

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

Ústav laboratorní diagnostiky a veřejného zdraví

Porovnání metod vyšetření glomerulární filtrace

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce: Aneta Vachtová

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: Ing. Marie Kašparová

Datum odevzdání práce: 3. 5. 2016

ABSTRAKT

V současné době ve světě trpí chronickým onemocněním ledvin více než 500 miliónů lidí, což znamená, že postihuje zhruba každého desátého obyvatele naší planety. Mezi nejdůležitější příčiny výrazného zvyšování počtu pacientů s chronickým onemocněním patří prodlužující se věk populace, nárůst arteriální hypertenze, obezity a diabetu.

Onemocnění ledvin je celá řada, často se jedná o poruchy kombinované, postihující více orgánů či orgánových systémů dohromady. Časná stadia chronického poškození jsou často nerozpoznána. Včasné zjištění, posouzení závažnosti a zahájení léčby může nejen zpomalit, v některých případech i zastavit, progresi onemocnění, ale také významně snížit výskyt život ohrožujících kardiovaskulárních komplikací. Dle KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) k základním metodám posouzení funkčnosti ledvin patří vyšetření GF (glomerulární filtrace). CKD (Chronické onemocnění ledvin, Chronic kidney disease) se dělí do pěti kategorií a to právě v závislosti na jejich snížené funkci zjistitelné metodou glomerulární filtrace.

Vyšetřování filtrační funkce ledvin je nezbytné nejen pro odhalení a přesnou klasifikaci chronických onemocnění ledvin, ale také pro posouzení s nimi spojeného kardiovaskulárního rizika. Ke stanovení glomerulární filtrace se používají jak metody přímé, tak v současnosti stále častěji metody výpočtové, nevyžadující sběr moče.

V této práci jsem se zabývala porovnáním metod vyšetření glomerulární filtrace. Jedné metody přímé, clearance endogenního kreatininu (CCL, creatinine clearance), u které je nutný přesný sběr moče za 24 hodin a tří metod výpočtových. Dvou metod závislých na sérové hladině kreatininu, rovnice MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) a CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) a jedné závislé na sérové koncentraci cystatinu C rovnice CKD-EPI.

V teoretické části je stručně vysvětlena funkčnost a stavba ledvin. Dále se zmiňuji o závažnosti a četnosti onemocnění ledvin a určení míry poškození v závislosti na určitých faktorech. Je zde uveden přehled používaných metod k určení hodnot glomerulární filtrace a vhodnost použití jednotlivých metod a odhadů.

V praktické části je popsán odběr vzorků, jejich analýza a princip stanovení vyšetřovaných hladin analytů ze vzorků potřebných ke zjištění hodnot glomerulární filtrace. Vyšetřila jsem 90 vybraných dospělých pacientů s podezřením na chronické onemocnění ledvin. U každého jsem změřila tři analyty, kreatinin a cystatin C v séru a kreatinin v moči. Měření sérové hladiny kreatininu, cystatinu C a močového kreatininu jsem provedla na analyzátoru Advia 1800 diagnostickými soupravami firmy Siemens na Pracovišti klinické chemie v Nemocnici České Budějovice, a.s. Výsledky jsem statisticky zhodnotila pomocí krabicového grafu, Passing-Bablokovy regrese a Bland-Altmanova diagramu.

Zhodnocením a porovnáním výsledných dat bylo prokázáno, že jednotlivé metody glomerulární filtrace jsou pro vybranou skupinu pacientů s podezřením na chronické onemocnění ledvin zastupitelné a nevykazují klinicky významné difference. Na základě těchto informací jsem hypotézu potvrdila. Stejně tak jsem si osvojila použité laboratorní vyšetřovací metody, jak bylo cílem mé práce.

ABSTRAKT

Currently, in the world 500 million people suffer from chronic kidney disease, which means that affects roughly every tenth inhabitant of our planet. Among many causes, the most important are an increase of numbers of patients with chronic diseases, increasing life expectancy, increase of arterial hypertension, obesity and diabetes.

There are many different kinds of kidney diseases, often it's the combined disturbances which are affecting multiple organs or organ systems. Early stages of chronic damage are often unrecognized. Early detection, assessment of severity and early treatment can not only slow but in some cases stop the progression of the disease and also significantly reduce life-threatening cardiovascular complication. According to a KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcome). The basic methods includes assessment and tests of kidney function GFR (Glomerular filtration rate). CKD (Chronic Kidney Disease) is divided into five categories, and it is based on their reduced function detectable by a glomerular filtration.

Investigation of filtering function of the kidneys is necessary not only for it's detection and classification of chronic kidney disease, but also to assess the associated cardiovascular risk. There are methods, which we are using to determine the glomerular filtration - Direct method and increasingly the calculation methods which don't require collection of urine.

In this work, I dealt with comparing methods of testing glomerular filtration. One direct method, creatinine clearance, which required accurate collection of urine for 24 hours and three calculation methods. Two methods which are dependent on creatinine serum, equation MDRD (Modification of Diet in Renal disease) and CKD- EPI (Chronic Kidney Disease-Epidemiology Collaboration) and one dependent on the concentration of serum of cystatin C equation CKD-EPI.

In the theoretical part is briefly explained the functionality and structure of the kidney. Then I mentioned the severity and frequency of kidney disease and determined

the extent of damage depending on certain factors. In this part is an overview of the methods used for determination of rate of glomerular filtration and suitability of individual methods and estimates.

The practical part describes taking a samples, their analysis and principle of investigation of analyte levels from samples which are needed to determine levels of glomerular filtration. I examined 90 selected adult patients with suspected chronic kidney disease. For each one, I measured three analytes- creatinine and cystatin C in serum and urine creatinine. Measurements of creatinine serum, cystatin C and urinary creatinine, I carried on analyser ADVIA 1800 diagnostic kit from company Siemens in workplace of Clinical Chemistry of Hospital Ceske Budejovice, a.s. The results were statistically evaluated by Box- diagram, by Passing-Bablokovy regression and by Bland- Altman diagram.

Assessing and compering the final data has shown that the various glomerular filtration methods are substitute for a selected group of patients with suspected chronic kidney disease and do not show a clinically significant differences. Based on this information, I confirm the hypothesis. I embraced used laboratory and investigation methods. This was the goal of my work.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval(a) samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne (datum)

.....

(jméno a příjmení)

Poděkování

Tímto bych chtěla vyjádřit velké poděkování své vedoucí práce Ing. Marii Kašparové za cenné rady, trpělivost, vedení a čas, který mi věnovala a zároveň Pracovišti klinické chemii v Nemocnici České Budějovice, a.s. za umožnění provedení praktické části mé bakalářské práce. A nakonec i své rodinně, která mě po celou dobu mého studia podporovala.

OBSAH

1. Úvod.....	9
2. Teoretická část	11
2.1 Anatomie ledvin.....	11
2.1.1 Nefron	12
2.2 Funkce ledvin.....	14
2.2.1 Funkce glomerulu	15
2.2.2 Funkce proximálního tubulu	15
2.2.3 Funkce Henleovy kličky	16
2.2.4 Funkce distálního tubulu.....	16
2.2.5 Složení a množství moče	17
2.3 Choroby ledvin	17
2.3.1 Chronické onemocnění ledvin (CKD)	18
2.3.1.1 Definice a klasifikace	19
2.3.2 Akutní poškození ledvin (AKI)	20
2.4 Glomerulární filtrace.....	21
2.4.1 Metody měření GF se sběrem moče	23
2.4.1.1 Renální clearance inulinu	23
2.4.1.2 Renální clearance (endogenního) kreatininu	23
2.4.2 Metody měření GF bez sběru moče	25
2.4.2.1 Cystatin C	25
2.4.2.1.1 Fyziologie a metabolismus cystatinu C.....	26
2.4.2.1.2 Faktory ovlivňující produkci cystatinu C.....	27
2.4.2.1.3 Vhodné využití cystatinu C	28
2.4.2.1.4 Stanovení cystatinu C.....	28
2.4.2.2 Kreatinin	30
2.4.2.2.1 Vznik a metabolismus	30
2.4.2.2.2 Vylučování kreatininu	31
2.4.2.2.3 Změny koncentrace kreatininu	31
2.4.2.2.4 Stanovení kreatininu.....	32
2.4.2.2.5 Využití stanovené koncentrace kreatininu.....	33
2.4.2.3 Výpočtové metody odhadu GF ze sérové koncentrace kreatininu	33
2.4.2.3.1 Odhad GF pomocí vzorců MDRD a CKD-EPI.....	33
2.4.2.3.2 Odhad GF u dětí pomocí rovnice podle Schwartze	35
2.4.2.4 Výpočtové metody odhadu GF ze sérové koncentrace cystatinu C ..	36
2.4.2.5 Rovnice CKD-EPI z roku 2012 (cystatin C)	36
2.4.2.6 Rovnice CKD-EPI z roku 2012 (kreatinin a cystatin C)	36
2.4.2.7 Izotopové metody vyšetření GF	37
3. Hypotézy a cíle práce.....	39
3.1 Cíle práce	39
3.2 Hypotézy.....	39
4. Metodika	40

4.1	Preanalytická část	40
4.1.1	Použitý biologický materiál	41
4.1.1.1	Sbíraná moč za 24 hodin	41
4.1.1.2	Venózní krev	41
5.	Analytická část.....	42
5.1	Stanovení kreatininu v séru a moči.....	42
5.1.1	Enzymatické stanovení kreatininu	42
5.1.2	Princip stanovení.....	42
5.1.3	Kalibrace, referenční meze	42
5.2	Stanovení cystatinu C	43
5.2.1	Princip stanovení.....	43
5.2.2	Podmínky odběru, stabilita reagensů.....	43
5.3	Použité vzorce	44
6.	Výsledky	46
6.1	Obecná statistika	47
6.2	Krabicový graf (krabicový diagram)	48
6.3	Passing-Bablokova regrese a Bland-Altmanův diagram	49
7.	Diskuze	55
8.	Závěr	58
9.	Použitá literatura	59
10.	Klíčová slova	63
11.	Přílohy.....	64

1. Úvod

V této bakalářské práci se zabývám porovnáním metod glomerulární filtrace, která se stanovuje metodou přímou nebo odhadem z metod výpočtových. Budu porovnávat čtyři metody glomerulární filtrace u vybraných pacientů. S metodu clearance endogenního kreatininu se sběrem moče za 24 hodin (přímou metodou) budu srovnávat metody výpočtu glomerulární filtrace odhadem ze sérové hladiny kreatininu pomocí zjednodušené rovnice MDRD a rovnice CKD-EPI a cystatinu C rovněž odhadem z rovnice CKD-EPI. Určení hodnoty glomerulární filtrace je z klinického hlediska velmi důležité, protože je ukazatelem funkčnosti ledvin, tedy určení klasifikace chronického onemocnění ledvin, a také pro posouzení s nimi spojeného kardiovaskulárního rizika.

2. Teoretická část

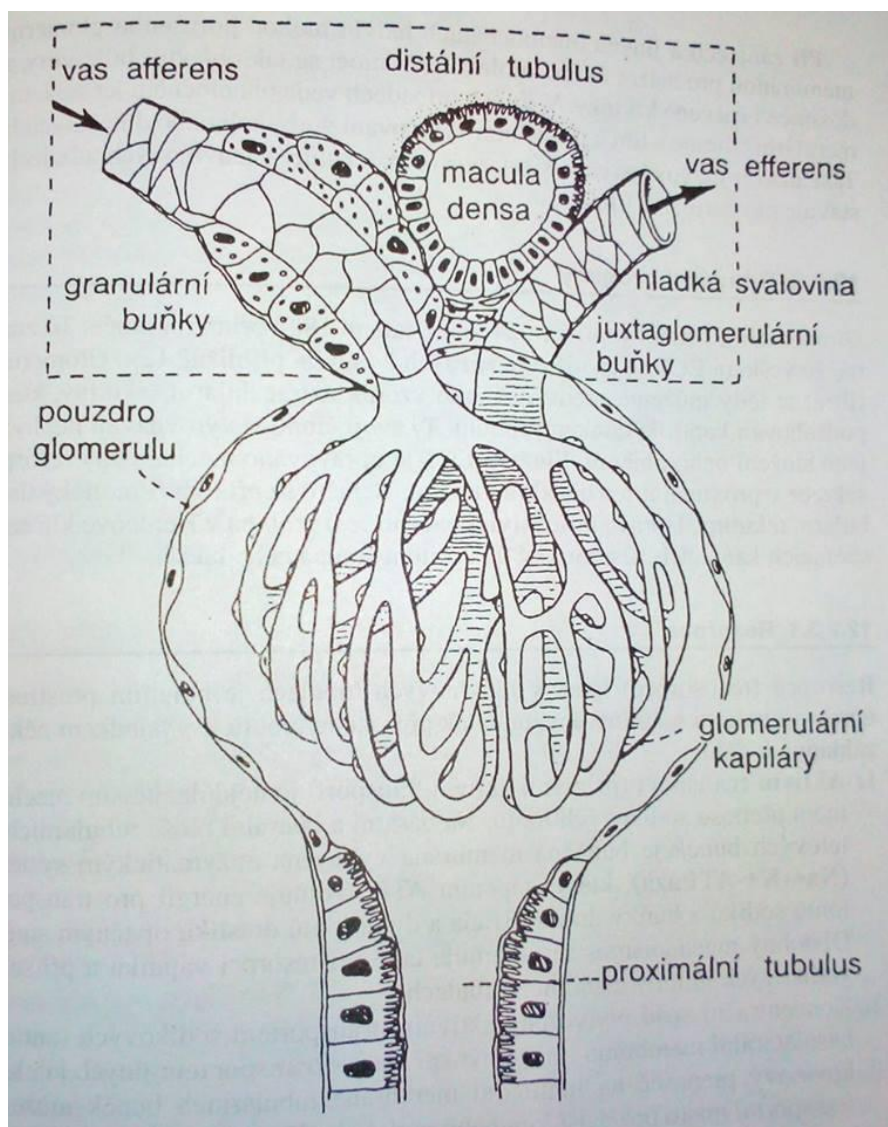
2.1 Anatomie ledvin

Ledviny jsou uloženy po stranách bederní páteře, pod stropem břišní dutiny – tzv. retroperitoneálně, tj. za dutinou břišní, která je ohraničena peritoneem (ve výši dvanáctého hrudního až třetího bederního obratle a nejsou obaleny pobřišnicí. Pravá ledvina je o něco níže, protože vpravo jsou rovněž uložena játra. Ledvina má fazolovitý, oválný tvar a je červenohnědé barvy. Místo vstupu tepny a výstupu žíly nazýváme hilus. Ledvina je na povrchu hladká a kryta vazivovým pouzdem. Na pouzdro naléhá pojivo prorostlé tukem, které chrání ledvinu před mechanickým poškozením. Pouzdro rovněž přispívá k udržení tlaku v cévách a tubulech. K ledvině přiléhá nadledvina a endokrinní žláza. [1,2,3]

Na řezu lze rozlišit tmavší část (kůru) a světlejší (dřeň). Dřeň vybíhá v 8 – 12 pyramid, jejich barva je hnědofialová a má okem rozpoznatelnou proužkovitou strukturu. Svou zevní částí jsou zanořené do ledvinové pánvičky. Každá z ledvin obsahuje okolo 1 milionu funkčních jednotek neboli nefronů. Tento počet zůstává po narození stejný, v dospělosti se totiž nové nefrony tvořit nemohou. [1,3]

Ledvina dospělého člověka měří přibližně 12 x 6 x 3 cm a váží kolem 150 g. Velikost ledvin se během života mění, maxima dosahují ve věku 28 – 30 let a po 65. roce věku se zpravidla zmenšují. Krev přitéká do ledviny tepnou (arteria renalis), která se postupně větví až na interglobulární arterie. [1,4,5]

2.1.1 Nefron



Obr. Č. 1 : Schéma glomerulu a juxtaglomerulárního aparátu [1]

Anatomicky i funkčně dělíme nefron na 5 oddílů – glomerulus (glomerulum), proximální tubulus, Henleovu kličku, distální tubulus a sběrný kanálek. Glomerulum, neboli cévní kloubíčko, je vmáčknuto do dvojrstevného Bowmanova pouzdra, z jehož štěrby začíná systém zmíněných kanálek. Nefron je základní stavební a funkční jednotkou ledvin. Nefrony jsou místem filtrace krevní plazmy a následné úpravy složení a objemu vzniklé tekutiny – moče. [1,5,6]

Glomerulus, dříve nazýván jako Malpighiho tělísko, je tvořen svazkem vlasečnic napojených na přívodní a odvodní tepénku. Prostor mezi jednotlivými kapilárami je tvořen mezangiem. Glomeruly protéká krev, která se stěnou kapilár a stěnou Bowmanova váčku zbavuje odpadních látek. Tekutina přefiltrovaná do Bowmanova váčku se nazývá glomerulární filtrát nebo také primární moč, denně asi 180 litrů tekutiny. [1,5,7]

Tubulus je kanálkovitá část nefronu. Je složena z několika částí, které se liší tvarem a funkcí. Do tubulů přitéká primární moč ze štěrbin Bowmanova pouzdra, kde je upravována na definitivní moč tak, že se průtokem proximálním kanálkem, Henleovou kličkou a kanálkem distálním zbavuje vody, glukózy aminokyselin a části minerálních látek. Tyto látky se vstřebávají zpět do krve kapilárami opřádající ledvinové kanálky. Vstřebávání látek se děje aktivním transportem a transportem pasivním, kterým je difúze. [1,5,8]

První částí je *proximální tubulus*, který je asi 15 mm dlouhý, má průměr 55 μm a představuje nejdelší část nefronu. Začíná jako část stočená a dále pokračuje jako část přímá. Jeho stěnu tvoří jednovrstevný epitel. Tyto buňky mají na svém povrchu tzv. kartáčový lem, který zvětšuje velikost plochy, jež je v kontaktu s tekutinou proudící uvnitř tubulu. Pokračováním proximálního tubulu je Henleova klička. [1,8]

Henleova klička má charakteristický tvar písmene U. Ohyb této trubice se nachází v různé hloubce pyramid, například u tzv. dlouhých Henleových kliček dosahuje až k papilám. Většina Henleových kliček však nezasahuje tak hluboko (u dospělého se takto dlouhé kličky vyskytují pouze asi jen u 15 % nefronů). Stavba Henleovy kličky je předpokladem pro činnost tzv. protiproudového systému, který umožňuje tvorbu koncentrované moče. Henleova klička se dělí na část sestupnou (*descendentní*), která směřuje k papile, a část vzestupnou (*ascendentní*), která se dále dělí na tlustý a tenký segment. Tlusté vzestupné raménko se dotýká glomerulu a prochází těsně kolem

aferentní a eferentní arterioly. Ve stěně aferentní arterioly jsou přítomny tzv. juxtaglomerulární buňky, které tvoří renin. Tubulární epitel je v tomto místě modifikován a vytváří macula densa. Juxtaglomerulární buňky, macula densa a vmezeřené buňky dohromady tvoří juxtaglomerulární aparát. [1,7,8,9]

Distální tubulus, jeho první část je prodloužením tlusté části vzestupného raménka Henleovy kličky. Distální tubulus je dlouhý přibližně 5 mm a je tvořen vrstvou kubických buněk bez kartáčového lemu. [1]

Sběrací kanálek je dlouhý asi 20 mm a prochází kůrou i dřením. Vyúsťuje na vrcholu pyramid. Zde se tubulární tekutina přeměňuje na definitivní moč a ta se dostává do kalichů a pánvičky. Propustnost pro vodu je řízena dvěma hormony aldosteronem a vasopresinem. Sběrací kanálky se také podílejí na udržování homeostázy, protože se podílejí aktivně na pH moče. [1,4,8]

2.2 Funkce ledvin

Jsou životně důležitým orgánem. Základní funkcí ledvin je udržování homeostázy. Na jejím udržení se podílejí tyto procesy: vylučování odpadních, nepotřebných a toxických látek z těla. Jedná se o látky, jimiž jsou urea (močovina), kreatinin, kyselina močová, metabolity hormonů, léků a jejich metabolitů. Dále koncentrace vodíkových iontů (pH) a základních minerálů, korekce osmolality a tvorba biologicky aktivních látek (renin, erythropoetin, prostaglandin a kalcitriol). Můžeme zde zařadit i účast na metabolických pochodech, jako je například glukoneogeneze apod. Všechny tyto funkce jsou zajištěné tvorbou moče, kdy její pH, koncentrace látek, množství a osmolalita se mění v závislosti na potřebách organismu. [1,8]

Moč, kterou ledviny vytvoří, je pak dále transportována pánvičkou a močovodem až do močového měchýře. Močovody jsou asi 30 cm dlouhé trubice, které procházejí retroperitoneálním prostorem do pánve a zde vstupují do močového měchýře. Močový

měchýř je dutý svalový orgán, ve kterém se moč shromažďuje a ze kterého je odváděna močovou trubicí pryč z těla. [1]

2.2.1 Funkce glomerulu

Převážnou část kapalných složek odevzdá glomerulus do Bowmanova pozdra, jímž je glomerulus obalen, kde vzniká glomerulární filtrací tzv. primární moč neboli ultrafiltrát, kterého se přefiltruje 170 – 200 l za 24 hodin. Tedy můžeme mluvit v průměru o přefiltrování 2ml/s glomerulárního filtrátu. Má podobné složení jako krevní plazma. Z tohoto filtrátu se některé živiny dále vstřebávají a dochází i exkreci látek (například léky). Vzhledem k tomu, že průtok krve ledvinou je zhruba 1000 – 1500 ml/min (tedy 600 – 800 ml plazmy) je profiltrované množství 15 – 20 % protékající krevní plazmy – filtrační frakce. [8]

Výsledný filtrační tlak je pouze 1,3 – 1,5 kPa a to v důsledku snížení původního tlaku proudícího kapilárami glomerulů (6 – 7 kPa). Snížení tlaku je způsobeno působením onkotického tlaku plazmatických bílkovin a tlakem tekutiny v Bowmanově pouzdře. Tlak působící v kapilárách glomerulů je téměř dvojnásobkem tlaku působícího v kapilárách jiných orgánů. Nesmíme zapomenout, že složení a množství filtrační tekutiny prošlé sítí glomerulů je stejně tak závislé jak na tlaku, tak i na propustnosti glomerulární membrány. Ta je složena z několika vrstev s různou propustností – endotelových buněk, bazální membrány a epitelových buněk Bowmanova váčku. [9]

2.2.2 Funkce proximálního tubulu

Hlavním úkolem proximálního tubulu je zpětná resorpce primární moče zpět do krve. Zpětně se zde resorbuje 75 – 80 % glomerulárního filtrátu, a to bez ohledu na stupeň hydratace organismu. Resorpce je poháněna aktivním transportem Na^+ , který zajišťuje Na^+/K^+ pumpa. Ostatní látky se většinou resorbují pasivně po osmotickém a koncentračním gradientu, který vzniká aktivní resorpcí Na^+ . Kromě vody se zde

vstřebává Na^+ , Cl^- , močovina a hydrogenuhličitan. Do peritubulární krve se vrací velká část K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , fosfátů aj. [8,11]

Kvantitativně se zde resorbuje také glukóza, aminokyseliny a množství dalších organických látek. Některé látky se v tubulech aktivně vylučují. Jsou to látky, které přijímáme potravou a které jsou fyziologicky nepotřebné, cizorodé či škodlivé (léky). Část se nejprve detoxikuje v játrech, například sloučením s kyselinou sírovou nebo glukuronovou a teprve pak se tyto sloučeniny vylučují ledvinami. Proximální tubulus se podílí na udržování objemu ECT (extra celulární tekutina) v organismu, nikoli však na udržování osmolality, pH a složení ECT. Do sestupného raménka Henleovy kličky pak odchází izosmotická tubulární tekutina zredukovaná na 20-25 % původního množství glomerulárního filtrátu. [8,11]

2.2.3 Funkce Henleovy kličky

Henleova klička má vlásenkové uspořádání, což znamená, že tekutina teče ve dvou raménkách protiproudem. To je výhodné pro osmotickou úpravu tubulární tekutiny. Descendentní raménko Henleovy kličky je volně prostupné pro vodu a ionty, zatímco tlustá část ascendentního raménka je pro vodu nepropustná a má aktivní mechanismus ke vstřebávání Na^+ a Cl^- z tubulu do intersticia. Tato část je velice důležitá pro vytvoření vysokého osmotického tlaku ve dřeni, který pak umožňuje tvorbu koncentrované moče. [1,8]

2.2.4 Funkce distálního tubulu

Pro vodu je relativně nepropustný. Převažuje zde odstraňování rozpuštěných látek nad odstraňováním rozpouštědla a tubulární tekutina se zředí. Resorpce vody a Na^+ v tomto úseku je variabilní a je regulována aldosteronem, vasopresinem a atriálním natriuretickým faktorem. V distálním tubulu dochází k odstranění asi 5 % filtrované vody. Objem tubulární tekutiny je zde závislý na stupni hydratace organismu a

osmolalitě ECT. Další částí tubulu je spojovací segment, který spojuje konec distálního tubulu se sběracími kanálky. [1,8,11]

2.2.5 Složení a množství moče

Moč je složena především z 95% vody. Dále ji tvoří odpadní látky vznikající při látkové přeměně v organismu (močovina, kyselina močová, močová barviva) a některé ionty. Složení moče odráží stav ledvin, proto její vyšetření dnes patří k základním biochemickým testům při hodnocení stavu organismu. Množství vyloučené moče závisí na příjmu (pitný režim) a ztrátách vody jinými cestami (průjmy, zvracení, pocení). Obvykle se pohybuje mezi 1000 – 1500 ml/24 hodin. Za normálních okolností moč neobsahuje měřitelné množství bílkovin, aminokyselin, glukózy ani bilirubinu a rovněž krev a patogeny (bakterie). Lze prokázat malé množství epitelových buněk a leukocytů a to po centrifugaci moče. Hormonálně je tvorba moče ovlivněna hormonem ADH (adiuretin), ten zvyšuje propustnost buněčných membrán pro vodu v distálním kanálku ledvin a umožňuje tak její reabsorpci. Nedostatek ADH vyvolává diabetes insipidus („žízňivku“). Dalším hormonem je aldosteron, ten zvyšuje v ledvinných kanálcích zpětné vstřebávání iontů sodíku (tím zvyšuje i zpětné vstřebávání vody) a současně sekreci iontů draslíku. [1,5,10]

2.3 Choroby ledvin

Z hlediska funkčnosti nefronu dochází k poškození glomerulární nebo tubulární části. Při poškození glomerulární části nefronu dochází k poklesu glomerulární filtrace (glomerulonefritida, diabetická glomeruloskleróza), a to vede ke špatnému vylučování vody, solí nebo dusíkatých látek. Také může dojít k poškození tubulů a jejich funkce (intersticiální nefritida, akutní tubulární nekróza nebo intoxikace těžkými kovy). Zpravidla všechna onemocnění postupně poškodí obě části glomerulu. Onemocnění ledvin můžeme rozdělit z hlediska průběhu poškození na akutní a chronické. [12,13]

Chronická forma poškození má pomalý nástup a onemocnění se rozvíjí během několika let. Poškození nefronu je nevratné a hodnoty glomerulární filtrace sahají až do patologických hodnot. Naproti tomu akutní forma se vyvíjí rychle a to během několika hodin až dnů. V krátkodobém případě se jedná o reverzibilní pokles exkretně metabolické funkce. [14]

Snížení glomerulární filtrace se projeví zvýšením ledvinových metabolitů v séru (močovina a kreatininu). Určení velikosti glomerulární filtrace (GF) má velký význam v diagnostice onemocnění ledvin. Stupeň snížení GF je přímo úměrný stupni poškození ledviny. [6]

2.3.1 Chronické onemocnění ledvin (CKD)

Chronické onemocnění ledvin (CKD) je stav, kdy ledviny drží stabilní vnitřní prostředí jen při určitých omezeních, jako jsou snížený příjem bílkovin (nizkoproteinová dieta), regulovaný příjem tekutin a minerálů, tělesné šetření a tedy ani žádná mimořádná zátěž (nadměrný přívod sodíku, bílkovin a vody, operace, trauma, infekce). Z klinické praxe je známo, že existuje mnoho situací, kdy nemocní mají omezenou renální funkci, a přesto je toto omezení nijak neohrožuje, protože není progresivní a spojeno s dalšími abnormalitami. Abnormality musí být přítomné po dobu delší jak tři měsíce. Tato doba je nutná pro odlišení od akutního poškození ledvin (AKI – Acute Kidney Injury). AKI mají odlišnou léčbu, diagnostiku, příčiny a následky onemocnění. V případě, že poškození ledvin během tří měsíců přestane být patrné, šlo o akutní poškození ledvin. Většina onemocnění ledvin nemá symptomy až do pozdějších stadií a jsou detekovatelná jako chronická onemocnění. Pacienti s CKD mají 10krát vyšší riziko úmrtí na infarkt myokardu nebo mozkovou příhodu. [15,16,17]

CKD lze vymezit do rozmezí 75 – 25 % normální funkce ledvin. U pacientů s poškozením ledvin se mohou hladiny metabolitů v krvi lišit od fyziologických hodnot,

tedy jsou vyšší avšak delší dobu stabilní, nenarůstají. [15]

2.3.1.1 Definice a klasifikace

V roce 2002 skupina KDOQI (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) vydala doporučení pro definici, klasifikaci a vyšetření CKD. To však vedlo k mnoha diskuzím a spekulacím, které vedly po několika letech k vytvoření nové definice a klasifikace CKD a to podle doporučení KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) publikovaném v roce 2013. [18,19]

Definice pro CKD dle KDIGO jsou: přítomnost poškození ledvin nebo pokles funkce ledvin pod ($1,0 \text{ ml}\cdot\text{s}^{-1}\cdot 1,73 \text{ m}^{-2}$). Obě tato kritéria musí být přítomna nejméně 3 měsíce). [18,20]

Ukazatele poškození ledvin:

- Albuminurie: obsah albuminu $\geq 30 \text{ mg}/24 \text{ hodin}$ nebo poměr albumin/kreatinin $\geq 3,0 \text{ mg}/\text{mmol}$ (fyziologická albuminurie je $< 1,0 \text{ mg}/\text{mmol}$ kreatininu)
- Nález v močovém sedimentu (např. erytrocytární válce, leukocytární válce, granulované válce)
- Nález ukazující na renální tubulární poruchy, tj. elektrolytové a jiné poruchy vnitřního prostředí způsobené tubulárními poruchami (např. renální tubulární acidóza, renální tubulární proteinurie)
- Histologický nález při biopsii. Nález zjištěný zobrazovacími metodami (např. polycystické ledviny, hydronefróza způsobená obstrukcí)
- Anamnéza transplantace ledvin

Pacient s CKD by měl být klasifikován podle:

- Příčiny (např. diabetické CKD, CKD způsobené amyloidózou)
- Kategorie GF (G1, G2, G3a, G3b, G4, G5)
- Kategorie albuminurie (A1, A2, A3)

Kategorie GF:

- CKD I: normální, nesnížená glomerulární filtrace (glomerulární filtrace $> 1,5$ ml/s. $1,73^{-2}$)
- CKD II: lehká ledvinná nedostatečnost (glomerulární filtrace 1,0 - 1,49 ml/s. $1,73^{-2}$)
- CKD III: středně těžká ledvinná nedostatečnost (glomerulární filtrace 0,5 - 0,99 ml/s. $1,73^{-2}$)
- CKD IV: těžká ledvinná nedostatečnost (glomerulární filtrace 0,25 - 0,49 ml/s. $1,73^{-2}$)
- CKD V: ledvinné selhání (glomerulární filtrace $< 0,25$ ml/s. $1,73^{-2}$)

Kategorie albuminurie

- A1 - Albuminurie <30 mg/24 h
- A2 - Albuminurie 30 až 300 mg/24 h
- A3 - Albuminurie >300 mg/24 h.

2.3.2 Akutní poškození ledvin (AKI)

Akutní poškození ledvin (dříve známé jako akutní selhání ledvin) se vyvíjí náhle během několika hodin až dní (např. při akutní glomerulonefritidě, vlivem nefrologických jedů či při šoku; při šoku je selhání ledvin zprvu reverzibilní, později dochází k anatomickým změnám – akutní tubulární nekróze. I v tomto případě může dojít k regeneraci buněk ledvin a částečné restituci renálních funkcí. Časnou

diagnostikou a účinnou léčbou můžeme tíži poškození významně ovlivnit. Akutní poškození ledvin bylo definováno a klasifikováno dle kritérií RIFLE (Risk, Injury, Failure, Loss, Endstage kidney disease), založených na nejhorší hodnotě sérového kreatininu nebo diurézy kdykoli v průběhu hospitalizace.[21,22,13]

3 stádia AKI:

- I. Riziko (Risk)
- II. Poškození ledvin (Injury)
- III. Selháni ledvin (Failure)

2.4 Glomerulární filtrace

Historie vyšetření glomerulární filtrace sahá až do roku 1926, kdy byl objeven princip měření GF. Funkční vyšetření ledvin umožňuje posoudit, zda je funkce ledvin fyziologická či snižená a určit stupeň tohoto snížení. K základním metodám patří právě vyšetřování glomerulární filtrace (GF), kdy stupeň snížení GF slouží jako klasifikační marker stupně závažnosti poškození ledvin. Glomerulární filtrace je společně s tubulární resorpcí a sekrecí jedním ze základních mechanismů sloužících k udržení homeostázy vnitřního prostředí. Hodnota GF se s přibývajícím věkem snižuje. [23,24,13]

Tabulka č. 1 Faktory rozhodující o filtraci v glomerulárních kapilárách

Faktory rozhodující o filtraci v glomerulárních kapilárách:
Rozsah kapilárního řečiště (filtrační plocha)
Permeabilita kapilár
Gradient hydrostatických a onkotických tlaků přes kapilární stěnu

Z hlediska teorie výpočtu GF je hodnota filtrace v jednom glomerulu:

$${}_SNGF = K_i \cdot (P - \pi)$$

Kde je:

- K_i – filtrační koeficient

- $K_i = k \cdot S$ (k je efektivní hydraulická permeabilita; S je velikost filtrační plochy)
- P – střední transkapilární hydraulický gradient
- π – střední diference onkotického tlaku.

Celková GF je pak rovná násobku $_{SN}GF$ počtem glomerulů:

$$GF = N \cdot _{SN}GF$$

Tabulka č. 2 Faktory ovlivňující GF.

Faktory ovlivňující GF
Změny průtoku krve ledvinou
Změny v systémovém krevním tlaku
Změny hydrostatického tlaku v Bowmanově pouzdře
Obstrukce ureteru
Edém ledvin v pevném pouzdru
Změny koncentrace plazmatických proteinů (dehydratace, hypoproteinemie)
Stadium CKD
Těhotenství
Snížení perfúze ledvin
Zvýšení a snížení objemu ECT
Léky
Akutní příjem bílkovin nebo aminokyselin
Hyper a hypoglykemie
Hodnota TK a hypertenze

V současné době se užívá ke stanovení GF metod přímých (se sběrem moče) či metod výpočtových (bez sběru moče) vycházejících z hodnoty sérového kreatininu nebo cystatinu C a dalších proměnných faktorů (věk, hmotnost, urea, albumin, pohlaví, rasa apod.).[20]

2.4.1 Metody měření GF se sběrem moče

2.4.1.1 Renální clearance inulinu

Polysacharid inulin je tvořen ze základních fruktózových jednotek. Je filtrován glomerulem a jeho veškeré přefiltrované množství je vyloučené v definitivní moči. Míra filtrace, tzv. clearance inulinu poskytuje nejpravdivější hodnotu GF, vyžaduje však přesné a metodicky poměrně náročné laboratorní vyšetření za standardních podmínek hydratace. Z tohoto důvodu se v praxi měření inulinu nevyužívá. [13,23]

2.4.1.2 Renální clearance (endogenního) kreatininu

Kreatinin vzniká ve svalů metabolizací kreatininu, je volně filtrován v glomerulech a je vylučován do moče převážně glomerulární filtrací, ale částečně také tubulární sekrecí. U zdravých jedinců je tubulární sekrecí vylučováno do moče maximálně 5 až 10 % vylučovaného kreatininu. Skutečnou hodnotu glomerulární filtrace tedy clearance kreatininu systematicky nadhodnocuje (zhruba o 10 až 20%). U pacientů s chronickým renálním onemocněním (CKD 4 až 5) se tubulární sekrece kreatininu zvyšuje a v konečných stádiích renálního selhání ledvin může clearance kreatininu přesahovat GF až o 100%. [13,23]

Některé léky, např. cimetidin nebo trimetoprim, mají za následek blokování tubulární sekrece kreatininu a v tomto případě nemusí znamenat vzestup sérového kreatininu snížení GF, ale pouze snížení tubulární sekrece kreatininu. [23]

Z praktických důvodů se často spokojíme s odhadem glomerulární filtrace podle hodnot sérového kreatinu. Vztah mezi clearancí kreatinu a sérovým kreatininem je hyperbolický, tzn., že při poklesu clearance kreatininu až přibližně o 50 % stoupá sérový kreatinin jen minimálně. Vzhledem k tomu že sérový kreatinin závisí také na

množství svalové hmoty, jsou hodnoty sérového kreatininu výrazně nižší u drobných jedinců, u žen a také nemocných se svalovou atrofií. Odhad glomerulární filtrace pouze na podkladě sérového kreatininu může vést u některých jedinců k nerozpoznání chronické renální insuficience. [13,20]

Kreatininová clearance se určuje podle měření močového vylučování kreatininu, sérové koncentrace kreatininu, doby sběru moče a objemu. Výpočet se provádí dle vzorce:

$$C_{kr} = (U_{kr} \cdot V) / S_{kr}$$

Kde je:

- U_{kr} - koncentrace kreatininu v moči v $\mu\text{mol/l}$
- V - objem moče vytvořený za sledovanou časovou jednotku v ml/s
- S_{kr} - koncentrace kreatininu v krevním séru v $\mu\text{mol/l}$

Hodnota C_{kr} (clearance kreatininu) poskytuje lepší představu o GF než odhad na základě S_{kr} , protože tato veličina není ovlivněna extrarenálními faktory působícími na hodnotu S_{kr} . Jde o extrarenální vylučování kreatininu především střevem u jedinců v pokročilejším stadiu CKD, změny distribučního prostoru kreatininu (zvláště u jedinců s velkými otoky) a zejména rozdíly v objemu svalové hmoty nebo příjmu masa. Produkce kreatininu závisí též na funkci jater. V játrech je tvořen kreatin, který je uvolňován do cirkulace, vychytáván ve svalech, kde je neenzymaticky přeměněn na kreatinin. Hodnoty C_{kr} se přepočítávají na ideální tělesný povrch ($1,73 \text{ m}^2$). Jak je zřejmé ze vzorce pro výpočet C_{kr} , je pro stanovení této veličiny nutný přesný sběr moče. Tato okolnost je v denní praxi často velkým problémem a chyby v neúplném sběru moče znemožňují posoudit správně C_{kr} . To je jedním z hlavních důvodů, proč řada kliniků raději volí odhad GF na podkladě hodnocení S_{kr} nebo užije výpočtové metody. [20]

2.4.2 Metody měření GF bez sběru moče

Cílem všech výpočtových metod odhadu glomerulární filtrace (eGF) je provedení bez sběru moče. Nesprávný sběr moče představuje největší zdroj chyb při běžném stanovení. Výpočtové metody vycházejí ze sérových hodnot stanovovaných analytů a dalších proměnných faktorů (věk, hmotnost, pohlaví, rasa, urea...). Mezi tyto analyty patří kreatinin a cystatin C. [20,25]

2.4.2.1 Cystatin C

V roce 1961 se uskutečnily tři různé studie, které nezávisle na sobě popsaly nový protein objevený při imunoэлектрофорéze. Tento bazický nízkomolekulární protein se objevuje v elektroфорéze za γ globulinovou frakcí, proto jeho první název byl "protein za γ " nebo " γ stopa" (z angl. "post γ protein" nebo " γ trace"). Později různí autoři potvrdili jeho přítomnost v krvi a dalších tělních tekutinách (slinách, cerebrospinnální tekutině-CSF, seminální tekutině a mlezivu). V roce 1979 Lofberg a Grubb použili k jeho stanovení radiální imunodifúzi a tím potvrdili jeho přítomnost v krvi, slinách a CSF, avšak v různém množství. Jeho koncentrace v CSF byla 5 krát vyšší než v plazmě. Dále byla zjištěna vyšší sérová koncentrace u dialyzovaných pacientů než u zdravých lidí. A také nárůst koncentrace v moči u pacientů s tubulopatií. Po určení sekvence aminokyselin a molekulové hmotnosti ($M_r = 13260$) vyjádřil v roce 1982 Brzin a kolegové podobnost mezi tímto proteinem a inhibitorem cysteinových proteináz patřící do rodiny cystatinů. Poté vznikl dnešní název cystatin C. V roce 1984 ho Grubb a kolegové navrhli jako biologický ukazatel glomerulární filtrace. Nedostal se však ještě na stejnou úroveň jako kreatinin z důvodu nedostatečných poznatků. O 20 let později se však znalosti o cystatinu C natolik zdokonalily, že byl navržen jako ukazatel glomerulární filtrace, který má nahradit kreatinin. Jeho význam nacházíme především u pacientů s výrazně odchýlenou hodnotou svalové hmoty. Další studie umožnily jeho využití v měření renální funkce u různých populací a dále i klinické využití v kardiologii, onkologii a klinické farmakologii. [26]

2.4.2.1.1 Fyziologie a metabolismus cystatinu C

Cystatin C patří do skupiny inhibitorů cysteinových proteináz. Cysteinové proteinázy jsou enzymy, které katalyzují štěpení bílkovin a obsahují ve svém aktivním centru aminokyselinu cysteinu. Hrají velkou roli v intracelulárním katabolismu peptidů a proteinů, např. při proteolýze prohormonů a proenzymů, destrukci kolagenu a crossingu bazální membrány v nádorových buňkách. [24,27,28]

Cystatin C je neglykosylovaný bazický nízkomolekulární protein o relativní molekulové hmotnosti 13000, který tvoří všechny jaderné buňky. Cystatin C je bez omezení filtrován přes glomerulární kapiláry, protože má nízkou molekulovou hmotnost a žádný vázající protein. V proximálním tubulu je zcela reabsorbován do tubulárních buněk, v kterých je kompletně katabolizován, takže do peritubulární tekutiny žádný cystatin C nepřechází. Tubulární reabsorbce se děje přes receptor megalin (společný pro více proteinů) procesem, který se nazývá endocytóza. Je široce akceptováno, že k tubulární sekreci cystatinu C nedochází. Fyziologická koncentrace cystatinu C v moči je extrémně nízká (v rozmezí desetin mg/l) a může být změřená imunonefelometricky. Zjištěné koncentrace vyšší než fyziologické jsou brány jako tubulární patologie.[23,26,27]

Cystatin C je kódován provozním genem, tj. genem, jehož exprese není regulována. To znamená, že má cystatin C konstantní produkci. Jeho konstantní produkce a malá molekula způsobují, že je koncentrace cystatinu C v krevním séru (plazmě) závislá především na glomerulární filtraci. Z tohoto důvodu byl cystatin C navržen jako marker renální funkce, který by mohl nahradit kreatinin. [23,25,26]

Fyziologické vlastnosti cystatinu C jako ukazatele GF:

- konstantní produkce a konstantní koncentrace v plazmě při kolísavé GFR
- nízká intraindividuální variabilita (u konkrétní osoby je jeho produkce konstantní)

- žádná vazebná plazmatická bílkovina
- žádná sekrece a reabsorpce do ECT
- žádná extrarenální clearance.

Protože produkce cystatinu C nepodléhá cirkadiánnímu rytmu, může se stanovit kdykoliv během dne. [17]

2.4.2.1.2 Faktory ovlivňující produkci cystatinu C

Pohlaví je jedním z faktorů ovlivňující hodnoty sérového cystatinu. Až do 60. roku života dospělých lidí jsou koncentrace cystatinu C u žen a mužů rozdílné. U žen je hladina v séru nižší než u mužů. Dále je vyšší produkce cystatinu C u dětí do 14 let, hranice 14 let je spojena se začínající pubertou. Zvýšené hodnoty jsou stanoveny také u novorozenců, včetně předčasně narozených, bez ohledu na pohlaví, hmotnost a výšku dítěte. Příčinou zvláště u dříve narozených dětí je nízká GF, která odráží proces vyžívání ledvin. [29]

Stanovení cystatinu C v séru u dětí je výhodou, protože jeho hladina není závislá na tělesné výšce na rozdíl od sérového kreatininu, který je na tomto parametru závislý. Dále je možno posoudit funkci ledvin plodu ze stanovení sérového cystatinu C, protože cystatin C neprochází fetoplacentární membránou oproti kreatininu. Studie o cystatinu C ukazují, že sérový cystatin C je ovlivněn svalovou hmotou, přesto variabilita produkce cystatinu C způsobená svalovou hmotou je daleko menší než v případě kreatininu. Velmi značná výhoda stanovení cystatinu C nad kreatininem je u pacientů se sníženou svalovou výbavou, např. při podvýživě či ztrátě významné části končetiny, dlouhodobé imobilizaci a svalové dystrofii. [29,30,31]

Zvýšenou sérovou hladinu cystatin C mají pacienti, kteří užívají k léčbě glukokortikoidy, pacienti s nekompenzovanou hypertyreózou nebo se vyskytuje u pacientů s progresí melanomu, kolorektálním karcinomem nebo u lymfoproliferativních

procesů. Naopak snížené hodnoty cystatinu C v séru mají pacienti s hypotyreózou, tedy koncentrace cystatinu C je přímo úměrná množství hormonů štítné žlázy. [13,25]

2.4.2.1.3 Vhodné využití cystatinu C

Velmi značná výhoda stanovení cystatinu C nad kreatininem je u pacientů se sníženou svalovou výbavou, např. při podvýživě či ztrátě významné části končetiny, dlouhodobé imobilizaci a svalové dystrofii. K potvrzení chronického onemocnění ledvin: GF pod $1,0 \text{ ml}\cdot\text{s}^{-1}\cdot 1,73\text{m}^{-2}$ podle odhadu ze sérového kreatininu, zejména nejsou-li přítomné markery poškození ledvin. U stavů, kde koncentrace kreatininu v séru je významně ovlivněna (těhotné, generalizované otoky, malé děti, rychlé změny stavu aj.) [13,30,31]

2.4.2.1.4 Stanovení cystatinu C

Cystatin C stanovujeme pomocí imunochemických metod založených na aglutinaci latexových částic potažených polyklonální protilátkou proti cystatinu C a to metody PENIA (particle-enhanced nephelometric immuno-assay), pracuje na principu imunonefelometrie a metodu PETIA (particle-enhanced turbidimetric immuno-assay), která pracuje na principu imunoturbidimetrie. U metody PETIA se měří množství propuštěného světla ve stejném směru jako zdroj světla a u metody PENIA se měří množství rozptýleného světla v úhlu 90° od zdroje světla. Hlavním rozdílem mezi metodami je, že PETIA může být prováděná na multianalytických automatických biochemických analyzátoch, na rozdíl od metody PENIA, která může být prováděná na automatických imunonefelometrech. [30]

Protilátky použité při aglutinaci jsou různého původu. Metoda PENIA Siemens užívá vlastní polyklonální protilátky. K dostání jsou také reagentie vyráběné od DakoCytomation, které obsahují latexové částice potažené králičí protilátkou. Tyto reagentie mohou být užity jak v PETIA tak v PENIA.

V současnosti jsou k dispozici 2 typy kalibračního materiálu:

- DakoCytomation a Gentian AS používají rekombinantní lidský sérový cystatin C
- Siemens používá purifikovaný cystatin C z lidské moče

Podle doporučení České nefrologické společnosti ČLS JEP a České společnosti klinické biochemie ČLS JEP z roku 2014 stanovení cystatinu C v séru je nezbytné provádět pouze metodou, jejíž pracovní kalibrátor je metrologicky návazný na mezinárodní referenční materiál ERM DA 471/IFCC. Použití nestandardizovaného stanovení cystatinu C bez metrologické návaznosti pracovního kalibrátoru na ERM-DA 471/IFCC je zcela obsoletní. Přesto není tato standardizace cystatinu C pomocí nového referenčního materiálu u některých metod některých výrobců doposud provedena. Preciznost měření lze při měření koncentrací kolem 1 mg/l charakterizovat hodnotou $CV = 3,0$ až $5,6$ % a při měření v koncentračním intervalu 2,0 až 4,0 mg/l cystatinu C je hodnota $CV = 1,1$ až $3,5$ %. [30,32]

Turbidimetrie je optická metoda založená na měření procházejícího světla zeslabeného rozptylem na částicích. Nejvýznamnější z metod založených na měření stupně zákalu – turbidity, je celá řada. Nejvýznamnější je skupina imunochemických metod založená na principu antigen protilátka. Absorpce záření po průchodu koloidním roztokem nebo roztokem zakaleným jemnou sraženinou, se měří absorpčními fotometry a spektrofotometry. Největší citlivosti turbidimetrických metod se dosahuje modrým světlem (435–480 nm), protože halogenová žárovka svítí při 340 nm poměrně slabě a její světlo musí být zesíleno násobičem. [33]

Nefelometrie se zabývá měřením intenzity difúzně rozptýleného světla na dispergovaných částicích. Rozptýlené světlo vychází z roztoku všemi směry, tzv. Tyndallovo světlo. Toto světlo se měří pod úhlem, který je odlišný od směru dopadajícího záření. Používá se buď laserový nefelometr, využívá helium-neonového laseru, detektor je nastaven pod úhlem 5 až 35 stupňů anebo konvenční nefelometr, ten využívá jako zdroj světla žárovku nebo xenonovou výbojku a mají interferenční filtr.

Detektor je nastaven pod úhlem 70 až 90 stupňů. Nefelometr je citlivější než turbidimetr. [33]

2.4.2.2 Kreatinin

Kreatinin ($M_r = 113,12$) je cyklická dusíkatá organická látka. Z hlediska chemické struktury je to anhydrid kreatinu. Kreatin je dusíkatá organická kyselina, na kterou poprvé upozornil roku 1832 francouzský chemik Michel Eugene Chevreul. Nově objevená kyselina získala svůj název z řeckého slova “kreas“ což znamená maso. [34]

2.4.2.2.1 Vznik a metabolismus

Kreatinin vzniká ve svalu z kreatinfosfátu ireversibilní neenzymovou dehydratací a ztrátou fosfátu. Kreatin se tvoří enzymaticky v játrech a na jeho biosyntéze se podílejí tři aminokyseliny- arginin, glycin a methionin. Z jater se kreatin transportuje krví především do kosterních svalů, myokardu a mozku. Ve svalech plní velmi důležitou funkci ve formě kreatinfosfátu tím, že kumuluje volnou energii v tzv. makroergních vazbách. [34,35]

Kreatinfosfát vzniká z ATP a kreatinu, když je sval relaxován a požadavky na ATP nejsou tak vysoké. Enzym, který katalyzuje fosforylaci kreatinu, se jmenuje kreatinfosfokináza (CPK). Nejvíce energie svalová buňka využívá na počátku zvýšené svalové činnosti, kdy se okamžitě z kreatinfosfátu uvolňuje makroergní fosfát. Ten se naváže na ADP za vzniku ATP a tím je dodána potřebná energie na stah. V kosterních svalech je asi 98% z celkové zásoby kreatinu, která je přímo úměrná svalové hmotnosti a závislá na věku, pohlaví a příjmu v potravě. Kreatinin je vlastně odpadním produktem degradace kreatinfosfátu. Denně jsou na kreatinin přeměněny asi 1-2 % svalového kreatinu. [35]

2.4.2.2.2 Vylučování kreatininu

Mezi produkcí a exkrecí kreatininu je za normálních okolností rovnovážný vztah. Koncentrace sérového kreatininu závisí na množství svalové hmoty a s tím souvisejícím věku a pohlaví. Dále na funkci glomerulů, proto je vhodným ukazatelem funkční kapacity glomerulů. A také koncentraci sérového kreatininu ovlivňuje jeho příjem v potravě. Kreatinin je látka bezprahová, protože se volně filtruje přes ledvinné glomeruly (90% je filtrováno a 10% se do moče dostává tubulární sekrecí) a není resorbována tubuly zpátky do krve. [35]

2.4.2.2.3 Změny koncentrace kreatininu

Koncentrace kreatininu během dne kolísá, podléhá cirkadiánnímu rytmu. Maximální koncentrace jsou večer a minimální ráno, s rozdílem až 50 %. Rozdíl je závislý na fyzické aktivitě. Jinak je koncentrace kreatininu menší u žen než u mužů (je to dáno menším množstvím svalové hmoty). Výrazně nižší hodnoty sérového kreatininu se nacházejí v dětském věku. Tím, že je produkce kreatininu přímo úměrná množství svalové hmoty, tak u konkrétní osoby je jeho denní produkce téměř konstantní. Sníženou koncentraci kreatininu v séru mají těhotné ženy a lidé s hyperthyreózou (mají zvýšenou velikost glomerulární filtrace). Dále pacienti se svalovými atrofiemi. Nízkou koncentraci kreatininu v séru také způsobuje nedostatečný příjem proteinů v potravě. Zvýšená koncentrace sérového kreatininu se vyskytuje u zvýšené produkce kreatininu (pacienti s rozsáhlým poškozením svalů při traumatech nebo při tělesné námaze) a také při zvýšeném příjmu bílkovin (maso, masné výrobky, masový vývar). Nebo je příčina ve sníženém vylučování kreatininu ledvinou (prerenální, renální a postrenální příčiny postižení ledvin). Zvýšenou hladinu mají pacienti se sníženou funkcí štítné žlázy. [30,31,35]

2.4.2.2.4 Stanovení kreatininu

Referenční metodou stanovení kreatininu je plynová chromatografie s izotopovou dilucí a hmotnostní spektrometrií. Byly vytvořeny referenční materiály, od kterých se odvozují komerční soupravy pro stanovení kreatininu, které mají eliminovat nízkou specifičnost stanovení. [30]

Rutiní metoda - Jaffého reakce je založena na reakci kreatininu v alkalickém prostředí s kyselinou pikrovou (trinitrobenzoovou) za vzniku červenooranžového komplexu. Intenzita zbarvení vzniklého produktu se stanovuje spektrofotometricky a je přímo úměrná koncentraci kreatininu v analyzovaném vzorku. [34,35]



Jaffého reakce není specifická, s kyselinou pikrovou reagují také tzv. Jaffého pozitivní chromogeny. Falešné zvýšení koncentrace kreatininu způsobuje např. kyselina askorbová a zvýšená koncentrace glukózy a ketolátek. Dále ovlivňuje výsledek stanovení kreatininu zvýšená koncentrace bilirubinu, proto je nutné rušící vliv bilirubinu odstranit (použití ferrikyanidu, který katalyzuje oxidaci bilirubinu na biliverdin). Další možností zvýšení specifity Jaffého reakce je kinetický způsob měření, protože látky reagují s kyselinou pikrovou různou rychlostí. V současnosti dochází k úpravám této metody, aby byly výsledky srovnatelné s referenční metodou alespoň v oblasti rozhodovacích limitů. Je doporučeno kalibrovat kalibračním materiálem s návazností na certifikovaný referenční materiál. [23,34]

Rutiní enzymová metoda je specifická pro kreatinin, a proto více preferována než Jaffého reakce. V současné době se v rutinní praxi používá stále častěji, avšak je stále nákladnější. Je založena na enzymatické přeměně kreatininu na kreatin, který je řetězcem enzymaticky katalyzovaných reakcí přeměněn na konečný produkt a ten je pak stanoven. Podmínkou enzymové metody je odstranit rušící vliv endogenního kreatinu v

krvi předtím než dojde k enzymatické přeměně kreatininu na kreatin. [23,34,35]

2.4.2.2.5 Využití stanovené koncentrace kreatininu

Mezi koncentrací sérového kreatininu a velikostí glomerulární filtrace je hyperbolická závislost, proto není koncentrace sérového kreatininu dostatečně citlivým ukazatelem GF. Při poklesu GF z normálních hodnot k hodnotám středně sníženým, je vzestup kreatininu v séru relativně malý. Takto unikají záhytu významné poklesy GF, pokud se sleduje pouze hodnota sérového kreatininu. Kreatininémie začne stoupat až tehdy, když je GF snížena pod 50%. Rychlost zvyšování kreatininémie je dána rychlostí produkce (uvolnění ze svalů, exogenní příjem), distribučním objemem (snížení objemů tělních tekutin) a novou úrovní GF (stupeň funkčnosti GF) [23,30,31]

I přesto, že hodnota sérového kreatininu není dostatečně platná pro určení GF, řadí se mezi základní nefrologická vyšetření a při rozhodování o dialyzační léčbě se přihlíží k vysokým hodnotám této látky v séru. Je doporučeno GF nehodnotit pomocí samotné sérové koncentrace kreatininu, ale za použití výpočtových metod pro odhad GF. [30,31]

2.4.2.3 Výpočtové metody odhadu GF ze sérové koncentrace kreatininu

2.4.2.3.1 Odhad GF pomocí vzorců MDRD a CKD-EPI

Rovnici CG (Crockrofta a Gaulta) nahradila rovnice MDRD. Na rozdíl od CG byla odvozena od studie na pacientech s CKD a jako proměnná v ní nefiguruje hmotnost a je vztahena na standardní povrch těla $1,73 \text{ m}^2$. V odhadu GF v rozmezí hodnot $< 60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ je přesnější než CG. Protože pro hodnoty $> 60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ vzorec MDRD podhodnocuje GF, byla z tohoto důvodu byla stejnými autory vytvořena rovnice, která bude použitelná i pro zdravou populaci a to v roce 2009 rovnice CKD-EPI. Rovnice CKD-EPI poskytuje výsledky nejbližší reálné GF a je doporučeno ji v

současnosti preferovat před rovnicí MDRD. Používá stejné čtyři proměnné jako MDRD rovnice. [25,30,36]

Rovnice MDRD

Rovnice mezinárodně doporučena, zjednodušená se čtyřmi členy.

Vzorec pro výpočet eGF [$\text{ml}\cdot\text{s}^{-1}\cdot 1,73 \text{ m}^{-2}$]

$$3,1 \cdot (S_{\text{kr}} \cdot 0,0113)^{-1,154} \cdot \text{věk}^{-0,203} \cdot 0,742 \text{ (ženy)} \cdot 1,21 \text{ (černá populace)}$$

Jednoduchou úpravou dostaneme:

$$547,1535 \cdot S_{\text{kr}}^{-1,154} \cdot \text{věk}^{-0,203} \cdot 0,742 \text{ (ženy)} \cdot 1,21 \text{ (černá populace)}$$

V souvislosti se zaváděním standardizované metody stanovení kreatininu, kdy výsledky měření jsou metrologicky návazné na mezinárodní standard, a použitím metody stanovení ID-MS z roku 2005 je rovnice modifikována a v této podobě platí pouze při stanovení kreatininu standardizovanou metodou. [36]

Vzorec pro výpočet eGF [$\text{ml}\cdot\text{s}^{-1}\cdot 1,73 \text{ m}^{-2}$]

$$2,92 \cdot (\text{stand } S_{\text{kr}} \cdot 0,0113)^{-1,154} \cdot \text{věk}^{-0,203} \cdot 0,742 \text{ (ženy)} \cdot 1,21 \text{ (černá populace)}$$

jednoduchou úpravou dostaneme:

$$515,383 \cdot (\text{stand } S_{\text{kr}})^{-1,154} \cdot \text{věk}^{-0,203} \cdot 0,742 \text{ (ženy)} \cdot 1,21 \text{ (černá populace)}$$

Rovnice CKD-EPI

Tabulka č. 3 Rovnice CKD-EPI z roku 2009 (kreatinin).

	S _{kr} [μmol/l]	Vzorec pro výpočet eGF [ml.s ⁻¹ .1,73 m ⁻²]
Ženy	≤ 62 2,4	2,4.(S _{kr} /0.7) ^{-0.329} . 0,993 ^{věk} . 1,159 (černá populace)
	> 62 2,4	2,4.(S _{kr} /0.7) ^{-1.209} . 0,993 ^{věk} . 1,159 (černá populace)
Muži	≤ 80	2,35.(S _{kr} /0.9) ^{-0.411} . 0,993 ^{věk} . 1,159 (černá populace)
	<80	2,35.(S _{kr} /0.9) ^{-1.209} . 0,993 ^{věk} . 1,159 (černá populace)

Tyto metody poskytují pravdivější odhad GF než S_{kr}. Obecně je eGF pomocí rovnice MDRD a CKD-EPI ze sérového kreatininu doporučována jako základní metoda. [30]

2.4.2.3.2 Odhad GF u dětí pomocí rovnice podle Schwartze

Tuto rovnici je doporučeno používat pro odhad GF u dětí a mladistvých. Rovnice podle Schwartze pochází z roku 1984 a byla určena pro děti do 13 let. V současné době je tato rovnice modifikovaná a lze ji použít do 18 let.

Vzorec pro výpočet eGF [ml.s⁻¹.1,73 m⁻²]:

$$eGF = F \cdot \text{výška} / S_{kr}$$

kde je:

- výška- výška postavy v cm
- S_{kr} - koncentrace kreatininu v séru v μmol/l
- F- faktor podle následující tabulky:

Tabulka č. 4 Podmínky použití faktoru F v rovnici dle Schwartze.

Podmínky	Faktor F
Věk do 1 roku	0,663
	0,487 u předčasně narozených
Dívky, od 1 do 18 let	0,810
Chlapci, od 1 do 12 let	0,810
Chlapci, od 12 do 18 let	0,959

2.4.2.4 Výpočtové metody odhadu GF ze sérové koncentrace cystatinu C

Pro odhad glomerulární filtrace ze sérového cystatinu C u dospělých lze využít rovnici CKD-EPI z roku 2012. Cystatin C musí být stanoven metodou metrologicky navázanou na referenční materiál DA ERM 471/IFCC, viz dále rovnice. [30]

2.4.2.5 Rovnice CKD-EPI z roku 2012 (cystatin C)

Tabulka č. 5 Rovnice CKD-EPI 2012 (cystatin C).

Scyst [mg/l]	Vzorec pro výpočet eGF [$\text{ml}\cdot\text{s}^{-1}\cdot 1,73\text{ m}^{-2}$]
$\leq 0,8$	$2,217 \cdot (S_{\text{cyst}}/0,8)^{-0.499} \cdot 0.996 \text{ věk} \cdot 0,932$ (pro ženy)
$> 0,8$	$2,217 \cdot (S_{\text{cys}}/0,8)^{-1.328} \cdot 0.996 \text{ věk} \cdot 0,932$ (pro ženy)

2.4.2.6 Rovnice CKD-EPI z roku 2012 (kreatinin a cystatin C)

Kombinovaná rovnice pro odhad ze sérového kreatininu a cystatinu C. Kreatinin i cystatin C byly měřeny standardizovanými metodami s metrologickou návazností výsledků měření. [30]

Tabulka č. 6 Rovnice CKD-EPI z roku 2012 (kreatinin a cystatin C).

	Skr [μmol/l]	Scyst [mg/l]	Vzorec pro výpočet eGF [ml.s ⁻¹ .1,73 m ⁻²]
Ženy	≤ 62	≤ 0,8	2,17. (S _{Kr} /0.7) ^{-0.248} . (S _{Cyst} /0.8) ^{-0.375} . 0.995věk . 1,08 (černá populace)
	≤ 62	> 0,8	2,17. (S _{Kr} /0.7) ^{-0.248} . (S _{Cyst} /0.8) ^{-0.711} . 0.995věk . 1,08 (černá populace)
	> 62	≤ 0,8	2,17. (S _{Kr} /0.7) ^{-0.601} . (S _{Cyst} /0.8) ^{-0.375} . 0.995věk . 1,08 (černá populace)
	> 62	> 0,8	2,17. (S _{Kr} /0.7) ^{-0.601} . (S _{Cyst} /0.8) ^{-0.711} . 0.995věk . 1,08 (černá populace)
Muži	≤ 80	≤ 0,8	2,25. (S _{Kr} /0.9) ^{-0.207} . (S _{Cyst} /0.8) ^{-0.375} . 0.995věk . 1,08 (černá populace)

Pro stanovení cystatinu C a odhadu GF podle jeho sérové koncentrace platí:

- Hodnota eGF má vyšší výpovědní hodnotu, než samotná hodnota cystatinu C.
- Výsledky stanovení cystatinu C v séru a hodnoty eGF_{cys} by se měly vydávat společně.
- K výpočtu eGF_{cys} se má používat rovnice CKD-EPI 2012.
- Výsledky cystatinu C a eGF se mají uvádět na dvě desetinná místa.

V pediatrii lze aplikovat výpočet eGF z cystatinu C:

$$eGF = 70,69. (S_{cyst})^{-0,931}$$

2.4.2.7 Izotopové metody vyšetření GF

Izotopové metody ⁹⁹mTc – DTPA (diethyltriaminopentaoctová kyselina), ⁵¹Cr – EDTA (ethylendiaminotetraoctová kyselina), ¹²⁵I – thalamát

Izotopem značená látka je vyšetřovanému intravenózně podána v přesně známém množství. Následují odběry krve ve stanovených časových intervalech a vyšetřování koncentrace značené látky v plazmě.

Z míry poklesu hladiny izotopem značené látky lze vypočítat plazmatickou clearance, která je pro vybrané látky vylučované z organismu pouze glomerulární filtrací totožná s její renální clearancí. [30]

3. Hypotézy a cíle práce

3.1 Cíle práce

Cílem mé práce bylo osvojení si použitých laboratorních vyšetřovacích metod a porovnání hodnot glomerulární filtrace získané pomocí výpočtů ze vzorců MDRD, CKD-EPI, které vycházejí pouze ze stanovení cystatinu C a kreatininu v séru a klasické clearance endogenního kreatinu se sběrem moče za 24 hodin. Dalším cílem bylo testování hypotézy.

3.2 Hypotézy

Předpokládám, že stanovení GF každou uvedenou metodou je zastupitelné u pacientů s podezřením na chronické poškození ledvin.

4. Metodika

4.1 Preanalytická část

Preanalytická fáze se skládá ze dvou částí - mimolaboratorní a laboratorní. Mimo laboratoř probíhá příprava a vyšetření pacienta, odběr vzorku a jeho transport do laboratoře. V této fázi je řada faktorů, kterými lze ovlivnit výsledek vyšetření. Je důležité, pokud to lze, tyto faktory úplně, nebo z velké části, eliminovat. V případě neúplného odstranění těchto faktorů je důležité je správně interpretovat ve vztahu k výsledkům z provedených analýz v dané laboratoři. [23]

Tabulka č. 7 Faktory ovlivňující neanalytickou fázi.

	Faktory ovlivňující preanalytickou fázi
Biologické vlivy	Neovlivnitelné – rasa, pohlaví, věk, gravidita, biologické rytmy
	Ovlivnitelné – hmotnost, životní styl, stravovací návyky, kouření, alkohol, drogy, fyzická zátěž a tělesná aktivity, zevní prostředí, mechanické trauma a stres
Odběr materiálu	Nejčastější chyby – odběr (vhodná stabilizační a protisrážlivá činidla, technika odběru, dostatečné a správné poučení pacienta) a jeho označení (důležité aby nedošlo k záměně materiálu)
Transport materiálu	Šetrný, rychlý, při adekvátní teplotě a světelných podmínkách
Skladování materiálu	Zpracování vzorku v časovém rozmezí 24 – 48 hodin – u většiny analytů postačí chladničková teplota 2 – 8°C Pro dlouhodobé zpracování – vhodné teploty -20°C, popřípadě -80°C Možná i chemická konzervace (spíše při skladování moče)

4.1.1 Použitý biologický materiál

4.1.1.1 Sbíraná moč za 24 hodin

Pacient sbírá moč po dobu 24 hodin. Sběr může být rozdělen do tzv. dvou frakcí, kdy každá frakce trvá po dobu dvanácti hodin. Nebo lze sbírat moč za celých 24 hodin. Doporučuje se začít v ranních hodinách (6:00), kdy ve stejnou dobu následujícího dne pacient sběr moče ukončí a následně transportuje odebraný materiál do příslušné laboratoře. Před zahájením se pacient naposledy vymočí mimo odběrovou nádobu a zaznamená čas zahájení sběru. Po dobu sběru mají být nádoby zakryté a uloženy v chladu a temnu. Naposled se vymočí do nádoby přesně na konci určení doby sběru, tj. v 6:00 hodin následujícího rána. Lze zaslat buď celý odebraný vzorek do čisté uzavřené nádoby, nebo pouze 10ml vzorek z každé frakce, ale potom je tedy nutné řádně samostatně změřit objem každého dvanácti hodinového sběru či celého 24hodinového a zapsat na příslušnou žádanku. Celý objem je nutný dobře promíchat před odlitím vzorku. Není zapotřebí sterilního odběru.

4.1.1.2 Venózní krev

Na konci sběru moče je pacientovi odebrán vzorek venózní krve do odběrové zkumavky (vakuety) s aktivátorem srážení. Je preferována krev odebraná do vakuety obsahující separační gel, která je vhodná pro automatizovanou analýzu, kdy se požadovaná stanovení provádí přímo z primární zkumavky.

5. Analytická část

5.1 Stanovení kreatininu v séru a moči

5.1.1 Enzymatické stanovení kreatininu

Na Pracovišti klinické chemie Nemocnice České Budějovice, a.s. se koncentrace kreatininu v séru a v moči stanovuje enzymatickou metodou na biochemickém analyzátoru ADVIA 1800 diagnostickou soupravou Enzymatic Creatinine_2 (ECRE_2) od firmy Siemens. [36]

5.1.2 Princip stanovení

Kreatinin je přeměňován na kreatin činností kreatininázy. Vytvářený kreatin je hydrolyzován kreatinázou za tvorby sarkozinu, který je rozkládán sarkozin oxidázou na glycin, formaldehyd a peroxid vodíku. Z peroxidu vodíku za přítomnosti peroxidázy vzniká kvantitativní oxidativní kondenzací s N-(3-sulfopropyl) -3-metoxy -5- metyl-anilinem a 4-aminoantipyrinem modré barvivo. Koncentrace kreatininu je stanovena měřením absorbance modré barvy při vlnové délce 596/694 nm. Koncentrace kreatininu je úměrná absorbanci této barvy. [36]

5.1.3 Kalibrace, referenční meze

Používá se kalibrátor Siemens Chemistry Calibrator. Kalibrace je dvoubodová, prvním bodem kalibrační funkce je deionizovaná voda a druhým bodem je kalibrátor s příslušnou koncentrací v $\mu\text{mol/l}$. Kalibrace je doporučována vždy po změně šarže činidel, po výměně důležité optické nebo hydraulické součásti, a pokud jsou výsledky kontrol mimo rozsah stanovený dle SOP laboratoře Pracoviště klinické chemie. [36]

Referenční meze kreatininu v laboratoři Pracoviště klinické chemie Nemocnice České Budějovice, a.s.:

V moči:

- Ženy, muži: 3-12 mmol/l

V séru:

- ženy: 49 - 90 $\mu\text{mol/l}$
- muži: 64 - 104 $\mu\text{mol/l}$

5.2 Stanovení cystatinu C

Na Pracovišti klinické chemie Nemocnice České Budějovice, a.s. se koncentrace cystatinu C v séru a plazmě stanovuje turbidimetricky (konkrétně imunoturbidimetrie na latexových částicích) na analyzátoru ADVIA 1 800 diagnostickou soupravou Cystatin C (CYSC) od firmy Siemens. [28]

5.2.1 Princip stanovení

Latexové činidlo ADVIA Chemistry Cystatin C (CYSC) je suspenzi stejnorodých částic latexu potažených protilátkou proti cystatinu C. Po smíchání séra obsahující cystatin C s latexovým činidlem dojde k aglutinaci a následně k nárůstu zákalu. Tato turbidita se stanoví při vlnové délce 571/805 nm. Koncentrace cystatinu C v séru se stanoví z kalibrační křivky. [28]

5.2.2 Podmínky odběru, stabilita reagensů

- Před centrifugací musí dojít k úplnému sražení krve.
- Sérum by mělo být od krvinek odděleno co nejdříve po centrifugaci pokud není použita odběrová zkumavka se separačním gelem.

- Vzorčky séra pro stanovení cystatinu C jsou v dobře uzavřených zkumavkách stabilní 7 dní při teplotě 2 až 8 °C a 3 měsíce při -20 °C nebo nižší teplotě, pokud jsou vzorky zamraženy během 24 hodin po odběru.
- Vzorčky nesmí před provedením testu obsahovat sraženiny. [28]

Referenční meze cystatinu C v laboratoři Pracoviště klinické chemie Nemocnice České Budějovice, a.s.:

- 15 – 150 (roky): 0,57 – 1,29 mg/l

5.3 Použité vzorce

Clearance endogenního kreatininu se vypočte dle vzorce:

$$Cl_{kr}(\text{ml/s}) = (U \cdot V) / P$$

U je koncentrace kreatininu v moči v mmol/l, **V** je objem moče (diuréza) v ml/s, **P** je koncentrace kreatininu v plazmě (séru) v mmol/l. Takto získané hodnoty clearance jsou obtížně srovnatelné mezi různými pacienty i s referenčními rozmezími – závisejí totiž na celkové ploše glomerulární membrány, která je u každého jiná. Předpokládá se však, že filtrační plocha je úměrná tělesnému povrchu. Proto se hodnota clearance koriguje na tzv. ideální tělesný povrch tj. 1,73 m². Hodnota tělesného povrchu vyšetřované osoby se vyhledá v tabulkách na základě údajů o tělesné hmotnosti a výšce pacienta nebo se může vypočítat podle vzorce:

$$A = 0,167 \cdot \sqrt{m} \cdot l$$

Kde **0,167** je empirický faktor (rozměr kg^{-1/2} · m^{3/3}), **m** hmotnost pacienta v kilogramech a **l** výška v metrech.

Výpočet korigované hodnoty clearance kreatininu je následující:

$$Cl_{kr.koring} \text{ (ml/s)} = Cl_{kr} \cdot 1,73 / \text{povrch těla pacienta v m}^2$$

Pro odhad GF ze sérového kreatininu jsem použila doporučenou rovnici z roku 2009 CKD-EPI a pro odhad GF ze sérového cystatinu C jsem použila doporučenou rovnici z roku 2012 CKD-EPI (Obě tyto rovnice jsem již zmínila výše v textu.).

6. Výsledky

V průběhu roku 2015 jsem na Pracovišti klinické chemie v Nemocnici České Budějovice, a.s. nashromáždila potřebná data od 90 pacientů. Jednalo se o vybrané pacienty nefrologické ambulance, kde jsou tito pacienti sledováni z důvodu podezření či pro již existující chronické onemocnění ledvin. U těchto pacientů, kteří mají dlouhodobé zkušenosti se sběrem moče na vyšetření glomerulární filtrace, jsem předpokládala minimální problémy s nedodržením preanalytické fáze zejména ve zmiňované rizikové oblasti sběru moče. U každého pacienta jsem si zaznamenala výšku, váhu a identifikační číslo (rodné číslo) ze kterého jsem si odvodila věk a pohlaví pacienta. Dále jsem stanovila koncentraci kreatininu v séru ($\mu\text{mol/l}$) a moči (mmol/l), koncentraci cystatinu C v séru (mg/l), GF se sběrem moče a vypočtený odhad GF pomocí MDRD rovnice, ze sérového cystatinu C a kreatininu podle rovnice CKD-EPI ($\text{GF v ml/s} \cdot 1,73\text{m}^2$). Před vlastním měřením jsem se všemi reagensy provedla kontrolu kvality s komerčně vyráběnými materiály. Vzhledem k tomu že výpočty ze vzorců jsou limitovány hodnotou $\geq 1,5 \text{ ml/s} / 1,73\text{m}^2$ uvádím taktéž i tímto způsobem hodnoty GF ze sběru moče. Pracovala jsem se souborem devadesáti vybraných pacientů (naměřené hodnoty uvádím v tabulce č. 8 – viz. příloha, vzhledem k jejich rozsahu je neuvádím v textu). Ze získaných dat byly vypočítány základní statistické parametry. Pro zhodnocení a porovnání výsledku jsem použila krabicový graf, Passing-Bablokovy regrese a Bland-Altmanův diagram.

6.1 Obecná statistika

Tabulka č. 8 Statistické zhodnocení souboru 90 pacientů.

	CCL/24hod	GFkr CKD-EPI	GFcyst CKD-EPI	MDRD
nejnižší hodnota [ml/s/1,73m ²]	0,13	0,20	0,21	0,34
nejvyšší hodnota [ml/s/1,73m ²]	1,50	1,50	1,50	1,50
průměrná hodnota [ml/s/1,73m ²]	1,15	1,11	1,05	1,12
Medián [ml/s/1,73m ²]	1,36	1,26	1,11	1,25
rozdíl hodnot (průměr x medián)	-0,21	-0,15	-0,06	-0,13
rozdíl hodnot (průměr x medián)	18,4%	13,5%	5,7%	11,6%

Tabulka č. 9 Rozdíl průměrných hodnot GF.

	GFkr CKD-EPI	GFcyst CKD-EPI	MDRD
CCL/24hod [ml/s/1,73m ²]	0,04	0,10	0,03
	3,5%	8,7%	2,6%

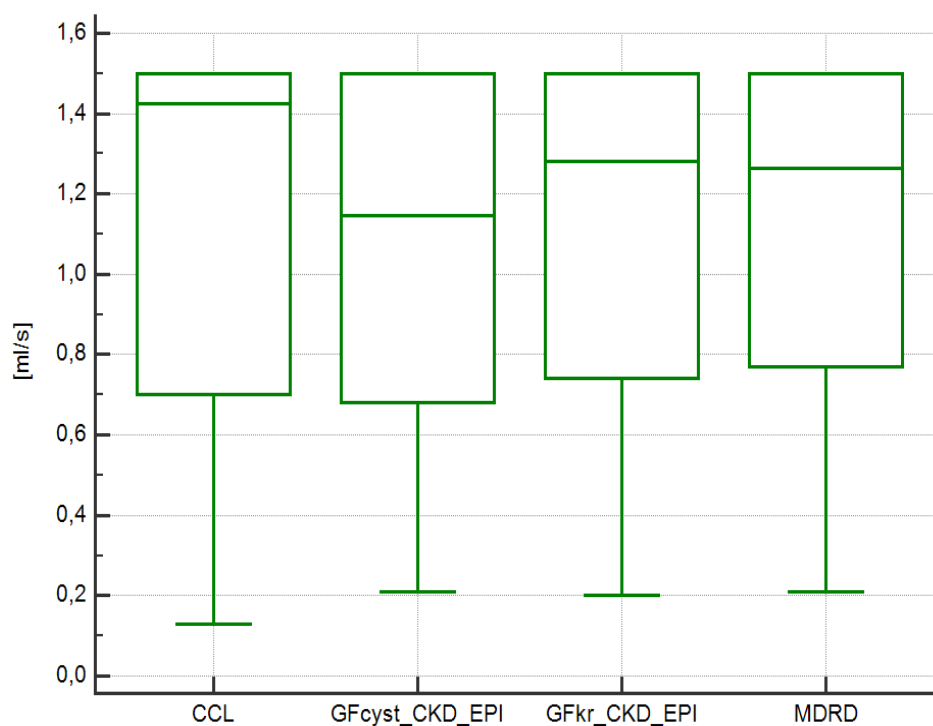
Tabulka č. 10 Rozdíl středních hodnot (mediánů) GF.

	GFkr CKD-EPI	GFcyst CKD-EPI	MDRD
CCL/24hod [ml/s/1,73m ²]	0,10	0,25	0,11
	7,4%	18,4%	8,1%

Tabulka č. 7, 8 a 9 znázorňuje základní statistické parametry naměřených hodnot GF (aritmetický průměr, medián a rozdíly mezi nimi u jednotlivých metod) u 90 vybraných pacientů.

6.2 Krabicový graf (krabicový diagram)

Graf č. 1 Znázornění pěti hodnot pro každou metodu: minimum, horní a dolní kvartil, medián a maximum.

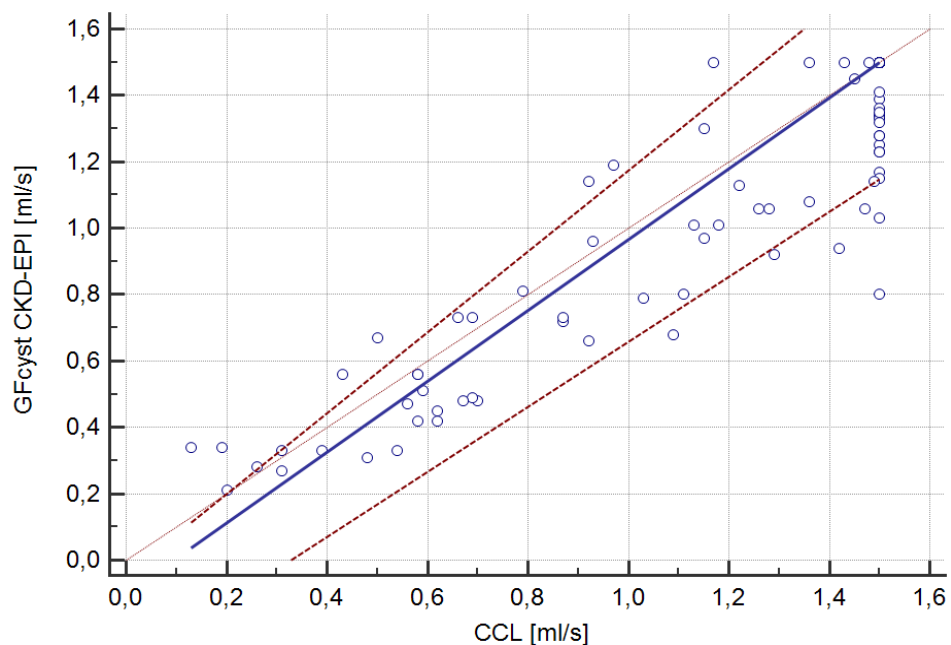


6.3 Passing-Bablokova regrese a Bland-Altmanův diagram

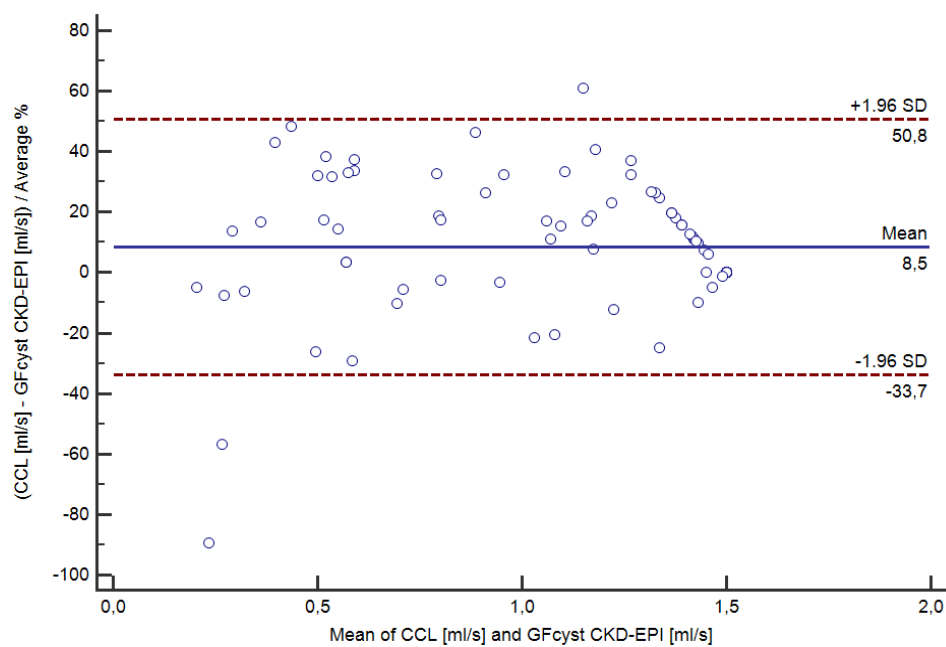
Tabulka č. 11 Porovnání výsledných GF pomocí Passing-Bablokovy regrese CCL vs. GFcyst CKD-EPI.

Velikost souboru	90
Regresní rovnice	$y = -0,102273 + 1,068182x$
Úsek směrnice (Intercept A)	-0,1023
95% CI	-0,3281 to -0,04435
Směrnice (Slope B)	1,0682
95% CI	0,9839 to 1,2188
P-faktor	P=0,06
Závěr	Odchylka od linearity

Graf č. 2 Porovnání výsledných hodnot GF pomocí Passing-Bablokovy regrese CCL vs. GFcyst CKD-EPI.



Graf č. 3 Porovnání výsledných hodnot GF pomocí Bland-Altmanova diagramu CCL vs. GFcyst CKD-EPI.

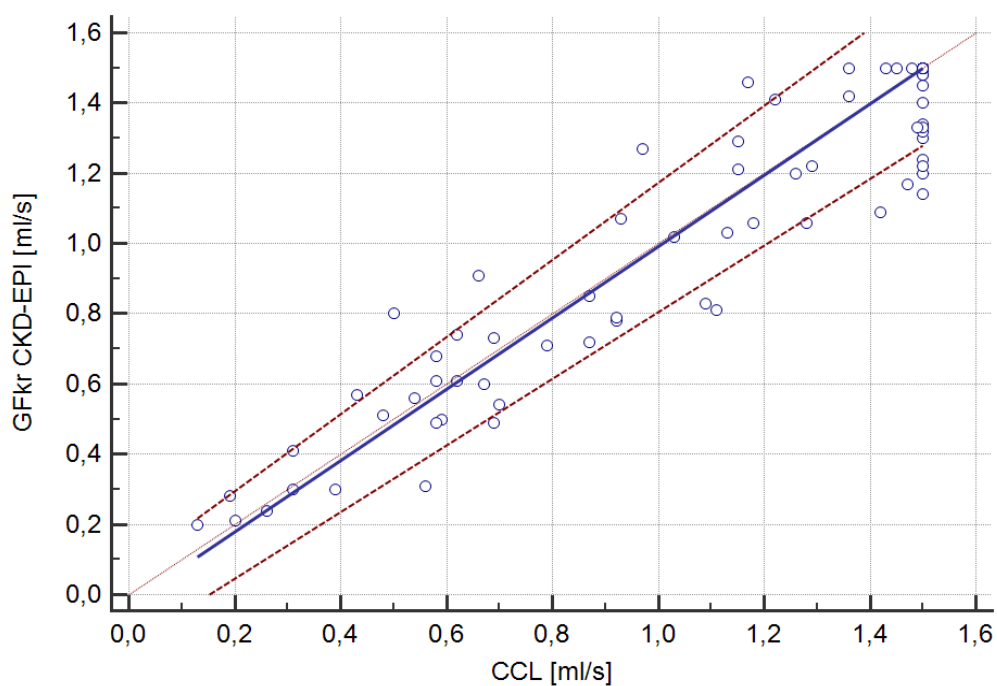


Osa x označuje průměry jednotlivých dvojic hodnot GF (CCL a GFcyst CKD-EPI) a **osa y** označuje rozdíly jednotlivých dvojic hodnot odhadů GF (CCL a GFcyst CKD-EPI).

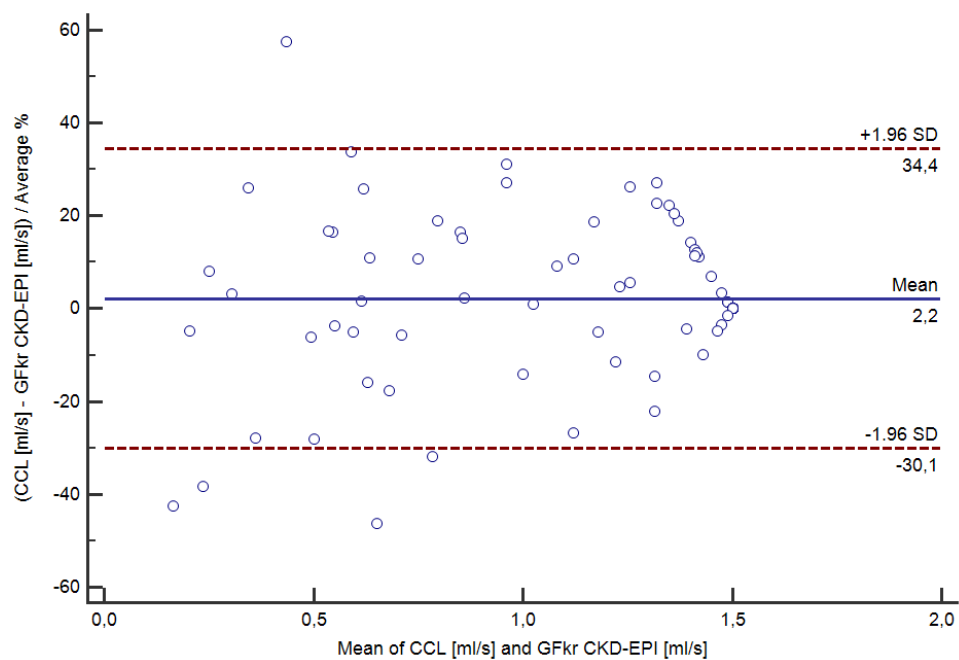
Tabulka č. 12 Porovnání výsledných hodnot GF pomocí Passing-Bablokovy regrese CCL vs. GFkr CKD-EPI.

Velikost souboru	90
Regresní rovnice	$y=0,000000 + 1,000000x$
Úsek směrnice (Intercept A)	0,0000
95% CI	-0,1184 to 0,9459
Směrnice (Slope B)	1,0000
95% CI	0,9510 to 1,0989
P-faktor	P=0,05
Závěr	Není významná odchylka od linearity

Graf č. 4 Porovnání výsledných hodnot GF pomocí Passing-Bablokovy regrese CCL vs. GFkr CKD-EPI.



Graf č. 5 Porovnání výsledných hodnot GF pomocí Bland-Altmana diagramu CCL vs. GFkr CKD-EPI.

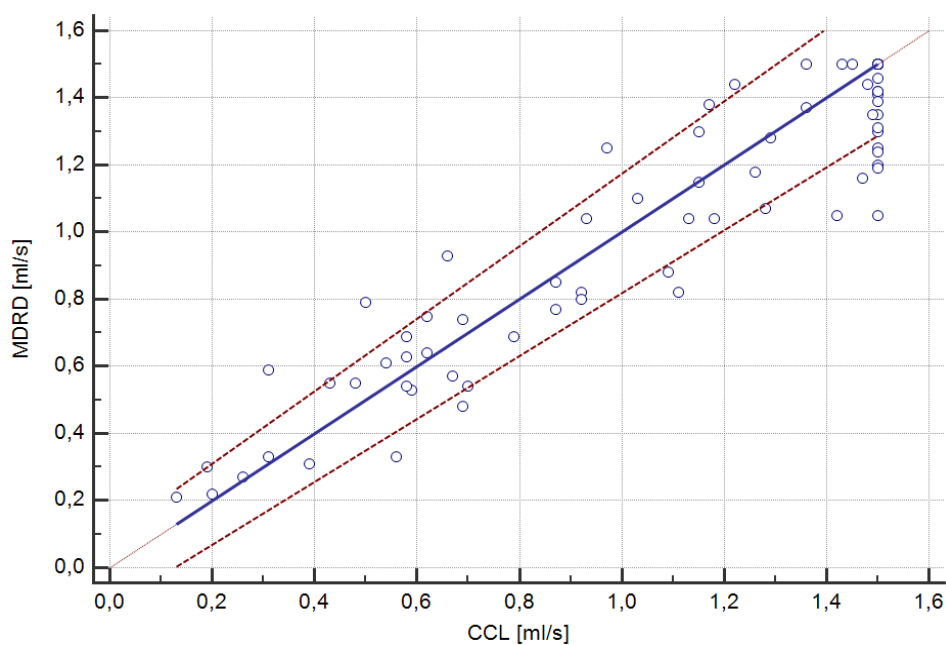


Osa x označuje průměry jednotlivých dvojic hodnot GF (CCL a GFkr CKD-EPI) a **osa y** označuje rozdíly jednotlivých dvojic hodnot odhadů GF (CCL a GFkr CKD-EPI).

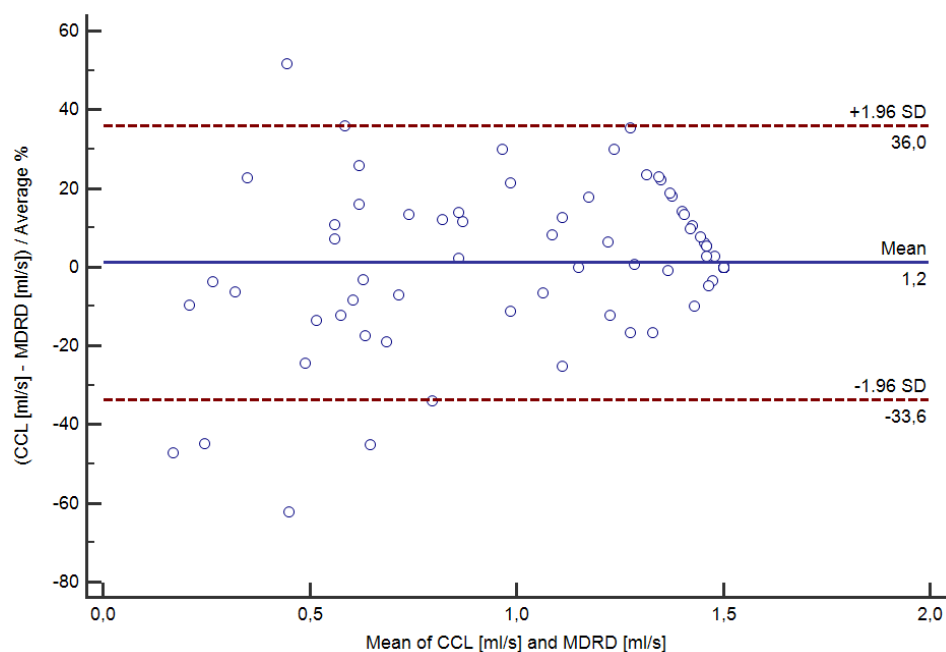
Tabulka č. 13 Porovnání výsledných hodnot GF pomocí Passing-Bablokovy regrese CCL vs. MDRD.

Velikost souboru	90
Regresní rovnice	$y=0,000000 + 1,000000$
Úsek směrnice (Intercept A)	0,0000
95% CI	-0,1184 to 0,9459
Směrnice (Slope B)	1,0000
95% CI	0,9369 to 1,0789
P-faktor	P=0,02
Závěr	Není významná odchylka od linearity

Graf č. 6 Porovnání výsledných hodnot GF pomocí Passing-Bablokovy regrese CCL vs. MDRD.



Graf č. 7 Porovnání výsledných hodnot GF pomocí Bland-Altmanova diagramu CCL vs. MDRD.



Osa x označuje průměry jednotlivých dvojic hodnot GF (CCL a MDRD) a **osa y** označuje rozdíly jednotlivých dvojic hodnot odhadů GF (CCL a MDRD).

Tabulka č. 14 Průměrná hodnota rozdílů dvojic hodnot GF.

	GFkr CKD-EPI	GFcyst CKD-EPI	MDRD
CCL	0,03	0,09	0,03

7. Diskuze

Cílem práce bylo porovnat tři metody odhadu glomerulární filtrace, GFkr CKD-EPI, GFcyst CKD-EPI a MDRD, s metodou se sběrem moče CCL a zjistit, zda jsou tyto metody zastupitelné. I přes to, že se výsledky mnoha studií značně liší, stále větší četnost chyb spadá do preanalytické části. Je stále velké riziko, že pacient při sběru moče, jež je základem pro vyšetření clearance endogenního kreatinu, udělá chybu, a proto byla vyvinuta snaha zajistit vyšetření glomerulární filtrace bez sběru moče, aby se co nejvíce eliminovalo riziko špatných výsledků způsobených právě preanalytickou částí odběru. Proto bylo doporučeno užívat u vybraných pacientů metod výpočtových. Z důvodu právě již zmíněných preanalytických chyb jsem vybrala pacienty z nefrologické ambulance, u kterých jsem předpokládala minimální problémy s nedodržením preanalytické fáze, a to především u sběru moče. Tito pacienti mají dlouhodobé zkušenosti se sběrem moče a to právě z důvodu podezření nebo již probíhajícího chronického onemocnění ledvin.

Nejprve jsem otestovala rovnoměrnost rozložení dat. K tomu jsem použila krabicové grafy. Podle vykreslení polohy mediánu uvnitř "krabice" je zřejmé, že rozložení dat je nerovnoměrné (polohy umístění mediánů neleží uprostřed "krabice"). Zároveň jsem normalitu rozložení dat posoudila odhadem z rozdílů aritmetického průměru a mediánu jednotlivých metod. Pro nerovnoměrné rozložení dat svědčí to, že tyto rozdíly jsou vyšší než 10%.

Vzhledem k nerovnoměrnému rozložení získaných dat jsem zvolila k porovnávání odhadů glomerulární filtrace neparametrickou regresní analýzu dle Passing-Babloka a rozdílový graf dle Altmana a Blanda. Regrese dle Passing-Babloka je v případě porovnávání odhadů glomerulární filtrace výhodnější oproti lineární regresi, protože nenadřazuje jeden soubor hodnot nad druhý a nevykazuje citlivost k náhodným chybám u obou metod. Do tabulek jsem zaznamenala výsledky regresní analýzy dle Passing-Babloka a k nim související grafy regresní analýzy a rozdílové grafy dle Altmana a Blanda. [38]

Z výsledků Passing Bablokovy regresní analýzy vždy zjišťujeme, zda 95 % interval spolehlivosti pro posun (Intercept A) zahrnuje 0, tedy posun od nuly není odlišný a není přítomna systematická chyba a zda 95 % interval spolehlivosti pro směrnici (Slope B) zahrnuje 1, tedy směrnice není od jedničky významně odlišná a není přítomna proporcionální chyba.

V prvním případě jsem z mého porovnání výsledných měření renální clearance endogenního kreatininu s odhadem glomerulární filtrace ze sérového cystatinu C pomocí rovnice CKD-EPI dle Passing-Bablokovy regrese zjistila, že 95 % interval spolehlivosti pro posun (Intercept A) nezahrnuje 0, ale 95% interval spolehlivosti pro směrnici (Slope B) zahrnuje 1 (směrnice není od jedničky významně odlišná; není proporcionální chyba). To, že Intercept A nezahrnuje hodnotu 0, může znamenat mírnou systematickou odchylku. Avšak porovnání výsledků renální clearance endogenního kreatininu s odhadem glomerulární filtrace ze sérového cystatinu C z rovnice CKD-EPI pomocí rozdílového grafu dle Altmana a Blanda prokázalo, že diference není významně odlišná od nuly (nula spadá do intervalu $\pm 1,96$ SD). Na základě výše uvedených skutečností lze považovat použité metody za zastupitelné.

Ve druhém porovnání se podle Passing-Bablokovy regrese výsledky naměřených hodnot glomerulární filtrace renální clearance endogenního kreatininu s odhadem glomerulární filtrace ze sérového kreatininu pomocí rovnice CKD-EPI ze souboru devadesáti pacientů shodují. 95% interval spolehlivosti pro posun (Intercept A) zahrnuje 0 (posun není od nuly významně odlišný; není systematická chyba) a 95% interval pro směrnici (Slope B) zahrnuje 1 (směrnice není od jedničky významně odlišná; není proporcionální chyba). Tento fakt prokázalo i porovnání výsledků renální clearance endogenního kreatininu s odhadem glomerulární filtrace ze sérového kreatininu pomocí rovnice CKD-EPI dle Altmana a Blanda a to proto, že diference není významně odlišná od nuly (nula spadá do intervalu $\pm 1,96$ SD).

V porovnání třetím se podle Passing-Bablokovy regrese výsledky naměřených hodnot glomerulární filtrace renální clearance endogenního kreatininu s odhadem glomerulární filtrace ze sérového kreatininu pomocí rovnice MDRD taktéž dobře

shodují. 95% interval spolehlivosti pro posun (Intercept A) zahrnuje 0 (posun není od nuly významně odlišný; není přítomna systematická chyba) a 95% interval spolehlivosti pro směrnici (Slope B) zahrnuje 1 (směrnice není od jedničky významně odlišná; není proporcionální chyba). Rozdílový graf Altmana a Blanda tuto shodu potvrzuje, protože se z porovnání výsledků prokázalo, že diference není významně odlišná od nuly (nula spadá do intervalu $\pm 1,96$ SD). Na základě statistického vyhodnocení porovnávaných metod pro vybranou skupinu pacientů lze potvrdit stanovenou hypotézu o zastupitelnosti metod pro pacienty s podezřením či již existujícím chronickým onemocněním ledvin.

8. Závěr

V rámci bakalářské práce se podařilo splnit všechny uvedené cíle a potvrdit pracovní hypotézu o zastupitelnosti jednotlivých metod stanovení glomerulární filtrace u pacientů s podezřením či již existujícím chronickým onemocněním ledvin. Z výsledků porovnání odhadů glomerulární filtrace ze sérové koncentrace kreatininu stanoveného enzymaticky a ze sérové koncentrace cystatinu C lze konstatovat, že se odhady glomerulární filtrace vypočtené pomocí MDRD rovnice a pomocí rovnice CKD-EPI vzájemně dobře shodují a nepatrný rozdíl, který byl zjištěn z porovnání CCL vs. GFcyst CKD-EPI lze považovat za klinicky nevýznamný. K porovnání odhadů glomerulární filtrace jsem použila na Pracovišti klinické chemie Nemocnice České Budějovice, a.s. statistický program MedCalc. Konkrétně regresní analýzu dle Passing-Babloka, rozdílový graf dle Altmana a Blanda a k otestování normality rozložení dat jsem použila krabicový graf.

9. Použitá literatura

1. SCHREIBER, M. *Funkční somatologie*. Vyd. 1. Jinočany: H & H, 1998. ISBN 80-86022-28-5.
2. KLENER, P. *Vnitřní lékařství II*. Praha: Informatorium, 2002. ISBN 80-86073-76-9.
3. ROKYTA, R. *Fyziologie pro bakalářská studia v medicíně, přírodovědných a tělovýchovných oborech*. Vyd. 1. Praha: ISV, 2000. Lékařství. ISBN 80-85866-45-5.
4. TEPLAN, V. *Praktická nefrologie. II.*, zcela přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2006. 3-4. ISBN 80-247-1122-2.
5. MERKUNOVÁ, A., OREL, M. *Anatomie a fyziologie člověka pro humanitní obory*. Vyd. 1. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-1521-6.
6. TESAŘ, V., VIKLICKÝ, O., (eds.). *Klinická nefrologie. II.*, zcela přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2015. ISBN 978-80-247-4367-7.
7. VOKURKA, M. *Praktický slovník medicíny*. Vyd. 6., rozš. Praha: Maxdorf, 2000. ISBN 80-85912-38-4.
8. DYLEVSKÝ, I. *Somatologie*. Vyd. 1. Olomouc: 2000. ISBN 80 – 86297 – 05 – 05.
9. TROJAN, S. *Lékařská fyziologie*. Vyd. 4., přeprac. a dopl. Praha: Grada, 2003. ISBN 80-247-0512-5.
10. PACÍK, D. *Urologie pro sestry*. Vyd. 1. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1996. ISBN 80-7013-235-3.
11. KITTNAR, O. *Fyziologické regulace ve schématech*. Vyd. 1. Praha: Grada, 2000. ISBN 80-7169-782-6.
12. SILBERNAGL, S., LANG, F. *Atlas patofyziologie člověka*. Vyd. 1. české. Praha: Grada, 2001. ISBN 80-7169-968-3.

13. RACEK, J. *Klinická biochemie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Galén, 2006. ISBN 80-7262-324-9.
14. ŠAFRÁNKOVÁ, A., NEJEDLÁ, M. *Interní ošetřovatelství*. Vyd. 1. Praha: Grada, 2006. Sestra (Grada). ISBN 80-247-1148-6.
15. FÖLSCH, U.R., SCHMIDT, R.F., KOCHSIEK, K. *Patologická fyziologie*. Vyd. 1. české. Praha: Grada, 2003. ISBN 80-247-0319-X.
16. Viklický, O. *Nová klasifikace chronických onemocnění ledvin*. Novinky v nefrologii. 2013, 11 (1), 2-4.
17. ŠTĚPÁNKOVÁ, Soňa, Stanislav ŠUREL a Jitka ŘEHOŘOVÁ. Chronická renální insuficience společným pohledem praktického lékaře a neurologa. *Med. pro praxi* 2008, 5 (3), 98-100. ISSN 1212-7299.
18. EKNOYAN, G., LAMEIRE, N. *KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease*. [online]. [cit. 2016-03-23]. Dostupné z <http://www.kdigo.org/clinical_practice_guidelines/pdf/CKD/KDIGO_2012_CKD_GL.pdf>.
19. LEVEY, AS., et al. *Definition and classification of chronic kidney disease: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)*. 2005, 67, 2089-2100.
20. Zima, T., Racek, J., Tesař, V., Viklický, O., Teplan, V., Schück, O., Janda, J., Friedecký B., Kubíček Z., Kratochvíla, J., Rajdl, D., Šálek, T., Kalousová, M., Granátová, J. *Doporučení k diagnostice chronického onemocnění ledvin*. *Klinická biochemie a metabolismus* 2014, 22 (43), 138-152.
21. BELLOMO, R., KELLUM, JA., RONCO, C. *Acute kidney Injury*. *Lancet*. 2012, 380, 756-766.
22. ZÍMA, T. *Proteiny, ledviny, volné radikály et.* [online]. [cit. 2016-03-23]. Dostupný z WWW: <<http://docplayer.cz/10187242-Proteiny-ledviny-volne-radikaly-etc.html>>.

23. ZIMA, T. *Laboratorní diagnostika*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, c2007. ISBN 978-80-7262-372-3.
24. ZÍMA, T. *Vyšetření glomerulární filtrace*. [online]. [cit. 2016-03-23]. Dostupný z <<http://www.cskb.cz/res/file/biolaby/2010/1-Zima.pdf>>.
25. Stará, D. *Specifika podávání léčiv pacientům s chronickým onemocněním ledvin*. Praktické lékařství. 2015, 11(15), 170-173.
26. SÉRONIE-VIVIEN, S., et al. *Cystatin C: current position and future prospects*. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. Clin Chem Lab Med. 2008, 46(12), 1664–1686.
27. MACISAAC, R. J., C. TSALAMANDRIS, M. C. THOMAS, et al. *Estimating glomerular filtration rate in diabetes: a comparison of cystatin-C- and creatinine-based methods*. *Diabetologia* 2006, 49(7), 1686-1689. DOI: 10.1007/s00125-006-0275-7. ISSN 0012-186x.
28. Cystatin C, Siemens Healthcare Diagnostic Inc, Tarrytown, NY 10591- 5097 USA 10493980 CS Rev. G, 2015-06.
29. GRUBB, A et al. *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 Schwarz and the Counahan-Barratt Prediction Equations for Children*. *Clinical Chemistry* 2005, 51(8), 1420-1431.
30. Zima, T. et al. *Doporučení České nefrologické společnosti a České společnosti klinické ČLS JEP k vyšetření glomerulární filtrace*. *Klinická biochemie a metabolismus* 2009, 2, 112-117.
31. Prouza, P. *Cystatin C vs kreatinin*. *Labor Aktuell*. 2008, 3, 27.
32. LEVEY, AS., STEVENS, LA., SCHMIDT, ChH., et al. *A new equation to estimate glomerular filtration rate*. *Annals of Internal Medicine* 2009, 150(9), 604-613.
33. Štern, P. *Současné možnosti turbidimetrie a nefelometrie*. *Klin. Biochem. Metab.* 2006, 14 (35.) 146-151.
34. CHROMÝ, V., FISCHER, J. *Analytické metody v klinické chemii*. Vyd. 1. Brno: Masarykova univerzita v Brně, 2000. ISBN 80-210-2363-5.

35. ČERMÁKOVÁ, M., ŠTĚPÁNOVÁ, I. *Klinická biochemie*. 2. upr. vyd. Brno: NCONZO, 2010. ISBN 978-80-7013-515-0.
36. Enzymatic Creatinine 2, Siemens Healthcare Diagnostic Inc, Tarrytown, NY 10591- 5097 USA 10493986 CS Rev. G, 2015-05.
37. HENDL, J. *Statistické přístupy k porovnávání biomedicínkových metod měření*. [on line]. [cit. 2016-03-26]. Dostupné z <<http://web.ftvs.cuni.cz/hendl/metodologie/blandaltmanclanek1.pdf>>.

10. Klíčová slova

Glomerulární filtrace - GF

Chronické onemocnění ledvin - CKD

Akutní poškození ledvin - AKI

Key Words

Glomerular filtration

Chronic Kidney Disease

Acute Kidney Injury

11. Přílohy

Tabulka č. 15 naměřené hodnoty.

rok narození	Objem za 24hod [ml]	kreatinin [$\mu\text{mol/l}$]	cystatin C [mg/l]	CCL [ml/s/1,73m^2]	Gfkr CKD-EPI [ml/s/1,73m^2]	Gfcyst CKD-EPI [ml/s/1,73m^2]	MDRD [ml/s]	Váha [kg]	Výška [cm]
82	2900	71	0,74	1,50	1,50	1,50	1,50	173	73
91	4250	67	0,85	1,50	1,50	1,50	1,50	179	81
44	1400	63	0,99	1,50	1,50	1,25	1,50	166	91
57	3830	66	0,84	1,50	1,48	1,50	1,42	164	82
73	1480	51	0,54	1,50	1,50	1,50	1,50	168	55
69	1750	69	0,82	1,50	1,50	1,50	1,41	180	67
59	2240	70	0,89	1,50	1,50	1,50	1,50	176	97
75	2020	74	0,75	1,50	1,50	1,50	1,50	170	75
50	2800	57	0,68	1,50	1,50	1,50	1,50	160	76
56	1340	70	0,95	1,50	1,50	1,39	1,50	181	65
82	2800	63	0,79	1,50	1,50	1,50	1,50	202	103
64	1590	59	0,75	1,50	1,50	1,50	1,50	164	67
64	2450	79	0,99	1,50	1,50	1,36	1,50	179	97
83	2450	67	0,85	1,50	1,50	1,50	1,50	187	85
74	1640	64	0,68	1,50	1,50	1,50	1,50	170	65
56	2660	75	0,77	1,50	1,50	1,50	1,50	178	77
66	2020	76	1,04	1,50	1,50	1,28	1,50	180	115
53	1900	70	0,92	1,50	1,34	1,34	1,30	170	75
50	2780	66	0,71	1,50	1,50	1,50	1,50	180	75
72	3430	80	0,79	1,50	1,30	1,50	1,20	169	73
62	1950	66	1,06	1,50	1,50	1,23	1,50	179	71
49	2240	69	0,91	1,50	1,32	1,34	1,31	162	92
54	1470	50	0,73	1,50	1,50	1,50	1,50	174	169
75	2800	91	0,99	1,50	1,14	1,33	1,05	165	105
96	1680	98	0,89	1,50	1,50	1,50	1,50	170	67
56	2940	83	1,08	1,50	1,48	1,17	1,46	186	104
50	2080	75	1,02	1,50	1,20	1,15	1,19	167	68
76	2900	84	1,00	1,50	1,50	1,41	1,50	180	125
45	3220	71	0,82	1,50	1,24	1,50	1,25	168	89
51	1450	94	1,17	1,50	1,22	1,03	1,24	170	78
52	1820	65	1,35	1,50	1,45	0,80	1,42	167	82
62	1960	60	0,73	1,50	1,50	1,50	1,50	167	59
78	1620	61	0,90	1,50	1,50	1,50	1,50	160	125

66	2330	80	1,02	1,50	1,50	1,32	1,50	180	118
55	2275	68	0,92	1,50	1,40	1,35	1,35	170	86
32	1525	76	0,97	1,50	1,33	1,23	1,50	174	86
66	2000	73	0,70	1,50	1,50	1,50	1,50	180	90
50	1650	59	0,94	1,50	1,50	1,28	1,50	156	176
75	2000	73	0,89	1,50	1,50	1,50	1,50	183	97
77	2960	72	0,80	1,50	1,50	1,50	1,39	162	58
49	1640	87	1,08	1,49	1,33	1,14	1,35	178	115
70	2140	68	0,72	1,48	1,50	1,50	1,44	162	58
51	3680	77	1,09	1,47	1,17	1,06	1,16	168	78
58	2040	61	0,88	1,45	1,50	1,45	1,50	164	63
43	1880	47	0,78	1,43	1,50	1,50	1,50	159	61
62	4790	87	1,23	1,42	1,09	0,94	1,05	163	61
64	1960	90	1,18	1,36	1,42	1,08	1,37	187	104
72	760	55	0,63	1,36	1,50	1,50	1,50	170	70
35	1700	68	1,16	1,29	1,22	0,92	1,28	158	90
48	1320	82	1,08	1,28	1,06	1,06	1,07	164	77
60	2540	101	1,18	1,26	1,20	1,06	1,18	163	85
40	1620	62	1,00	1,22	1,41	1,13	1,44	162	92
56	3160	86	1,15	1,18	1,06	1,01	1,04	156	69
64	1800	69	0,79	1,17	1,46	1,50	1,38	168	60
46	1800	69	0,92	1,15	1,29	1,30	1,30	174	66
64	1040	81	1,21	1,15	1,21	0,97	1,15	130	34
49	1960	84	1,12	1,13	1,03	1,01	1,04	162	76
55	2720	136	1,44	1,11	0,81	0,80	0,82	180	80
36	1540	94	1,46	1,09	0,83	0,68	0,88	167	86
31	1380	77	1,28	1,03	1,02	0,79	1,10	164	70
51	1390	72	1,00	0,97	1,27	1,19	1,25	164	65
59	1150	87	1,20	0,93	1,07	0,96	1,04	168	118
46	3450	133	1,07	0,92	0,78	1,14	0,82	165	67
58	2350	141	1,68	0,92	0,79	0,66	0,80	179	82
39	1000	107	1,41	0,87	0,72	0,72	0,77	165	70
63	3060	136	1,57	0,87	0,85	0,73	0,85	175	118
74	2340	169	1,50	0,79	0,71	0,81	0,69	186	75
68	3100	204	2,19	0,70	0,54	0,48	0,54	173	100
69	3000	175	2,05	0,69	0,49	0,49	0,48	159	55
61	1180	152	1,57	0,69	0,73	0,73	0,74	176	75
90	1520	168	2,22	0,67	0,60	0,48	0,57	155	62
43	1200	91	1,41	0,66	0,91	0,73	0,93	165	76
52	3080	167	2,32	0,62	0,61	0,42	0,64	168	110
56	2500	147	2,23	0,62	0,74	0,45	0,75	161	77
54	1860	200	2,01	0,59	0,50	0,51	0,53	175	92

61	3500	161	1,91	0,58	0,68	0,56	0,69	180	52
57	1440	172	1,90	0,58	0,61	0,56	0,63	162	85
35	2140	144	2,09	0,58	0,49	0,42	0,54	162	57
59	2390	304	2,18	0,56	0,31	0,47	0,33	176	84
43	1800	171	2,70	0,54	0,56	0,33	0,61	167	103
72	2200	151	1,73	0,50	0,80	0,67	0,79	192	120
38	2700	142	2,67	0,48	0,51	0,31	0,55	165	75
87	1280	171	1,96	0,43	0,57	0,56	0,55	172	68
68	4400	330	2,92	0,39	0,30	0,33	0,31	176	112
27	900	160	2,45	0,31	0,41	0,33	0,59	160	60
39	1945	221	2,90	0,31	0,30	0,27	0,33	168	80
42	1860	347	3,04	0,26	0,24	0,28	0,27	178	99
67	2750	348	3,82	0,20	0,21	0,21	0,22	158	101
53	1100	320	2,71	0,19	0,28	0,34	0,30	190	140
54	1300	343	2,57	0,13	0,20	0,34	0,21	162	81