [43] LIM, Salim. Metabolic acidosis. *Acta medica Indonesiana*. 2007, roč. 39, č. 3, s. 145–150. ISSN 0125-9326.
- [44] POISONING, The American Academy of Clinical Toxicology Ad Hoc Committee on the Treatment Guidelines for Methanol, Donald G. BARCELOUX, G. Randall BOND, Edward P. KRENZELOK, Hannah COOPER a J. Allister VALE. *American Academy of Clinical*

*Toxicology Practice Guidelines on the Treatment of Methanol Poisoning* [online]. 23. červenec 2002 [vid. 18. leden 2013]. Dostupné z: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1081/CLT-120006745>

- [45] PLATTEBORZE, Peter L., Petrie M. RAINEY a Geoffrey S. BAIRD. Ketoacidosis with Unexpected Serum Isopropyl Alcohol. *Clinical Chemistry* [online]. 2011, roč. 57, č. 10, s. 1361–1364 [vid. 18. leden 2013]. ISSN 0009-9147, 1530-8561. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2010.157248
- [46] VERHELST, David, Pierre MOULIN, Vincent HAUFROID, Xavier WITTEBOLE, Michel JADOUL a Philippe HANTSON. Acute renal injury following methanol poisoning: analysis of a case series. *International journal of toxicology* [online]. 2004, roč. 23, č. 4, s. 267–273. ISSN 1091-5818. Dostupné z: doi:10.1080/10915810490506795
- [47] SADUN, A. Acquired mitochondrial impairment as a cause of optic nerve disease. *Transactions of the American Ophthalmological Society*. 1998, roč. 96, s. 881–923. ISSN 0065-9533.
- [48] SINGH, Amita, Rohan SAMSON a Ankur GIRDHAR. Portrait of a Methanol-intoxicated Brain. *The American Journal of Medicine* [online]. 2011, roč. 124, č. 2, s. 125–127 [vid. 9. červenec 2013]. ISSN 0002-9343. Dostupné z: doi:10.1016/j.amjmed.2010.09.001
- [49] BEVC, Sebastjan, Radovan HOJS, Robert EKART, Matej ZAVRŠNIK, Maksimiljan GORENJAK a Ludvik PUKLAVEC. Simple cystatin C formula for estimation of glomerular filtration rate in overweight patients with diabetes mellitus type 2 and chronic kidney disease. *Experimental diabetes research* [online]. 2012, roč. 2012, s. 179849. ISSN 1687-5303. Dostupné z: doi:10.1155/2012/179849
- [50] SILVEIRO, Sandra P., Gustavo N. ARAUJO, Mariana N. FERREIRA, Fabiola D.S. SOUZA, Halley M. YAMAGUCHI a Eduardo G. CAMARGO. Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) Equation Pronouncedly Underestimates Glomerular Filtration Rate in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* [online]. 2011, roč. 34, č. 11, s. 2353–2355 [vid. 7. srpen 2013]. ISSN 0149-5992. Dostupné z: doi:10.2337/dc11-1282
- [51] ROGNANT, Nicolas, Sandrine LEMOINE, Martine LAVILLE, Aoumeur HADJ-AISSA a Laurence DUBOURG. Performance of the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate in Diabetic Patients. *Diabetes Care* [online]. 2011, roč. 34, č. 6, s. 1320–1322 [vid. 7. srpen 2013]. ISSN 0149-5992. Dostupné z: doi:10.2337/dc11-0203
- [52] CAMARGO, E. G., A. A. SOARES, A. B. DETANICO, L. S. WEINERT, F. V. VERONESE, E. C. GOMES a S. P. SILVEIRO. The Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) equation is less accurate in patients with Type 2 diabetes when compared with healthy individuals. *Diabetic Medicine* [online]. 2011, roč. 28, č. 1, s. 90–95 [vid. 20. srpen 2013]. ISSN 1464-5491. Dostupné z: doi:10.1111/j.1464-5491.2010.03161.x
- [53] LLINARES-TELLO, Francisca. Rational use of laboratory tests: albuminuria. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2013, roč. 51, č. 4, s. e55–e56.
- [54] SELVIN, Elizabeth, Stephen P JURASCHEK, John ECKFELDT, Andrew S LEVEY, Lesley A INKER a Josef CORESH. Within-person variability in kidney measures. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation* [online]. 2013, roč. 61, č. 5, s. 716–722. ISSN 1523-6838. Dostupné z: doi:10.1053/j.ajkd.2012.11.048



- [55] DIMECH, Wayne, Barbara FRANCIS, Jennifer KOX, Graham ROBERTS a SEROLOGY UNCERTAINTY OF MEASUREMENT WORKING PARTY. Calculating uncertainty of measurement for serology assays by use of precision and bias. *Clinical chemistry* [online]. 2006, roč. 52, č. 3, s. 526–529. ISSN 0009-9147. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2005.056689
- [56] KLEE, George G, Patricia G SCHRYVER, Amy K SAENGER a Timothy S LARSON. Effects of analytic variations in creatinine measurements on the classification of renal disease using estimated glomerular filtration rate (eGFR). *Clinical chemistry and laboratory medicine: CCLM / FESCC* [online]. 2007, roč. 45, č. 6, s. 737–741. ISSN 1434-6621. Dostupné z: doi:10.1515/CCLM.2007.168
- [57] SCHOTTKER, Ben, Christian HERDER, Heiko MULLER, Hermann BRENNER a Dietrich ROTHENBACHER. Clinical Utility of Creatinine- and Cystatin C-Based Definition of Renal Function for Risk Prediction of Primary Cardiovascular Events in Patients With Diabetes. *Diabetes Care* [online]. 2012, roč. 35, č. 4, s. 879–886 [vid. 7. srpen 2013]. ISSN 0149-5992. Dostupné z: doi:10.2337/dc11-1998
- [58] KUMAR, Rakesh, Prashant PENDYALA, Kris ATTWOOD, Vanessa GRAY, Rocco VENUTO a Kathleen TORNATORE. Comparison of 12-hour creatinine clearance and estimated glomerular filtration rate in renal transplant recipients. *Renal failure* [online]. 2013, roč. 35, č. 3, s. 333–337. ISSN 1525-6049. Dostupné z: doi:10.3109/0886022X.2012.757824
- [59] HAHN, Theresa, Song YAO, Lauren M. DUNFORD, Julie THOMAS, James LOHR, Pradeep ARORA, Minoo BATTIWALLA, Shannon L. SMILEY a Philip L. MCCARTHY. A Comparison of Measured Creatinine Clearance versus Calculated Glomerular Filtration Rate for Assessment of Renal Function before Autologous and Allogeneic BMT. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [online]. 2009, roč. 15, č. 5, s. 574–579 [vid. 4. únor 2014]. ISSN 1083-8791. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbmt.2009.01.015
- [60] FOTOPOULOS, Andreas, Jihad Al BOKHARHLI, Spyridon TSIOURIS, Afroditi KATSARAKI, Athanasios PAPADOPOULOS, Maria TSIRONI a Jane THEODOROU. [Comparison of six radionuclidic and non-radionuclidic methods for the assessment of glomerular filtration rate in patients with chronic renal failure]. *Hellenic journal of nuclear medicine*. 2006, roč. 9, č. 2, s. 133–140. ISSN 1790-5427.
- [61] ŠÁLEK, Tomáš a Petr PONÍŽIL. Estimated glomerular filtration rate in diabetic patients. *Klinická biochemie a metabolismus*. nedatováno, roč. 22(43),2014, č. 1, s. 4–7.
- [62] JABOR, Antonín, Janka FRANEKOVÁ, Zdeněk KUBÍČEK a Tomáš ŠÁLEK. eGFR a problémy interpretace rovnic CKD-EPI. *Klinická biochemie a metabolismus*. nedatováno, roč. 22(43),2014, č. 1, s. p. 8–10.
- [63] DELANAYE, Pierre, Etienne CAVALIER, Olivier MORANNE, Laurence LUTTERI, Jean-Marie KRZESINSKI a Olivier BRUYÈRE. Creatinine-or cystatin C-based equations to estimate glomerular filtration in the general population: impact on the epidemiology of chronic kidney disease. *BMC Nephrology* [online]. 2013, roč. 14, č. 1, s. 57 [vid. 31. leden 2014]. ISSN 1471-2369. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2369-14-57

# 11 Přílohy

## 11.1 Seznam publikované literatury v recenzovaných a impaktovaných časopisech

### Původní práce:

1. Šálek T., Moravčíková D., Humpolíček P., Tichý M., Palička V. The prevalence of decreased glomerular filtration rate in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Klin. Biochem. Metab.* 2013, 21 (42), No. 1, p. 25-29
2. Šálek T., Humpolíček P., Ponižil P. Metabolic disorders due to metanol poisoning. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* DOI číslo 10.5507/bp.2013.074 **IF 0,999** (epub ahead of print)
3. Šálek T., Ponižil P. Estimated glomerular filtration rate in diabetic patients *Klin. Biochem. Metab.* 2014, 22 (43), No. 1, p. 4-7.
4. Jabor, A., Franeková, J., Kubíček, Z., Šálek, T. eGFR a problémy interpretace rovnic CKD-EPI *Klin. Biochem. Metab.* 2014, 22 (43), No. 1, p. 8-10.
5. Sergey Zakharov, Daniela Pelclova, Tomas Navratil, Jaromir Belacek, Ivana Kurcova, Ondrej Komzák, **Tomas Salek**, Jiri Latta, Radovan Turek, Robert Bocek, Cyril Kucera, Jaroslav A Hubacek, Zdenka Fenclova, Vit Petrik, Martin Cermak and Knut Erik Hovda. Intermittent hemodialysis is superior to continuous veno-venous hemodialysis/hemodiafiltration to eliminate methanol and formate during treatment for methanol poisoning. *Kidney Int advance online publication*, March 12, 2014; doi:10.1038/ki.2014.60 **IF 7,9**
6. Šálek T., Palička V. Comparison of creatinine clearance and estimated glomerular filtration rate in patients with chronic kidney disease. *Klin. Biochem. Metab.* 2014, 22 (43), No. 3,
7. Martin J., Gasljevic V., Šálek T., Horvath A., Borg C., Flegar Mestric Z., Jakovic, M., Šilhavík J., Adonics A., Szlamka Z., Brincat I., Buttigieg, D., Ciantar, N., Sciortino A., Mifsud A., Adkins A., Bennett, T., Rice, K., Taylor, Y. Comparison of Approaches and Measurement of Continuing Professional Development for Specialists in Laboratory Medicine within Four European Countries. [Accepted for publication in *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*; 09 June 2014] **IF 3,009**

### Přehledové články, doporučení, kazuistiky

1. Dufka A, Šálek T. Recidivující synkopa jako vedoucí symptom u parciálního centrálního diabetes insipidus. *Interní Med.* 2007; 4 : 195-197
2. Šálek T. Laboratorní diagnostika diabetes mellitus a diabetické nefropatie. *Med. Pro Praxi* 2007; 4 (9): 369–370
3. Šálek T. Laboratorní diagnostika mnohočetného myelomu. *Interní Med.* 2008;10(9):407-409
4. Šálek T. Současné metody stanovení glomerulární filtrace a jejich klinický význam. *Kardiolog Rev;* 2010; 3: 151-152
5. Šálek T. Diagnostika diabetu mellitu 2. Typu. *Acta medicae* 2012; 3: 17-18
6. Vodička M., Šálek T. Röderová E., Černý D. Hepatotoxicita po cyproteron acetátu v léčbě karcinomu prostaty – kazuistika *Klin. Onkol.* 2013, roč. 26, č. 1, s. 47-48.
7. Zima Tomáš, Racek Jaroslav, Tesař Vladimír, Viklický Ondřej, Teplan Vladimír, Schuck Otto, Janda Jan, Friedecký Bedřich, Kubíček Zdeněk, Kratochvíla Josef, Rajdl Daniel, Šálek Tomáš, Kalousová Marta A Granátová Jana. *Česká nefrologická společnost ČLS JEP a Česká společnost klinické biochemie ČLS JEP Doporučení k diagnostice chronického onemocnění ledvin (odhad glomerulární filtrace a vyšetřování proteinurie)* [online]. Dostupné z: [http://www.cskb.cz/res/file/zapisy-vyboru-cskb/2014/36/Dop\\_nefrol-2014.pdf](http://www.cskb.cz/res/file/zapisy-vyboru-cskb/2014/36/Dop_nefrol-2014.pdf)

8. Kurfürstová Irena, Šálek Tomáš, Kadlčková Eva. Renální insuficience při onemocnění myelomem z lehkých řetězců. Interní Med. 2014; 16(4):164-166

## **11.2 Naskenované vybrané publikované články**

## The prevalence of decreased glomerular filtration rate in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance.

Šálek T.<sup>1</sup>, Moravčíková D.<sup>2</sup>, Humpolíček P.<sup>3</sup>, Tichý M.<sup>4</sup>, Palička V.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Biochemistry, Tomas Bata Regional Hospital in Zlín a. s., Havlíčkovo nábřeží 600, 762 75 Zlín

<sup>2</sup>Faculty of Humanities, Institute of Health Care Studies, Degree Programme Midwifery, Tomas Bata University in Zlín, Mostní 5139, 760 01 Zlín

<sup>3</sup>Centre of Polymer Systems, Polymer Centre, Tomas Bata University in Zlín, T. G. Masaryka Sq. 5555, 760 01 Zlín

<sup>4</sup>Institute of Clinical Biochemistry and diagnostics, Faculty of Medicine in Hradec Králové and University Hospital, 500 05 Hradec Králové

### SUMMARY

**Background:** Renal function is more frequently decreased in patients with monoclonal gammopathy. 10% of patients with multiple myeloma present with acute renal failure and renal function is included in CRAB criteria for the diagnosis of multiple myeloma.

**Aim:** The aim of this study is to determine the prevalence of chronic renal failure (CRF), defined as a glomerular filtration rate (GFR) below 1.0 mL/s/1.73m<sup>2</sup>, in 101 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS).

**Design:** retrospective study

**Material and methods:** We compared GFR estimates from serum creatinine (MDRD GFR) and serum cystatin C (CysC GFR) and looked at the correlation between free light chains (FLC) concentration and renal markers. We performed serum protein electrophoresis (SPE) with quantification of monoclonal intact immunoglobulin (Mlg) and measured serum creatinine, cystatin C,  $\kappa$  and  $\lambda$  FLC and  $\beta$ 2microglobulin in all patients.

**Results:** We found CRF in 38.6% patients using estimation from serum cystatin C and 34.6% using estimation from serum creatinine.  $\beta$ 2microglobulin has the highest number of significant correlations; cystatin C (0.90), CysC GFR (-0.69), creatinine (0.70), MDRD GFR (-0.60), Mlg concentration (0.24),  $\kappa$  FLC (0.22)  $\lambda$  FLC (0.34) and age (0.40). The best correlation results may be explained by the fact that  $\beta$ 2microglobulin reflects both malignant cells burden and renal function.

**Conclusions:** We found CRF in 38.6% MGUS patients using estimation from serum cystatin C and in 34.6% using estimation from serum creatinine. The class of monoclonal immunoglobulin may influence results of glomerular filtration estimated from cystatin C but it does not influence GFR estimated from creatinine. Diabetic patients had not significantly lower GFR than patients without diabetes mellitus.

**Key words:** chronic renal failure, glomerular filtration rate, monoclonal gammopathy, free light chains

### SOUHRN

**Šálek T., Moravčíková D., Humpolíček P., Tichý M., Palička V.: Prevalence míry snížení glomerulární filtrace u pacientů s monoklonální gamapatií neurčeného významu.**

**Cíl:** Cílem studie je stanovit prevalenci chronického selhání ledvin u 101 pacientů s monoklonální gamapatií neurčeného významu (MGUS).

**Typ studie:** retrospektivní studie.

**Materiál a metody:** Porovnali jsme glomerulární filtraci odhadovanou ze sérového kreatininu a cystatinu C a hodnotili jsme korelaci mezi koncentrací volných lehkých řetězců v séru a funkcí ledvin. U všech pacientů jsme provedli elektroforézu proteinů séra s densitometrickou kvantifikací monoklonálního imunoglobulinu a změřili jsme koncentraci kreatininu, cystatinu C, volných lehkých řetězců kappa a lambda,  $\beta$ 2 mikroglobulinu.

**Výsledky:** Chronické selhání ledvin jsme našli u 38,6% pacientů na základě odhadu ze sérového cystatinu C a u 34,6% pacientů na základě odhadu ze sérového kreatininu.  $\beta$ 2mikroglobulin má největší počet významných korelací; cystatin C (0,90), CysC GFR (-0,69), Kreatinin (0,70), MDRD GFR (-0,60), Mlg koncentrace (0,24),  $\kappa$  FLC (0,22)  $\lambda$  FLC (0,34) a věk (0,40). Tento velký počet korelací lze vysvětlit tím, že  $\beta$ 2mikroglobulin odráží jak zátěž organismu maligními buňkami, tak pokles glomerulární filtrace.

**Závěr:** Chronické selhání ledvin jsme našli u 38,6% pacientů při odhadu glomerulární filtrace z cystatinu C a u 34,6% při odhadu ze sérového kreatininu. Třída monoklonálního imunoglobulinu může mít vliv na výsledky odhadu glomerulární filtrace ze sérového cystatinu C, odhad glomerulární filtrace ze sérového kreatininu není ovlivněn třídou imunoglobulinu. Diabetici neměli statisticky významně nižší glomerulární filtraci než pacienti bez diabetu mellitu.

**Klíčová slova:** chronické selhání ledvin, glomerulární filtrace, monoklonální gamapatie, volné lehké řetězce

## Introduction

CRF is a very important medical, social and economic issue. One patient out of nine suffers from this condition. The current definition was established by National Kidney Foundation in 2002. The presence of CRF is defined as decreased level of GFR below 1.0 ml/s/1,73m<sup>2</sup> with or without kidney damage for more than 3 months. Markers of kidney damage are pathological findings in urine (usually increased proteinuria or albuminuria), blood or pathological findings in imaging studies [1]. Five stages are defined according to the level of GFR [1]. Czech society for clinical biochemistry adopted the same staging system in its recommendation on determination of GFR. The most commonly used method to measure renal function is GFR [2]. The most frequently used substances to determine GFR are serum or plasma creatinine and cystatin C. MDRD equation and Grubb equation are recommended to estimate GFR [2]. Creatinine is not an ideal marker of renal function. It is influenced by factors such as age, gender, muscle mass and physical activity [3, 18], race, catabolic or anabolic state [3, 18] and is insensitive to small decreases in GFR [2]. Serum creatinine is an unreliable indicator in the elderly whose muscle mass has been reduced and therefore their results must be interpreted carefully [5]. Substances with low molecular weight such as cystatin C (13.3kDa) or  $\beta$ 2microglobulin (11.8 kDa) appear to be better indicators of GFR [4, 18]. Cystatin C, a cysteine protease inhibitor [2, 18], is a relatively new marker of establishing GFR [6, 18]. It seems to be better than creatinine because its concentration in serum is independent of muscle mass. It is unlikely to be influenced by age or gender [7] and it is easily filtered by the glomerulus [6, 8]. However, cystatin C can be influenced by extra renal factors such as corticosteroid administration and thyroid dysfunction [7, 9, 18]. The current reference method for determination of GFR is a DTPA isotope method. This method is invasive, time consuming and available only in specialised centres [10].

Major risk factors for chronic renal failure include diabetes mellitus, hypertension, atherosclerosis and family history of renal disease [1, 11]. Monoclonal gammopathies may also cause renal damage [12, 16]. Renal insufficiency is defined as serum creatinine levels > 177  $\mu$ mol/l as part of the CRAB criteria for diagnosis of multiple myeloma described by the International Myeloma Working group in 2003 [13].

**[C]** Calcium elevation in the blood S. Calcium >2.75 mmol/l

**[R]** Renal insufficiency S. Creatinine > 177  $\mu$ mol/l

**[A]** Anemia Hemoglobin < 100 g/l or 20g/l < normal

**[B]** Lytic bone lesions or osteoporosis

MGUS is an asymptomatic pre-malignant disorder introduced in 1978 by Dr. Robert A. Kyle and characterized by clonal proliferation of plasma cells. The etiology of this disease is unknown, but it is related to genetic predisposition and the environmental factors [14, 15]. MGUS is frequently presented as an idiopathic rearrangement of immunoglobulin genes, which cau-

ses production of an M-protein [15] and when accompanied by production of monoclonal FLC can cause kidney disease [16]. In the kidney nephron, FLC pass through fenestrated epithelia of the glomerular wall and when their quantity overwhelms the renal reabsorption capacity, they cause nephrotoxicity, such as the formation of waxy casts. Production of monoclonal FLC and abnormal  $\kappa/\lambda$  ratio predict the development of MGUS to further stages [17, 20].

## Materials and methods

This study included 101 consecutive patients with MGUS from Thomas Bata Regional Hospital in Zlín from January 2009 to June 2011. This group consisted of 35 Caucasian men and 66 Caucasian women, with age ranged from 43 to 95 years. We have created 3 age groups: 40 – 59 years, 60 – 79 years and 80 – 99 years. 32 patients suffered from diabetes mellitus. All patients had an intact monoclonal immunoglobulin molecule; we did not include Light Chain only MGUS in our patient cohort. We retrospectively evaluated patients for the presence of CRF. The CRF is defined according to National Kidney Foundation as GFR below 1.0 ml/s/1,73m<sup>2</sup> with or without kidney damage. It includes stage 3, stage 4 a stage 5 according to the level of GFR. It is not a particular clinical diagnosis, it is the level of GFR. We originally planned to assess proteinuria, as a marker of kidney damage, but did not have urine samples from large proportion of the patients. Fasting blood samples were collected during routine medical check-up. We compared two methods of GFR estimation. The first one was estimation from serum cystatin C (CysC GFR). Cystatin C was measured by an immunoturbidimetric technique using DAKO calibration on an Abbott Architect analyser. CysC GFR was calculated by Grubb equation: CysC GFR= 1.4115 x cystatin C (mg/L)<sup>-1.680</sup>, (multiplied by 0.948 in females). The second one was an estimation from serum creatinine (MDRD GFR), using a standardized photometric enzymatic method traceable to NIST SRM 967 reference material on an Abbott Architect analyser [18]. Estimation of GFR from serum creatinine was calculated using the four parameter MDRD equation: MDRD GFR = 515.3832 x creatinine<sup>-1.154</sup> x age<sup>-0.203</sup>, (multiplied by 0.742 in females) [18,19].

All patients had determined serum levels of  $\beta$ 2microglobulin determined using an immunoassay on the AxSYM analyser; the concentration of intact monoclonal immunoglobulin was performed using SPE densitometry and calculation from total protein;  $\kappa$  and  $\lambda$  FLC and their ratios were determined by particle enhanced immunoturbidimetric assays (Freelite; The Binding Site, Birmingham, UK) using an Olympus analyser. We compared GFR in patients with and without diabetes mellitus.

The study has been approved by The Ethical Committee of Tomas Bata Hospital. We were allowed to collect and anonymously report retrospective data of patients. Now we realized that we did not need this ap-

proval for this article. The Spearman correlation coefficient was used to assess correlation between the following parameters: cystatin C, creatinine, monoclonal immunoglobulin concentration,  $\kappa$  and  $\lambda$  FLC, FLC  $\kappa/\lambda$  ratio,  $\beta$ 2microglobulin, gender and age. The influence of monoclonal immunoglobulin class on markers of GFR was evaluated using a mixed linear model (MLM).

## Results and Discussion

The studied population had an average CysC GFR value of  $1.23 \pm 0.60$  ml/s/1.73m<sup>2</sup> and MDRD GFR of  $1.16 \pm 0.37$  ml/s/1.73m<sup>2</sup>. Results show that GFR estimates from cystatin C were over decision limit (1.0 ml/s/1.73m<sup>2</sup>) in 62 patients and 39 patients had CRF (stage 3 had 29 patients, stage 4 had 8 patients and stage 5 had 2 patients). GFR estimates from creatinine were over decision limit in 66 patients and 35 patients had CRF (stage 3 had 34 patients, stage 4 had 1 patient, nobody had stage 5). Discrepancies were found in 14 cases. 9 cases had CysC GFR in the range of CRF and MDRD GFR was over decision point 1.0 ml/s/1.73m<sup>2</sup>. 5 patients had CysC GFR over decision limit 1.0 ml/s/1.73m<sup>2</sup>, while MDRD GFR was in the range of CRF. Overall, more than 1/3 of patients had CRF by cystatin C or creatinine.

The Spearman correlation analysis is shown in (Table 1).  $\beta$ 2microglobulin has the highest number of significant correlations: cystatin C (0.90), CysC GFR (-0.69), creatinine (0.70), MDRD GFR (-0.60), Mlg concentration (0.24),  $\kappa$  FLC (0.22)  $\lambda$  FLC (0.34) and age (0.40). The best correlation results may be explained by the fact that  $\beta$ 2microglobulin reflects both malignant cells burden and renal function [18]. The higher correlation with cystatin C compared to creati-

nine can be explained by decreased muscle mass in elderly patients [3]. The Spearman coefficient of correlation between  $\kappa/\lambda$  FLC ratio and CysC GFR and MDRD GFR was approaching zero. We can explain it as the majority of our patients had physiological  $\kappa/\lambda$  FLC ratio.

Mlg concentration has only two significant correlations:  $\kappa$ FLC and  $\beta$ 2microglobulin. Increased serum  $\beta$ 2microglobulin concentration probably reflects higher number of plasma cells in bone marrow [18].  $\kappa/\lambda$  FLC ratio was significant only in two cases: with Mlg concentration (0.36) and with  $\kappa$  FLC (0.45).

The influence of monoclonal immunoglobulin class on markers of GFR is shown in (Table 2). We can see that CysC GFR shows statistically significant differences between biconal paraproteins and IgA  $\lambda$ . There is an average value 0.92 with standard deviation 0.19 for biconal paraproteins and 1.6 as an average value with standard deviation 0.24 for IgA  $\lambda$ . We can conclude that the class of monoclonal immunoglobulin may influence results of glomerular filtration estimated from cystatin C but it does not influence GFR estimated from creatinine. We do not have explanation for these results. Gender was also evaluated as a factor to influence results of GFR (Table 3). The age-dependent differences in estimated GFR were statistically significant in both types of estimation (CysC GFR or MDRD GFR) (Table 4). There must be relationship between age and estimated GFR because the age is included in these equations [19]. The age dependent GFR decrease is sharper in CysC GFR than in MDRD GFR. This may be explained by more rapid decrease in muscle mass in elderly patients due to chronic diseases associated with aging [3]. Diabetic patients had not significantly lower GFR than patients without diabetes mellitus (Table 5).

**Tab. 1:** Spearman correlation coefficients between observed parameters

	Cystatin C	cys C GFR	Creatinine	MDRD GFR	Mlg concentration	Class of paraprotein	$\kappa$ FLC	$\lambda$ FLC	$\kappa/\lambda$	$\beta$ 2mikro-globulin	Gender	Age
Cystatine C		-0.84*	0.79*	-0.70*	0.19	0.06	0.20*	0.24*	0.03	0.90*	-0.02	0.43*
cys C GFR	-0.84*		-0.66*	0.70*	-0.15	-0.02	-0.22*	-0.20*	-0.08	-0.69*	0.01	-0.47*
Creatinine	0.79*	-0.66*		-0.83*	0.10	-0.02	0.23*	0.17	0.04	0.70*	-0.23*	0.32*
MDRD GFR	-0.70*	0.70*	-0.83*		-0.10	-0.03	-0.15	-0.11	-0.03	-0.60*	-0.20*	-0.36*
Mlg concentration	0.19	-0.15	0.10	-0.10		0.02	0.25*	0.12	0.36*	0.24*	0.05	0.08
Class of paraprotein	0.06	-0.02	-0.02	-0.03	0.02		-0.18	-0.02	-0.07	-0.02	0.13	0.10
$\kappa$ FLC	0.20*	-0.22*	0.23*	-0.15	0.25*	-0.18		0.24*	0.45*	0.22*	-0.23*	0.12
$\lambda$ FLC	0.24*	-0.20*	0.17	-0.11	0.12	-0.02	0.24*		-0.15	0.34*	0.01	0.06
$\kappa/\lambda$	0.03	-0.08	0.04	-0.03	0.36*	-0.07	0.45*	-0.15		-0.02	-0.12	0.08
$\beta$ 2mikro-globulin	0.90*	-0.69*	0.70*	-0.60*	0.24*	-0.02	0.22*	0.34*	-0.02		-0.01	0.40*
Gender	-0.02	0.01	-0.23*	-0.20*	0.05	0.13	-0.23*	0.01	-0.12	-0.01		-0.05
Age	0.43*	-0.47*	0.32*	-0.36*	0.08	0.10	0.12	0.06	0.08	0.40*	-0.05	

Note: Marked correlation are significant on level of probability  $P \leq 0.05$  (\*)

**Tab. 2:** Differences between classes of paraprotein by GFR (LSM ± SD)

	Biclonal	IgA κ	IgA λ	IgG κ	IgG λ	IgM κ	IgM λ
Cys C GFR ml/s/1,73m <sup>2</sup>	0.92 ± 0.19 a	1.30 ± 0.20	1.60 ± 0.24b,*	1.22 ± 0.1	1.13 ± 0.11**	1.20 ± 0.19	1.43 ± 0.32
MDRD GFR ml/s/1,73m <sup>2</sup>	1.06 ± 0.12	1.15 ± 0.13	1.25 ± 0.16	1.17 ± 0.06	1.15 ± 0.07	1.12 ± 0.12	1.29 ± 0.21

Note: Values with different superscripts show significance level within rows: P ≤ 0.05 (\*); P ≤ 0.1 (\*\*)

**Tab. 3:** Differences in gender by GFR (LSM ± SD)

	Male	Female
CysC GFR ml/s/1,73m <sup>2</sup>	1.27 ± 0.11	1.24 ± 0.09
MDRD GFR ml/s/1,73m <sup>2</sup>	1.26 ± 0.07 a	1.08 ± 0.06 b

Note: Values with different superscripts show significance level within row P ≤ 0.05 (\*\*)

## Conclusions

We have found CRF in 38.6% patients using GFR estimation from cystatin C and in 34.6% patients using GFR estimation from creatinine. B2microglobulin has the highest number of significant correlations: cystatin C (0.90), CysC GFR (- 0.69), Creatinine (0.70), MDRD GFR (-0.60), Mlg concentration (0.24), κ FLC (0.22) λ FLC (0.34) and age (0.40). The best correlation results may be explained by the fact that β2microglobulin reflects both malignant cells burden and renal function. The class of monoclonal immunoglobulin may influence results of GFR estimated from cystatin C but it does not influence GFR estimated from creatinine. We do not have explanation for these results. Diabetic patients had not significantly lower GFR than patients without diabetes mellitus. Further studies are needed to evaluate which parameter of GFR is most suitable and practical for patients with monoclonal gammopathies, and to evaluate treatment options for patients with elevated FLC.

## References

1. **Levey, S., Coresh, J., Balk, E. et al.** National Kidney Foundation practice guidelines for chronic renal failure: evaluation, classification and stratification. *Ann Intern Med.*, 2003, vol. 139, s. 137-147.
2. **Zima, T., Teplan, V., Tesaf, V. et al.** Doporučení České nefrologické společnosti a České společnosti klinické biochemie ČLS JEP k vyšetřování glomerulární filtrace. *Klin. Biochem. Metab.*, 2009, č. 2, s. 109-117.
3. **Larson, A., Flodin, M., Hanson, L. O., Carlsson, L.** Patient selection has a strong impact on cystatin C and Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) estimated glomerular filtration rate. *Clinical Biochemistry*, 2008, vol. 41, s. 1355 – 1361.

4. **Donadio, C., Lucchesi, A., Ardini, M., Giordani, R.** cystatin C, β2microglobulin, and retinol-binding protein as indicators of glomerular filtration rate: comparison with plasma creatinine. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2001, vol. 24, s. 835-42.
5. **Hsu, C. Y., Chertow, G. M., Curhan, G. C.** Methodological issues in studying the epidemiology of mild to moderate chronic renal insufficiency. *Kidney Int.*, 2002, vol. 61, s. 1567 – 1576.
6. **Narvaez-Sanchez, R., Gonzales, L., Salamanca, A., Silva, M., Rios, D. et al.** cystatin C could be a replacement to serum creatinine for diagnosing and monitoring kidney function in children. *Clinical Biochemistry*, 2008, vol. 41(7-8), s. 498-503.
7. **Daniel, K. M., Cason, C. L.** Estimating Glomerular Filtration Rate in the Elderly. *The Journal for Nurse Practitioners – JNP*, 2007 (3), 4, s. 242-244.
8. **Newman, D. J., Thakkar, H., Edwards, R. G., Wilkie, M., White, T. et al.** Serum cystatin C measured by automated immunoassay: a more sensitive marker of ganges in GFR than serum creatinine. *Kidney Int.*, 1995, vol. 47, s. 312 – 318.
9. **Chen, H. H.** Is cystatin C an Important Prognostic Marker Independent of Renal Function. *JACC*, 2010, vol. 56, s. 1937 – 1938.
10. **Vížda, J., Lepej, J., Křížková, H., Urbanová, E.** *Atlas scintigrafie ledvin*. Praha: Agentura Pankrác spol. s.r.o. 2002, s. 5-10.
11. **Schoolwerth, A. C., Eengelgau, M. M., Hostetter, T. H. et al.** Chronic kidney disease: a public health problem that needs a public health action plan. *Prev Chronic Dis.*, 2006, vol. 3, s. A57.
12. **Bradwell, A. R.** *Serum free light chain analysis fourth edition*. U.S.A. Binding Site Inc: SanDieg, Ca 92121, s.173-182.
13. **The international myeloma working group.** Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol.*, 2003, vol. 121, s. 749-757.
14. **Madan, S., Greipp, P. R.** The incidental monoclonal protein: Current approach to management of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). *Blood Rev.*, 2009, vol. 23, s. 257 – 265.
15. **Munshi, N. C.** Monoclonal gammopathy of undetermined significance. genetic vs. environmental etiologies. *Mayo Clin Proc.*, 2007, vol. 82, s. 1457 – 1459.
16. **Hutchison, C. A., Basnayake, K., Cockwell, P.** Serum free light chain assessment in monoclonal gammopathy and kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.*, 2009, vol. 5, s. 621 – 627.

## Metabolic disorders due to methanol poisoning

Tomas Salek<sup>a</sup>, Petr Humpolicek<sup>b,c</sup>, Petr Ponizil<sup>b,d</sup>

**Aim.** The aim of this study is to compare markers of glomerular filtration rate (GFR), estimated GFR (eGFR), and metabolic parameters between admission and recovery in 13 patients of Tomas Bata hospital with methanol poisoning during methanol problems in the Czech Republic in 2012. The impact of methanol concentration and age on metabolic parameters were discovered at the time of admission to hospital.

**Materials and Methods.** The serum osmolality, methanol, ethanol, creatinine, cystatin C, Troponin I, ALT, plasma pH and lactate were measured in these 13 patients. The eGFR from serum creatinine (creatinine eGFR) and from cystatin C (cystatin C eGFR) were also determined.

**Results.** Increased serum osmolality and markers of metabolic acidosis are key indirect laboratory findings in patients with methanol poisoning. There were no significant changes in eGFR in our patients between admission and recovery. Increased serum troponin I concentration was confirmed as an indicator of myocardial necrosis in four patients. Two patients developed acute kidney injury (AKI) before admission.

**Conclusions.** We found statistically significant differences in serum osmolality concentration, plasma pH and lactate between admission and recovery. We found no changes in eGFR between admission and recovery. One patient had vision problems due to damage to the occipital lobes. Methanol poisoning may cause increase in markers of cardiac damage.

**Key words:** intoxication, osmolality, metabolic acidosis, creatinine, cystatin C

Received: May 10, 2013; Accepted with revision: September 19, 2013; Available online: September 27, 2013  
<http://dx.doi.org/10.5507/bp.2013.074>

<sup>a</sup>Department of Clinical Biochemistry, Tomas Bata Regional Hospital in Zlín a.s., Zlín, Czech Republic

<sup>b</sup>Centre of Polymer Systems, Polymer Centre, Tomas Bata University in Zlín, Zlín

<sup>c</sup>Polymer Centre, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, Zlín

<sup>d</sup>Department of Physics and Materials Engineering, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, Zlín

Corresponding author: Tomas Salek, e-mail: [tsalek@bnzlin.cz](mailto:tsalek@bnzlin.cz)

### INTRODUCTION

Methanol poisoning is a serious medical, social and economical problem. Mass methanol poisonings are rare but occur both in developed and developing countries<sup>1</sup>. Accidental cases of methanol poisoning are reported<sup>2</sup>. Suicide attempts using pure methanol are also presented in the literature<sup>3</sup>. Almost all cases of acute methanol toxicity result from accidental ingestion<sup>4</sup>. Methanol has relatively low toxicity and its metabolism is responsible for the transformation of methanol to its toxic metabolites, especially formic acid<sup>5</sup>. An interesting fact is that toxic and lethal doses of methanol have not hitherto been determined unequivocally. 15 mL of 40% methanol have caused death in some individuals, whereas others have survived consuming as much as 500 mL of such solution. These differences are probably caused by the simultaneous ethanol consumption, different folate content in the diet or the activity of methanol metabolism systems<sup>6</sup>. However, the minimal lethal dose of methanol in humans has been assumed to be 1 g per kg body weight (b.w.) in persons not having simultaneously consumed ethanol<sup>7</sup>.

Typical features of methanol intoxications include metabolic acidosis, hyperosmolality, increased osmolar gap, retinal damage with blindness, damage to putamen and caudate with neurologic dysfunction. Metabolic aci-

dosis is caused by formic acid, lactic acid, and ketones. Methanol is oxidized by alcohol dehydrogenase to formaldehyde, which is then metabolized by formaldehyde dehydrogenase to formic acid. Formate acid is an inhibitor of mitochondrial cytochrome c oxidase which causes histotoxic hypoxia<sup>8</sup>. This leads to reduced adenosine triphosphate (ATP) production. Neurotoxic effects of formic acid to neurons and glial cells was also demonstrated in neural cultures<sup>9</sup>. The optic nerve is especially sensitive to reduced ATP production. This is due to its neurons' having long axons and very small diameter<sup>10</sup>. Brain changes can be demonstrated by computed tomography and magnetic resonance imaging<sup>11</sup>. Formate is also toxic to retinal cells<sup>12</sup>. There is a high level of free radical production during acute formic acid poisoning in animal models<sup>13</sup>. Formate is mainly responsible for metabolic acidosis<sup>14</sup>. Differential diagnosis of alcohol drinkers with high levels of serum osmolality, increased osmolar gap and metabolic acidosis also include isopropyl alcohol intoxication<sup>15</sup>. Definitive diagnosis of methanol ingestion requires determination of methanol by gold standard test which is gas chromatography<sup>16</sup>. Acid base balance is frequently discussed in patients with methanol intoxication. Markers of GFR and cardiac damage are not discussed in the literature in such clinical situations. For this reason we evaluated these markers in this clinical setting.



## MATERIAL AND METHODS

The study included 13 patients with methanol poisoning at the Tomas Bata hospital in the town of Zlín in the Czech Republic. There were 7 males and 6 females. The age of patients ranged from 28 to 79 years, mean 53 years. All patients survived. Two patients with the lowest methanol concentration were treated only with ethanol. Ten patients were treated with both hemodialysis and ethanol. One patient of this combination treatment group also had fomepizol. The onset of dialysis treatment ranged from 15 min to 6 h after admission. Serum osmolality was measured by freezing point depression. Serum methanol was measured by gas chromatography. Other serum markers were measured by automated Abbott Architect analyzer. Serum ethanol was determined by enzymatic photometry. Serum creatinine was measured by a standardized photometric enzymatic method traceable to NIST SRM 967 reference material<sup>17</sup>. Creatinine eGFR was estimated by the Lund Malmö equation<sup>18</sup>. Cystatin C was determined by a standardized immunoturbidimetric technique traceable to ERM DA 471/IFCC reference material<sup>19</sup>. Cystatin C eGFR was calculated by equation validated for this method and analyser. Serum troponin I concentration was performed using immunochemiluminiscent technique. Serum alanin aminotransferase was determined by enzymatic method with pyridoxal phosphate activation. Plasma pH was determined by an electrochemical method on a Radiometer acid-base analyzer. We compared both creatinine eGFR and cystatin C eGFR in 13 methanol poisonings at admission and after recovery. We also compared osmolality, pH, ALT and lactate between admission and recovery. We looked at serum troponin I concentration which is a marker of cardiomyocyte necrosis. We used Risk, Injury, Failure, Loss, End-Stage

Renal Disease (RIFLE) criteria for the diagnosis of acute kidney injury<sup>20</sup>. Urine output was measured over ml/kg/hour in twelve patients. The clinical and laboratory status of one patient was so good that urine volume was not evaluated. The study was carried out according to the latest Declaration of Helsinki. It was approved by the Ethic Committee of Tomas Bata Hospital. We were allowed to collect and anonymously report the retrospective data of patients.

### Statistical evaluation

Impact of methanol intoxication on metabolic markers was studied. These markers were followed: osmolality, Lactate and pH. To discover the relationship between the level of methanol intoxication and these markers three statistical tests were used, paired t-tests for differences between the levels of individual markers at the beginning and at the end of hospitalization, correlations between individual markers, age of patients and methanol level (mmol/L) and linear regression with age and methanol level as fixed factors.

## RESULTS

Key results of each patient are summarized in Table 1.

We found statistically significant differences in serum osmolality concentration, plasma pH and lactate between admission and recovery. The results of paired two-sample Student's t-test are shown in Table 2. A significant shift in osmolality, lactate and pH level was found. The differences between the level of osmolality, pH and lactate at the beginning and at the end of therapy were significant at the  $P \leq 0.01$ ;  $P \leq 0.01$  and  $P \leq 0.05$ , respectively.

Table 1. Sex, age, methanol concentration and all studied markers at admission and discharge for each patient.

Sex	Age	Methanol (mmol/L)	Cystatin C (mg/L)		Creatinine (μmol/L)		Osmolality (mmol/kg)		Lactate (mmol/L)		pH		Urine output (mL/kg/h (1 <sup>st</sup> day))	Dialysis
			adm.	dis.	adm.	dis.	adm.	dis.	adm.	dis.	adm.	dis.		
M	69	5	0.95	0.98	68	72	294	288			7.39	7.42	2.27	No
F	58	76	0.77	0.90	71	58	390	281	-	-	7.11	7.47	1.72	YES
F	63	55	1.12	0.92	79	56	373	288	0.9	1.4	7.09	7.41	4.67	YES
M	42	12	0.66	0.63	73	75	303	-	1.5		7.30	7.40	1.56	YES
F	35	33	1.27	1.25	77	55	348	290	8.3		7.08	7.42	0.57	YES
M	48	62	1.68	0.62	167	44	374	280	7.6		6.82	7.50	2.76	YES
M	79	10	1.55	0.94	80	61	310	282	4.4	0.9	7.33	7.49	2.3	YES
F	58	38	0.80	0.72	84	58	378	286	5.1	1.8	7.09	7.46	5	YES
M	42	63	0.70	0.70	68	80	409	-	1.4	-	7.41	7.41	1.43	YES
F	62	30	1.01	0.90	76	60	311	291	2.0	1.0	7.18	7.45	4.05	YES
M	58	61	1.63	1.19	124	74	383	287	12.8	1.7	6.76	7.51	1.25	YES
F	52	138	0.92	0.86	44	45	463	284	1.5	1.4	7.22	7.45	4.38	YES
M	28	12	0.79	0.79	73	86	300	283	0.9	1.0	7.33	7.36	-	No
Mean	53.38	45.76	1.06	0.88	83.38	63.38	356.61	285.45	4.21	1.31	7.16	7.44	2.66	
+SD	+14.15	+36.50	+0.35	+0.19	+30.50	+12.98	+51.01	+3.70	+3.90	+0.36	+0.20	+0.04	+1.50	

adm. is the marker level at the admission time;

dis. is the marker level at the recovery time = discharge.

**Table 2.** Average differences in marker levels at the beginning and at the end of therapy.

Cystatin C (mg/L)	Creatinine ( $\mu\text{mol/L}$ )	Osmolality (mmol/kg)	Lactate (mmol/L)	pH	ALT	eGFR Cystatin C	eGFR Creatinine
$0.18 \pm 0.09$	$20.00 \pm 9.88$	$71.27 \pm 15.56^{**}$	$3.24 \pm 1.20^*$	$-0.28 \pm 0.06^{**}$	$0.77 \pm 0.71$	$-0.26 \pm 0.14$	$-0.23 \pm 0.13$

(Average change  $\pm$  standard error of the mean). The statistical differences by paired *t*-test (*t* value).

ALT is alanine aminotransferase; eGFR is estimated glomerular filtration rate.

\*  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$ .

The significant effect on the osmolality was subsequently confirmed by the correlation between osmolality and methanol level (Table 3,  $P \leq 0.01$ ).

The correlation between osmolality and methanol level was confirmed by the multiple correlation (Table 4). The correlation coefficient between osmolality and age methanol was 0.97 which, compared to the correlation to methanol only (Table 2; 0.95), showed a nonsignificant increase. The small impact of age was confirmed by partial correlation coefficient (Table 5) which confirmed the relations between the osmolality and methanol ( $P \leq 0.01$ ;  $r = 0.96$ ) but not between age and methanol. Moreover, based on the linear regression we can state

that the increase in methanol level by 10 mmol/L will increase the osmolality about  $13.0 \pm 1.4$  mmol/L. We found increased troponin I above 99<sup>th</sup> percentile of healthy population in four patients (male 58 years old, females 58, 35 and 58 years old). None of the patients had clinical features of acute coronary syndrome and electrocardiography showed no ischemic changes.

There was no difference in either creatinine eGFR or cystatin C eGFR between admission and recovery. Two patients had AKI according to RIFLE criteria. They met GFR criteria but not urine volume criteria (urine output below 0.5 mL/kg/h during hospital stay). AKI developed before admission to the hospital. Creatinine and cystatin C decreased and GFR increased in these two patients during treatment.

One patient - a 48 years old man - had vision problems. Magnetic resonance imaging of brain revealed cerebral white matter swellings (semioval center). Most of the impairments impacted the corona radiata center in the subcortical occipital regions. There was also haemorrhagic necrosis of basal ganglia, especially putamen and the globus pallidus.

**Table 3.** Correlation between the individual markers and age or methanol level.

	Osmolality (mmol/kg)	Lactate (mmol/L)	pH
$r_{\text{age}}$	-0.43	-0.35	0.06
$r_{\text{met}}$	0.95**	0.01	-0.27

$r_{\text{age}}$  is the Pearson correlation coefficient between age and marker  $r_{\text{met}}$  is the Pearson correlation coefficient between methanol level and marker \*\*  $P \leq 0.01$  by testing for the significance of the correlation coefficient.

**Table 4.** Multiple correlation between the individual markers and combination of age with methanol.

	Osmolality (mmol/kg)	Lactate (mmol/L)	pH
$r_{\text{met/age}}$	0.97**	0.36	0.27

$r_{\text{met/age}}$  is the multiple correlation coefficient between age and methanol level as independent variables and marker as dependent variable. \*\*  $P \leq 0.01$  by testing for the significance of the multiple correlation coefficient.

## DISCUSSION

We compared metabolic parameters and markers of GFR between admission and discharge. We found increased serum osmolality and metabolic acidosis in the majority of patients. It has been repeatedly reported, that serum osmolality increases with methanol poisoning<sup>21</sup> and that methanol intoxication causes high anion gap metabolic acidosis<sup>22</sup>. The acidosis seen in early clinical course is caused directly by formic acid production. Lactate is produced later as formic acid interferes with intracellular respiration and promotes anaerobic metabolism<sup>5</sup>. These findings are seen in common clinical practice. Differential diagnosis of alcohol intoxication includes ethanol, ethylenglycol and isopropyl alcohol intoxication<sup>15</sup>.

**Table 5.** Partial correlation between the individual markers and age or methanol with removed effect of second variable.

	Osmolality	Lactate	pH
$R_{\text{parc}_{\text{age}}}$	-0.622	-0.361	-0.010
$R_{\text{parc}_{\text{met}}}$	0.964*	-0.083	-0.267

$R_{\text{parc}_{\text{age}}}$  is partial correlation between marker and age (effect of methanol level is removed).

$R_{\text{parc}_{\text{met}}}$  is partial correlation between marker and methanol level (effect of age is removed).

\*  $P \leq 0.05$  by testing for the significance of the partial correlation coefficient.

We found no statistically significant changes in eGFR. The small number of patients may also contribute to this result. Further, we are not able to accurately determine small GFR changes in patients on dialysis treatment. Two patients fulfilled the GFR criteria for AKI. We are unable to conclude that methanol intoxication caused this state. Dehydration could also have played a part in the development of AKI. Nephrotoxic drugs, sepsis and multiorgan dysfunction probably did not cause AKI in our patients. Acute renal failure developed in some studies in patients with methanol poisoning<sup>23</sup>. The limitation of our study is that we did not measure methanol and formic acid in urine. This could be useful to better understand the kinetics of methanol and formate elimination<sup>24</sup>.

Formate is especially toxic for nerve cells and the optic nerve. These cells need large amounts of energy. The inhibition of cytochrome c oxidase leads to low levels of ATP and cell dysfunction. The great sensitivity of the optic nerve to formate is well clinically documented in large epidemic problems in Cuba and in animal models<sup>10</sup>. Our patients were assessed by an ophthalmologist. One patient had vision problems. Magnetic resonance imaging of the brain revealed cerebral white matter swellings (semioval center). Most of the impairments impacted the corona radiata center in the subcortical occipital regions. There was also the hemorrhagic necrosis of the basal ganglia, especially the putamen and globus pallidus. Similar findings have been described in the literature<sup>11</sup>. Today, cardiac troponins are the gold standard for the diagnosis of myocardial necrosis<sup>25</sup>. We found no cardiac troponins in patients with methanol poisoning in the database of PubMed. Four of our patients had elevated serum levels of troponin I.

In summary, our results confirm well-known data on acid base and osmolality disorders in patients with methanol poisoning. One new finding was elevation of troponin I in some patients. The major limitation of our study is the small number of patients and the fact that we do not measure serum or urine formic acid.

## CONCLUSIONS

We found statistically significant differences in serum osmolality concentration, plasma pH and lactate between admission and recovery. We found no changes in eGFR between admission and recovery. We found increased serum troponin I concentration as an indicator of myocardial necrosis in four patients. One patient had vision problems due to damage to occipital lobes. This should be taken into account in treating these patients.

## CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

**Author's conflict of interest disclosure:** *None declared.*

## REFERENCES

- Paasma R, Hovda KE, Jacobsen D. Methanol Poisoning and Long Term Sequelae - a Six Years Follow-up after a Large Methanol Outbreak. *BMC Clinical Pharmacology* 2009;9:5. doi:10.1186/1472-6904-9-5
- Epker JL, Bakker J. Accidental Methanol Ingestion: Case Report. *BMC Emergency Medicine* 2010;10:3. doi:10.1186/1471-227X-10-3
- Bucarechi F, De Capitani EM, Madureira PR, Cesconetto DM, Lanaro R, Vieira RJ. Suicide Attempt Using Pure Methanol with Hospitalization of the Patient Soon after Ingestion: Case Report. *São Paulo Medical Journal = Revista Paulista de Medicina* 2009;127:108-10.
- Xiao JH. Accidental Methyl Alcohol Poisoning. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi [Chinese Journal of Preventive Medicine]* 1990;24:160-2.
- Barceloux DG, Bond GR, Krenzelok EP, Cooper H, Vale JA. American Academy of Clinical Toxicology Ad Hoc Committee on the Treatment Guidelines for Methanol Poisoning. *American Academy of Clinical Toxicology Practice Guidelines on the Treatment of Methanol Poisoning Journal of Toxicology: Clinical Toxicology* 2002;40:415-46.
- Bennett IL Jr, Cary FH, Mitchell GL Jr, Cooper MN. Acute Methyl Alcohol Poisoning: a Review Based on Experiences in an Outbreak of 323 Cases. *Medicine* 1953;32: 31-63.
- Röe O, Enoksson P. Species Differences in Methanol Poisoning. *Critical Reviews in Toxicology* 1982;10:275-86. doi:10.3109/10408448209003368
- Liesivuori J, Savolainen H. Methanol and Formic Acid Toxicity: Biochemical Mechanisms. *Pharmacology & Toxicology* 1991;69:157-63.
- Dorman DC, Bolon B, Morgan KT. The Toxic Effects of Formate in Dissociated Primary Mouse Neural Cell Cultures. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1993;122:265-72. doi:10.1006/taap.1993.1195
- Sadun A. Acquired Mitochondrial Impairment as a Cause of Optic Nerve Disease. *Transactions of the American Ophthalmological Society* 1998;96: 881-923.
- Singh A, Samson R, Giridhar A. Portrait of a Methanol-intoxicated Brain. *The American Journal of Medicine* 2011;124:125-7. doi:10.1016/j.amjmed.2010.09.001
- Treichel JL, Henry MM, Skumatz CM, Eells JT, Burke JM. Formate, the Toxic Metabolite of Methanol, in Cultured Ocular Cells. *Neurotoxicology* 2003;24:825-34. doi:10.1016/S0161-813X(03)00059-7
- Dikalova AE, Kadiiska MB, Mason RP. An in Vivo ESR Spin-trapping Study: Free Radical Generation in Rats from Formate Intoxication - Role of the Fenton Reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011;98:13549-53. doi:10.1073/pnas.251091098
- Kraut JA, Kurtz I. Toxic Alcohol Ingestions: Clinical Features, Diagnosis, and Management. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2008;3:208-25. doi:10.2215/CJN.03220807
- Platteborze PL, Rainey PM, Baird GS. Ketoacidosis with Unexpected Serum Isopropyl Alcohol. *Clinical Chemistry* 2011;57:1361-4. doi:10.1373/clinchem.2010.157248
- Anyfantakis D, Symvoulakis EK, Cristodoulakis EV, Frantzeskakis G. Ruling in the Diagnosis of Methanol Intoxication in a Young Heavy Drinker: a Case Report. *Journal of Medicine and Life* 2012;5:332-4.
- Drion I, Cobbaert C, Groenier KH, Weykamp C, Bilo HJ, Wetzels JF, Kleefstra N. Clinical Evaluation of Analytical Variations in Serum Creatinine Measurements: Why Laboratories Should Abandon Jaffe Techniques. *BMC Nephrology* 2012;13:133. doi:10.1186/1471-2369-13-133
- Björk J, Bäck SE, Sterner G, Carlson J, Lindström 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. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 2007;67:678-95. doi:10.1080/00365510701326891
- Grubb A, Blirup-Jensen S, Lindström V, Schmidt C, Althaus H, Zegers I, IFCC Working Group on Standardisation of Cystatin C (WG-SCC). First Certified Reference Material for Cystatin C in Human Serum ERM-DA471/IFCC. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine: CCLM/FESCC* 2010;48:1619-21. doi:10.1515/CCLM.2010.318
- Eknoyan G, Lameire N, Eckardt KU, Kasiske BL. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work

- Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney International Supplements* 2012;2:1-138.
21. Meatherall R, Krahn J. Excess Serum Osmolality Gap after Ingestion of Methanol. *Clinical Chemistry* 1990;36:2004-7.
22. Lim S. Metabolic Acidosis. *Acta Medica Indonesiana* 2007;39:145-50.
23. Verhelst D, Moulin P, Haufroid V, Wittebole X, Jadoul M, Hantson P. Acute Renal Injury Following Methanol Poisoning: Analysis of a Case Series. *International Journal of Toxicology* 2004;23:267-73. doi:10.1080/10915810490506795
24. Hovda KE, Mundal H, Urdal P, McMartin K, Jacobsen D. Extremely Slow Formate Elimination in Severe Methanol Poisoning: a Fatal Case Report. *Clinical Toxicology (Philadelphia, Pa.)*, 2007;45:516-21. doi:10.1080/15563650701354150
25. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD. Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Universal Definition of Myocardial. Third Universal Definition of Myocardial Infarction. *European Heart Journal* 2012;33:2551-67. doi:10.1093/eurheartj/ehs184

## Estimated glomerular filtration rate in diabetic patients

Šálek T.<sup>1</sup>, Ponížil P.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Biochemistry, Tomas Bata Regional Hospital in Zlín a. s., Havlíčkovo nábřeží 600, 762 75 Zlín, Czech Republic

<sup>2</sup>Centre of Polymer Systems, Polymer Centre, Tomas Bata University in Zlín, Náměstí T. G. M. 5555, 760 05 Zlín, Czech Republic

<sup>3</sup>Department of Physics and Materials Engineering, Faculty of Technology, Tomas Bata University at Zlín, Náměstí T. G. M. 275, 762 72 Zlín, Czech Republic

### SUMMARY

**Objective:** The aim of the study is to compare estimated glomerular filtration rate (eGFR) from serum creatinine (eGFR<sub>creatinine</sub>) and cystatine C (eGFR<sub>cystatin C</sub>) and to study the impact of these estimations on detection and staging of chronic kidney disease (CKD) in diabetic patients.

**Design:** retrospective cross section design.

**Settings:** Department of clinical biochemistry, Tomas Bata Hospital Inc., Zlín, Czech Republic.

**Materials and methods:** The study population consisted of 565 consecutive diabetic patients from the outpatient diabetic clinic of Tomas Bata Hospital in Zlín in the Czech Republic. Serum creatinine and cystatin C were measured by newly standardized methods and eGFR was calculated according to Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) equations, which were established in 2012. CKD is defined as GFR below 1.0 ml/s/1.73m<sup>2</sup>.

**Results:** The mean eGFR<sub>creatinine</sub> (1.443 ± 0.014) ml/s/1.73m<sup>2</sup> was lower than eGFR<sub>cystatin C</sub> (1.512 ± 0.017) ml/s/1.73m<sup>2</sup>, (p < 0.002). We found poor accordance to identify CKD. The discrepancy was found in 38 patients.

**Conclusion:** Mean eGFR<sub>cystatin C</sub> was significantly higher than eGFR<sub>creatinine</sub>. eGFR<sub>cystatin C</sub> gives higher values than eGFR<sub>creatinine</sub> mainly at eGFR over 1.5 ml/s/1.73m<sup>2</sup>. Our results support the use of both eGFR<sub>creatinine</sub> and eGFR<sub>cystatin C</sub> in patients with diabetes mellitus without albuminuria or another marker of kidney damage at GFR stages 2 and 3a according to eGFR<sub>creatinine</sub>.

**Keywords:** creatinine, cystatin C, glomerular filtration rate, chronic kidney disease, Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI)

### SOUHRN

**Šálek T., Ponížil P.: Odhad glomerulární filtrace u pacientů s diabetem.**

**Cíl studie:** Cílem studie je porovnat odhadovanou glomerulární filtraci (eGFR) ze sérového kreatininu (eGFR<sub>creatinine</sub>) a cystatinu C (eGFR<sub>cystatin C</sub>) a studovat dopad těchto odhadů na detekci a klasifikaci chronického onemocnění ledvin (CKD) u pacientů s diabetes mellitus.

**Typ studie:** retrospektivní průřezová

**Název a sídlo pracoviště:** Oddělení klinické biochemie, Krajská nemocnice T. Bati a. s. Havlíčkovo nábřeží 600, Zlín 762 75

**Materiál a metody:** Studovanou populaci tvořilo 565 po sobě jdoucích diabetiků z diabetické ambulance Krajské nemocnice Tomáše Bati ve Zlíně. Sérový kreatinin a cystatin C jsme měřili standardizovanými metodami a eGFR byla počítána podle Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) rovnic, které byly vytvořeny v roce 2012. CKD je definováno jako GFR pod 1,0 ml/s/1,73m<sup>2</sup>.

**Výsledky:** Průměrná eGFR<sub>creatinine</sub> (1,443 ± 0,014) ml/s/1,73m<sup>2</sup> byla nižší než eGFR<sub>cystatin C</sub> (1,512 ± 0,017) ml/s/1,73m<sup>2</sup>, (p < 0,002). Našli jsme malou shodu v detekci CKD mezi eGFR<sub>creatinine</sub> a eGFR<sub>cystatin C</sub>. Růzdná detekce byla u 38 pacientů.

**Závěr:** Průměrná eGFR<sub>cystatin C</sub> byla významně vyšší než eGFR<sub>creatinine</sub>. eGFR<sub>cystatin C</sub> dává větší průměrné hodnoty než eGFR<sub>creatinine</sub> hlavně v oblasti eGFR nad 1,5 ml/s/1,73m<sup>2</sup>. Naše výsledky podporují společné používání eGFR<sub>creatinine</sub> a eGFR<sub>cystatin C</sub> u pacientů s diabetes mellitus bez albuminurie nebo jiného markeru poškození ledvin ve stadiu GFR 2 a 3a podle eGFR<sub>creatinine</sub>.

**Klíčová slova:** kreatinin, cystatin C, glomerulární filtrace, chronické onemocnění ledvin, Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI)

## Introduction

Diabetic patients are routinely screened for chronic kidney disease (CKD). It is included in diabetes mellitus medical clinical practice guidelines [1]. Decreased glomerular filtration rate (GFR) is a part of the definition of CKD. CKD is divided into 6 stages according to GFR: G1 ≥1.5 ml/s/1.73m<sup>2</sup>, G2 1.0 – 1.49 ml/s/1.73m<sup>2</sup>, G3a 0.75 – 0.99 ml/s/1.73m<sup>2</sup>, G3b 0.5

– 0.74 ml/s/1.73m<sup>2</sup>, G4 0.25 – 0.49 ml/s/1.73m<sup>2</sup>, G5 < 0.25 ml/s/1.73m<sup>2</sup>. The knowledge of GFR is important for the diagnosis and staging of CKD. GFR is the best overall index of kidney function [2]. Drug dosing also depends on GFR [3]. Renal function should be considered in patients with acute kidney failure and CKD [4]. Reference methods with exogenous filtration marker for measurement of GFR (mGFR) are time consuming and are available only in specialized

centres. GFR is estimated from endogenous serum markers in clinical practice. eGFR is better than reporting the concentration of these endogenous markers without estimation of GFR [5-7]. The GFR is most routinely estimated from serum creatinine, serum cystatin C and by combined equation (eGFR<sub>creatinine+cystatin C</sub>). eGFR<sub>creatinine</sub> is recommended for initial assessment of kidney function. Decreased eGFR<sub>creatinine</sub> below 1.0 ml/s/1.73m<sup>2</sup> should be confirmed by eGFR<sub>cystatin C</sub> in patients without albuminuria or other marker of kidney damage [2]. We can measure both serum creatinine and cystatin C by standardized methods. Serum creatinine level depends on muscle mass. Serum cystatin C level does not have this limitation [8]. Serum cystatin C level may be falsely changed in patients with thyroid dysfunction [9] and corticosteroid administration [10]. Increased cystatin C level is regarded as cardiovascular disease risk factor [11].

The aim of this study is to compare eGFR<sub>creatinine</sub> and eGFR<sub>cystatin C</sub> in diabetic patients and to compare our results with previous studies. We studied the impact of these two equations on the CKD staging, which is important for clinical practice, mainly for treatment. We looked at the proportion of patients who are reclassified by cystatin C based equations. The first certified reference material for cystatin C was announced in 2010 [12]. One or two years later it entered routine clinical practice. New equations were developed in 2012 and we still do not have enough information on clinical utility of these equations. The biological variation of serum markers and the uncertainty of measurement are rarely taken into account. This is the reason why we performed this study.

## Materials and methods

### Patients

The cross sectional retrospective study included 565 consecutive diabetic patients from the outpatient diabetic clinic of Tomas Bata hospital in the town of Zlín in the Czech Republic. Patients with gestational diabetes were not included. The age of participants ranged from 19 to 86 years. There were 268 females with mean age of 59±14 years and 297 males with mean age of 57±13 years.

### Laboratory methods

We measured serum creatinine by standardized photometric enzymatic method on Abbott Architect analyzer. The calibration is traceable to NIST SRM 967 reference material. Enzymatic traceable methods have lower bias than nonspecific Jaffé method [13]. Estimation of GFR from serum creatinine was calculated according to the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) equation [14]. Cystatin C was determined by standardized immunoturbidimetric technique on Abbott Architect analyzer. The calibration was traceable to DA ERM 471 reference material [12]. We used CKD-EPI equations for estimation from serum cystatin C and combined estimation from serum creatinine + cystatin C [15].

### Statistical tests

A Bland-Altman plot [16] was used to compare estimations of eGFR based on creatinine and/or cystatin. The mean of the (eGFR<sub>cystatin C</sub> + eGFR<sub>creatinine</sub>)/2 was assigned as the abscissa (x-axis) value, and the difference (eGFR<sub>cystatin C</sub> - eGFR<sub>creatinine</sub>) as the ordinate (y-axis) value. Student's t-Test was used for comparison of means. Paired t-Test was used for testing of the differences.

The study was approved by The Ethical Committee of Tomas Bata Hospital.

## Results

The mean eGFR<sub>creatinine</sub> (1.443 ± 0.014) ml/s/1.73m<sup>2</sup> was lower than eGFR<sub>cystatin C</sub> (1.512 ± 0.017) ml/s/1.73m<sup>2</sup>, (p < 0.002). It is showed at Bland-Altman plot (Fig. 1). The average difference for GFR higher than 1.5 ml/s/1.73m<sup>2</sup> (eGFR<sub>cystatin C</sub> - eGFR<sub>creatinine</sub>) is (0.156 ± 0.011) ml/s/1.73m<sup>2</sup>. It is evident that, at values of GFR < 1.0 ml/s/1.73m<sup>2</sup>, the GFR values estimated from cystatin C are lower than values estimated from creatinine. The average difference for GFR lower than 1.0 ml/s/1.73m<sup>2</sup> (eGFR<sub>cystatin C</sub> - eGFR<sub>creatinine</sub>) is - (0.067 ± 0.019) ml/s/1.73m<sup>2</sup> (p = 0.0007).

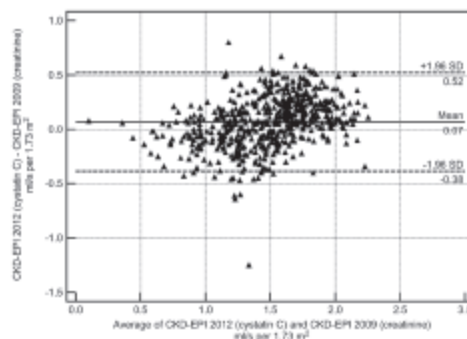


Fig. 1. Bland-Altman plot: eGFR<sub>cystatin C</sub> and eGFR<sub>creatinine</sub>

From a total amount of 565 patients, 42 of them had both eGFR<sub>cystatin C</sub> and eGFR<sub>creatinine</sub> lower than 1 ml/s/1.73m<sup>2</sup>. The total of 11 patients had eGFR<sub>cystatin C</sub> ≥ 1 ml/s/1.73m<sup>2</sup> and eGFR<sub>creatinine</sub> < 1 ml/s/1.73m<sup>2</sup>. 27 patients has eGFR<sub>cystatin C</sub> < 1 ml/s/1.73m<sup>2</sup> and eGFR<sub>creatinine</sub> ≥ 1 ml/s/1.73m<sup>2</sup>. The discrepancy was found in 38 patients. Numbers of patients according to GFR stages are given in Table 1.

Table 1: Number of patients in assigned into GFR stages by cystatin C or creatinine only and both cystatin C and creatinine.

eGFR stage	G5	G4	G3b	G3a	G2	G1
eGFR <sub>cystatin C</sub>	1	5	16	46	192	305
eGFR <sub>creatinine</sub>	1	2	12	37	232	281
eGFR by both methods	1	2	14	45	207	296

## Discussion

We found similar results of CKD-EPI  $eGFR_{\text{creatinine}}$  equation in the work by Sebastjan Bevč [17]. Authors used gold standard mGFR by  $^{51}\text{CrEDTA}$  clearance method and found high negative bias for the CKD-EPI  $eGFR_{\text{creatinine}}$  equation. Creatinine was not determined by standardized enzymatic reaction, but less specific Jaffé reaction was used.  $eGFR$  from cystatin C traceable to reference method was also used in this study.  $eGFR$  from cystatin C gave systematically higher values compared to CKD-EPI  $eGFR_{\text{creatinine}}$ . The results are similar as in our study, but the equation for  $eGFR_{\text{cystatin C}}$  was different than in our study. Work by Silverio also found underestimation of GFR estimated from serum creatinine by the CKD-EPI equation [18]. The reference method in this study was  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  clearance. Creatinine in this study was determined by Jaffé method on Roche Modular P analyzer. The third work with same direction of bias between inulin clearance mGFR and CKD-EPI  $eGFR_{\text{creatinine}}$  was demonstrated by Nicolas Rognant's work [19]. Unspecific Jaffé reaction was also employed in this study. The negative bias of the CKD-EPI  $eGFR_{\text{creatinine}}$  is greater in diabetic patients than in healthy individuals [20]. Creatinine in this study was determined by Jaffé reaction.

The main advantage of our study is the fact that both our laboratory methods are standardized. The standardization of measurement of creatinine and cystatin C is the key point for obtaining true results. Standardized cystatin C has only been available in clinical practice since 2011. If we use standardized method we get comparable results at different time and place. New CKD-EPI equations, which we use, have been available since 2012 [15].

The most important decision point of GFR is  $1.0 \text{ ml/s/1.73m}^2$ . Patients with GFR below  $1.0 \text{ ml/s/1.73m}^2$  are designated as having CKD. It means that the most important task of  $eGFR$  is the identification of the stage 3a. When we look at the ability of  $eGFR_{\text{creatinine}}$  and  $eGFR_{\text{cystatin C}}$  to identify the stages 2 and 3a, we can see that there are a significant number of patients who are identified only by one method. It may be useful to perform also  $eGFR_{\text{cystatin C}}$  in patients with  $eGFR_{\text{creatinine}}$  at stages 2 and 3a. We do not need second marker of GFR for confirmation of CKD in patients with increased albuminuria or other markers of kidney damage, because these patients fulfill the definition of CKD. Albuminuria usually precedes the decrease of kidney function [21].

The overlap is also between GFR stages 1 and 2, but it is not so clinically important.

The need for the use of two markers near the  $1.0 \text{ ml/s/1.73m}^2$  as an important decision point may be supported by the fact that each serum marker has its own biological variability [22] and an uncertainty of measurement exists [23]. Analytical performance characteristics of creatinine and their impact on  $eGFR$  are described in the work from Mayo Clinic. Small analytic changes in serum creatinine create major shifts in distribution of  $eGFR$  [24]. The issue of cystatin C is the same.

Creatinine and cystatin C are two makers of GFR in clinical practice. It is important to consider which of the markers has higher prognostic importance.

The  $eGFR_{\text{cystatin C}}$  is of higher prognostic importance than  $eGFR_{\text{creatinine}}$ . The prognostic importance for cardiovascular and overall mortality is supported by prospective The Atherosclerosis Risk in Communities Study. Any degree of decreased  $eGFR_{\text{cystatin C}}$  or any degree of albuminuria is associated with increased risk of all-cause mortality, incident coronary heart disease and incident heart failure hospitalization [25]. Results of  $eGFR_{\text{cystatin C}}$  in this study were re-expressed according to International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine ERM DA 471 reference material. CKD-EPI equation was used for estimation of GFR in this study. This standardization enables us to use the outcomes of risk evaluation from the study also for participants of our study.

The cohort of 1153 diabetic patients was derived from the prospective ESTHER study and investigators assessed the ability of  $eGFR_{\text{creatinine}}$  and  $eGFR_{\text{cystatin C}}$  to predict cardiovascular events. Authors concluded that only the cystatin C based CKD definition was an independent risk predictor for cardiovascular events in diabetic study cohort [26].

When we take into account that only low proportion of patients at CKD stage 3a is identified by both  $eGFR_{\text{creatinine}}$  and  $eGFR_{\text{cystatin C}}$ , biological variability of creatinine and cystatin C, the uncertainty of measurement of these markers and at the end better prognostic value of cystatin C, we can support the use of  $eGFR_{\text{cystatin C}}$  and  $eGFR_{\text{creatinine+cystatin C}}$  in diabetic patients without marker of kidney damage at the CKD stages 2 and 3a according to  $eGFR_{\text{creatinine}}$ .

The major limitation of our study is the lack of GFR measurement by reference method with exogenous GFR marker, but the same situation is in real clinical practice.

External quality assessment systems play important role in interlaboratory comparability of kidney function tests [27].

## Conclusion

Mean  $eGFR_{\text{cystatin C}}$  was significantly higher than  $eGFR_{\text{creatinine}}$ .  $eGFR_{\text{cystatin C}}$  gives higher values than  $eGFR_{\text{creatinine}}$  mainly at  $eGFR$  over  $1.5 \text{ ml/s/1.73m}^2$ . Our results support the use of both  $eGFR_{\text{cystatin C}}$  and  $eGFR_{\text{creatinine+cystatin C}}$  in patients with diabetes mellitus without albuminuria or another marker of kidney damage at GFR stages 2 and 3a according to  $eGFR_{\text{creatinine}}$ .

## References

1. **American Diabetes Association.** Standards of Medical Care in Diabetes – 2013. *Diabetes Care*, 2012, 36(S1), p. S11–S66.
2. **International Society of Nephrology.** Definition and Classification of CKD. *Kidney Int. Suppl.*, 2013, 3(1), p. 19–62.

3. Jones, G. R. D. Estimating Renal Function for Drug Dosing Decisions. *Clin. Biochem. Rev.*, 2011, 32(2), p. 81–8.
4. Matzke, G. R., Aronoff, G. R., Atkinson, A. J. Jr. et al. Drug Dosing Consideration in Patients with Acute and Chronic Kidney Disease – a Clinical Update from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.*, 2011, 80(11), p. 1122–1137.
5. Hostetter, T. H., Levey, A. S., Stevens, L. A. Clinical Impact of Reporting Estimated Glomerular Filtration Rates. *Clin. Chem.*, 2010, 56(9), p. 1381–3.
6. Hemmelgarn, B. R., Zhang, J., Manns, B. J. et al. Nephrology Visits and Health Care Resource Use before and after Reporting Estimated Glomerular Filtration Rate. *JAMA*, 2010, 303(12), p. 1151–8.
7. Friedecký, B. Kreatinin a odhad glomerulární filtrace. *Klinická biochemie a metabolismus*, 2007, 15(3), p. 164–7.
8. Baxmann, A. C., Ahmed, M. S., Marques, N. C. et al. Influence of Muscle Mass and Physical Activity on Serum and Urinary Creatinine and Serum Cystatin C. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 2008, 3(2), p. 348–54.
9. Den Hollander, J. G., Wulkan, R. W., Mantel, M. J., Berghout, A. Is Cystatin C a Marker of Glomerular Filtration Rate in Thyroid Dysfunction? *Clin. Chem.*, 2003, 49(9), p. 1558–9.
10. Shigemura, M., Konno, S., Nasuhara, Y., Shimizu, C., Matsuno, K., Nishimura, M. Impact of Asthmatic Control Status on Serum Cystatin C Concentrations. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2012, 50(8), p. 1367–71.
11. Taglieri, N., Koenig, W., Kaski, J. C. Cystatin C and Cardiovascular Risk. *Clin. Chem.*, 2009, 55(11), p. 1932–43.
12. Grubb, A., Blirup-Jensen, S., Lindström, V. et al. First certified reference material for cystatin C in human serum ERM-DA471/IFCC. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2010, 48(11), p. 1619–21.
13. Drion, I., Cobbaert, C., Groenier, K. H. et al. Clinical evaluation of analytical variations in serum creatinine measurements: why laboratories should abandon Jaffe techniques. *BMC Nephrol.*, 2012, 13(1), p. 133.
14. Levey, A. S., Stevens, L. A., Schmid, C. H. et al. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann. Intern. Med.*, 2009, 150(9), p. 604–12.
15. Inker, L. A., Schmid, C. H., Tighiouart, H. et al. Estimating glomerular filtration rate from serum creatinine and cystatin C. *N Engl. J. Med.*, 2012, 367(1), p. 20–9.
16. Altman, D. G., Bland, J. M. Measurement in Medicine: The Analysis of Method Comparison Studies. *The Statistician*, 1983, 32, p. 307–17.
17. Bevc, S., Hojs, R., Ekart, R., Završnik, M., Gorenjak, M., Puklavec, L. Simple Cystatin C Formula for Estimation of Glomerular Filtration Rate in Overweight Patients with Diabetes Mellitus Type 2 and Chronic Kidney Disease. *Exp. Diabetes Res.*, 2012, Sep 12. [Epub] doi:10.1155/2012/179849.
18. Silveiro, S. P., Araújo, G. N., Ferreira, M. N., Souza, F. D., Yamaguchi, H. M., Camargo, E. G. Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) Equation Pronouncedly Underestimates Glomerular Filtration Rate in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 2011, 34(11), p. 2353–5.
19. Rognant, N., Lemoine, S., Laville, M., Hadj-Aïssa, A., Dubourg, L. Performance of the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate in Diabetic Patients. *Diabetes Care*, 2011, 34(6), p. 1320–2.
20. Camargo, E. G., Soares, A. A., Detanico, A. B. et al. The Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) Equation Is Less Accurate in Patients with Type 2 Diabetes When Compared with Healthy Individuals. *Diabet. Med.*, 2011, 28(1), p. 90–5.
21. Linares-Tello, F. Rational use of laboratory tests: albuminuria. *Clin. Chem. and Lab. Med.*, 2013, 51(4), e55–e56.
22. Selvin, E., Juraschek, S. P., Eckfeldt, J., Levey, A. S., Inker, L. A., Coresh, J. Within-person Variability in Kidney Measures. *Am. J. Kidney Dis.*, 2013, 61(5), p. 716–22.
23. Dimech, W., Francis, B., Kox, J., Roberts, G. Serology Uncertainty of Measurement Working Party. Calculating Uncertainty of Measurement for Serology Assays by Use of Precision and Bias. *Clin. Chem.*, 2006, 52(3), p. 526–9.
24. Klee, G. G., Schryver, P. G., Saenger, A. K., Larson, T. S. Effects of Analytic Variations in Creatinine Measurements on the Classification of Renal Disease Using Estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR). *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2007, 45(6), p. 737–41.
25. Waheed, S., Matsushita, K., Sang, Y. et al. Combined Association of Albuminuria and Cystatin C-based Estimated GFR with Mortality, Coronary Heart Disease, and Heart Failure Outcomes: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am. J. Kidney Dis.*, 2012, 60(2), 207–16.
26. Schöttker, B., Herder, C., Müller, H., Brenner, H., Rothenbacher, D. Clinical Utility of Creatinine- and Cystatin C-Based Definition of Renal Function for Risk Prediction of Primary Cardiovascular Events in Patients With Diabetes. *Diabetes Care*, 2012, 35(4), p. 879–86.
27. Friedecký, B. Program zlepšování kvality měření sérového kreatininu. *Klinická biochemie a metabolismus*, 2006, 14(35), p. 173–6.

Do redakce došlo 14. 11. 2013

Adresa pro korespondenci  
MUDr. Tomáš Šálek  
Záhumerí 789  
687 22 Ostrožská Nová Ves  
e-mail: tsalek@saznam.cz



## eGFR a problémy interpretace rovnic CKD-EPI

Krátké sdělení - datové rozšíření a komentář k článku „Estimated glomerular filtration rate in diabetic patients“ autorů Šálek, T. a Ponižil, P.

Jabor A.<sup>1</sup>, Franeková J.<sup>1</sup>, Kubiček Z.<sup>1</sup>, Šálek T.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pracoviště laboratorních metod, IKEM Praha

<sup>2</sup>Oddělení klinické biochemie, Baťova nemocnice, Zlín

### SOUHRN

Autoři navázali na sdělení „Estimated glomerular filtration rate in diabetic patients“ autorů Šálek, T. a Ponižil, P. a expandovali původní datový soubor (N=565) o dalších 950 vyšetření. Porovnali rovnice pro odhad glomerulární filtrace (eGFR) podle doporučení KDIGO 2012 (rovnice CKD-EPI ve verzi 2009 jen pro kreatinin, verzi 2012 jen pro cystatin C a verzi 2012 pro kombinaci kreatinin + cystatin C). Autoři konstatují, že CKD-EPI rovnice poskytují odlišné hodnoty v různých pásmech glomerulární filtrace. Rovnice vycházející z cystatinu C (CKD-EPI 2012, cystatin C) poskytuje vyšší hodnoty eGFR v pásmu nad 1,5 ml/s na 1,73 m<sup>2</sup> než rovnice CKD-EPI 2009 (kreatinin), v pásmu pod 1,5 ml/s na 1,73 m<sup>2</sup> je tomu opačně. V kombinované rovnici CKD-EPI 2012 (kreatinin + cystatin C) je větší váha položena na koncentraci cystatinu C. Tato zjištění mají význam pro interpretaci a strategii použití odhadu GFR v klinické praxi.

**Klíčová slova:** kreatinin, cystatin C, glomerulární filtrace.

### SUMMARY

**Jabor A., Franeková J., Kubiček Z., Šálek T.: Estimated glomerular filtration rate and problems in the interpretation of CKD-EPI equations. (Short communication - data expansion and comments to the article „Estimated glomerular filtration rate in diabetic patients“ published by Šálek, T. and Ponižil, P.)**

Authors followed the article „Estimated glomerular filtration rate in diabetic patients“ published by Šálek, T. and Ponižil, P. We expanded original data set (N=565) with additional 950 examinations and compared equations for glomerular filtration rate estimation (eGFR) from KDIGO 2012 Guidelines (equation CKD-EPI, version 2009 for creatinine only, version 2012 for cystatin C only and version 2012 for the combination of creatinine + cystatin C). Authors concluded, that CKD-EPI equations offer different results in different intervals of glomerular filtration. Cystatin C based equation (CKD-EPI 2012, cystatin C) offers higher values of eGFR in the interval above 1.5 ml/s per 1.73 m<sup>2</sup> in comparison to the equation CKD-EPI 2009 (creatinine) and vice versa in the interval below 1.5 ml/s per 1.73 m<sup>2</sup>. Combined equation CKD-EPI 2012 (creatinine + cystatin C) is more related to the concentration of cystatin C than to the concentration of creatinine. These results may have impact on the interpretation and strategy of GFR estimation in clinical practice.

**Keywords:** creatinine, cystatin C, glomerular filtration.

## Úvod

Ve sdělení „Estimated glomerular filtration rate in diabetic patients“ [1] předkládají autoři Šálek, T. a Ponižil, P. výsledky sledování odhadované glomerulární filtrace (eGFR) odhadované pomocí recentně doporučených rovnic CKD-EPI [2]. Na skupině 565 konsekutivně vyšetřených pacientů diabetologické ambulance zjistili, že běžně používaná rovnice CKD-EPI (2009) pro odhad eGFR pouze z hodnoty sérového kreatininu, věku a pohlaví poskytuje průměrně nižší hodnoty eGFR než výpočet podle rovnice CKD-EPI (2012) ze sérového cystatinu C, věku a pohlaví. Konstatovali dále, že tento rozdíl je patrný především v oblasti hodnot nad 1,5 ml/s na 1,73 m<sup>2</sup> tělesného povrchu. Grafické znázornění hodnot pomocí rozdílového grafu naznačilo, že naopak v oblasti hodnot pod 1,5 ml/s na 1,73 m<sup>2</sup> tělesného povrchu může být výpočet využívající sérový cystatin C spojen s nižšími hodnotami eGFR. Protože Pracoviště laboratorních metod IKEM, Praha, a Oddělení klinické biochemie Krajské nemocnice T. Bati, Zlín, používají stejnou technologii a stejné principy metod,

pokusili jsme se ověřit naznačený trend v rozdílech na širším souboru pacientů s výraznějšími poruchami glomerulární filtrace.

## Metodika

Z dat laboratorního informačního systému byli vybráni všichni pacienti, u nichž bylo k dispozici současné stanovení sérového kreatininu a cystatinu C z jednoho vzorku. Někteří pacienti byli vyšetřeni opakovaně (na rozdíl od souboru ze Zlína, kde byl každý pacient pouze jedenkrát). Analyzátor Abbott Architect byl použit na obou pracovištích (Praha, Zlín), stejně jako enzymové stanovení kreatininu a cystatinu C originálními postupy firmy Abbott se stejnou návazností (NIST SRM 967, resp. DA ERM 471). Pro výpočet jsme použili rovnice CKD-EPI po otestování shody rovnic na obou pracovištích. Vzhledem k postupu použitému v původní publikaci [1] jsme rovněž použili rozdílový graf Blanda a Altmana. Terminologicky označujeme rovnice v souladu s doporučením KDIGO 2012 [2] jako:

- CKD-EPI 2009 (kreatinin) pro rovnici vycházející z kreatininu, věku a pohlaví
- CKD-EPI 2012 (cystatin C) pro rovnici vycházející z cystatinu C, věku a pohlaví
- CKD-EPI 2012 (kreatinin + cystatin C) pro kombinovanou rovnici vycházející z kreatininu, cystatinu C, věku a pohlaví.

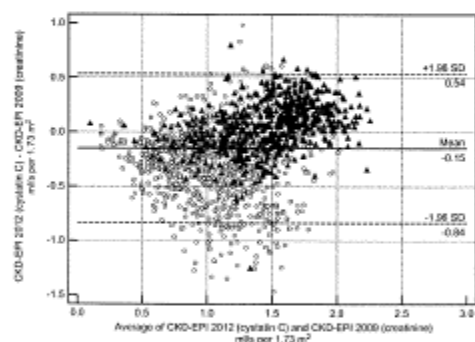
## Výsledky

Populace pacientů IKEM zahrnovala pacienty v těžším stavu s mediánem hodnot sérového kreatininu 95,7  $\mu\text{mol/l}$  a cystatinu C 1,34  $\text{mg/l}$  (Tabulka 1). Vyloučili jsme hodnoty šesti pacientů s hodnotami sérového kreatininu pod 40  $\mu\text{mol/l}$ .

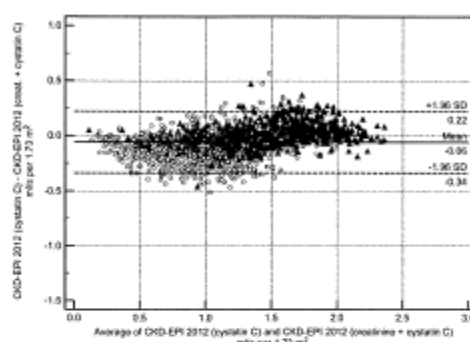
**Table 1.** Comparison of both sexes in the IKEM population of patients

	Men (N=721)		Women (N=229)	
	Median	Interquartile range	Median	Interquartile range
Serum creatinine ( $\mu\text{mol/l}$ )	100.8	84.2 – 124.1	79.0	67.8 – 107.3
Serum cystatin C ( $\text{mg/l}$ )	1.36	1.15 – 1.74	1.20	0.93 – 1.67
Age (years)	59.3	50.8 – 62.7	51.2	39.0 – 63.6
CKD-EPI 2009 (kreatinin; $\text{ml/s per } 1.73 \text{ m}^2$ )	1.185	0.916 – 1.512	1.230	0.869 – 1.454
CKD-EPI 2012 (cystatin C; $\text{ml/s per } 1.73 \text{ m}^2$ )	0.880	0.620 – 1.118	0.971	0.619 – 1.370
CKD-EPI 2012 (kreatinin + cystatin C; $\text{ml/s per } 1.73 \text{ m}^2$ )	1.001	0.750 – 1.281	1.056	0.711 – 1.409

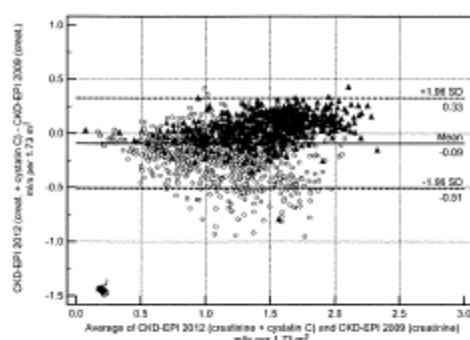
Obr. 1 představuje rozšíření dat Šálka a Ponžila [1] o populaci pacientů IKEM. Celkem je v grafu 1515 hodnot. V původním grafu Blanda a Altmana pro data z pracoviště Zlín (obrázek 1 z referencie 1) byla hodnota průměrné rozdílu +0,07 (CI -0,38 až +0,52), pro samostatná data z IKEM je průměr rozdílu -0,28 (CI -0,96 až +0,40)  $\text{ml/s na } 1.73 \text{ m}^2$ . Analogicky je na obr. 2 znázorněn vztah mezi kombinovanou rovnici CKD-EPI 2012 (kreatinin + cystatin C) a rovnici CKD-EPI 2012 (cystatin C). Konečně obr. 3 ukazuje vztah mezi kombinovanou rovnici CKD-EPI 2012 (kreatinin + cystatin C) a rovnici CKD-EPI 2009 (kreatinin).



**Fig. 1.** Relationship between eGFR calculated by CKD-EPI 2012 (cystatin C) and CKD-EPI 2009 (creatinine), described by Bland-Altman difference plot. Triangle – Hospital Zlín, open circle – IKEM Praha (Prague)



**Fig. 2.** Relationship between eGFR calculated by CKD-EPI 2012 (cystatin C) and CKD-EPI 2012 (creatinine + cystatin C), described by Bland-Altman difference plot. Triangle – Hospital Zlín, open circle – IKEM Praha (Prague)



**Fig. 3.** Relationship between eGFR calculated by CKD-EPI 2012 (creatinine + cystatin C) and CKD-EPI 2009 (creatinine), described by Bland-Altman difference plot. Triangle – Hospital Zlín, open circle – IKEM Praha (Prague)

## Diskuse

Impulsem k naší analýze byla data autorů Šálka a Ponžila, velmi zajímavě prezentovaná v samostatném sdělení [1]. Především fakt, že odhad eGFR z cystatinu C poskytuje vyšší výsledky hlavně v pásmu „fyziologických“ hodnot eGFR – což by bylo v rozporu s teorií „creatinine-blind zone“ – byl překvapující podobně jako míra rozdílu mezi výsledky rovnic, recentně publikovaných v doporučení KDIGO 2012 [2]. Problémem pro praxi může být i postoj k používání kombinované rovnice CKD-EPI 2012

z kreatininu a cystatinu C nebo samostatné použití rovnice zvlášť pro kreatinin (CKD-EPI 2009) a zvlášť pro cystatin (CKD-EPI 2012). Protože používáme na našem pracovišti stejnou technologii jako na OKB Zlín, pokusili jsme se analyzovat jak vlastní data, tak spojení obou datových souborů. Jak je patrné z Tabulky 1, v IKEM je větší zastoupení mužů, kteří jsou průměrně starší. Výpočet eGFR podle CKD-EPI 2012 z cystatinu C poskytuje v populaci pacientů IKEM nižší hodnoty než výpočet z kreatininu (podle CKD-EPI 2009), což je v souladu s daty Šálka [1]. Obr. 1 ukazuje data z obou pracovišť kumulovaně. I zde je patrné, že rovnice vycházející z cystatinu C poskytuje nižší výsledky především v oblasti hodnot pod 1,5 ml/s na 1,73 m<sup>2</sup> a naopak vyšší výsledky v normálních hodnotách eGFR. Hlubší a individuální rozbor (hlavně z hlediska možných interferencí při stanovení kreatininu) je potřebné provést u skupiny pacientů, kde je rozdíl hodnot CKD-EPI z cystatinu C a CKD-EPI z kreatininu nižší než -0,84 ml/s na 1,73 m<sup>2</sup> (obr. 1). Obr. 2 ukazuje rozdílový graf pro kombinovanou rovnici CKD-EPI 2012 (kreatinin a cystatin C) a CKD-EPI 2012 (cystatin C). Je vidět vysoká shoda a podobně i rozdílový graf mezi kombinovanou rovnici CKD-EPI 2009 (kreatinin) a CKD-EPI 2012 (kreatinin a cystatin C) ukazuje lepší shodu. Analogicky vypovídají pořadové korelace uvedené v Tabulce 2. Větší váhu v kombinované rovnici má tedy cystatin C než kreatinin (vyplyvá to z vyššího korelačního koeficientu 0,960 i z parametrů rozdílového grafu na obr. 2). Lze tedy říci, že rovnice CKD-EPI neposkytují shodná data a pro řadu situací bude výhodné přiklonit se ke kombinované rovnici z kreatininu a cystatinu C. Lze ovšem předpokládat, že nefrologická obec akceptuje po éře rovnice MDRD spíše jednoparametrovou rovnici CKD-EPI 2009 z kreatininu, věku a pohlaví.

**Table 2.** Spearman correlation of eGFR calculated by different CKD-EPI equations

Correlation	R (Spearman)	p
CKD-EPI 2012 (creatinine + cystatin C) vs. CKD-EPI 2012 (cystatin C)	0.960	<0.0001
CKD-EPI 2012 (creatinine + cystatin C) vs. CKD-EPI 2009 (creatinine)	0.868	<0.0001
CKD-EPI 2009 (creatinine) vs. CKD-EPI 2012 (cystatin C)	0.705	<0.0001

V práci se podrobněji nezabýváme analytickou stránkou věci a není možné také porovnat jednotlivé odhady GFR se zlatým standardem, kterým je i podle posledního doporučení KDIGO 2012 stále clearance inulinu [2], i když je tato metoda na pracovišti IKEM dostupná. Bylo by proto nepochybně vhodné analyzovat návaznosti metody stanovení kreatininu a cystatinu C jak v oblasti eGFR snížených (nebo velmi snížených), tak oblasti eGFR zvýšených. Porovnáním výsledků EHK v období přibližně 12 měsíců jsme zjistili, že pro kreatinin je rozdíl průměrných bias 2,5 % (průměrné bias pracoviště Zlín +1,8 %, IKEM -0,7 %), pro cystatin C je rozdíl průměrných bias 0,2 % (na pracovišti Zlín +6,3 %, IKEM +6,5 %). Tyto odchylky tedy umožňují zpracování všech dat současně. V obou na sebe navazujících sděleních byly použity standardizované metody stanovení s odpovídající návazností, ale není úplně jasné, co je důvodem pro nesouhlas - v některých případech závažný - mezi výsledky různých odhadů eGFR v různých pásmech hodnot. Pozornost si jstě

zasluhuje i problematika vícebodové kalibrace, specifických vlastností použitých diagnostických souprav, vlastní kvalita kalibrátorů v použitých diagnostických soupravách apod. Pravděpodobně hlavním faktorem, který si zasluhuje zvláštní pozornost, jsou interference léků s enzymovým stanovením kreatininu [3,4]. Především na pracovišti s vysokým podílem pacientů se závažnými oběhovými problémy může interferovat dopamin a podobné látky. Pacienti z IKEM s koncentrací kreatininu pod 40 μmol/l byli vyloučeni ze zpracování, ale jak vyplývá z obrázku 1, je určitá množina výsledků, kde je v oblasti kolem 0,75 – 1,75 ml/s na 1,73 m<sup>2</sup> výrazně vyšší eGFR podle rovnice CKD-EPI 2009 (kreatinin) než při použití výpočtu z cystatinu C. Pokud jsou předkládaná fakta platná i pro další široce používané diagnostické postupy v ČR, jsou zjištěné údaje velmi důležité z hlediska taktiky postupů pro odhad GFR.

## Závěry

Z uvedené analýzy dat dvou pracovišť (Praha, Zlín) vyplývá, že:

- 1) CKD-EPI rovnice poskytují odlišné hodnoty v různých pásmech glomerulární filtrace
- 2) rovnice vycházející z cystatinu C (CKD-EPI 2012, cystatin C) poskytuje překvapivě vyšší hodnoty eGFR v pásmu nad 1,5 ml/s na 1,73 m<sup>2</sup> než rovnice CKD-EPI 2009 (kreatinin)
- 3) v kombinované rovnici CKD-EPI 2012 (kreatinin + cystatin C) je větší váha položena na koncentraci cystatinu C
- 4) uvedené vztahy je nutné dále sledovat jak z hlediska kliniky, tak z hlediska kvality analytických metod.

## Literatura

1. Šálek, T., Ponižil, P. Estimated glomerular filtration rate in diabetic patients. *Klin. Biochem. Metab.*, 22 (43), 2014, No. 1, p. 4–7.
2. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney International Supplements*, 2013, Vol. 3(1), p. 1–150
3. Saenger, A. K., Lockwood, C., Snozek, C. L. et al. Catecholamine Interference in Enzymatic Creatinine Assays. *Clin. Chem.*, 2009, 55(9), p. 1732–1736.
4. Weber, J. A., van Zanten, A. P. Interferences in Current Methods for Measurements of Creatinine. *Clin. Chem.*, 1991, 37(5), p. 695–700.

Do redakce došlo 5. 2. 2014

Adresa pro korespondenci  
prof. MUDr. Antonín Jabor, CSc.  
Pracoviště laboratorních metod IKEM  
Vládká 1958/9, 140 21 Praha 4  
e-mail: anja@ikem.cz