

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Ústav lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF UK a FN Motol

Karolína Hrušovská

**Laboratorní vyšetření cystatinu C
u vybraných skupin pacientů**

Bakalářská práce

Praha 2013

Autor práce: **Karolína Hrušovská**

Vedoucí práce: **Ing. Karel Kotaška, Ph.D.**

Oponent práce: **Ing. Eva Klapková, Ph.D.**

Datum obhajoby: **2013**

Bibliografický záznam

HRUŠOVSKÁ, Karolína, *Laboratorní vyšetření cystatinu C u vybraných skupin pacientů*. Praha: Univerzita Karlova, 2. Lékařská fakulta, 2013, s. 49. Vedoucí bakalářské práce Ing. Karel Kotaška, Ph.D.

ANOTACE

Cílem bakalářské práce bylo ověřit možnost stanovení koncentrace cystatinu C v moči a její využití pro diagnostiku postižení ledvin. Dále byla vyhodnocována a porovnávána glomerulární filtrace vypočtená z koncentrací kreatininu a cystatinu C u pacientů s normální funkcí ledvin a u pacientů s postižením ledvin.

Koncentrace cystatinu C v séru a v moči a kreatininu v séru byly vyšetřeny u 84 pacientů rozdělených do skupin podle různého stupně postižení ledvin. První skupinu tvořili pacienti s normální funkcí ledvin charakterizovanou koncentracemi sérového kreatininu v referenčním rozmezí a druhou skupinu tvořili pacienti s postiženou funkcí ledvin charakterizovanou zvýšenou koncentrací kreatininu.

Ověřili jsme základní validační charakteristiky pro stanovení cystatinu C v moči – limit detekce = 0,25 mg/l opakovatelnost – variační koeficient (CV) = 1 %, reprodukovatelnost CV = 5 %. Prokázali jsme zvýšené koncentrace Cystatinu C v séru a v moči u pacientů s postižením ledvin (0,25 mg/l vs. 0,8 mg/l v moči resp. 0,86 mg/l vs. 2,72 mg/l v séru) a sníženou glomerulární filtraci u pacientů s renální dysfunkcí (GFR cystatin C = 1,82 ml/s/1,73 m² vs. 0,26 ml/s/1,73 m²; GFR kreatinin 1,51 ml/s/1,73 m² vs. 0,32 ml/s/1,73 m²). U pacientů s postižením funkcí ledvin byla prokázána zvýšená korelace GFR cystatinu C oproti GFR kreatininu ($r = 0,73$ vs. $r = 0,31$). GFR cystatinu C u pacientů s postižením ledvin negativně korelovala s GFR pro normální ledvinové funkce ($r = - 0,19$), zatímco korelace GFR kreatininu byla u těchto pacientů pozitivní ($r = 0,01$). Dále jsme zjistili pozitivní korelaci sérového cystatinu C oproti kreatininu u pacientů s renálním selháním ($r = 0,71$), v moči byla naopak nalezena negativní korelace ($r = - 0,16$).

Stanovení cystatinu C v séru i v moči je vhodným ukazatelem glomerulární filtrace a postižení ledvin. Byla potvrzena snížená glomerulární filtrace u pacientů s renální dysfunkcí.

ANNOTATION

The aim of bachelor's work was to evaluate concentration of cystatin C in urine and its use for diagnosis of renal impairment and evaluate glomerular filtration calculated from the concentration of creatinine and cystatine C in patients with normal renal function and patients with impaired renal function.

The concentration of cystatin C in serum and urine and creatinine in serum were investigated in 84 patients divided into groups according to the degree of renal impairment. The first group consisted of patients with normal renal function characterized by concentrations of S-creatinine within the reference range and the second group consisted of patients with renal impairment characterized by elevated serum creatinine concentrations.

We verified the basic validation characteristic for the determination of cystatin C in urine – a detection limit = 0,25 mg/l, repeatability – coefficient of variation (CV) = 1 %, reproducibility – CV = 5 %. We have demonstrated increased concentrations of cystatin C in serum and urine in patients with renal impairment (0,25 mg/l vs. 0,8 mg/l in urine or 0,86 mg/l vs. 2,72 mg/l in serum) and reduced glomerular filtration in patients with renal dysfunction (GFR cystatin C = 1,82 ml/s/1,72m² vs 0,26 ml/s/1,72m²). Increased correlation of GFR cystatin C compared to GFR creatinine was demonstrated in patients with impaired renal function ($r = 0,73$ vs. $r = 0,31$). GFR cystatin C in patients with renal impairment negatively correlated with GFR for normal renal function ($r = - 0,19$), while the correlation GFR creatinine in these patients was positive ($r = 0,01$).

We also found a positive correlation between serum cystatin C over creatinine on patients with renal failure ($r = 0,71$), in urine was, however found a negative correlation $r = - 0,16$).

Determination of cystatin C in serum and urine is proved to investigate of glomerular filtration and impairment. Decrease of glomerular filtration in patients with renal impairment was confirmed.

Klíčová slova

cystatin C, kreatinin, glomerulární filtrace

Keywords

cystatin C, creatinine, glomerular filtration

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně pod vedením Ing. Karla Kotašky, Ph.D., uvedla všechny použité literární a odborné zdroje a dodržovala zásady vědecké etiky. Dále prohlašuji, že stejná práce nebyla použita pro získání jiného akademického titulu nebo stejného akademického titulu.

V Praze 22. 4. 2013

Karolína Hrušovská

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli Ing. Karlovi Kotaškovi Ph.D. za trpělivost, odborné vedení a cenné rady, které mi byly v průběhu celé práce poskytnuty. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Blance Jedličkové za pomoc a podporu v praktické části práce.

OBSAH

ANOTACE	5
ANOTATION	6
SEZNAM ZKRATEK	11
ÚVOD	13
TEORETICKÁ ČÁST	14
1. Ledviny	14
1.1. Anatomie a fyziologie ledvin	14
1.2. Patologie ledvin	16
2. Glomerulární filtrace	18
2.1. Mechanismus glomerulární filtrace	18
2.1.1. Stanovení kreatininu	20
3. Cystatin C	25
3.1. Laboratorní vyšetření cystatinu C	26
4. CÍLE.....	27
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
5. Materiál, metody a charakteristika pacientů	28
5.1. Stanovení cystatinu C a kreatininu	28
5.2. Přístroje a doplňkový materiál	29
5.3. Charakteristika souboru pacientů	30
5.4. Statistické nástroje a analýza dat	31
6. Výsledky	32
6.1. Vyhodnocení validačních parametrů pro stanovení cystatinu C v moči	33
6.2. Stanovení cystatinu C u pacientů s různým stupněm dysfunkce ledvin	35
7. Diskuze	40
ZÁVĚR	43
SEZNAM LITERATURY	44

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

4-AAP	4 aminoantipyrin
Abs	absorbance
ADP	adenosindifosfát
Alb	albumin
ATP	adenosintrifosfát
Cl_{Krea}	clearance kreatininu
con	koncentrace
CRDIM	kreatindeimininasa
cys C	cystatin C
CV	variační koeficient
F	faktor
GMD	glutamátdehydrogenáza
GF	glomerulární filtrace
GF_{Krea}	glomerulární filtrace kreatininu
GFR	rychlost glomerulární filtrace
Krea	kreatinin
LD	laktátdehydrogenasa
LN	přirozený logaritmus
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
NAD^+	oxidovaná forma kation nikotinamidadeninukleotidu
NADH	redukována forma nikotinamidadeninukleotidu
$NADP^+$	oxidovaná forma nikotinamidadeninukleotidfosfátu
NADPH	redukována forma nikotinamidadeninukleotidfosfátu
PENIA	particle enhanced immunonephelometry assay

PETIA	particle enhanced immunoturbidimetry assay
r	Spearmanův korelační koeficient
ref	referenční
S-	sérum
S _{Alb}	albumin v séru
S _{cys C}	cystatin c séru
SD	směrodatná odchylka
S _{Krea}	kreatinin v séru
S _{Urea}	močovina v séru
SOx	sarkosinoxidasa
TNP	2,4,6 - trinitrofenol (kyselina pikrová)
TOPS	N-ethyl-N-sulfopropyl-m-toluidin
U-	moč
U _{CysC}	cystatin C v moči
U _{Krea}	kreatinin v moči
V	objem

ÚVOD

Laboratorní vyšetření funkcí ledvin patří mezi základní diagnostické postupy. Funkce ledvin je nejčastěji charakterizována prostřednictvím glomerulární filtrace (GF). Hlavními ukazateli glomerulární filtrace jsou kreatinin a cystatin C. Koncentrace kreatininu závisí na několika faktorech (věk, pohlaví, rasa) a poměru svalové hmoty. Současné studie ukazují hyperbolickou závislost koncentrace sérového kreatininu na glomerulární filtraci. Při snížení glomerulární filtrace o méně než 50 %, stoupá koncentrace kreatininu v séru minimálně. Z tohoto důvodu roste význam využití cystatinu C jako markeru glomerulární filtrace. Cystatin C se zvyšuje již v časných stádiích poškození ledvin, tedy daleko dříve, než dochází k zvýšení koncentrace kreatininu. Při akutním selhání ledvin vzestup koncentrace sérového cystatinu C předchází o 1-2 dny vzestup sérové koncentrace kreatininu [10]. Výhoda stanovení cystatinu C spočívá v tom, že není ovlivněna analytickými interferencemi tak, jako u kreatininu. Pacientům odpadá nutnost 24 hodinového sběru moči, a tak jsou eliminovány nepřesnosti ze špatného sběru moči. Hodnoty cystatinu C nejsou závislé na pohlaví.

Přítomnost cystatinu C v moči je známkou poškození glomerulů. Proto je zajímavé věnovat se laboratornímu vyšetření koncentrace cystatinu C v moči, které se dosud zcela běžně nevyužívá a mohlo by prospět ke zpestření diagnostiky ledvinového selhání.

Ve své práci se budu snažit verifikovat metodu pro stanovení cystatinu C v moči, posoudit její užitečnost v diagnostice renálního selhání u vybrané skupiny pacientů a porovnat s výsledky získanými prostřednictvím kreatininu. Dále se budu zabývat vyhodnocením úrovně glomerulární filtrace u pacientů s různým stupněm postižení ledvin.

TEORETICKÁ ČÁST

1. LEDVINY

Základní funkcí ledvin je vylučování odpadních, nepotřebných a toxických látek (močovina, kyselina močová, kreatinin, metabolity hormonů a léků). Jejich funkce je důležitá z hlediska udržování stability vnitřního prostředí neboli homeostázy. Tu představují osmotický tlak, koncentrace minerálních látek a hladina vodíkových iontů (pH prostředí). Regulaci vnitřního prostředí zajišťují glomerulární filtrace, tubulární zpětná resorpce a sekrece. Ledviny se podílejí na tvorbě biologicky aktivních látek (renin, erythropoetin, kalcitriol, či prostaglandin). V ledvinách se odehrávají základní metabolické procesy glykogeneze a aoniogeneze [1, s. 119; 2, s. 205].

Ledviny především zajišťují tvorbu moči. Její složení se mění dle potřeby organismu [3, s. 99].

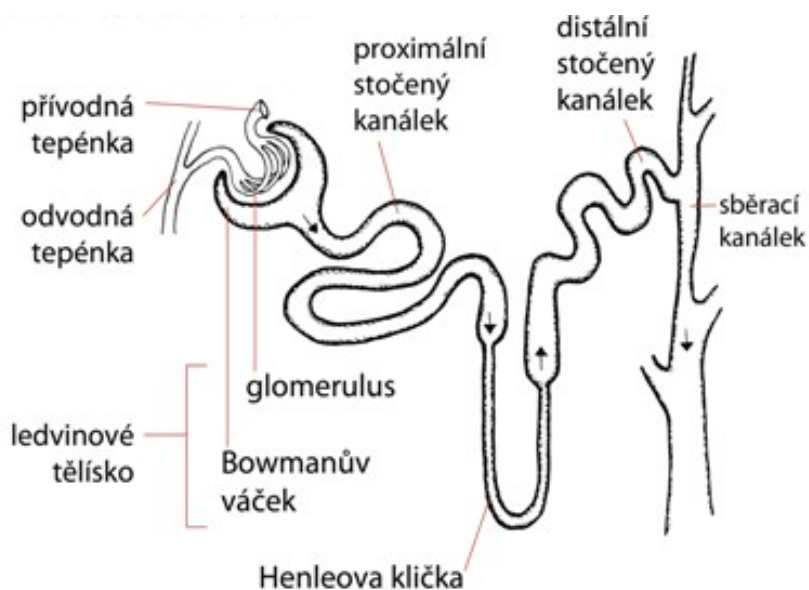
1.1. Anatomie a fyziologie ledvin

Ledviny jsou párový orgán, uložený v horní části břišní dutiny po stranách páteře. Jsou fazolovitého tvaru a červenohnědé barvy. Na povrchu je tenká vazivová blána. Tukový polštář, který ledviny obaluje, je chrání před mechanickými otřesy [3, s. 97].

Základní funkční jednotkou ledvin je nefron. Každá ledvina obsahuje asi 1,3 milionů nefronů. Nefron se skládá z části cévní a z části tubulární [4, s. 702].

Cévní část (glomerulus) je tvořena kapilárami, které jsou obklopeny tzv. Bowmanovým pouzdrem, které spolu s glomerulem tvoří Malpighiho tělísko. Bowmanovo pouzdro jednou stranou přiléhá na glomerulus a jeho druhá strana se rozevívá do tubulárního systému, který je tvořen soustavou kanálků tubulů. Hlavním kanálkem je proximální tubulus, na který navazuje sestupná a vzestupná část Henleovy kličky. Následuje distální stočený kanálek přecházející ve sběrný kanálek. Tyto části tvoří nefron, který je součástí kůry ledvin. Dřeň ledvin je tvořena pyramidovými útvary, které vycházejí ze sběracích kanálků. Ledvina je tvořena asi 7 až 9 pyramidami. Na jejich vrcholech mají vyústění sběrací kanálky. Ledvinové pyramidy se sbíhají do ledvinových kalichů a dále do ledvinové pánvičky. Ta vyúsťuje do močovodu a následně do močového měchýře [1, s. 119; 2, s. 205; 3, s. 97-98].

Ledviny jsou zásobovány břišní aortou, která přivádí krev do ledvinných tepen. Dělí se na menší přívodné tepénky a kapiláry. Tyto cévy přivádí krev do Bowmanova pouzdra a glomerulů. Zde se plazma rozděluje tak, že část se filtruje, vstupuje do tubulů a druhá část proudí nadále v cévní soustavě odvodných tepének. Tepénky se větví do kapilární sítě a spojují se ve venózní část cévního oběhu. V glomerulu dochází k filtraci krve. Při správné funkci ledvin prochází do proximálních tubulů jen nízkomolekulární látky. Vysokomolekulární bílkoviny, jsou zadrženy a vzniká primární moč. Ta je v těchto kanálcích upravována a redukována. Dochází k odstraňování přebytečné vody a metabolitů z organismu. V Henleově kličce dochází k vytvoření hypertonického prostředí kolem sběracích kanáleků a uskutečňuje se zde konečná úprava moči, tzv. zahušťování. Zahuštění moči je dáno osmotickým gradientem mezi obsahem tubulů a intersticiální tekutinou v dřeni ledvin. Vzniká moč definitivní. Hlavní složkou definitivní moči je močovina. Fyziologická moč je čirá tekutina, nažloutlé barvy se specifickým zápachem. Zdravý člověk vyloučí za den asi 1,5 litru moči [1, s. 119; 3, s. 99; 4, s. 702-703].



Obrázek 1: Základní struktura nefronu

(<http://www.samouk.cz/moodle/file.php/9/8-vylucovací-soustava-kuze/vylucovací-kuze-4.PNG>)

1.2. Patologie ledvin

Poruchy funkce ledvin nastávají z důvodu nefunkčnosti či nedostatečnosti. Dochází k poruše tubulární, nebo glomerulární části. Ve většině případů, zvláště v pozdějších stádiích onemocnění, dochází k poškození celého nefronu [1, s. 119].

Primární poškození glomerulů vede k poklesu glomerulární filtrace. Hlavním příznakem bývá patologický nálezn proteinů v moči. Nadměrné vylučování bílkovin do moči, tzv. proteinurie, způsobuje hypoproteinémii a hyperlipoproteinémii a vzniká nefrotický syndrom. Při diabetické nefropatii dochází k mikroalbuminurii [4, s. 730; 5, s. 119-120].

Jiná onemocnění způsobují poškození tubulární části. Mezi tato onemocnění patří nefrogenní diabetes insipidus, intersticiální nefritida, proximální či distální renální tubulární acidóza (intoxikace rtutí či kadmíem). Onemocnění se projevuje především poruchou složení vnitřního prostředí (např. metabolická acidóza) nebo abnormálním výskytem metabolitů a proteinů, které se v moči za fyziologických podmínek nevyskytují. Poruchy tubulů mohou vést až k vývoji mnohočetných cyst v ledvinách, které může přejít až v selhání ledvin [4, s. 730; 5, s. 119-120].

Onemocnění většinou postihnou obě části nefronu, jak glomerulární tak i tubulární část. Mezi onemocnění ledvin patří tzv. nedostatečnost ledvin neboli renální insuficience. Tímto termínem se označuje stav, kdy ledviny jsou schopny udržet stabilitu vnitřního prostředí jen při zachování určitých omezení. Patří sem například snížení příjmu bílkovin, regulace příjmu tekutin a minerálů [5, s. 225-226].

Nejzávažnějším případem je selhání ledvin. V tomto případě je míra poškození ledvin tak velká, že ledviny nejsou schopny udržovat stálost vnitřního prostředí ani při zachování omezujících podmínek. Selhání ledvin dělíme na akutní a chronické. Akutní selhání ledvin se rozvíjí během několika hodin až dnů. Příčinou může být rychle progredující glomerulonefritida, hypoperfúze, obstrukční uropatie, zánět, či působení toxických jedů. Během několika dnů se začne vyvíjet oligoanurie, dojde k vzestupu močoviny a kreatininu a k poruše homeostázy. Dochází k reverzibilnímu poklesu exkrece-metabolické funkce ledvin a k poklesu diurézy. Při chronickém selhání ledvin se ze začátku obtíže u pacientů neobjevují, selhání ledvin se postupně vyvíjí po dobu několika let. V ledvinách dokáží ke kompenzačním dějům, kde reziduální nefrony účinně nahrazují funkci poškozených, či zaniklých nefronů. Tím je udržována diuréza i homeostáza minerálů. Dochází k výrazným změnám ve složení extracelulární tekutiny. Chronické onemocnění ledvin může být způsobeno diabetickou

nefropatií, chronickou glomerulonefritidou, ischemickou nefropatií nebo polycystickými ledvinami [5, s. 120-122; 6, s. 226; 7, s. 323-324,330; 8, s. 259; 279].

2. GLOMERULÁRNÍ FILTRACE

Glomerulární filtrace (GF) je důležitá z hlediska posouzení funkce ledvin. Míra snížení GF je významným ukazatelem stupně závažnosti poškození ledvin [9, s. 3].

GF pomáhá udržet stálost vnitřního prostředí. Její velikost je dána poměrem rozdílu tlaku v přívodné a odvodné tepénce a tlaku v Bowmanově pouzdře. Tento děj označujeme jako filtrační tlak. Velikost glomerulární filtrace závisí na propustnosti glomerulární membrány, gradientu hydrostatických a onkotických tlaků a velikosti filtrační plochy. Fyziologická hodnota velikosti glomerulární filtrace je 2 ml/s/1,73 m² [6, s. 226; 9, s. 3].

Glomerulární filtraci stanovuje pomocí látek, které jsou vylučovány filtrací a nejsou již dále v tubulech zpětně resorbovány ani secernovány. Mezi tyto látky patří kreatinin, cystatin C, inulin a další. GF může měřit přímo. Toto měření je ale komplikované a náročné. Nejčastěji GF měříme nepřímo, a to jako tzv. renální clearanci. Velikost GF můžeme spočítat podle výpočtových vzorců. V tomto případě se jedná o odhad glomerulární filtrace. U žen je hodnota GF asi o 8 % nižší. Hodnota GF s věkem klesá. Nižší hodnoty než referenční hodnoty ukazují na sníženou funkci ledvin [5, s. 128; 6, s. 226; 7, s. 39-40].

Tabulka 1: Vzájemný vztah mezi selháním ledvin a glomerulární filtrací [10]

Stupeň selhání ledvin	Pásmo GF (ml/s)	Popis
1.	nad 1,5	Postižení ledvin s normální nebo zvýšenou GF
2.	1,0 – 1,49	Postižení ledvin s mírně sníženou GF
3.	0,5 – 0,99	Středně snížená GF
4.	0,25 - 0,49	Závažně redukováná GF
5.	pod 0,25 nebo dialýza	Selhání ledvin

2.1. Mechanismus glomerulární filtrace

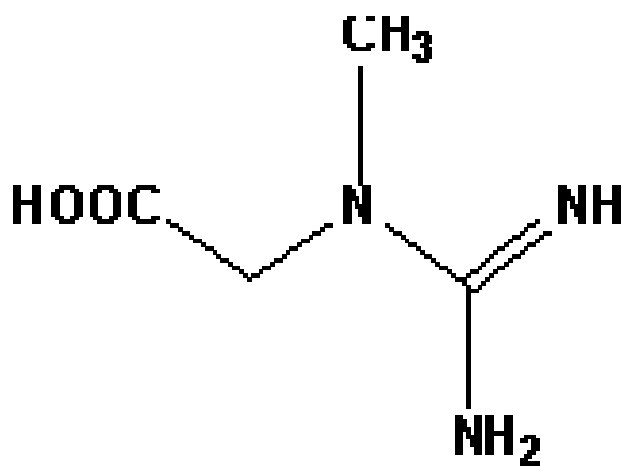
Krev přiváděná do ledvin je dále distribuována pomocí cév do glomerulů a následně filtrována přes stěny vlásečnic. Vzniká primární moč, která obsahuje kromě vody i minerály, aminokyseliny, sacharidy a další látky [3, s. 98-99].

Ledviny během dne přefiltrují až 180 litrů primární moči. Toto množství je upraveno na definitivní moč o objemu 1 – 1,5 litrů moče a dále eliminováno. Zbytek je vracen zpět do krevního oběhu [5, s. 128].

Hodnocení glomerulární filtrace

GF můžeme nejčastěji hodnotit prostřednictvím clearance kreatininu případně cystatinu C [6, s. 226-227].

Kreatinin je konečný produkt svalového metabolismu. Vzniká ve svalových buňkách z kreatinfosfátu (fosforylovaná molekula kreatinu). Kreatin je syntetizován v játrech z methioninu, glycinu a argininu. Kreatinfosfát slouží jako pohotovostní zdroj energie (pro doplňování adenosintrifosfátu - ATP). Kreatinin vzniká neenzymovou dehydratací a defosforylací. Poté je uvolňován do krve. Je transportován do ledvin, kde je filtrován z 90 %. Za normálních okolností je 10 % kreatininu secernováno do moče v proximálním tubulu [1, s. 120; 8, s. 298; 11, s. 88; 12; 13, s. 352].



Obrázek 2: Vzorec kreatininu

(http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/AJDJX.htm)

Kreatinin je produkován periodicky a relativně stálou rychlostí. Používá se jako marker glomerulární filtrace. Glomerulární filtrace je posuzována prostřednictvím výpočtu clearance kreatininu [2, s. 215].

Při poklesu glomerulární filtrace dochází ke snižování vylučování kreatininu a tím jeho hodnota v séru stoupá. Ke zvýšení hladiny koncentrace kreatininu v séru dochází při snížení glomerulární filtrace pod 50 %. K rychlému vzestupu hladiny koncentrace kreatininu může dojít při totálním selhání ledvin, při nadměrném uvolnění kreatininu ze svalů nebo při snížení objemu tekutin v těle [1, s. 120].

Hodnota kreatininu je ovlivnitelná několika faktory. Jeho hladina je především závislá na množství svalové hmoty, svalovém metabolismu, tělesné hmotnosti, koncentraci proteinů v těle, věku, pohlaví, rase a jiných [10].

Hodnota kreatininu v séru závisí na distribučním objemu mimobuněčné tekutiny. Při jeho zvětšování dochází ke snižování plazmatické koncentrace kreatininu. To vede k nepřesným výpočtům glomerulární filtrace [14].

Nepřesné výsledky glomerulární filtrace mohou být způsobeny špatným sběrem moče [6, s. 228].

2.1.1. Stanovení kreatininu

Kreatinin vyšetřujeme v séru, plazmě a moči. Před vyšetřením se nedoporučuje dieta s vyšším obsahem mastných kyselin a větší tělesná zátěž [15].

Jaffého reakce

Jaffého reakce patří mezi základní stanovení kreatininu. Metoda je založena na principu reakce kreatininu s kyselinou pikrovou (TNP) v alkalickém prostředí. Spolu s kreatininem reaguje s kyselinou pikrovou i glukosa, kyselina močová, askorbát, acetacetát, pyruvát a léky zvyšující sérový kreatinin (cimetidin, trimetoprim). Tyto látky označujeme jako Jaffé pozitivní chromogeny. Jejich přítomnost ve vzorku snižuje specifitu stanovení [1, s. 222; 2, s. 215; 15].

Pozitivní reakce dává červenooranžové zbarvení. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci kreatininu ve vzorku. Ten stanovujeme spektrofotometricky. Měříme při vlnové délce 340 nm [2, s. 215; 16, s. 3].

Enzymové stanovení

Enzymové stanovení kreatininu je založeno na využití specifických enzymů.

První variantou je Tanganelliho reakce. Kreatinin je za přítomnosti kreatindeimininasy (CRDIM) rozložen na amoniak a N-methylhydantoin. Za katalýzy glutamátdehydrogenázy (GMD) následně vzniká z amoniaku, 2-oxoglutarátu a NADPH glutamát a NADP^+ . Výsledná koncentrace kreatininu je přímo úměrná úbytku NADPH. Dochází ke změně absorbance, která se měří kineticky při 340nm [1, s. 223; 17].

Druhou variantou je přeměna kreatininu na sarkosin. Oxidací sarkosinoxidasou (SOx) vzniká glycin, formaldehyd a peroxid vodíku. Ten se stanoví Trinderovou reakcí. Reakcí s 4-aminoantipyrinem (4-AAP) a N-ethyl-N-sulfopropyl-m-toluidinem (TOPS) červeně zbarvený komplex. Intenzita zbarvení komplexu je při 522 nm přímo úměrná koncentraci kreatininu v séru [1, s. 223; 17].

Třetí variantou je přeměna kreatininu na kreatinfosfát a adenosindifosfát (ADP) za pomoci hexokinasy. Za přítomnosti pyruvátkinasy a fosfoenolpyruvátu dojde k přeměně na pyruvát a adenosintrifosfát (ATP). Dále laktátdehydrogenasa (LD) oxiduje NADH na NAD⁺. Současně dochází k redukci pyruvátu na laktát. Úbytek absorbance je přímo úměrný koncentraci kreatininu. Měříme kineticky při 340 nm [1, s. 223; 17].

Clearance kreatininu

Clearance je definována jako objem plazmy, který se očistí od dané látky za určitou časovou jednotku. Tuto látku pak můžeme vypočítat jako podíl téže látky vyloučené do moče (za jednotku času) a její koncentrací ve vzorku [5, s. 128-129].

Clearance kreatininu je vhodná pro určení GF, zejména v případě, kdy velikost GF nepřekročila ještě 50%. Její hodnota neodpovídá přesné hodnotě GF. Hodnota je vyšší o faktor 1,1 – 1,2 [2, s. 219; 18, s. 2].

Výsledná hodnota glomerulární filtrace za pomoci výpočtu clearance kreatininu je založena na předpokladu konstantní produkce kreatininu, kdy je kompletně secernován do moči, a ve vzorku nejsou žádné interferující látky. Ve většině případů nejsou tato kritéria splněna. Vzhledem k tomu, že kreatinin je částečně reabsorbován (10 %) je výsledek GF pomocí clearance nadhodnocován. Clearance kreatininu je proto o 10 – 20 % větší než je skutečná hodnota glomerulární filtrace [2, s. 215; 16, s. 2].

Clearance kreatininu se vypočítá dle rovnice:

$$Cl_{Krea} \approx GF_{Krea} = \frac{U_{Krea} \cdot V}{S_{Krea}}$$

Cl_{Krea}	= clearance kreatininu	[ml/s/1,73m ²]
GF_{Krea}	= glomerulární filtrace kreatininu	[ml/s/1,73m ²]
U_{Krea}	= koncentrace kreatininu v moči	[mmol/l]
S_{Krea}	= koncentrace kreatininu v séru	[μmol/l]
V	= objem moči (diuréza)	[ml]

Clearance kreatininu stanovujeme v moči i séru. Vyšetření se provádí jednorázově v případech, že moč je sbírána jedno sběrné období. Nejčastěji po dobu 24 hodin, nebo děleně, kdy je moč sbírána ve více intervalech. Nejčastěji ve čtyřech tříhodinových intervalech přes den a třech čtyřhodinových intervalech přes noc [6, s. 227].

Možnosti výpočtu GFR jsou shrnuty v tabulce 2.

Tabulka 2: Možnosti výpočtu glomerulární filtrace

NÁZEV	ROVNICE	CITACE
Odhad glomerulární filtrace podle rovnice Cockcrofta a Gaulta	$GFR = \frac{(140 - \text{Věk}) \cdot \text{hmotnost}}{48,8 \cdot S_{\text{Krea}}} \cdot F \text{ [ml/l/1,73m}^2\text{]}$ (F= 1,0 pro muže, 0,85 pro ženy)	[11, s. 93]
Odhad glomerulární filtrace u dětí podle rovnice dle Schwartze	$GF = \frac{F \cdot \text{výška}}{S_{\text{Krea}}} \text{ [ml/l/1,73m}^2\text{]}$ F: do 1 roku = 0,663 od 1-12 let = 0,810 věk od 12 – 18 let = 0,959	[9, s. 9]
Odhad glomerulární filtrace pomocí rovnice MDRD	<u>Tříparametrová (kreatinin, urea, albumin):</u> $GFR \text{ (MDRD1)} = 2,83 \cdot (S_{\text{Krea}} \cdot 0,0113)^{-0,999} \cdot \text{věk}^{-0,176} \cdot (S_{\text{Urea}} \cdot 2,8)^{-0,17} \cdot (S_{\text{Alb}}/10)^{0,318} \cdot F \text{ [ml/l/1,73m}^2\text{]}$ (F= 1,0 pro muže, 0,762 pro ženy) <u>Dvoupametrová (Kreatinin, urea):</u> $GFR \text{ (MDRD2)} = 4,5 \cdot (S_{\text{Krea}} \cdot 0,0113)^{-1,007} \cdot \text{věk}^{-0,180} \cdot (S_{\text{Urea}} \cdot 2,8)^{-0,169} \cdot F \text{ [ml/l/1,73m}^2\text{]}$ (F= 1,0 pro muže, 0,762 pro ženy) <u>Jednparametrová (Kreatinin):</u> $GFR \text{ (MDRD3)} = 3,1 \cdot (S_{\text{Krea}} \cdot 0,0113)^{-1,154} \cdot \text{věk}^{-0,203} \cdot F \text{ [ml/l/1,73m}^2\text{]}$ (F= 1,0 pro muže, 0,742 pro ženy)	[11, s. 94]
Odhad glomerulární filtrace pomocí rovnice dle Grubba	$GFR = 1,4115 \cdot S_{\text{cyst C}}^{-1,68} \cdot F \text{ [ml/l/1,73m}^2\text{]}$ (F= 1,0 pro muže, 0,948 pro ženy, 1,384 pro děti do 14 let)	[19, s. 110]
Leveyova rovnice	$GFR = 1,278 \cdot S_{\text{cyst C}}^{-1,68} \text{ [ml/s/1,73m}^2\text{]}$	[9, s. 8]
Odhad glomerulární filtrace pomocí rovnice Lund-Malmö	$GFR = e^{x-0,0124 \cdot \text{věk} + 0,339 \cdot (\text{LN}(\text{věk}) - 0,226 \text{ (ženy)})} \text{ [ml/l/1,73m}^2\text{]}$ $x = 4,62 - 0,0112 \cdot S_{\text{Krea}} \text{ (pro } S_{\text{Krea}} < 150\mu\text{mol/l)}$ $x = 8,17 + 0,0005 \cdot S_{\text{Krea}} - 1,07 \cdot \text{LN}(S_{\text{Krea}}) \text{ (kde } S_{\text{Krea}} \geq 150\mu\text{mol/l)}$	[20, s. 3]

GFR	= glomerulární filtrace	[ml/s/1,73m ²]
S _{Krea}	= koncentrace kreatininu v séru	[μmol/l]
S _{Urea}	= koncentrace močoviny v séru	[mmol/l]
S _{Alb}	= koncentrace albuminu v séru	[g/l]
S _{cys C}	= koncentrace cystatinu C v séru	[mg/l]
LN	= přirozený logaritmus	
Výška		[cm]
Věk		[roky]
Hmotnost		[kg]

Odhad GF podle rovnice Cockcrofta a Gaulta

Clearance kreatininu dle Cockcrofta a Gaulta lze vypočítat na základě koncentrace kreatininu v séru a není již nutný sběr moči. Rovnice již zahrnuje ukazatele, které ovlivňují velikost glomerulární filtrace (věk, pohlaví a hmotnost) (Tabulka 2) [11, s. 93].

Odhad glomerulární filtrace u dětí podle rovnice dle Schwartz

Výpočet glomerulární filtrace podle rovnice dle Schwartz je určena především pro děti a mladistvé do věku 18 let (Tabulka 2) [9, s. 9].

Odhad glomerulární filtrace pomocí rovnice MDRD

Rovnice MDRD (Modification of Diet in Renal Disease), je v současné době doporučována pro odhad glomerulární filtrace. Pomocí této rovnice určíme glomerulární filtraci při chronickém onemocnění ledvin. Rovnice pro odhad GF byla převzata z multicentrické studie. V této studii autoři navrhli vzorec pro predikaci glomerulární filtrace vyplývající z multivariantní regresní analýzy na podkladě sérové koncentrace kreatininu (S_{Krea}), močoviny (S_{Urea}) a albuminu (S_{Alb}) a základních demografických veličin [11, s. 94].

Rovnice MDRD je uvedena v tabulce 2 a byla použita k výpočtu glomerulární filtrace v naší práci.

Odhad glomerulární filtrace pomocí rovnice dle Grubba

Rovnice dle Grubba byla použita pro výpočet GFR cystatinu C v naší práci (Tabulka 2) [19, s. 110].

Leveyova rovnice

Leveyova rovnice se používá při stanovení cystatinu C metodou PENIA (particle enhanced immunonephelometry assay) (Tabulka 2) [9, s. 8].

Odhad glomerulární filtrace pomocí rovnice Lund-Malmö

Rovnice může být použita u dospělých i u dětí od 1 roku života. Je použitelná v rozsahu koncentrace kreatininu v séru od 45 do 545 $\mu\text{mol/l}$. Rovnice Lund – Malmö je uvedena v tabulce 2 [20, s.3; 21, s. 37].

3. CYSTATIN C

Cystatin C patří do skupiny cysteinových proteáz. Je produkován všemi jadernými buňkami. Molekulová hmotnost je 13,3 kDa. Je přítomen v tělních tekutinách (krev, mozkomíšní mok a mateřské mléko). Výskyt v moči je patologický [2, s. 216].

Cystatin C je vylučován periodicky. Volně prochází glomeruly a poté je resorbován proximálním tubulem zpět do oběhu a není již dále secernován [2, s. 216; 11, s. 91-93].

Struktura cystatinu C je znázorněna na obrázku 3.



Obrázek 3: Molekula cystatinu C

(https://en.wikipedia.org/wiki/File:Cystatin_C_1r4c.png)

Cystatin C je významným ukazatelem ledvinových onemocnění. Lze jej prokázat již v časných stádiích postižení ledvin, tedy v případech, neklesne-li glomerulární filtrace pod 50 %. Cystatin C nepodléhá cirkadiálním rytmům a jeho koncentrace není závislá na množství svalové hmoty ani jiných parametrech [11, s. 91-92].

Metabolismus a vylučování

Cystatin C je filtrován z krve glomeruly, jejichž stěnou prostupuje voda a v ní rozpuštěné látky. Krevní buňky a větší proteinové molekuly jsou zachytávány na stěnách cév. Vytváří se primární filtrát. Poté je cystatin C reasorbován spolu s glukózou a dalšími látkami.

Zbývající složky jsou vyloučeny do moči. Reabsorbovaný cystatin C je po vytvoření glomerulárního filtrátu odbourán a do krevního oběhu se již nevrací. Na jeho zpětné resorpci se podílí membránový přenašeč zvaný megalin. Zvýšená koncentrace cystatinu C se objevuje v důsledku snížené funkce ledvin, dochází-li ke snížení rychlosti tvorby filtrátu. Vylučování cystatinu C do moči je patologický stav, a poukazuje tak na postižení funkce ledvin [10; 15; 11, s. 91-92].

3.1. Laboratorní vyšetření cystatinu C

Koncentrace Cystatinu C na rozdíl od kreatininu není ovlivňována množstvím svalové hmoty, pohlavím, věkem ani rasou [11, s. 92].

Koncentrace cystatinu C roste s poklesem GF. Při poškození tubulů se koncentrace cystatinu C v moči zvyšuje. Zvýšené hodnoty cystatinu C však můžeme zaznamenat i v případě, že hodnota glomerulární filtrace je normální. Koncentraci cystatinu C vyšetřujeme v séru a plazmě [5, s. 128-130; 18, s. 264].

Cystatin C stanovujeme pomocí imunochemických metod. Metoda PENIA (particle enhanced immunoturbidimetry assay) pracuje na principu imunonefelometrie. Metoda PETIA (particle enhanced immunonephelometry assay) pracuje na principu imunoturbidimetrie. K zesílení citlivosti reakce se používá latexových částic s vázanou protilátkou. Pro metodu PENIA se používá ke kalibraci purifikovaný cystatin C izolovaný z lidské moče a pro metodu PETIA se používá rekombinantní lidský cystatin C [22].

Principem reakce je aglutinace séra (plazmy) obsahujícího antigen a protilátkou navázanou částici. Intenzita vzniklého zákalu se měří při vlnové délce 545 nm [23, s. 4].

Současné studie ukazují, že stanovení cystatinu C v moči by mohlo lépe reflektovat glomerulární filtraci [10].

4. CÍLE PRÁCE

- 1. Stanovit cystatin C v moči u zdravých jedinců a vyhodnotit základní validační charakteristiky (limit detekce, limit stanovitelnosti, opakovatelnost a reprodukovatelnost)**

- 2. Vyhodnotit korelaci koncentrace kreatininu, cystatinu C a GFR kreatininu a cystatinu C v séru a v moči ve vybrané skupině pacientů (pacienti s koncentrací sérového kreatininu v referenčním rozmezí, pacienti se zvýšenou koncentrací sérového kreatininu.)**
 - a. U pacientů s normální funkcí ledvin charakterizovanou hladinou sérového kreatininu v referenčním rozmezí a normální glomerulární filtrací.**

 - b. U pacientů s renální dysfunkcí charakterizovanou zvýšenou koncentrací sérového kreatininu a sníženou glomerulární filtrací.**

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5. MATERIÁL, METODY A CHARAKTERISTIKA PACIENTŮ

5.1. Stanovení cystatinu C a kreatininu

Tabulka 3: Chemikálie a reagenty pro stanovení cystatinu C

Název	Výrobce
Cystatin C Immunoparticles	Dako Cytomation
Reaction buffer 9	Dako Cytomation

Reagenty v setu:

Reagent R1: reakční pufr 9

Reagent R2: králičí protilátka proti lidskému imunoglobulinu A

Pomocné roztoky:

- 0,9% NaCl
- 3,6% NaOH
- kyvetový kondicionér
- inkubační olej
- Reagent Probe Wash 1
- Reagent Probe Wash 2
- Reagent Probe Wash 3
- deionizovaná voda

Tabulka 4: Chemikálie a reagenty pro stanovení kreatininu

Název	Výrobce
Enzymatic Creatinine_2 (ECRE_2)	Siemens Medical Solutions Diagnostics

Reagencie v setu:

Reagencie R1: (4 x 38 ml)

- Kreatináza	75 U/ml
- Sarkozinioxidáza	20 U/ml
N-(3-sulfopropyl)-3-metoxy-5-metylanilin	0,9 mmol/l

Reagencie R2: (4 x 15,4 ml)

- Kreatinináza	400 U/ml
- A-aminoantipyrin	6,1 mmol/l
- Peroxidáza	50 U/l
- azid sodný	0,095%

Pomocné roztoky

- 0,9% NaCl
- 3,6% NaOH
- Kyvetový kondicionér
- inkubační olej
- Reagent Probe Wash 1
- Reagent Probe Wash 2
- Reagent Probe Wash 3
- deionizovaná voda

5.2. Přístroje a doplňkový materiál

Přístroje a přídavná zařízení

- Automatický biochemický analyzátor ADVIA 1800
- Universal Rack handling Systém
- Pipety
- Mikropipety 100 µl, 200 µl
- Vortex (Vepl scientifica)

Doplňkový materiál

- Cup B ADVIA (Siemens)
- automatické pipety
- špičky žluté
- zkumavky ependorf 1,5 ml
- stojan na zkumavky ependorf 1,5 ml

5.3. Charakteristika souboru pacientů

Do studie bylo zařazeno celkem 84 pacientů. Pacienti byli rozděleni do dvou skupin dle závažnosti poškození ledvin. První skupinu tvořili pacienti s normální funkcí ledvin, tedy s normální hodnotou glomerulární filtrace a koncentrací sérového kreatininu v referenčním rozmezí. Druhou skupinu tvořili pacienti s poruchou funkce ledvin, jejichž koncentrace sérového kreatininu byla zvýšená a hodnota glomerulární filtrace snižena. Tam, kde tyto parametry nebyly dostupné, byly doměřeny koncentrace kreatininu v moči a dopočteny hodnoty glomerulární filtrace. Charakteristika souboru pacientů je shrnuta v tabulce 5.

Hodnoty jednotlivých parametrů jsou vyjádřeny jako medián \pm směrodatná odchylka (SD).

Tabulka 5: Charakteristika pacientů

	Počet (muži/ženy)	věk (roky) (rozmezí)	S- Kreatinin [$\mu\text{mol/l}$]	U- Kreatinin [mmol/l]	S- Cystatin [mg/l]	U- Cystatin [mg/l]	GFR-K sérum [ml/s/1,73m^2]	GFR-C - sérum [ml/s/1,73m^2]
Pacienti s normální funkcí ledvin	51 (19/33)	44 (18-70)	66 ± 13	$10,56 \pm 8,24$	$0,86 \pm 0,11$	$0,25 \pm 0,00$	$1,51 \pm 0,30$	$1,82 \pm 0,39$
Pacienti s poruchou funkce ledvin	33 (27/6)	53 (17-87)	$288 \pm 246,03$	$4,9 \pm 3,96$	$2,72 \pm 1,37$	$0,8 \pm 2,00$	$0,32 \pm 0,16$	$0,26 \pm 0,17$

S-kreatinin – kreatinin v séru, U-kreatinin – kreatinin v moči, S-cystatin C – cystatin C v séru, U-cystatin C – cystatin C v moči, GFR–K – odhad glomerulární filtrace prostřednictvím kreatininu v séru, GFR–C – odhad glomerulární filtrace prostřednictvím cystatinu C v séru.

Rozdíly mezi koncentracemi kreatininu a cystatinu C v séru a moči a rozdíly v hodnotách GFR v obou skupinách byly statisticky významné ($p < 0,0001$ – Mann Whitneyův U-test)

5.4. Statistické nástroje a analýza dat

D'Agostinův Pearsonův test byl použit k ověření normálního rozložení dat obou souborů. Vzhledem k tomu, že rozložení dat v souborech nebylo parametrické, použili jsme k porovnání výsledků v jednotlivých skupinách neparametrický Mann-Whitneyův U-test a Spearmanův korelační koeficient. Hodnota $p < 0,05$ byla stanovena jako hladina významnosti.

K vyhodnocení dat byl využit software GraphPad Prism verze 5.0 (San Diego, California).

6. VÝSLEDKY

6.1. Vyhodnocení validačních parametrů pro stanovení cystatinu C v moči

Validační parametry pro stanovení cystatinu C v moči byly definovány na základě předdefinovaných parametrů pro stanovení cystatinu C v séru. Byla připravena šesti bodová kalibrace cystatinu C. Jako nulový kalibrátor byla použita destilovaná voda. Ředění standardů se provádí automaticky v analyzátoru podle definovaných parametrů metody.

Stanovovali jsme následující parametry: mez detekce, mez stanovitelnosti, opakovatelnost a reprodukovatelnost.

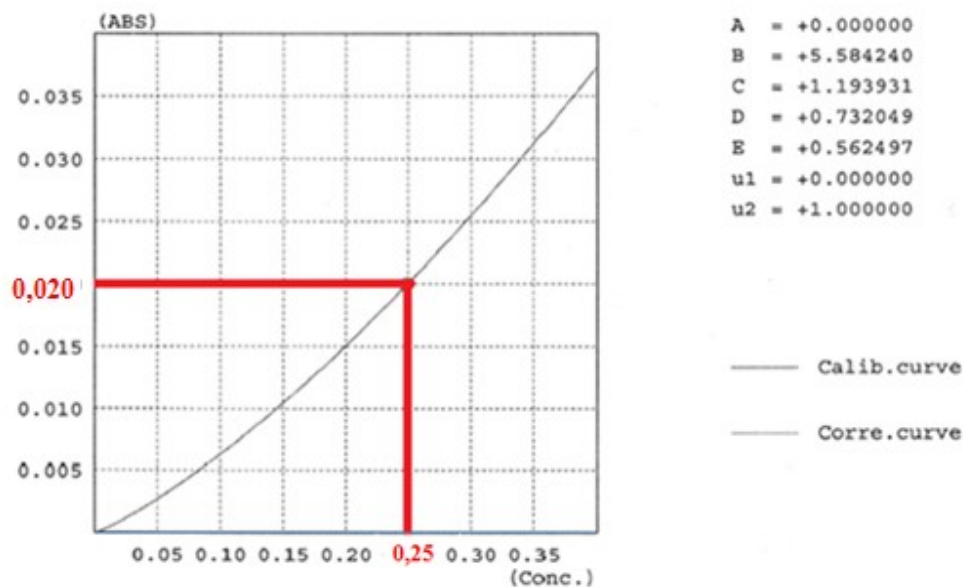
Mez detekce

Pro měření meze detekce byla 10krát změřena absorbance slepého vzorku. Jako slepý vzorek byla použita destilovaná voda. Z uvedených výsledků byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Absorbance odpovídající mezi detekce byla vypočítána jako trojnásobek směrodatné odchylky. Hodnota koncentrace 0,25 mg/l pro mez detekce byla odečtena z kalibrační křivky (Obrázek 4). Výsledky hodnot absorbancí jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6: Hodnoty absorbancí pro mez detekce

Měření	Absorbance
1.	0,75104
2.	0,74887
3.	0,75668
4.	0,76021
5.	0,75107
6.	0,75428
7.	0,74407
8.	0,75073
9.	0,73853
10.	0,74054
Průměr	0,749602
Směrodatná odchylka	0,006879
Limit detekce (LOD)	0,02

Obrázek 4 : Graf kalibrační křivky pro mez detekce

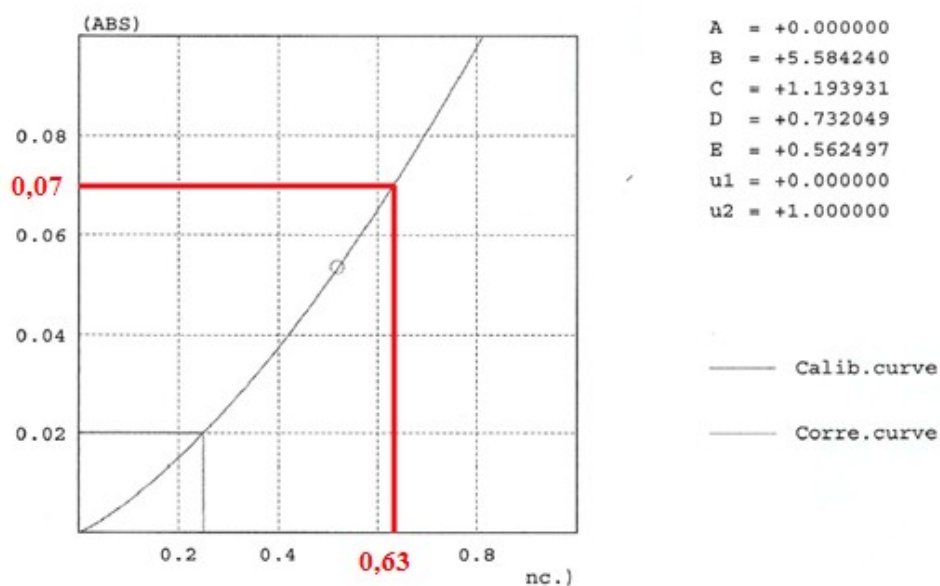


Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti byla vypočítána jako desetinásobek průměrné hodnoty absorbance směrodatné odchylky. Hodnota koncentrace 0,63 mg/l pro mez stanovitelnosti byla odečtena z grafu (Obrázek 5). Jednotlivé hodnoty absorbancí jsou zaznamenány v tabulce 7.

Tabulka 7: Hodnoty absorbancí pro mez stanovitelnosti

Měření	Absorbance
1.	0,75104
2.	0,74887
3.	0,75668
4.	0,76021
5.	0,75107
6.	0,75428
7.	0,74407
8.	0,75073
9.	0,73853
10.	0,74054
Průměr	0,749602
Směrodatná odchylka	0,006879
Limit stanovitelnosti (LOQ)	0,07

Obrázek 5: Graf kalibrační křivky pro mez stanovitelnosti**Opakovatelnost**

Opakovatelnost byla stanovena měřením 10 vzorků směsného séra pacienta během jednoho dne v jedné sérii. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8: Opakovatelnost

Číslo měření	Koncentrace [mg/l]
1	4,09
2	4,01
3	3,99
4	4,03
5	4,06
6	3,96
7	3,99
8	4,00
9	4,02
10	3,97
Průměr	4,01
Směrodatná odchylka [%]	0,04
variační koeficient [%]	1,00

Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost byla stanovena měřením stejného vzorku smíšeného séra jako v případě opakovatelnosti po dobu 10 dnů. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9: Reprodukovatelnost

Číslo měření	koncentrace [mg/l]
1	4,67
2	4,64
3	4,67
4	4,92
5	4,29
6	4,57
7	4,11
8	4,31
9	4,61
10	4,51
Průměr	4,53
Směrodatná odchylka [%]	0,23
Variační koeficient [%]	5,17

6.2. Stanovení cystatinu C u pacientů s různým stupněm dysfunkce ledvin

Koncentrace cystatinu C v séru a v moči byly stanoveny u pacientů s normální funkcí ledvin charakterizovanou normálními hodnotami kreatininu a ve skupině pacientů s postiženou funkcí ledvin charakterizovanou zvýšenou koncentrací sérového kreatininu a sníženou glomerulární filtrací. V obou skupinách byly vypočteny hodnoty glomerulární filtrace. GFR pro cystatin C a kreatinin byly vypočteny dle rovnice uvedených v tabulce 2.

Pro výpočet GFR prostřednictvím cystatinu C byla použita Grubbova rovnice:

$$\text{GFR} = 1,4115 \cdot S_{\text{cyst C}}^{-1,68} \cdot F \quad [\text{ml/s/1,73m}^2]$$

(F= 1,0 pro muže, 0,948 pro ženy, 1,384 pro děti do 14 let)

Pro výpočet GFR prostřednictvím kreatininu byla využita rovnice MDRD:

$$\text{GFR} = 3,1 \cdot (S_{\text{Krea}} \cdot 0,0113)^{-1,154} \cdot \text{věk}^{-0,203} \cdot F \quad [\text{ml/s/1,73m}^2]$$

(F= 1,0 pro muže, 0,742 pro ženy)

Výsledky jsou podrobně shrnuty v tabulce 5 – charakteristika pacientů.

Vyhodnotili jsme korelaci kreatininu, cystatinu C a vypočtených glomerulárních filtrací v obou skupinách

Výsledky jsou znázorněny v tabulce 10 a v grafech 1 – 6.

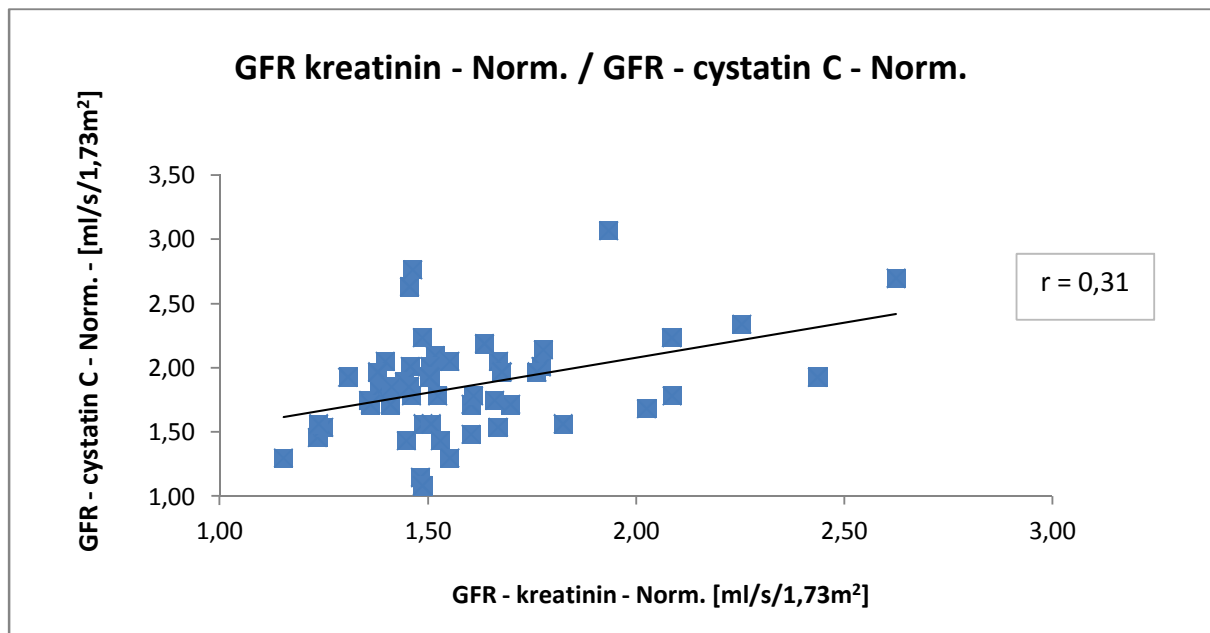
Tabulka 10: Přehled korelací jednotlivých parametrů

	Korelační koeficient – r (Spearmanův)
GFR-kreatinin-Norm./ GFR-cystatin C-Norm. [Graf 1]	0,31
GFR-kreatinin-Postiž./ GFR-cystatin C-Postiž. [Graf 2]	0,73
GFR-cystatin C-Norm./ GFR-cystatin Postiž. [Graf 3]	-0,19
GFR-kreatinin-Norm./ GFR-kreatinin-Postiž. [Graf 4]	0,01
sérum-kreatinin-Postiž./sérum-cystatin C-Postiž. [Graf 5]	0,71
moč-kreatinin-Postiž./moč-cystatin C-Postiž. [Graf 6]	-0,16

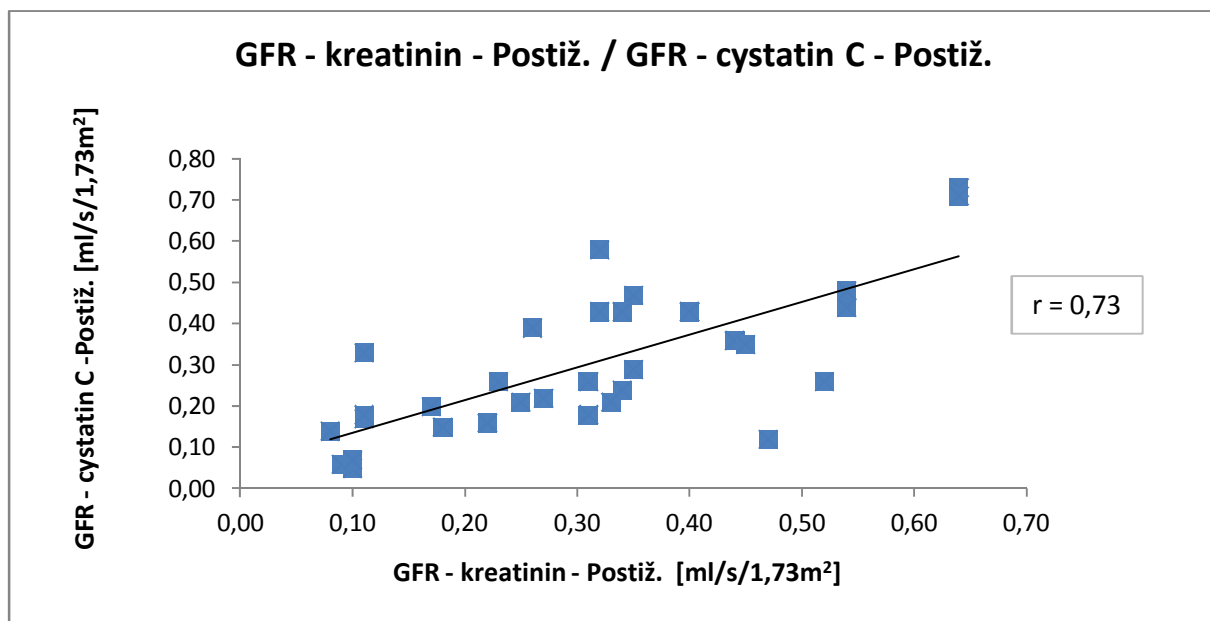
Norm. – normální funkce ledvin

Postiž. – postižená funkce ledvin

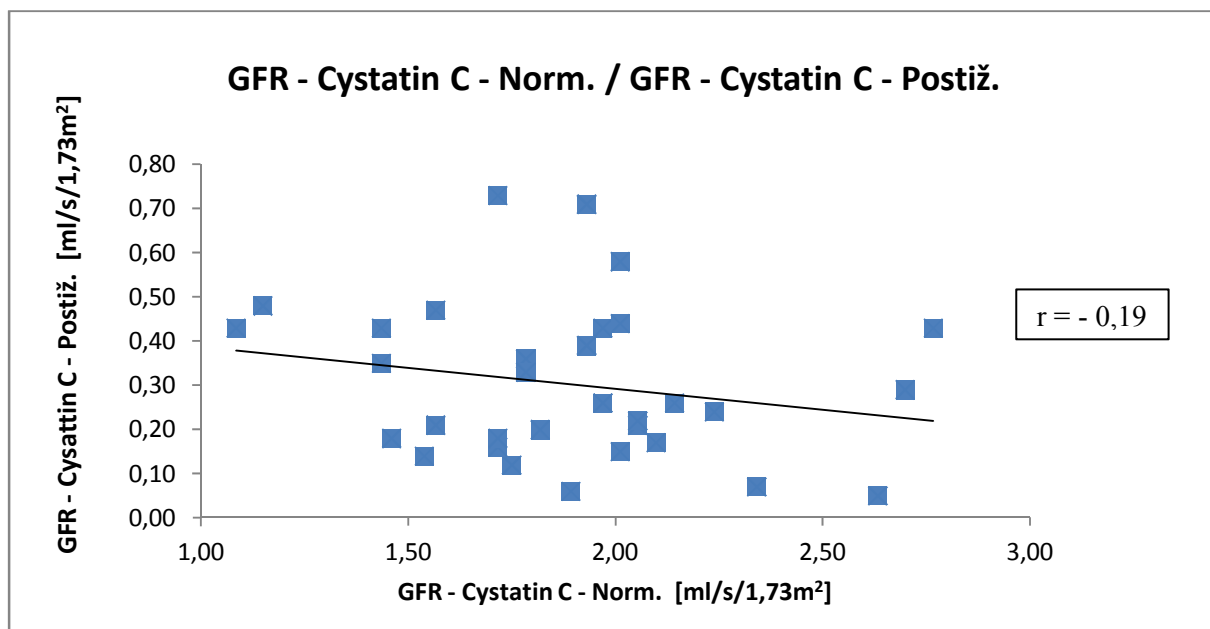
Graf 1: Porovnání GFR kreatininu a GFR cystatinu C u pacientů s normální funkcí ledvin



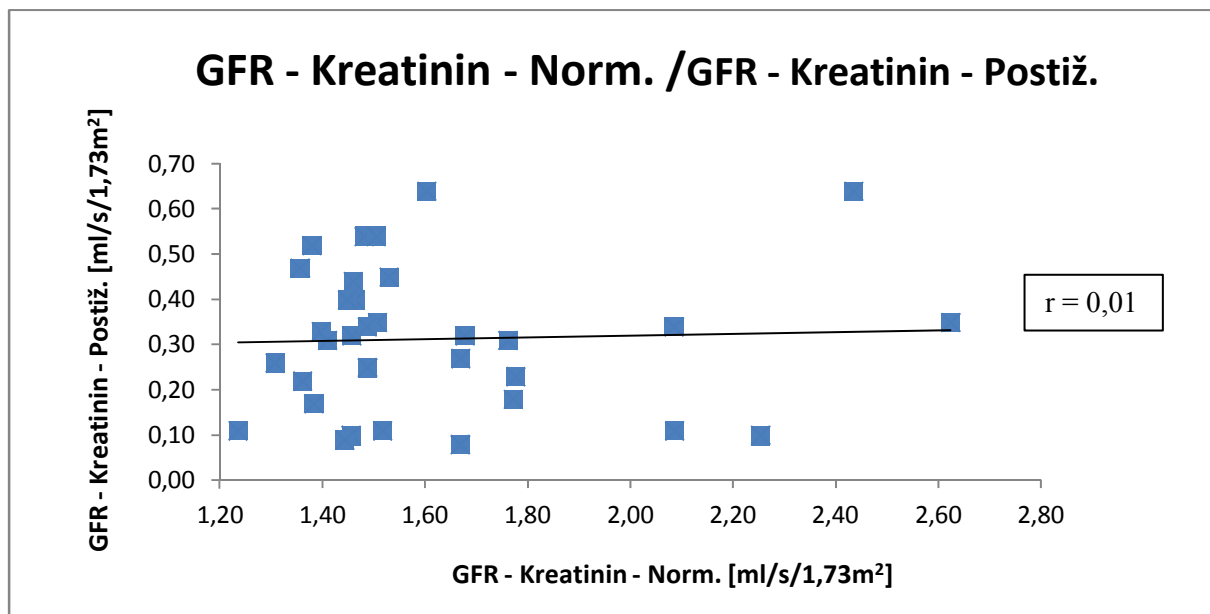
Graf 2: Porovnání GFR kreatininu a cystatinu C u pacientů s postižením ledvin



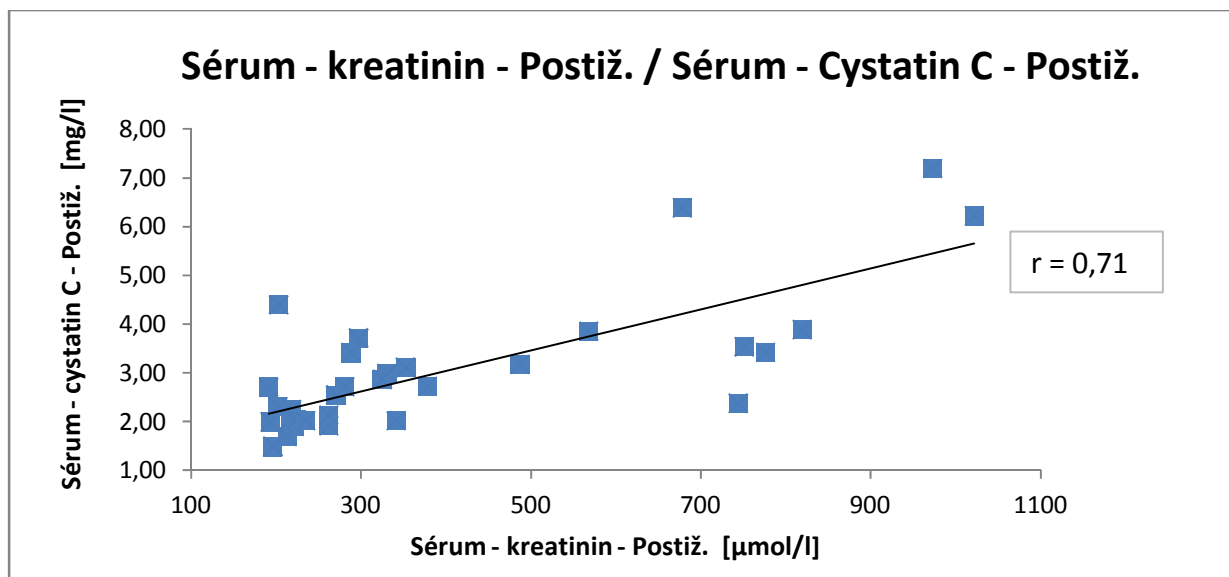
Graf 3: Porovnání GFR cystatinu C u pacientů s normální funkcí ledvin a s ledvinovou dysfunkcí



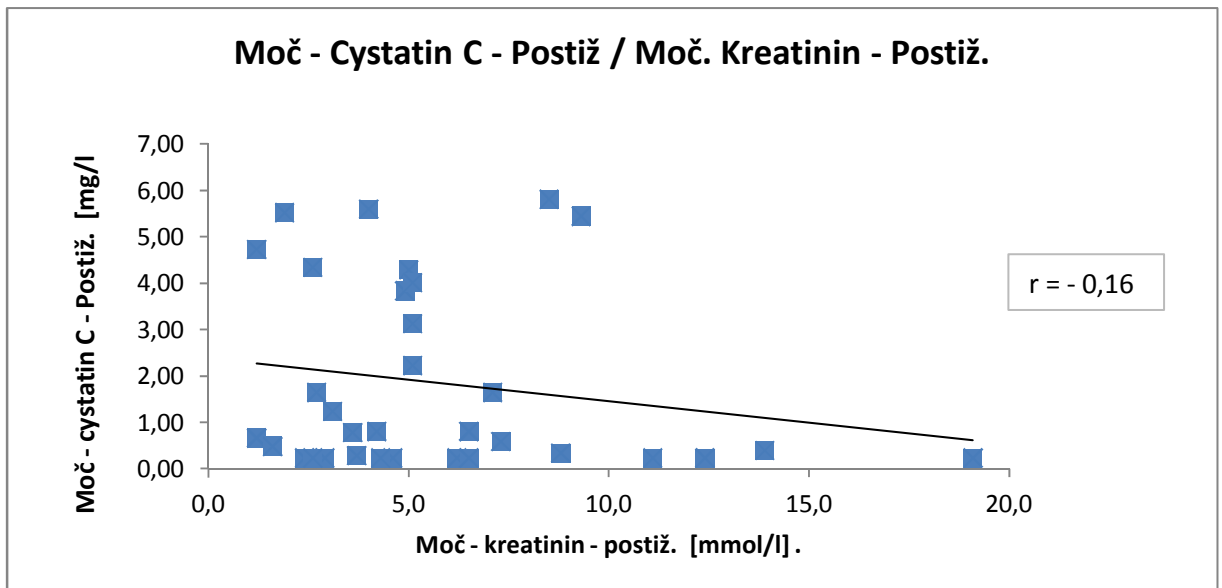
Graf 4: Porovnání GFR kreatininu u pacientů s normální funkcí ledvin a s renální dysfunkcí



Graf 5: Porovnání koncentrace kreatininu a cystatinu C v séru u pacientů s renální dysfunkcí



Graf 6: Porovnání koncentrací kreatininu a cystatinu C v moči u pacientů s renální dysfunkcí



7. DISKUZE

Ověřili jsme validační parametry stanovení cystatinu C v moči. Vzhledem k tomu, že metoda na stanovení cystatinu C v moči nebyla dosud vyvinuta, byla verifikace provedena dle parametrů dostupných pro vyšetření cystatinu C v séru.

V této práci byla pro stanovení cystatinu C v moči použita metoda PETIA. Pro stanovení cystatinu C v séru jsou výrobcem definovány následující hodnoty validačních parametrů: Opakovatelnost = variační koeficient (CV) < 3 %, reprodukovatelnost = CV < 4 % při koncentraci 1 mg/l, limit detekce = 0,07 mg/l.

Získané výsledky validačních parametrů pro vyšetření cystatinu C v moči (limit detekce – 0,25 mg/l, limit kvantifikace – 0,63 mg/l, CV za podmínek opakovatelnosti = 1%, CV za podmínek reprodukovatelnosti 5 % jsou vyhovující a stanovení cystatinu C v moči může být tedy využito pro diagnostiku renálního selhání.

Podarilo se potvrdit významný nárůst koncentrací cystatinu C v moči i v séru u pacientů s postižením ledvin (0,25 mg/l vs. 0,8 mg/l v moči resp. 0,86 mg/l vs. 2,72 mg/l v séru). Obdobný nárůst byl zaznamenán i u sérového kreatininu (288 mmol/l vs. 66 mmol/l). Oproti tomu koncentrace kreatininu v moči u pacientů s postižením ledvin byly sníženy (10,56 mmol/l vs. 4,9 mmol/l). Glomerulární filtrace vyjádřená hodnotou GFR byla snížena ve skupině pacientů s renální dysfunkcí (GFR cystatin C = 1,82 ml/s/1,73 m² vs. 0,26 ml/s/1,73 m²; GFR kreatinin 1,51 ml/s/1,73 m² vs. 0,32 ml/s/1,73 m²) (Tabulka 5).

Prokázali jsme zvýšenou korelaci hodnot GFR cystatinu C oproti GFR kreatininu u pacientů s renálním selháním ($r = 0,73$). Korelace hodnot GFR cystatinu C oproti GFR kreatininu u pacientů s normální funkcí ledvin byla nižší ($r = 0,31$) (Grafy 1 a 2).

Nalezli jsme negativní korelaci GFR cystatinu C u pacientů s renálním selháním ($r = - 0,19$), zatímco korelace GFR kreatininu byla u těchto pacientů pozitivní ($r = 0,01$) (Grafy 3 a 4).

Obdobné výsledky byly zjištěny i pro koncentraci kreatininu a cystatinu C v séru a v moči. Zjistili jsme pozitivní korelaci sérového cystatinu C oproti kreatininu u pacientů s renálním selháním ($r = 0,71$), v moči byla naopak nalezena negativní korelace ($r = - 0,16$) (Grafy 5 a 6).

Výpočet glomerulární filtrace z rovnice MDRD i odhad GF z koncentrace cystatinu C dobře korelují se standardními metodami stanovení glomerulární filtrace. V porovnání s metodami odhadu GF ze sérového cystatinu C rovnice MDRD výsledky GF nadhodnocuje a

vykazuje rozdíly mezi pohlavími. Rovnice byla odvozena z dat pacientů s chronickou renální insuficiencí, takže její použití v oblasti fyziologických nebo mírně snížených hodnot filtrace nelze jednoznačně doporučit.

Cystatin C je filtrován glomeruly a kompletně reabsorbován a katabolizován v buňkách proximálního tubulu. Při normální glomerulární filtraci je koncentrace cystatinu C v plazmě v rozmezí 0,5 – 1,2 mg/l. Tento předpoklad byl potvrzen, protože medián souboru pacientů s normální glomerulární filtrací byl 0,86 mg/l.

Při poškození tubulů nedochází k úplnému vstřebávání cystatinu C do krve, a tím se zvyšuje jeho koncentrace v moči. U pacientů s normální glomerulární filtrací a koncentrací kreatininu v séru v referenčním rozmezí je koncentrace cystatinu C v moči < 0,3 mg/l [10]. Tento předpoklad jsme potvrdili, neboť koncentrace cystatinu C v moči ve studované skupině pacientů s normální funkcí ledvin byla menší než stanovený detekční limit 0,25 mg/l.

Kreatinin do moči přechází glomerulární filtrací tubulární sekrecí a zpět do krve se nevstřebává. Zvýšená koncentrace kreatininu v séru může nastat v případě sníženého vylučování kreatininu ledvinami, při uzávěru ledvinových tepen a žil. Při snížení GF je prvotní vzestup kreatininu v séru kompenzován zvýšenou tubulární sekrecí kreatininu do moči. Z toho důvodu dochází při poškození ledvin průniku cystatinu C do moči a současnému zvýšení koncentrace kreatininu v krvi, jak je ukázáno a potvrzeno v tabulce 5 - zvýšení hodnoty cystatinu C v moči (0,25 mg/l vs. 0,8 mg/l), snížení kreatininu v séru (66 mmol/l vs. 288 mmol/l) a snížení koncentrace kreatininu v moči (10,56 mmol/l vs. 4,9 mmol/l) [10].

Jak již bylo zmíněno v úvodní teoretické části, glomerulární filtrace vypočtená z hodnot kreatininu může být ovlivňována řadou faktorů (např. velikost svalové hmoty, užívání specifických léků). V těchto případech je pro stanovení glomerulární filtrace citlivějším ukazatelem cystatin C, který není těmito faktory ovlivňován [24].

Diagnostická senzitivita u kreatininu je při snížení glomerulární filtrace 52,4 % stanovení cystatinu C je ukazuje senzitivitu 71,4 % [20].

Vysoká hladina glukózy v krvi může vést k postupnému poškození ledvinových cév. Jednou z významných příčin snížené glomerulární filtrace může být např. diabetická nefropatie. Ledviny přestávají správně fungovat, snižuje se glomerulární filtrace a může dojít až k úplnému selhání ledvin. V našem souboru pacientů s postižením ledvin bylo celkem 12 pacientů s hyperglykemií (koncentrace glukózy v plazmě byly v rozmezí 6 – 9,8 mmol/l). U 5 pacientů byla potvrzena diagnóza diabetes mellitus. Podařilo se potvrdit, že pacienti s hyperglykemií mají sníženou glomerulární filtraci oproti pacientům s normální koncentrací glukózy v plazmě, jak ukazuje tabulka 11.

Tabulka 11: Přehled velikosti GF u pacientů s hyperglykemií a u pacientů s hodnotou glykemie v referenčním rozmezí.

	Medián koncentrace normální glykémie [ml/s/1,73m²]	Medián koncentrace hyperglykémie [ml/s/1,73m²]	Korelační koeficient [r - Spearmanův]
GFR – Kreatinin [ml/s/1,73m²]	0,34	0,30	- 0,11
GFR – Cystatin C [ml/s/1,73m²]	0,25	0,17	- 0,08

ZÁVĚR

Stanovili jsme koncentraci cystatinu C v moči a na základě vyhodnocených validačních charakteristik (mez detekce, mez stanovitelnosti, opakovatelnost, reprodukovatelnost) lze potvrdit využití koncentrací cystatinu C v moči pro diagnostiku renálního selhání.

Vyhodnotili jsme korelaci koncentrací kreatininu, cystatinu c a GFR kreatininu a cystatinu C u pacientů s renální dysfunkcí charakterizovanou zvýšenou koncentrací kreatininu a sníženou glomerulární filtrací.

Prokázali jsme zvýšené koncentrace Cystatinu C v séru a v moči a sníženou glomerulární filtraci u pacientů s postižením ledvin. U pacientů s postižením funkcí ledvin jsme našli zvýšenou korelaci GFR cystatinu C oproti GFR kreatininu. GFR cystatinu C u pacientů s postižením ledvin negativně korelovala s GFR pro normální ledvinové funkce, zatímco korelace GFR kreatininu byla u těchto pacientů pozitivní. Dále jsme zjistili pozitivní korelaci sérového cystatinu C oproti kreatininu u pacientů s renálním selháním, v moči byla naopak nalezena negativní korelace.

Cystatin C je vhodným markerem pro stanovení glomerulární filtrace u pacientů s postižením ledvin. Potvrdili jsme vzájemnou korelaci glomerulární filtrace se stupněm postižení ledvin.

SEZNAM LITERATURY

1. ŠTERN, Petr. *Obecná a klinická biochemie: pro bakalářské obory studia*. 2., upr. vyd. Praha: Univerzita Karlova, 2011, 269 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 978-802-4619-798.
2. MASOPUST, Jaroslav. *Klinická biochemie: Požadování a hodnocení biochemických vyšetření*. I. část. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1998, 429 s. ISBN 80-718-4648-1.
3. NOVOTNÝ, Ivan a Michal HRUŠKA. *Biologie člověka*. 4., rozš. a upr. vyd. Praha: Fortuna, 2007, 239 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 978-80-7373-007-9.
4. GANONG, William F. *Review of medical physiology*. 21st ed. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2003. ISBN 00-714-0236-5.
5. ZIMA, Tomáš. *Laboratorní diagnostika*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2007, 906 s. ISBN 978-802-4614-236.
6. RACEK, Jaroslav. *Klinická biochemie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Galén, 2006, 329 s. ISBN 80-726-2324-9.
7. TEPLAN, Vladimír. *Praktická nefrologie*. 2., zcela přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2006, 496 s., 12 s. barev. obr. příloh. ISBN 80-247-1122-2.
8. SCHÜCK, Ota, V TESAŘ a V TEPLAN. *Klinická nefrologie*. [1. vyd.]. Praha: MEDPRINT, c1995, 406 s. ISBN 80-902-0360-4.
9. ZIMA, Tomáš a Vladimír TEPLAN. *Doporučení České nefrologické společnosti a České společnosti klinické biochemie ČLS JEP k vyšetřování glomerulární filtrace*. 2009, s. 1-14. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/doporuzeni/dopGFR.pdf>
10. *Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi*. [online]. 2012. vyd. [cit. 2013-04-2]. Dostupné z: <http://www.enclabmed.cz/>

11. TEPLAN, Vladimír. Akutní poškození a selhání ledvin. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2010, 416 s. ISBN 978-802-4711-218.
12. KVASNICOVÁ, Vladimíra. [online]. 2006. vyd. [cit. 2013-03-14]. Dostupné z: http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/AJDJX.htm
13. MURRAY, Robert K, Daryl K. Granner, Peter A. Mayes. Harperova Biochemie: a LANGE medical book. 23. vyd., V ČR 3. vyd., V nakl. H. Jinočany: H, 1998, 872 s. ISBN 80-857-8738-5.
14. Vyšetřovací metody: Laboratorní vyšetření ledvinových funkcí. [online]. 2012 [cit. 2013-02-12]. Dostupné z: <http://pfyziolifup.upol.cz/castwiki2/?p=1550>
15. PICK, MUDr. Pavel. Biochemická syndromologie nemocí ledvin a močových cest. [online]. [cit. 2013-04-04]. Dostupné z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/biochem/text4.htm>
16. ZIMA, Tomáš, Vladimír TEPLAN a Vladimír TESAŘ. Doporučení odborných společností: Doporučení České nefrologické společnosti a České společnosti klinické biochemie ČLS JEP k vyšetřování glomerulární filtrace [online]. 2009 [cit. 2013-02-15]. Dostupné z: http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2009/2-09/KBM0209_Dop_eGF.pdf
17. BÁRTOVÁ, Marie. Porovnání odhadu glomerulární filtrace ze sérových hladin cystatinu C a kreatininu stanoveného enzymaticky. Brno, 2010. Dostupné z: http://is.muni.cz/th/101776/lf_b/Bakalarska_prace.txt. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně, lékařská fakulta. Vedoucí práce RNDr. Hana Dobrovolná.
18. JABOR, Antonín, Antonín JABOR a Vladimíra KVASNICOVÁJABOR. Kreatinin v moči. [online]. 2006 [cit. 2013-03-10]. Dostupné z: http://www.prevedig.cz/pict/fotogalerie/Odborne_texty/Kreatinin%20v%20mo%4%8Di%20%28odpad%29.pdf

19. Diabetes Health Center: Diabetic Nephropathy - Topic Overview. [online]. 2011, s. 1-2 [cit. 2013-02-02]. Dostupné z: <http://diabetes.webmd.com/tc/diabetic-nephropathy-topic-overview>
20. GRUBB, Anders, Ulf NYMAN a Jonas BJÄRK. Improved estimation of glomerular filtration rate (GFR) by comparison of eGFR cystatin C and eGFR creatinine. Scandinavian Journal of Clinical [online]. roč. 72, č. 1, s. 73-77 [cit. 2013-03-12]. ISSN 0036-5513. DOI: 10.3109/00365513.2011.634023. Dostupné z: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/00365513.2011.634023>
21. JABOR, A. [online]. [cit. 2013-03-29]. Dostupné z: <http://web2.stapro.cz/bullfons/22010/klin2.pdf>
22. Standardní operační postup Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF a FN v Motole: Stanovení Cystatinu C imunoturbidimetrickou metodou. 2008, 13.
23. Laboratorní příručka Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF UK a FN v Motole. 2011, 158 s. [cit. 12-02-2013]. Dostupné z: <http://www.lf2.cuni.cz/Ustavy/ukbp/laboratorni-prirucka.pdf>
24. BAČÍKOVÁ, L., E. BODIŠOVÁ a L. DUBSKÁ. Abstrakta přednášek a posterů [online]. Brno, 2008 [cit. 2013-03-3]. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/biolaby/biolab-2008-sbornik.pdf>
25. LOTHAR, Thomas. Clinical laboratory diagnostics: use and assessment of clinical laboratory results. 1st ed. Editor Lothar Thomas. Frankfurt am Main: TH-Books, c1998, 1527 s. ISBN 39-805-2154-0.
26. DASTYCH, Milan a Petr BREINEK. Klinická biochemie: bakalářský obor Zdravotní laborant. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2008, 232 s. ISBN 978-802-1045-729.
27. ČERMÁKOVÁ, Marta a Irena ŠTĚPÁNOVÁ. Klinická biochemie. 1. vyd. Brno: IDVPZ, 2003, 120 s. ISBN 80-701-3372-4.

28. Cystatin C Immunoparticles [online]. 2005. vyd. 8 s. [cit. 12-03-2013].
29. SINGH, D. a MA. WHOOLEY. Vztah mezi cystatinem C, odhadnutou hodnotou GF a zánětlivými biomarkery: studie Heart and Soul. [online]. [cit. 2013-02-05]. Dostupné z: http://www.transplant.cz/vzdelavani/2007/07_03_11.pdf
30. Laboratorní příručka. [online]. [cit. 2013-02-15]. Dostupné z: <http://www.nembo.cz/lekari/HVEZDAAAWL.htm>
31. ADVIA 1800 Chemistry System [online]. [cit. 2013-04-08]. Dostupné z: <http://healthcare.siemens.com/clinical-chemistry/systems/advia-1800-chemistry-system>
32. Zelená hvězda: Glomerulární filtrace. [online]. 2010 [cit. 2013-04-04]. Dostupné z: <http://www.zelenahvezda.cz/pacientska-sekce/p-dialyza/glomerularni-filtrace>
33. Turbidimetry/Nephelometry. [online]. 2006 [cit. 2013-04-05]. Dostupné z: <http://www.dako.com/dist/download.pdf?objectid=104967004>
34. Standardní operační postup Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF a FN v Motole: Stanovení Cystatinu C imunoturbidimetrickou metodou. 2008, 13.
35. Standardní operační postup Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF a FN v Motole: Stanovení kreatininu enzymatickou kolorimetrickou metodou. 2008, 13.
36. FRIEDECKÝ, Bedřich, ŠPRONGL a Josef KRATOCHVÍLA. Česká společnost klinické biochemie: Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně [online]. 2004 [cit. 2013-02-016]. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuceni--validace-a-verifikace-metod>
37. Medixa.org. [online]. [cit. 2013-03-06]. Dostupné z: <http://cs.medixa.org/lecba/kreatinin>

38. VAN DEVENTER, Hendrick E., Janice E. PAIKER, Ivor J. KATZ a Jaya A. GEORGE. A comparison of cystatin C- and creatinine-based prediction equations for the estimation of glomerular filtration rate in black South Africans [online]. 2012 [cit. 2013-03-05]. Dostupné z: <http://ndt.oxfordjournals.org/content/26/5/1553.full?sid=f51aae3f-66ca-4099-8efc-0044389af75a>
39. MACUNLUOGLU, Aydin ATAKAN, Munir DEMIRCI, Elif ARi, Ahmet TOPUZOGLU a Ali BORAZAN. A comparison of different methods for the determination of glomerular filtration rate in elderly patients with chronic renal failure. *International Urology and Nephrology* [online]. roč. 43, č. 1, s. 257-263 [cit. 2013-03-10]. ISSN 0301-1623. DOI: 10.1007/s11255-010-9846-0. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11255-010-9846-0>.
40. UDY, Andrew, Robert BOOTS, Siva SENTHURAN. Anesthesia and analgesia: Augmented Creatinine Clearance in Traumatic Brain Injury. 2010, roč. 111, č. 6, s. 1505-1510. Dostupné z: <http://www.anesthesia-analgesia.org/content/111/6/1505.long>
41. MAILLARD, Nicolas, Manolie MEHDI, Lise THIBAUDIN. *Nephrology Dialysis Transplantation* [online]. roč. 25, č. 9 [cit. 2013-03-10]. ISSN 0931-0509. Dostupné z: <http://ndt.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/ndt/gfq123>.
42. WU, Cho-Kai, MD, Jou-Wei Lin, MD, James L. Caffrey. *Journal of the American College of Cardiology: Cystatin C and Long-Term Mortality Among Subjects With Normal Creatinine-Based Estimated Glomerular Filtration Rates* [online]. s. 1930-1936 [cit. 2013-02-11]. ISBN 0735-1097.
43. TASKAPAN, Hulya, Pliakogiannis THEODOROS, Paul TAM, Joanne BARGMAN a Dimitrios OREOPOULOS. Glomerular filtration rate (GFR) estimated from serum creatinine predicts total (urine and peritoneal) creatinine clearance in patients on peritoneal dialysis. *International Urology and Nephrology* [online]. roč. 42, č. 4, s. 1085-1092 [cit. 2013-03-10]. ISSN 0301-1623. DOI: 10.1007/s11255-010-9715-x. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11255-010-9715-x>.

44. BAXMANN, A. C., M. S. AHMED, N. C. MARQUES, V. B. MENON, A. B. PEREIRA, G. M. KIRSZTAJN and I. P. 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* [online]. roč. 3, č. 2, s. 348-354 [cit. 2013-03-10]. ISSN 1555-9041. DOI: 10.2215/CJN.02870707. Dostupné z: <http://cjasn.asnjournals.org/cgi/doi/10.2215/CJN.02870707>.
45. WAIKAR, Sushrut S, Venkata S SABBISSETTI, Joseph V BONVENTRE, V. B. MENON, A. B. PEREIRA, G. M. KIRSZTAJN a I. P. HEILBERG. Normalization of urinary biomarkers to creatinine during changes in glomerular filtration rate. *Kidney International* [online]. roč. 78, č. 5, s. 486-494 [cit. 2013-04-20]. ISSN 0085-2538. DOI: 10.1038/ki.2010.165. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ki.2010.165>.
46. LIPCSEY, M., Mia FUREBRING, Sten RUBERTSSON, Anders LARSSON, A. B. PEREIRA, G. M. KIRSZTAJN, I. P. HEILBERG a M. LIPCSEY. Significant differences when using creatinine, modification of diet in renal disease, or cystatin C for estimating glomerular filtration rate in ICU patients. *Upsala Journal of Medical Sciences* [online]. roč. 116, č. 1, s. 39-46 [cit. 2013-03-15]. ISSN 0300-9734. DOI: 10.3109/03009734.2010.526724. Dostupné z: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/03009734.2010.526724>.
47. ZABAIRI, A. M. a A. HUSASIN. Original article: The glomerular filtration rate: comparison of various predictive equations based on serum creatinine with conventional creatinine clearance test in Pakistani population. 2008, roč. 58, č. 4, s. 182-185. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18655426>.
48. GOLDSTEIN, Stuart L. Urinary kidney injury biomarkers and urine creatinine normalization: a false premise or not?. DOI: 10.1038/ki.2010.200. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ki.2010.200>.