

Ml. Bl. 40/05.

16. simpozij.

MEDICINA I TEHNIKA

33. međunarodni sajam medicine, farmacije,
laboratorijske i rehabilitacijske opreme, optike i dentala

18.-21. svibnja 2005.



16. simpozij Hrvatskog društva medicinskih biokemičara

Laboratorijska dijagnostika bubrežnih bolesti



Zagrebački Velesajam
Kongresna dvorana
19. svibnja 2005.



16. simpozij
Hrvatskog društva medicinskih biokemičara

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA BUBREŽNIH BOLESTI

18.-21. svibnja 2005.

Organizacijski odbor

Ivana Dujmov

Ilza Salamunić

Nada Vrkić

Nora Nikolac

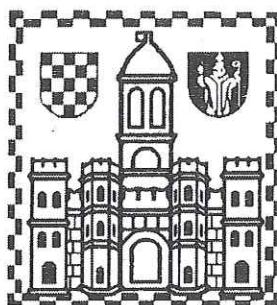
ORGANIZATORI:



Hrvatsko društvo medicinskih biokemičara



Zagrebački Velesajam



Odjel za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku
Kliničke bolnice Split

Poštovane kolegice i kolege,

Čast nam je i zadovoljstvo što je organizacija 16. simpozija Hrvatskog društva medicinskih biokemičara dodijeljena Odjelu za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku Kliničke Bolnice Split.

Tema je Simpozija Laboratorijska dijagnostika bubrežnih bolesti.

Klinička Bolnica Split smještena je na dvije lokacije, na Firulama i na Križinama, na kojima je organiziran Odjel za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku. Odsjek za nefrologiju i hemodializu u sklopu Klinike za unutarnje bolesti smješten je na lokaciji Križine.

Zajedno s kliničarima ove Klinike timski smo pripremili radove iz dijagnostike bubrežnih bolesti.

Nadamo se da ćemo uspješno prikazati njihovu problematiku, dijagnostiku i terapiju.

prof. dr. *Elizabeta Topić*
predsjednica HDMB

dipl. ing. *Ivana Dujmov*
predsjednica Organizacijskog odbora



16. simpozij Hrvatskog društva medicinskih biokemičara

Laboratorijska dijagnostika bubrežnih bolesti

SADRŽAJ

GLOMERULOPATIJE I VRIJEDNOSTI LABORATORIJSKIH PRETRAGA U DIJAGNOSTICI

prof. dr. sc. Dragan Ljutić

Klinika za unutarnje bolesti-Križine, Odsjek za nefrologiju i hemodijalizu
KB Split, Split

5

LABORATORIJSKE PRETRAGE KOD BUBREŽNIH BOLESNIKA

dipl. ing. Ivana Dujmov, mr. sc. Nada Ivanović-Ivelja, dipl. ing. Katarina Čepić
Odjel za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku

KB Split, Split

23

ACETIL-HIDROLAZA TROMBOCITNOG FAKTORA AKTIVACIJE U BOLESNIKA NA HEMODIJALIZI I PERITONEJSKOJ DIJALIZI

mr. sc. Ilza Salamunić¹, dr. sc. Zlata Flegar Meštrić², prof. dr. Dragan Ljutić¹,
prof. dr. Dubravka Juretić³

¹Klinička Bolnica Split, ²Klinička Bolnica Merkur, Zagreb,

³Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

31

ANEMIJE KOD BOLESNIKA NA HEMODIJALIZI

dipl. ing. Ada Sapunar, dipl. ing. Nada Bošnjak, dipl. ing. Katarina Čepić,
dipl. ing. Daniela Šupe-Domić

Odjel za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku

KB Split, Split

34

POREMEĆAJI PRIMARNE HEMOSTAZE KOD BOLESNIKA

S KRONIČNIM ZATAJVANJEM BUBREGA

dipl. ing. Branka Pauković Sekulić

Odjel za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku,

KB Split, Split

39

CISTATIN C KAO MJERA GLOMERULARNE FILTRACIJE

dipl. ing. Blanka Mladina, dipl. ing. Daniela Šupe-Domić

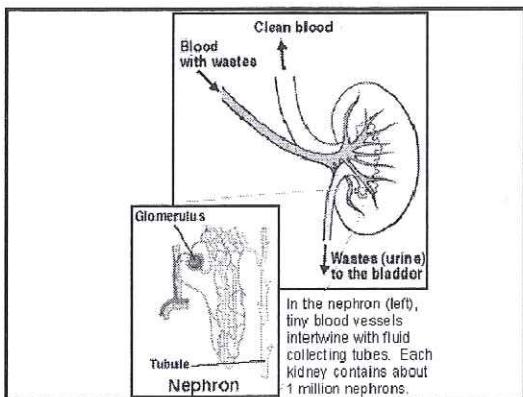
Odjel za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku,

KB Split, Split

44

GLOMERULOPATIJE I VRIJEDNOSTI LABORATORIJSKIH PRETRAGA U DIJAGNOSTICI

prof. dr. sc. Dragan Ljutić



Funkcija nefrona

Primarni urin je ultrafiltrat plazme u Bowmannov prostor pod filtracijskim tlakom od 10 mm Hg.

Konačni urin nastaje aktivnošću epitela bubrežnih kanalica

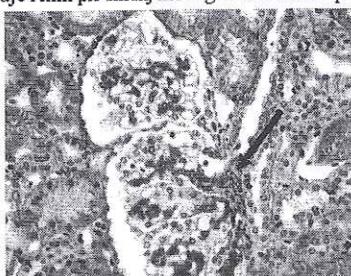
Aferentna arteriola

gradijent krvnog tlaka između arterije i glomerularnih kapilara



Juktaglomerularni aparat

povezuje aferentnu arteriolu s distalnim kanalićem
izlučuje renin pri smanjenom glomerularnom protoku



Sastavnice glomerula

Fenestrirana endotelna stanica

- Oblaže gomerularnu kapilaru i izravno dodiruje mezangij
- Aktivacijom hipertrofira i izlučuje posrednike upale

Sastavnice glomerula

Mezangij

potječe iz medije aferentne arteriole, multifunkcionalan



Sastavnice glomerula

Bazalna membrana

Sadrži kolagen tipa 4, negativnog je električnog naboja



Sastavnice glomerula

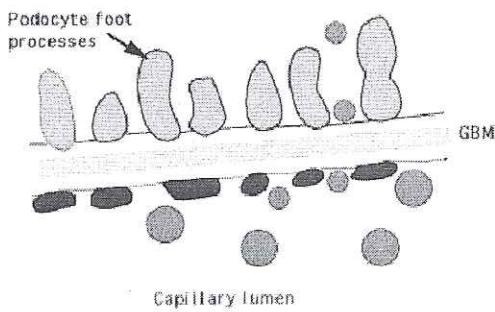
Bowmanova čahura

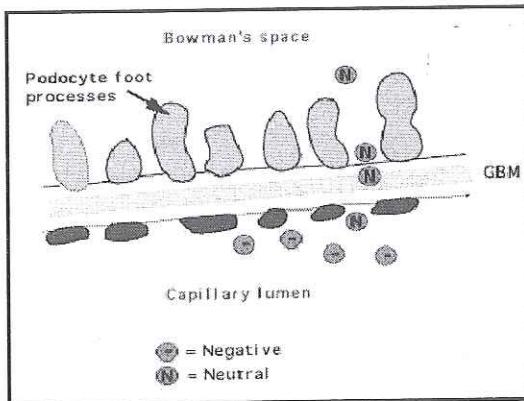
PARIJETALNI EPITEL
oblaže čahuru
proliferira nakon rupture bazalne
membrane

PODOCITI
nožicama omeđuju filtracijske pukotine
antetiziraju sastojke bazalne membrane



Bowman's space





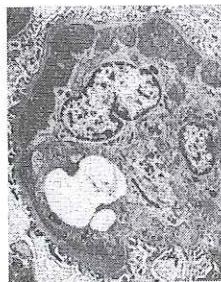
Uzrok glomerularnog oštećenja je imunološki poremećaj

Izazvan:

- * depozitima cirkulirajućih imunih kompleksa
- * autoprotilijelima na sastojke GBM
- * citokinima
- * antineutrofilnim protutijelima

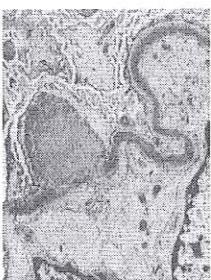
Smještaj imunih depozita

subendotelno



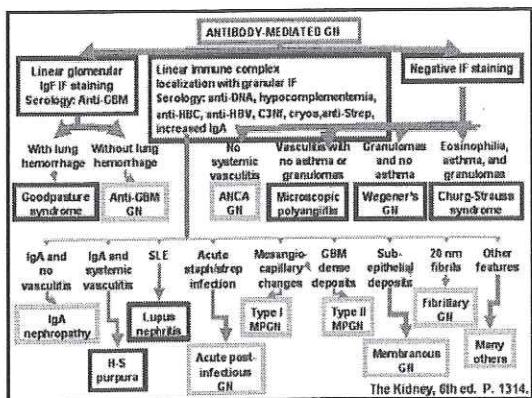
Smještaj imunih depozita

subepitelno
intramembranski



Smještaj imunih depozita

mezangijalno



Glomerularno oštećenje izaziva upalnu reakciju

glomerularne stanice se mogu aktivirati i proliferirati

leukociti iz krvi i fibroblasti iz periglomerularnog intersticija mogu infiltrirati glomerul

Klasifikacija glomerularnih bolesti

Ne-proliferativne

- Bolest minimalnih promjena
- FSGS
- Membranska nefropatija

Proliferativne

- Mezangijkska proliferativna (IgA) nefropatija
- Difuzni proliferacijski GN
- Fokalni segmentalni GN
- Krescentni GN

Manifestacije glomerularnih bolesti

- Asimptomatska proteinurija
- Asimptomatska hematurija
- Nefrotski sindrom
- Nefritički sindrom
- Akutno/Brzoprogresivno zatajenje bubrega
- Terminalni stadij zatajenja bubrega
- Arterijska hipertenzija

Nefrotski sindrom

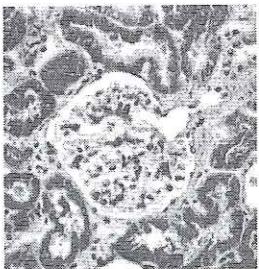
*proteinurija >3,5 g dnevno, edemi i hiperholesterolemija

- * bolest minimalnih promjena
- * fokalna segmentalna glomeruloskleroza
- * membranski glomerulonefritis
- * membranoproliferacijski glomerulonefritis

Bolest minimalnih promjena

- toksični T limfocitni citokin pojačava propusnost GBM za albumine
- kortikosteroidna terapija obično će zaustaviti proteinuriju

Glomeruli su normalni, bez imunih depozita



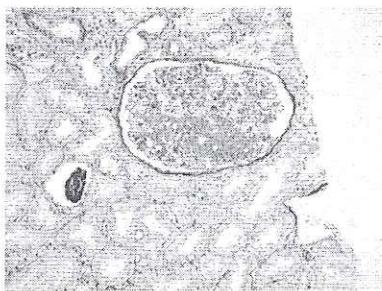
Podociti gube nožice i naliježu na
GBM



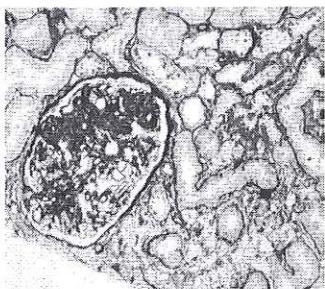
Fokalna segmentalna
glomeruloskleroza

T stanični citokin citotoksično djeluje na
podocite koji gube nožice i odvajaju se od GBM

U mezangij eksudirani proteini (IgM, C3) izazivaju
hijalinizaciju i skleroziranje dijela kapilarnog klupka



Skleroziranje glomerularnog segmenta

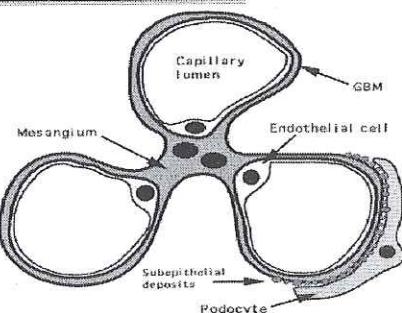


Membranski glomerulonefritis

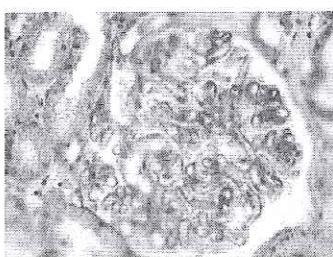
primarni- autoprotiljelo na antigen podocita?

sekundarni- cirkulirajući imuni kompleksi IgG4

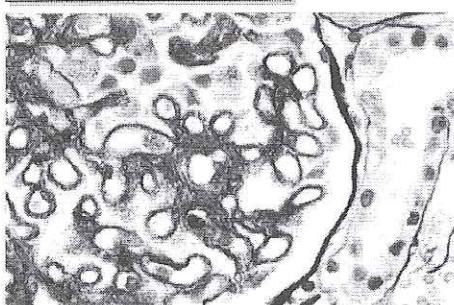
Membranska glomerulopatija



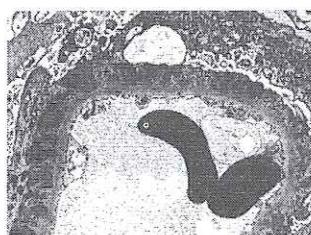
GBM je difuzno zadebljana



Membranska glomerulopatija



GMB urasta poput šiljaka između subepitelnih imunih depozita



Membranoproliferativni glomerulonefritis

tip 1. subendotelni imuni depoziti

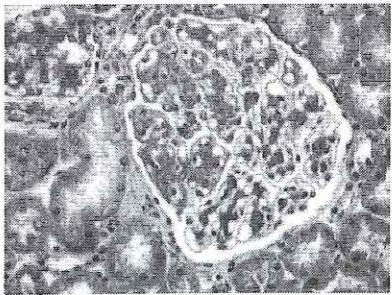
tip 2. autoprototijelo na C3 konvertazu izaziva trajno aktiviranje komplementa

Posljedica

upalna reakcija s lobuliranjem klupka
urastanje mezangija u GBM
stvaranje nove lamine i podvostručenje membrane

u tipu 2: vrpčasto zgasnuće membranske lamine
dense

Lobularni glomerulonefritis



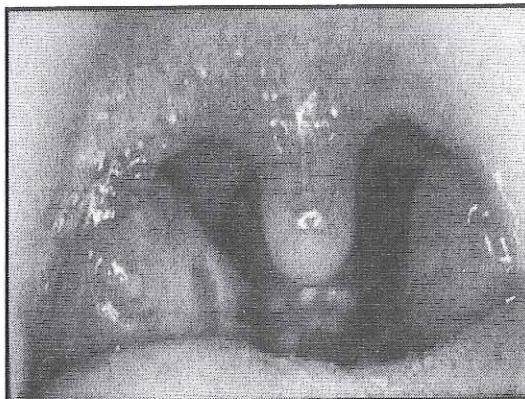
Nefritički sindrom

hematurija, oligurija i hipertenzija

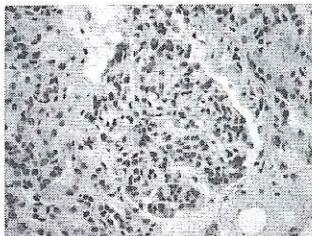
akutni postinfekcijski glomerulonefritis
brzoprogresivni glomerulonefritis
IgA nefropatija

Akutni postinfekcijski glomerulonefritis

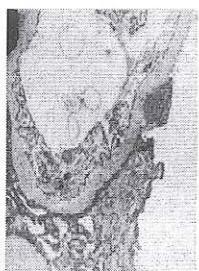
Imuni depoziti u glomerulu nekoliko tjedana nakon bakterijske ili virusne infekcije



Hipercelularni glomerul- eksudirani leukociti i aktiviran endotel



Subepitelni imuni depoziti u obliku grba



Complement Abnormalities in Glomerulonephritis

GN With Hypocomplementemia	GN Without Hypocomplementemia
Postinfectious GN	ANCA-associated SVV
Endocarditis GN (including shunt nephritis)	IgA nephritis
MPGN	Henoch-Schönlein purpura
Lupus GN	
Cryoglobulinemic DN	

Legend:
■ Low C3
□ Low C3 and low C4

Diagnostic Application in Renal Disease

Disease	Hypocomplementemia Sensitivity
Postinfectious GN	+
Lupus GN	+
MPGN	?
Cryoglobulinemic GN	+
IgA nephropathy	-
Pauci-immune GN	-
Anti GBM GN	+

Brzoprogresivni GN

Uzrok:

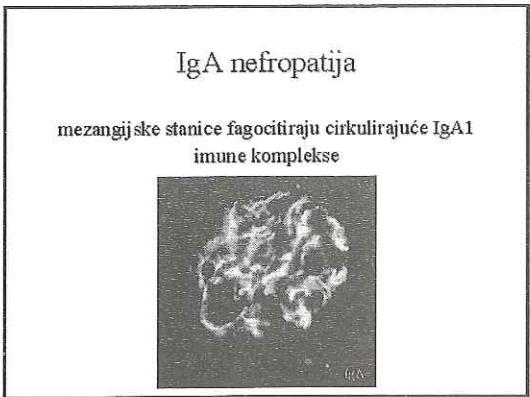
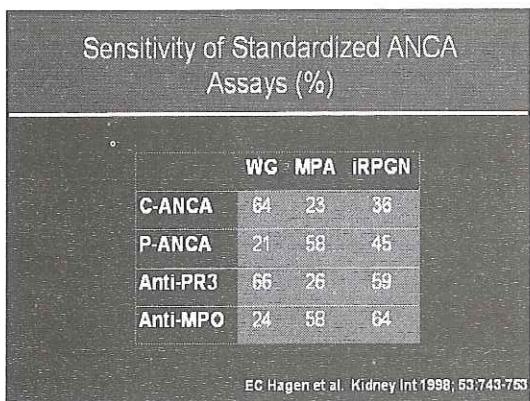
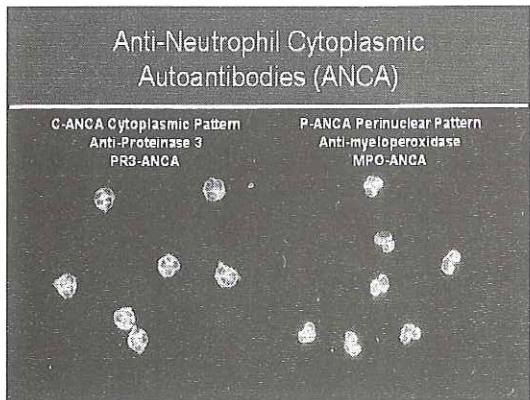
circulirajući imuni kompleksi
antineutrofilna protutijela
autoprotutijelo na komponentu GBM

Glavni oblici krescentnog GN

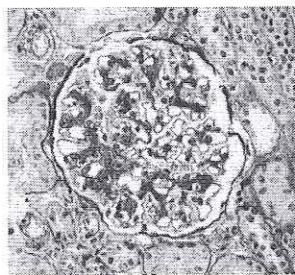
- Anti GBM bolest
- Primarni sistemski vaskulitis: mikroskopski poliarteritis, Wegenerova granulomatoza, Churg-Strauss sindrom
- Sistemske bolesti: SLE, Esencijalna mješana krioglobulinemija, Pupura H-S, Behcetov sindrom, Reumatoидни artritis
- Primarni GN: Mezangiokapilarni GN, Mezangijska IgA nefropatija, Membranska nefropatija
- S infekcijom udružen Postinfekcijski GN, Endokarditis
- Malignomi: Karinom, Limfom
- Lijekovi: Hidralazin, Penicilamin

Ruptura bazalne membrane uzrokuje
stvaranje polumjeseca u >50%
glomerula





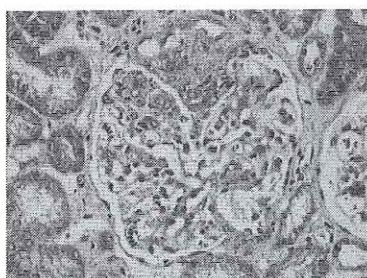
Difuzno proširenje mezangija



Henoch- Schonleinova purpura- IgA vaskulitis

infekcija gornjih dišnih putova,
osip po bedrima,
artritis i
bol u trbuhi.

Nekroza dijela glomerularnog klupka

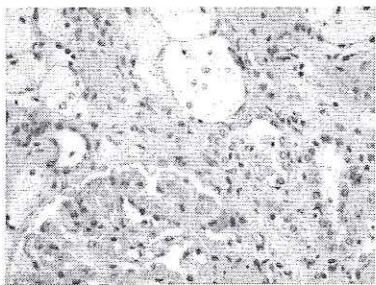


Hereditarni nefritis

Alportov sindrom: nedostatak alfa-5 lanca
kolagena tipa 4
gluhoća, nefritis i subluksacija leće

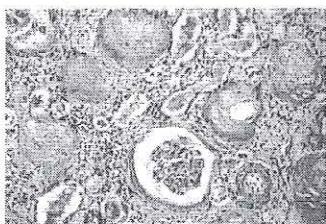
laminirana i supepitelno nepravilna kontura GBM.

Alportov sindrom - sačasti makrofagi u intersticiju



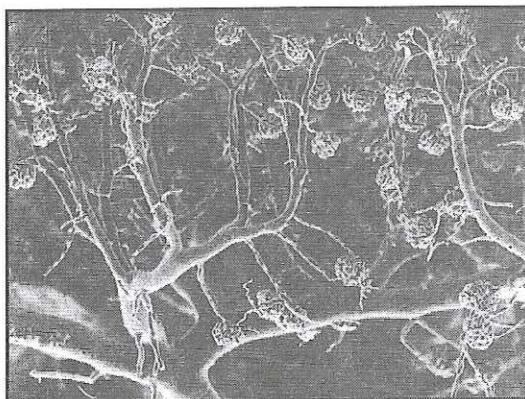
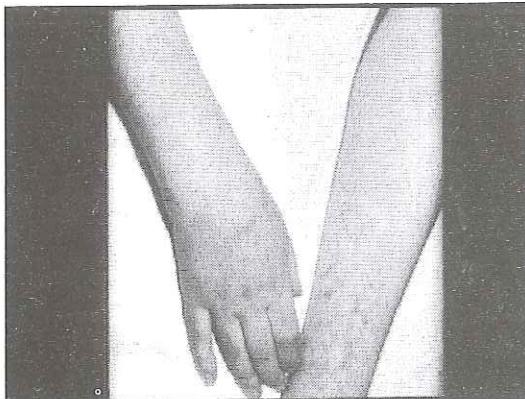
Kronični glomerulonefritis

Promjenjene su
sve bubrežne
strukture



Sekundarni uzroci GN

- Bolest minimalnih promjena: Lijekovi, posedno NSAID, Hodgkinova bolest
- FSGS: Narkomani, HIV infekcija, Malignom, nakon Fokalnog segmentalnog GN, Lječenje litijem
- IgA nefropatijska: Ciroza jetre, Celjakija/Dermatitis herpetiformis, Seronegativni artritis, Tuberkuloza
- Membranska nefropatijska: Tumori (15%), Lijekovi (osobito zlato i penicilamin), Infekcije (hepatitis B, sifilis, kvaratna malarija), SLE, Bolest srpskih stanica
- Mezangiolikapilarni GN: Tumori i kronična limfatična leukemijska, Infekcije (endokarditis, B i C hepatit, šistosomijaza), Mješana esencijalna krioglobuli-nemija, SLE



LABORATORIJSKE PRETRAGE KOD BUBREŽNIH BOLESNIKA

Ivana Dujmov, Nada Ivanović-Ivelja, Katarina Čepić

Odjel za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku, KB Split, Split

BOLESTI BUBREGA

Bubreg je parni organ, a njegova osnovna funkcionalna jedinica je nefron, koji se sastoji od glomerula i tubula. Oni održavaju sastav i volumen izvanstanične tekućine, a stalna izmjena vode i tvari kroz stanične membrane omogućava bubrežima da neizravno doprinose regulaciji volumena, sastava i tonusa unutarstaničnih tekućina.

Svakodnevno unošenje hrane i tekućine zahtijeva izlučivanje unesenih tvari i njihovih metabolita u opsegu koji održava ravnotežu unesenoj količini, pa iako gubici kožom, plućima i crijevima tome doprinose, najveća odgovornost za izlučivanje tvari i vode otpada na bubrege.

Poremećaji u funkciji bubrega su:

Poremećaji u funkciji glomerula – smanjena glomerularna filtracija

– nefrotički sindrom

Poremećaji funkcije tubula

– tubuli ne izlučuju vodikove ione

– oštećen mehanizam za reapsorpciju i izmjenu kalijevih iona, glukoze, fosfata ili aminokiselina

1. Zatajivanje bubrega

a) Akutno zatajivanje bubrega (AZB) karakterizirano je nagnim smanjenjem protoka krvi kroz bubrege, brzim padom glomerularne filtracije (GF) i zadržavanjem dušikovih odpadnih spojeva (ureja i kreatinin). Oligurija (izlučivanje mokraće < 400 mL/dan) je česta, ali i reverzibilna pojava. AZB može nastati kao komplikacija različitih bolesti. Uspješno se liječi konzervativnim metodama, premda oko 5% bolesnika zahtjeva dugotrajno zamjensko liječenje, kao što su kronična dijaliza i presađivanje bubrega.

b) Kronično zatajivanje bubrega (KZB) je sindrom koji označava postupno, trajno i ireverzibilno propadanje nefrona te dolazi do insuficijencije svih bubrežnih funkcija. Uremija je klinički sindrom koji je posljedica teškog gubitka bubrežne funkcije.

2. Glomerulonefritis

Glomerulonefritis je upala bubrega u kojoj su prvenstveno zahvaćeni glomeruli.

3. Nefrotički sindrom

Nefrotički je sindrom karakteriziran obilnom proteinurijom, hipoalbuminemijom, hiperlipidemijom i generaliziranim edemima.

4. Intersticijski nefritis

Intersticijski nefritis označava upalni proces, koji se odvija u bubrežnom intersticiju.

5. Pijelonefritis

Pijelonefritis obuhvaća infekcije mokraćnog sustava.

DIJALIZA I PRESAĐIVANJE BUBREGA U LIJEČENJU BUBREŽNIH BOLESNIKA

Ukoliko konzervativno liječenje ne daje rezultate dolazi do kasnog stadija zatajivanja bubrega, što zahtjeva dijalizu, ili u najpovoljnijem slučaju presađivanje organa.

Dijaliza

Kakav će se tip dijalize provesti (hemodializa ili peritonealna) ovisi o individualnim potrebama bolesnika.

a) Hemodializa je proces difuzije kroz polupropusnu membranu kojim se uklanaju nepoželjne tvari iz krvi, a dodaju se željene komponente. Problemi vrlo česti kod bolesnika na hemodializiji su pristup cirkulaciji, česte depresije, povišena incidencija pojave B i C hepatitisa i CMV zbog učestalih transfuzija krvi. Dodatak eritropoietina bolesnicima je smanjio broj potrebnih transfuzija, a tako je smanjen i rizik od oboljevanja od B i C hepatitisa.

b) Peritonealna dijaliza se izvodi s pomoću privremenog intraperitonealnog katetera.

Presađivanje bubrega

Bubreg za presađivanje može se uzeti od živog srodnog davaatelja, ili se može primaocu dati kadaverični bubreg. Kod davaatelja bubrega prethodno se provodi tipizacija tkiva i klinička imunogenetika.

Primatelj bubrega ne smije imati izvanbubrežnih komplikacija opasnih po život, akutne infekcije i glomerulonefritis. Relativne kontraindikacije su visoka dob, abnormalnost uretera i mokraćnog mjehura te oksaloza.

Presađivanje je često vezano uz mogućnost komplikacija vezanih uz imunosupresivno liječenje.

Imunosupresivno liječenje

Kad između davaatelja i primatelja postoje razlike u histokompatibilnosti potrebna je modifikacija ili supresija imunološkog odgovora, da bi se primatelju omogućilo da prihvati presađeni bubreg. Kod bolesnika se vrši farmakološka imunosupresija.

Najprije se imunosupresija provodila sa azatioprinom, samim ili u kombinaciji sa glukokortikoidima, tako da bi se smanjio učinak na monocitno-makrofagni sustav.

Danas se koristi imunosupresiv ciklosporin, koji ima snažno imunosupresivno djelovanje jer djeluje na ranu aktivaciju pomocnih inducirajućih T limfocita pa štedi odgovore supresorskih T stanica. Klinički rezultati terapije su impresivni, iako toksični učinak ciklosporina predstavlja veliki problem (nefrotoksičnost i hepatotoksičnost).

Ciklosporin se uglavnom eliminira putem žuči, a tim putem se izlučuju i njegovi metaboliti. Na njegovu farmakokinetiku uveliko utječe bolesti jetre i gastrointestinalne poteškoće. Mnogi lijekovi utječu na razinu ciklosporina tako da potiču metabolizam i utječu na reapsorpciju lijeka. Toksične nuspojave zbog kojih je nužno pratiti koncentraciju lijeka prvenstveno se odnose na oštećenje bubrega. Oštećenja su reverzibilna, a mogu se pojačati sinergističkim djelovanjem drugih lijekova.

Epizode odbacivanja presatka

Klinički znaci odbacivanja presatka očituju se tako što kod bolesnika dolazi do značajnog pada volumena mokraće, smanjene koncentracije natrija, porasta koncentracije kreatinina i pada klirensa kreatinina. Slično pogoršanje bubrežnih funkcija može nastati i uslijed djelovanja ciklosporina. Da bi se ustanovilo o čemu se radi pristupa se biopsiji bubrega. Ukoliko se biopsijom ne otkrije da se radi o staničnom odbacivanju, smanjuju se doze ciklosporina.

I kod dijaliziranih i kod bolesnika s presađenim bubrengom dolazi do cerebralnih i koronarnih oštećenja, tako da veliki broj bolesnika umire od moždanog udara i infarkta miokarda, što je naročito izraženo kod bolesnika koji još dodatno imaju i šećernu bolest. Opasna je prisutnost hipertenzije i povećana koncentracija triglicerida, LDL-kolesterol, kao i snižene vrijednosti HDL-kolesterol, pa i te promjene zahtijevaju ciljano liječenje.

SUVREMENI LABORATORIJSKI PRISTUP U OTKRIVANJU I PRAĆENJU BUBREŽNIH BOLESNIKA

Kod bolesnika sa sumnjom na bubrežnu bolest treba dijagnostiku usmjeriti na ispitivanje bubrežne funkcije. U tu svrhu služimo se nizom dijagnostičkih pretraga. U prvom se redu provodi pregled mokraće i testovi procjene bubrežne funkcije.

1. Pregled mokraće

Za pregled mokraće uzima se srednji mlaz prve jutarnje mokraće, a pretragu treba napraviti unutar dva sata od uzimanja uzorka. Radi isključivanja i razlikovanja patoloških procesa u bu-

brežnim bolestima, postupno se provodi razlikovanje proteinurije, leukocituirije i hematurije.

a) Proteinurija

Određivanje proteinurije test trakama (laboratorijski *screening*) ima nedostataka, kao što su nedovoljna osjetljivost i specifičnost te nemogućnost otkrivanja tubularne disfunkcije. Test polje za proteine napravljeno je tako da otkriva isključivo prisutnost albumina i to u koncentracijama $> 0,3 \text{ g/L}$ te se ne mogu otkriti mikroalbuminurija, tubularna i prerenalna proteinurija.

Diferencijacija mokraćnih proteina je dijagnostički pristup ranom otkrivanju oboljenja bubrežnog parenhima, odnosno isključenja njihove prisutnosti, a služi kao i informacija o poremećajima koji se događaju na drugim organima.

Određuje se koncentracija ukupnih proteina u 24 satnoj mokraći. Fiziološki je normalno izlučivanje ispod 150 mg/24 sata, a najčešće se izlučuju albumini (50-60%), neke manje proteinske molekule te tubularni proteini (Tamm-Horsfallov protein). Ova pretraga je klinički korisna za praćenje već dokazane bubrežne bolesti.

U svrhu isključenja, osim mjerena koncentracije ukupnih proteina te podataka dobivenih test trakom (leukocituirija i hematurija), određuje se koncentracija:

- albumina, kao biljega glomerularne proteinurije
- α_1 -mikroalbumina, kao biljega tubularne proteinurije.

Ukoliko je neki od ovih parametara patološki, pristupa se daljnjoj diferenciranoj dijagnostici:

- IgG je velika molekula čija prisutnost u urinu ukazuje na neselektivnost glomerularne proteinurije
- α_1 -makroglobulin, koji ukazuje na nemogućnost tubularne reapsorpcije malih proteina
- aktivnost N-acetil- β -D-glukozaminidaze koja se povećava kod akutnih oštećenja, čime diferenciramo akutnu od kronične lezije bubrega
- α_2 -makroglobulin koji ni kod većih oštećenja ne prolazi kroz glomerularni filter, a povišene vrijednosti ukazuju na postrenalni uzrok hematurije

- Bence-Jonesov protein koji se pojavljuje u slučaju mijeloma
- mioglobin, kao posljedica ozljede mišića
- β_2 -mikroglobulin je povećan u mokraći kod niza bolesti koje su povezane sa tubularnom disfunkcijom (i kod odbacivanja presatka).

b) Hematurija

Screening test trakom zadovoljava. Diferencijacija hematurije uključuje pregled morfologije eritrocita fazno kontrastnim mikroskopom, pri čemu je prisutnost dismorfičnih eritrocita potvrda glomerularnog porijekla krvarenja.

c) Leukociturija

Ako test traka pokaže pozitivni nalaz leukociturije, vrši se mikroskopski pregled sedimenta mokraće i mikrobiološka obrada. Ukoliko se u sedimentu uz leukocite nađu i cilindri radi se o bubrežnom porijeklu leukociturije.

Kako bi interpretacija navedenih nalaza bila što jednostavnija i pristupačnija grupa njemačkih autora razvila je tzv. ekspertni sustav UPES (engl. *Urinary Protein Expert System*) pomoću kojeg, nakon unošenja osnovnih parametara isključenja bubrežne bolesti, program generira prijedlog nalaza koji obuhvaća prosudbu je li bubrežna bolest prisutna ili ne, o kojem tipu bubrežne bolesti se radi, kao i koje je dodatne laboratorijske pretrage potrebno napraviti.

2. Procjena bubrežne funkcije

a) Mjerenje glomerularne filtracije (GF)

GF je određena veličinom renalnog protoka plazme, permeabilitetom i površinom filtracijske membrane te silama na nivou glomerulskih kapilara, koje određuju filtracijski gradijent.

Na GF utječu:

- dnevne oscilacije
- fizički napor
- stupanj hidracije

- infuzija aminokiselina
- trudnoća
- životna dob.

Laboratorijska dijagnostika za određivanje GF:

- klirens inulina
- klirens kreatinina
- Cistatin C kao endogeni marker GF.

Klirens kreatinina je nepouzdan zbog vrste analitičkog postupka, tubularne sekrecije kreatinina, mišićne mase i sakupljanja 24 satne mokraće.

Cistatin C smatra se vrlo pouzdanim testom za određivanje GF. Na koncentraciju cistatina C ne utječe upala, malignitet, mišićna masa, dob i spol. Eliminira se iz cirkulacije isključivo GF, te reapsorbira i katabolizira u proksimalnim tubulima.

b) Renalni protok plazme

Klirens PAH-a

c) Sposobnost stvaranja koncentrirane mokraće

Određuje se osmolalnost mokraće (broj osmotskih čestica u 1 kg vode).

d) Test acidifikacije mokraće

To je sposobnost tubulskih stanica da luče vodikov ion i amonijak.

DIJAGNOSTIČKI ZNAČAJNA ODREĐIVANJA U SERUMU I PLAZMI KOD BUBREŽNIH BOLESNIKA

- kreatinin u serumu ili plazmi – služi za ocjenu GF
- klirens kreatinina – služi za ocjenu GF
- ureja – važna je kod bolesnika s krajnjim stadijem bubrežne insuficijencije
 - kalij – do hiperkalijemije dolazi kod AZB, dok se kod KZB javlja kad GF padne ispod 15 mL/min
 - kalcij i fosfor – hipokalcemija i hiperfosfatemija nalaze se kod KB insuficijencije

- C3 i C4 – njihovi imuno kompleksi se kontinuirano stvaraju i vezuju na glomerule te uzrokuju membranoproliferativni glomerulonefritis
 - antinuklearna antitijela (ANA) nalaze se prisutna kod sistemskog lupusa eritematozus
 - antitijela na citoplazmatski antigen neutrofilnih granulocita (ANCA) nalaze se prisutna kod imunog vaskulitisa. Ovo kao i predhodno oboljenje može uvjetovati bolest bubrega.
 - antiglomerularna antitijela na baznu membranu (anti GBM) nalaze se prisutna kod slučajeva progresivnog glomerulonefritisa.
 - mokraćna kiselina
 - natrij i kloridiKKS, % hipokromnih eritrocita
 - željezo
 - UIBC
 - feritin
 - B₁₂ i folna kiselina
 - CRP
 - ciklosporin
 - osmolalnost seruma i mokraće
 - cistatin C.

LITERATURA:

1. Thomas L. Clinical Laboratory Diagnosis of Kidney and Urinary Tract Disorders. In Thomas L. (ed.): Clinical Laboratory Diagnostics: Use and Assessment of Clinical Laboratory Results. TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt, Germany, 1998: 362-400
2. Tietz NW. Clinical Guide to Laboratory Tests. WB Saunders Company, Philadelphia, 1983.
3. Burtis CA, Ashwood RE (eds): Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, 5th ed., WB Saunders Company, Philadelphia, USA, 2001.
4. Topić E, Primorac D, Janković S. Medicinsko-biohemjska dijagnostika u kliničkoj praksi. Medicinska naklada, Zagreb, 2004.
5. Harrison TR. Principi interne medicine, Prvo hrvatsko izdanje, Split: Placebo, 1997.

ACETIL-HIDROLAZA TROMBOCITNOG FAKTORA AKTIVACIJE U BOLESNIKA NA HEMODIJALIZI I PERITONEJSKOJ DIJALIZI

Ilza Salamunić¹, Zlata Flegar Meštrić², Dragan Ljutić¹, Dubravka Juretić³

¹Klinička Bolnica Split, ²Klinička Bolnica Merkur, Zagreb, ³Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Acetyl-hidrolaza trombocitnog faktora aktivacije (PAF-AH - Platelet-activating factor acetylhydrolase) (EC 3.1.1.47.), je enzim koji katalizira hidrolizu trombocitnog faktora aktivacije, (1-O-alkil-2-acetyl-*sn*-glicero-3-fosfokolin) (PAF), i razgradnju oksidiranih fosfolipida koji su po građi slični PAF-u pa se zato i smatra mogućim anti-upalnim i anti-aterogenim enzimom. PAF-AH hidrolizira *sn*-2 acetilni ostatak PAF-a, a pokazuje i značajnu katalitičku aktivnost prema supstratima koji na položaju *sn*-1 imaju etersku ili estersku vezu, i na položaju *sn*-2 acilne ostatke sa manje od šest ugljikovih atoma (1, 2). Tijekom upalnog procesa središnja funkcija PAF-a je aktivacija leukocita vezanjem za stijenku krvnih žila putem specifičnih adhezijskih molekula koje izlučuju endotelne stanice. Osim njegovog djelovanja u kontroliranoj upalnoj reakciji, sve više se pokazuje i doprinos PAF-a u razvoju patoloških promjena kao što su upalne i alergijske reakcije koje zahvaćaju kardiovaskularni, moždani, plućni, probavni i reproduktivni sustav, te bubrege, jetru, i gušteriću (3). Danas su poznati mnogi fosfolipidi slični PAF-u koji oponašaju njegovu bioaktivnost pa su vjerojatno i odgovorni za značajan udio patologije koja se pripisuje PAF-u. Fosfolipidi slični PAF-u nastaju tijekom oksidativne modifikacije lipoproteina niske gustoće (LDL) u plazmi. Oksidira-

ni LDL gubi svojstvo vezanja na receptore pa se ubrzava ulazak u makrofage i stvaranje pjenastih stanica. Oksidirani LDL ima stoga centralnu ulogu u inicijaciji ateroskleroze (1, 4).

Kronična bubrežna insuficijencija povezana je s procesom ubrzane lipidne peroksidacije i ubrzane aterogeneze stoga je važno ustanoviti ulogu PAF-AH u razvoju tih promjena u bolesnika na hemodializi i peritonejskoj dijalizi. U tu svrhu katalitičke koncentracije PAF-AH i koncentracije CRP-a izmjerene su u serumu bolesnika na hemodializi i peritonejskoj dijalizi te u serumu kontrolne grupe ispitanika iz područja u kojem obitavaju bolesnici.

Ispitivanja su provedena na 140 bolesnika (76 muškaraca i 63 žene) na hemodializu, 40 bolesnika (15 muškaraca i 25 žena) na peritonejskoj dijalizi i 234 zdravih (119 muškaraca i 115 žena) ispitanika. Navedena istraživanja odobrilo je Etičko povjerenstvo Kliničke bolnice Split. Katalitičke koncentracije PAF-AH izmjerene su spektrofotometrijskom metodom u kojoj hidroliziranjem supstrata, 1-miristoil-2-(p-nitrofenilsukcinil)fosfatidilkolina, u sn-2 položaju na pH 7.6 nastaje p-nitrofenilsukcinat, koji se u vodenoj otopini odmah razgrađuje oslobađajući p-nitrofenol. Koncentracija CRP određena je imunoturbidimetrijskom metodom. Mjerenja su izvedena na Olympus AU 600 biokemijskom analizatoru. Određivanja su bila dopuna pretragama koje su sastavni dio mjesечnih kontrolnih pregleda bolesnika na hemodializu i peritonejskoj dijalizi.

Katalitičke koncentracije enzima pokazuju statistički značajan porast kako u serumu bolesnika na hemodializu tako i u serumu bolesnika na peritonejskoj dijalizi (Tablica 1).

Tablica 1. Acetil-hidrolaza trombocitnog faktora aktivacije (PAF-AH) u serumu ispitanika

	N	SV ± STD	Medijan	(Q1-Q3)	p
Katalitička aktivnost (U/L)					
Kontrolni ispitanici	234	334 ± 49	326	306-362	
Hemodializa	139	369 ± 113	352	301-407	0.012 ^a
Peritonejska dijaliza	38	399 ± 140	368	288-491	0.024 ^a

^aStatistički značajno različito prema kontrolnoj grupi (Mann-Whitney rank sum test)
(Q1-Q3) interkvartilni raspon

Statistički značajan porast koncentracije CRP-a izmjerен je samo u skupini bolesnika na hemodializu iako je rasipanje vrijednosti izraženo u obje grupe bolesnika (Tablica 2).

Tablica 2. Koncentracije C-reaktivnog proteina (CRP) u serumu kontrolnih ispitanika i bolesnika na dijalizi

	N	SV ± STD	Medijan	(Q1 - Q3)	p
Kontrolni ispitanici	234	3.63 ± 2.57	3.30	2.00-4.90	
Hemodializa	139	14.3 ± 24.6	5.80	3.60-14.0	<0.001 ^a
Peritonejska dijaliza	38	8.28 ± 13.7	1.55	0.43-9.70	0.280

^aStatistički značajno različito prema kontrolnoj grupi (Mann-Whitney rank sum test)
(Q1-Q3) interkvartilni raspon

Porast aktivnosti enzima u obje ispitivane grupe bolesnika u odnosu na kontrolnu grupu u korelaciji je sa koncentracijom CRP-a. U serumu bolesnika na hemodializi ($r = -0,195$; $p < 0.05$) i peritonejskoj dijalizi ($r = -0,282$; $p < 0.05$) ustanovljena je negativna korelacija između katalitičke koncentracije enzima i koncentracija CRP-a što bi ukazivalo na protuupalno djelovanje PAF-AH-a. Dosadašnja ispitivanja PAF-AH provedena su u bolesnika na hemodializi s membranama niske biokompatibilnosti (5). Kako se danas u našoj zemlji primjenjuju samo membrane visoke biokompatibilnosti, rezultati naših ispitivanja pokazuju i utjecaj stupnja biokompatibilnosti membrana na aktivnost ovoga enzima.

LITERATURA:

- Chen CH. Platelet-activating factor acetyl-hydrolase: is it good or bad for you? *Curr Opin Lipidol* 2004; 15:337-341.
- Juretić D. Uloga acetil-hidrolaze trombocitnog faktora aktivacije u zdravlju i bolesti. *Biohemia Medica* 2003; 13: 15-20.
- Imaizumi T, Stafforini D, Yamada Y, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Platelet-activating factor: a mediator for clinicians. *J Int Med* 1995; 238:5-20.
- Flegar-Meštrić Z, Vrhovski-Hebrang D, Juretić D, Perkov S, Preden-Kereković V, Hebrang A, Vidjak V, Odak D, Grga A, Kosaka T: Serum platelet-activating factor acetylhydrolase activity in patients with angiographically established cerebrovascular stenosis. U: Proceedings of 15th IFCC-FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, EUROMEDLAB 2003, Barcelona, June 1-5, 2003. Bologna: Monduzzi Editore, International Proceedings Division; 2003. Str. 369-372.
- Haralampus JM, Elisaf MS, Karabina SAP, Bairaktari E, Tselepis AD, Siamopoulos KC. Plasma and Lp(a)-associated PAF-acetylhydrolase activity in uremic patients undergoing different dialysis procedures. *Kidney Int* 1999; 56: 2276-2285.

ANEMIJE KOD BOLESNIKA NA HEMODIJALIZI

Ada Sapunar, Nada Bošnjak, Katarina Čepić, Daniela Šupe-Domić

Odjel za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku
KB Split, Split

U bolesnika s kroničnim zatajivanjem bubrega (KZB) anemija je redovita izvanbubrežna komplikacija bolesti. Za nastanak anemije odgovorna su tri patofiziološka mehanizma, od kojih je primarni smanjena sinteza eritropoietina (EPO) zbog poremećene endokrine funkcije bubrega. Sekundarni mehanizam uključuje inhibiciju sinteze hema i diferencijacije matičnih eritrocito-poetičkih stanica koštane srži uremičnim toksinima s retencijom metaboličkih produkata, zbog smanjene ekskretorne funkcije bubrega. Kao dodatni mehanizmi tu su i skraćeni životni vijek eritrocita (Erc) i sklonost krvarenjima, zbog retencije metaboličkih produkata, koji kao izvaneritrocitni hemolitički čimbenici, pridonose razvoju anemije. Ostali mogući popratni uzroci anemije kod KBZ jesu nedostaci čimbenika potrebnih za hematopoezu, kao što su željezo, folna kiselina i vitamin B₁₂.

Anemija kod KZB normocitna je i normokromna, ali mogu biti prisutna i obilježja sideropenične anemije. Krvna slika pokazuje smanjen broj Erc i koncentraciju hemoglobina, uz normalnu ili blago sniženu vrijednost prosječnog volumena eritrocita (MCV). Broj je retikulocita (Rtc) unutar granica referentnog intervala ili snižen. Broj leukocita i trombocita obično je normalan, ali mogu biti prisutni funkcionalni poremećaji tih stanica. U razmazu periferne krvi prisutne su poikilocitoza, fragmentirani Erc, eliptociti, a ponekad i akantociti i shizociti. Koštana srž pokazuje urednu staničnost, uz normalan omjer stanica granulocitopoeze i eritroci-

topoeze, što je u izraženoj anemiji patološki nalaz. Koncentracija EPO u serumu je snižena ovisno o stupnju anemije.

Prema novijim istraživanjima, sekundarni nedostatak željeza u bolesnika s anemijom kod KBZ glavni je uzrok smanjenog odgovora na terapiju rekombiniranim humanim EPO. Stoga je izuzetno važno u ovih bolesnika pratiti status željeza u organizmu. Koncentracije serumskog željeza mogu izrazito varirati u bolesnika ovisno o statusu željeza u organizmu. Učestale ponavljane transfuzije mogu dovesti do hiperferemije i opterećenja željezom. Transfuzije krvi mogu doprinijeti i potiskivanju eritropoeze pa ih zbog povišenog rizika od nastanka hepatitisa i hemosideroze treba izbjegavati sve dok eritropoietin ispravlja anemiju. Nedostatan odgovor na eritropoietin je obično posljedica nedostatka željeza, ali i inducirane mikrocitoze ili fibroze koštane srži. Parenteralno ili oralno lijeчењe željezom je indicirano u bolesnika s utvrđenim nedostatkom željeza.

Folnu, askorbinsku kiselinu i topljive vitamine B kompleksa treba davati za nadoknadu kroničnih gubitaka ovih tvari putem dijalize. Učestali gubici krvi mogu uzrokovati sideropeniju, a pridružene upalne promjene i infekcijske komplikacije mogu dati vrijednosti kao kod anemije u kroničnih bolesti.

Koncentracija feritina u serumu je unutar granica referentnog intervala ili povišena, često je lažno povišena zbog pridruženih infekcijskih komplikacija.

Laboratorijska obrada bolesnika s anemijom KZB

Svi bolesnici s KZB koji imaju anemiju trebaju dijagnostičku obradu radi mogućeg liječeњa. Dijagnostičku obradu treba izvršiti kada koncentracija hemoglobina padne ispod 110 g/L bez obzira na dob, spol i rasnu pripadnost.

Prema preporuci Hrvatskog društva za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju početnu kliničku laboratorijsku obradu u bolesnika s KZB treba završiti prije početka terapije lijekovima koji stimuliraju eritropoezu. Potrebno je otkriti druge moguće uzroke anemije koji uz relativni manjak eritropoietina uzrokuju ili pogoršavaju anemiju.

Procjena anemije obuhvaća sljedeće laboratorijske pretrage:

- koncentracija hemoglobina zbog procjene stupnja anemije

- MCV i MCH zbog procjene tipa anemije
- broj retikulocita zbog procjene eritropoetske aktivnosti
- serumski feritin zbog procjene rezervi željeza
- postotak hipokromnih eritrocita
- koncentracija hemoglobina u retikulocitima zbog procjene raspoloživosti željeza.

Proširene pretrage obuhvaćaju:

- C reaktivni protein zbog procjene upale
- koncentraciju vitamina B₁₂ i folata u serumu
- broj leukocita i trombocita, diferencijalnu krvnu sliku
- hemokult zbog procjene krvarenja iz probavnog sustava itd.

Prema preporukama Hrvatskog društva za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju, bolesnici s KZB trebali bi postići i održati ciljnu koncentraciju hemoglobina veću od 110 g/L u roku od četiri mjeseca od početka liječenja bez obzira na dob, spol i rasnu pripadnost. Koncentraciju hemoglobina treba odrediti prije postupka hemodijalize.

U liječenih bolesnika nije poželjna koncentracija hemoglobina viša od 140 g/L prije postupka hemodijalize zbog mogućih rizika hemokoncentracije nakon završene hemodijalize.

Liječenje anemija u bolesnika s kroničnim zatajivanjem bubreга započinje pri koncentraciji kreatinina u serumu 250 µmol/L ili pri glomerularnoj filtraciji < 35 mL/min/1,73 m², izraženoj kao klirens endogenog kreatinina.

Rezultati

Ispitivanje anemije kod bolesnika s KZB provedeno je na 83 bolesnika na hemodijalizi, od kojih su 42 muškarci (50,6%) i 41 žene (49,4%). Određivani su hemoglobin, hematokrit, MCV, hipokromni eritrociti, postotak hemoglobina u retikulocitima, feritin, vitamin B₁₂ i folna kiselina. Bolesnici su laboratorijski obrađeni prije postupka hemodijalize. Od ukupnog broja bolesnika 16 (15,2%) nije primalo terapiju eritropoietinom, 53 bolesnika (50,5%) uzimali su lijek 1 (Recor[®]), a 14 bolesnika (13,3%) lijek 2 (Eprex[®]). Bolesnici se razlikuju po učestalosti tjedne terapije od jedan do četiri puta tjedno i dozi koja se kreće od 2000 do 4000 jedinica.

Prosječna životna dob bolesnika je $59,4 \pm 15,5$ godina, minimalno 27 godina, maksimalno 91 godinu (muškarci $57,8 \pm 17,2$, a žene $60,9 \pm 13,7$). Duljina dijalize kod muškaraca iznosila je $6,12 \pm 4,8$ godina, a kod žena $6,12 \pm 6,5$ godina.

Mann-Whitney-U-testom dokazali smo da nema statistički značajne razlike u duljini dijalize između muškaraca i žena ($z=0,71$, $p=0,480$).

Bolesnici s kroničnim zatajivanjem bubrega trebali bi postići i održati ciljnu koncentraciju hemoglobina veću od 110 g/L u roku od četiri mjeseca od početka liječenja, bez obzira na dob, spol, etničku ili rasnu pripadnost (preporuka Hrvatskog društva za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju). S obzirom na navedenu preporuku svrstali smo bolesnike u dvije skupine ovisno o koncentraciji hemoglobina.

Hemoglobin	Bez terapije	Recor®	Eprex®	Ukupno
$\leq 110\text{g/L}$	8	28	9	45
$> 110\text{g/L}$	8	25	5	38
ukupno	16	53	14	83

Chi-square testom utvrdili smo da nema statistički značajne razlike u koncentraciji hemoglobina s obzirom na to prima li bolesnik lijek i koju vrstu lijeka ($\chi^2=0,73$, $p=0,695$).

Ispitujući duljinu dijalize vezano uz prethodno spomenute dvije skupine bolesnika ovisno o koncentraciji hemoglobina utvrđeno je da duljina dijalize ne utječe na koncentraciju hemoglobina (po Mann-Whitney-U-testu, $z=1,03$, $p=0,305$).

Koncentracija hemoglobina	Duljina dijalize
$\leq 110\text{ g/L}$	$5,64 \pm 5,61$
$> 110\text{ g/L}$	$6,62 \pm 5,83$

Uspoređivane su dvije skupine bolesnika (s koncentracijama hemoglobina manjim i većim od 110 g/L) s vrijednostima hematokrita i feritina, postotkom hipokromnih eritrocita i koncentracijom hemoglobina u retikulocitima.

Usporedba hemoglobina i hematokrita je pokazala statistički značajnu razliku ($\chi^2=25,3$, $p<0,0001$), kao i usporedba postotka hipokromnih eritrocita s hemoglobinom.

Usporedba koncentracije hemoglobina s koncentracijom feritina nije pokazala statistički značajnu razliku ($\chi^2=0,84$, $p=0,361$).

Usporedba s koncentracijom hemoglobina u retikulocitima također nije pokazala statistički značajnu razliku.

Usporedba MCV s vitaminom B₁₂ nije pokazala značajnu statističku razliku ($\chi^2=1,12$, $p=0,289$) kao ni usporedba s folnom kiselinom ($\chi^2=1,2$, $p=0,274$).

Zaključak

Jedno od ključnih područja nefrologije koje može utjecati na ishod u bolesnika na dijalizi je liječenje anemije u smislu poboljšanja kvalitete života.

LITERATURA:

1. Thomas L. Clinical Laboratory Diagnosis of Kidney and Urinary Tract Disorders. In Thomas L. (ed.): Clinical Laboratory Diagnostics: Use and Assessment of Clinical Laboratory Results. TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt, Germany, 1998: 362-400
2. Projekt reforme Ministarstva zdravstva: Liječenje anemija u bolesnika s kroničnim zatajivanjem bubrega, 2003.
3. Hrvatsko društvo za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju: Promijenjene i nadopunjene smjernice liječenja anemije u bolesnika s kroničnim zatajivanjem bubrega, 2004.
4. Topić E, Primorac D, Janković S. Medicinsko-bioteknološka dijagnostika u kliničkoj praksi. Medicinska naklada, Zagreb, 2004.
5. Harrison TR. Principi interne medicine. Prvo hrvatsko izdanje. Split: Placebo, 1997.

POREMEĆAJI PRIMARNE HEMOSTAZE KOD BOLESNIKA S KRONIČNIM ZATAJIVANJEM BUBREGA

Branka Pauković Sekulić

Odjel za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku, KB Split, Split

Kod bolesnika s kroničnim zatajivanjem bubrega javljaju se poremećaji hemostaze u obliku povećane sklonosti krvarenju ili trombozi. Odnos između ova dva rizika je izrazito složen pošto su trombociti, endogeni čimbenici koagulacije i njihovi inhibitori s jedne strane u kontaktu s uremičnim toksinima, a s druge strane s biokompatibilnim membranama za dijalizu u okviru izvajanje snog protoka krvi.

Povezanost između krvarenja i renalne disfunkcije prvi je opisao Morgagni GB u "Opera Omnia" - Epistola Anatomico - Medica XLI-1764 (1), a postao je klinički problem uvođenjem dijalize kao terapije prije pedesetak godina kada su pacijenti počeli umirati od krvarenja u gastrointestinalni trakt i abdominalne organe (2).

Poremećaji hemostaze u uremiji u obliku krvarenja ovisni su o stupnju uremije, a intenzivno se ispituju zadnjih trideset godina. Klinički se očituju pojavom purpure, petehia, ekhimosa, epistaksa, produženog krvarenja nakon operativnog zahvata i biopsije, gastrointestinalnog krvarenja i najtežeg kao što su subduralni hematom i subarahnoidalno krvarenje (3).

Patofiziologija krvarenja u uremiji je višestruka i ne može se samo jednim tumačenjem objasniti kompleksne i međusobno povezane patološke promjene. Ipak, općenito se može reći da je pojava krvarenja posljedica poremećaja primarne hemostaze i uvjetovana poremećenom funkcijom trombocita. Poremećaji se odvijaju

na razini endotela krvne žile, na razini funkcije trombocita i na razini patoloških promjena u krvi. Poteškoće u ispitivanju postoje zbog dijalize koja djeluje na trombocite i sustav koagulacije (4).

Poremećaji na razini endotela krvne žile obuhvaćaju promjene von Willebrandovog faktora (vWF), prostaciklina (PGI_2) i dušikovog oksida (NO).

Uloga von Willebrandovog faktora je sporna više od dvadeset godina. Razina je normalna ili čak povećana, ali smanjena je ristocetinska aktivnost (vWFRi:CoF). Poremećeno je vezanje vWF na glikoproteinski receptor IIb/IIIa kompleks (GP IIb/IIIa) na membrani trombocita što smanjuje agregaciju trombocita na subendotel (5).

Sadržaj najvećih multimera vWF koji su biološki najaktivniji i odgovorni za proces adhezije trombocita je također smanjen.

Podatak da krioprecipitat koji je bogat s FVIII i vWF i dezmospresin koji otpušta vWF iz rezervi, skraćuju vrijeme krvarenja kod bolesnika s uremijom, potvrđuje da funkcionalni poremećaj u interakciji vWF-trombocit ima važnu ulogu u poremećaju hemostaze.

Utjecaj endotela krvnih žila očituje se povećanim stvaranjem PGI_2 i NO. PGI_2 produžava vrijeme krvarenja (VK), a i fiziološki je snažni inhibitor agregacije trombocita.

U uremiji je njegovo djelovanje znatno izraženije. NO je snažni vazodilatator koji inhibira adheziju i agregaciju trombocita na subendotel i vezanje fibrinogena na trombocitni GPIIb/IIIa receptor. Stvaraju ga endotelne stanice i trombociti iz prekursora L-arginina pomoću enzima NO-sintaze.

Većina fizioloških učinaka NO je posljedica aktivacije gvaniлат ciklaze, enzima koji katalizira nastajanje cikličnog gvanozin monofosfata (cGMP) (6). Ispitivanja su pokazala da je razina L-arginina u uremičara znatno viša nego u kontrolnim skupinama, trombociti u uremičnom mediju stvaraju više NO i razina cGMP u trombocitima je viša nego u normalnoj plazmi (7).

Poremećaji na razini funkcije trombocita posljedica su poremećaja interakcija trombocit-trombocit i trombocit-stijenka krvne žile. Poremećaj interakcije trombocit-trombocit nastaje zbog biokemijskih promjena u trombocitima koje se očituju smanje-

njem sadržaja ADP-a i serotoninina u α -granulama i poremećajem metabolizma arahidonske kiseline (smanjena sinteza tromboksa- A_2 , povećani sadržaj cAMP-a i smanjena koncentracija intrace-
lularnih Ca-iona).

Interakcija trombocit-stijenka krvne žile ovisna je o dva plazmatska faktora, fibrinogenu i vWF i o dva receptora na trombo-
citnoj membrani, GPIb i GPIIb/IIIa kompleksu. Broj GPIIb/IIIa
receptora je normalan, ali zbog uremičnog medija poremećena
im je aktivnost. Posljedica je smanjeno vezanje fibrinogena i vWF,
a pacijenti imaju poremećenu adheziju i reducirani agregacijski
odgovor na ADP, epinefrin i kolagen (8).

Poremećaji na razini patoloških promjena u krvi uključuju
kroničnu anemiju, uremične toksine i ostale čimbenike kao što su
heparin, trombocitopenija inducirana heparinom i dijaliza.

Broj eritrocita i hematokrit su važni faktori za transport trom-
bocita prema subendotelu krvne žile (9). Zbog reducirane mase
eritrocita trombociti su manje vremena u kontaktu sa stijenkom
krvne žile. Eritrociti povećavaju funkciju trombocita otpuštanjem
ADP-a potrebnog za aktivaciju trombocita i inaktivacijom PGI₂.
Kod terapije s r-HuEPO povećanje je ovisno o povećanju vrije-
dnosti hematokrita i očituje se normalizacijom vremena krvare-
nja.

Uremični toksini su spojevi koji zbog visokih koncentracija u
plazmi imaju značajnu ulogu u poremećaju funkcije trombocita.
To su ureja, kreatinin, fenol, fenolna kiselina, gvanidinsukcinilna
kiselina (GSA) i paratiroidni hormon (PTH).

Fenol smanjuje otpuštanje trombocitnih faktora 3 i 4. PTH
ima niz nepovoljnih učinaka na stanične funkcije što mu daje
karakteristiku uremičnog toksina. PTH inhibira sekreciju i agre-
gaciju trombocita.

Akumulacija ureje u plazmi ima inhibitorni efekt na enzime
ureja ciklusa, a alternativni put metabolizma L-arginina dovodi
do nastanka GSA. GSA ima vazodilatački učinak, posredno
povećava nastajanje cGMP u endotelnim stanicama i poput NO
inhibira agregaciju trombocita (10).

Ukoliko se plazmi bogatoj trombocitima koja ima normalnu
agregaciju s ADP-om, doda GSA i izvrši preinkubacija, dolazi do
izostanka druge faze agregacije trombocita.

Hemodializa se izvodi sa sistemskim antikoagulantima, najčešće heparinom za sprječavanje tromboze u izvanzjelesnom protoku krvi. Heparin kod manjeg broja pacijenata izaziva aktivaciju trombocita i trombocitopeniju. Sama dijaliza reducira masu eritrocita i disfunkciju hemostatskog sustava, ali ostaje standardna terapija za sprječavanje krvarenja u uremiji.

Laboratorijska dijagnostika obuhvaća određivanje broja trombocita, adhezije trombocita, agregacije s ADP-om, adrenalinom i kolagenom, trombocitnih faktora 3 i 4, vremena krvarenja po Ivy-u. Navedene analize mogu imati patološke vrijednosti.

Rezultati protrombinskog vremena i aPTV-a su u granicama referentnih vrijednosti. Vrijeme krvarenja je laboratorijski test za primarnu hemostazu, ali pokazuje velike varijabilnosti, ne korelira s kliničkim stanjem pacijenta i stoga ne ukazuje pouzdano na djelotvornost terapije.

Terapija krvarenja u uremiji provodi se primjenom dijalize, kontrolom anemije uz primjenu r-HuEPO, dezmpresinom koji oslobađa vWF i korigira VK u 75% slučajeva, krioprecipitatom koji se primjenjuje kod bolesnika koji ne odgovaraju na terapiju s dezmpresinom, konjugiranim estrogenima (17β -estradiol) kod težih oblika krvarenja, inhibitorima NO, antifibrinolitičkim lijekovima (ϵ -aminokapročna i traneksamična kiselina), transfuzijom trombocita u slučajevima nekontrolirane hemoragije i transplantacijom bubrega kao najboljim postupkom za eliminaciju utjecaja uremije na stijenkama krvne žile, trombocite i druge komponente krvi.

Terapija s r-HuEPO. Kao regulator eritrocitopoeze r-HuEPO korigira vrijednost hematokrita i posljedično povećava adheziju i agregaciju trombocita. Kao humoralni čimbenik pridonosi razvoju i sazrijevanju megakariocita, povećava broj i oslobađanje novih metabolički aktivnijih trombocita i neutralizira uremične toksine. Kod primjene potreban je oprez pošto povećanjem hematokrita, viskoznosti krvi, agregabilnosti trombocita i utjecaja na koagulačko-fibrinolitičku ravnotežu, r-HuEPO povećava rizik za nastanak tromboze.

Cilj ispitivanja je bio procijeniti učinak r-HuEPO na broj trombocita, trombocitne indekse i agregaciju trombocita nakon

terapije s r-HuEPO u dozi od 40 U/kg tjelesne težine tri puta tje-dno prije svakog dijaliznog postupka kod 19 ispitanika (8 Ž i 11 M) prvog i osmog dana liječenja.

Rezultati: Raspon broja trombocita prije terapije s r-HuEPO bio je $142\text{-}256 \times 10^9/\text{L}$, a nakon osmog dana $159\text{-}265 \times 10^9/\text{L}$ (povećanje 6,5%). Trombocitne konstante nisu bile promijenjene prije i poslije terapije.

Raspon agregacije s ADP-om u koncentraciji 2 μM prije terapije bio je 52-86%, poslije terapije 8. dana 57-87% (povećanje 4,3%). Raspon agregacije s adrenalinom u koncentraciji 1,5 μM prije terapije bio je 49-91%, a poslije terapije 57-95% (povećanje 8,7%). Iako je zabilježeno povećanje brojčane koncentracije i agregacije trombocita, nije utvrđena statistički značajna razlika nakon osmog dana liječenja r-HuEPO. Razlog bi mogao biti kratko vrije-me liječenja bolesnika s r-HuEPO.

Zaključak: Patofiziologija krvarenja u uremiji je složena i još uvijek nedovoljno objašnjena. Testovi za praćenje i terapijski pristup razvijeni su uglavnom na osnovi kliničkog iskustva. Dijaliza i terapija eritropoietinom značajno smanjuju veličinu ovoga problema.

LITERATURA:

1. *Morgan GB*. Opera Omnia Ex Typographia Remondiniana. Venezia, Italy, 1764
2. *De Santo NG, Capodicasa G, Perna N, De Pascale C, Giordano C*. Haematoma of Rectus Abdominis Associated with Dialysis. *Br Med J* 1972; 3:281-282.
3. *Eberst ME, Berkowitz LR*. Hemostasis in renal disease: pathophysiology and management. *Am J Med* 1994; 96:168-179.
4. *Noris M, Remuzzi G*. Uremic Bleeding: Closing the Circle After 30 Years of Controversies. *Blood* 1999; 94:2559-2574.
5. *Escolar G, Cases A, Bastida E, et al*. Uremic platelets have a functional defect affecting the interaction of vWF with glycoprotein IIb/IIIa. *Blood* 1990; 76:1336-1340.
6. *Aiello S, Noris M, Remuzzi G*. Nitric Oxide / L-Arginine in Uremia. *Miner Electrolyte Metab* 1999; 25:384-390.
7. *Pawlak K, Naumann B, Brzosko S, Pawlak D, Musliwiec M*. Oxidative stress – a link between endothelial injury, coagulation activation and atherosclerosis in haemodialysis patients. *Am J Nephrol* 2004; 24:154-161.
8. *Benigni A, Boccardo P, Remuzzi G, et al*. Reversible activation defect of the platelet glycoprotein IIb-IIIa complex in patients with uremia. *Am J Kidney Dis* 1993; 22:668.
9. *Carvalho AC*. Acquired platelet dysfunction in patients with uremia. *Hematol Oncol Clin North Am* 1990; 4:129-143.
10. *Siebert W*. Does cGMP mediate platelet inhibition or stimulation? *Blood* 2004; 2435-2436.

CISTATIN C KAO MJERA GLOMERULARNE FILTRACIJE

Blanka Mladina, Daniela Šupe-Domić

Odjel za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku KB Split, Split

Određivanje endogenog kreatinina u serumu i određivanje kreatinin klirensa koriste se kao rutinski testovi za utvrđivanje glomerularne filtracije. Poznato je da ovi testovi imaju kako fiziološka tako i predanalitička i analitička ograničenja. Za cistatin C, protein male molekularne mase (13359 D) koji djeluje kao inhibitor cistein proteaze, tvrdi se da je bolji pokazatelj brzine glomerularne filtracije od kreatinin klirensa.

Sintetizira se u svim stanicama s jezgrom, a prisutan je u svim tjelesnim tekućinama. Najveće koncentracije nađene su u likvoru a najmanje u mokraći. Na koncentraciju cistatina C ne utječe upala, malignitet, mišićna masa, dob i spol. Eliminira se iz cirkulacije isključivo glomerularnom filtracijom, te reapsorbira i katabolizira u proksimalnim tubulima. Zbog tih svojstava smatra se da je vrlo pouzdan test za određivanje brzine glomerularne filtracije, osobito u stanjima početnog slabljenja funkcije bubrega. Posebno je pogodan za određivanje brzine glomerularne filtracije kod osoba s umjereno smanjenom glomerularnom filtracijom (između 80 i 40 ml/minuta) te kod djece kod koje je određivanje klirensa otežano zbog problema sakupljanja mokraće i promjena površine tijela tijekom godina. Kod tumačenja nalaza klirensa kreatinina treba uzeti u obzir i utjecaj lijekova koji mogu smanjiti ili povećati glomerularnu filtraciju ili poremetiti tubularnu sekreciju kreatinina. Neki lijekovi mogu interferirati s enzimskom metodom određivanja kreatinina i dovesti do lažno povišenih koncentracija. Nalaz klirensa kreatinina ovisi o točnosti sakupljanja 24-satne

mokraće, jer greške prilikom sakupljanja mokraće često dovode do pogrešnih rezultata pretrage. Za razliku od kreatinin klirensa koji iziskuje sakupljanje 24-satne mokraće i mjerjenje kreatinina u serumu i mokraći, vrijednost cistatina C dobiva se mjeranjem jednog uzorka seruma osjetljivim imunonefometrijskim ili imuno-turbidimetrijskim metodama kod kojih se rezultat dobiva za nekoliko minuta.

Zbog svih tih nedostataka kod određivanja klirensa kreatinina, cistatin C zauzima sve važnije mjesto u kliničkoj praksi.

Mi smo ispitivali korelaciju između cistatina C i kreatinina, te cistatina C i kreatinin klirensa da bi utvrdili u kojoj mjeri je određivanje cistatina C pouzdaniji pokazatelj glomerularne filtracije od određivanja endogenog kreatinina u serumu i klirensa kreatinina. Cistatin C u serumu određivali smo imunonefometrijskom metodom (Dade Behring), a kreatinin u serumu i mokraći metodom po Jaffeu. Obrađena su 42 pacijenta s različitim bubrežnim oboljenjima. Za kreatinin klirens utvrdili smo raspon od 0,10 do 1,99 ml/sek, a za cistatin C od 0,57 do 7,0 mg/l. Dobiveni koeficijent korelacije iznosio je -0,7637. Prema našim rezultatima možemo zaključiti da pad vrijednosti kreatinin klirensa prati porast koncentracije cistatina C. Prateći odnos kreatinina i cistatina C uočili smo da je cistatin C osjetljiviji parametar. Cistatin C prelazi granice referentnih vrijednosti dok je kreatinin još uvijek u granicama referentnog područja.

U suradnji s Odjelom za nuklearnu medicinu napravili smo korelaciju između cistatina C i scintigrafije bubrega. Scintigrafija bubrega rabi se u prvom redu za evaluaciju funkcije bubrega mjeranjem glomerularne filtracije (GFR-glomerular filtration rate) ili efektivnog protoka plazme kroz bubrege procijenjujući pri tome i perfuziju bubrega i diferencijalnu funkciju lijevog i desnog bubreга. Naše ispitivanje proveli smo na 62 pacijenta s različitim oboljenjima. GFR je određivan s 99m -Tc-DTPA-klirensom. Dobivena je dobra korelacija između cistatina C i 99m -Tc-DTPA-klirensa ($r = -0,8$, $p < 0,01$). Slabija korelacija dobivena je između serumskog kreatinina i 99m -Tc-DTPA-klirensa ($r = -0,595$, $p < 0,01$).

S obzirom na visok koeficijent korelacije između cistatina C i GFR zaključujemo da je cistatin C dobar biljeg za određivanje glomerularne filtracije, jer je prikladan za pacijenta, a analitički je pouzdan.

LITERATURA

1. Thomas L. Clinical Laboratory Diagnosis of Kidney and Urinary Tract Disorders. In Thomas L. (ed.): Clinical Laboratory Diagnostics: Use and Assessment of Clinical Laboratory Results. TH-Books Verlagsellschaft, Frankfurt, Germany, 1998: 362-400
2. Harrison TR. Principi interne medicine, Prvo hrvatsko izdanje, 1997., Placebo, Split
3. Topić E, Primorac D, Janković S. Medicinsko-biokemijska dijagnostika u kliničkoj praksi. Medicinska naklada, Zagreb, 2004.
4. Finney H, Newman D, Gruber W, Merle P, Price C. Initial evalution of cystatin C measurement by particle-enhanced immunonephelometry on the Behring Nephelometer systems (BNA, BN II). 1997; Clin Chem 43: 1016-1022.
5. Tian S, Kusano E, Ohara T, Tabel K, Itoh Y, Kawai T, Asano Y. Cystatin C measurement and its practical use in patients with various renal diseases. Clinical Nephrology 1997; 48: 104-108.

Tisak: "KIKA-GRAF" - Zagreb, Horvaćanska 28/I

Sponzori

DADE BEHRING

MEDLAB

Jasika



OLYMPUS



Diagnostics

MD LAB

