

Levin Vrhovec<sup>1</sup>

# Pomen serumskega cistatina C za ugotavljanje okvare ledvic med kemoterapijo<sup>2</sup>

*Serum Cystatin-C as a Kidney Failure Marker during Chemotherapy*

---

## IZVLEČEK

**KLJUČNE BESEDE:** cistatin – kri, ledvica funkcijski testi, kreatinin, antineoplastiki – škodljivi učinki

Mnoge citotoksične učinkovine, ki jih uporabljamo pri zdravljenju raka, lahko okvarijo delovanje ledvic, zato moramo pred in med kemoterapijo redno spremljati delovanje ledvic. Za oceno njihovega delovanja in zgodnjih okvar so najpomembnejši testi očistkov. V vsakodnevni klinični praksi delovanje ledvic vrednotimo z očištkom kreatinina (endogenous creatinine clearance – ECC), saj so preiskave s pomočjo eksogenih označevalcev (npr. inulin, <sup>51</sup>Cr-EDTA) nepraktične in obremenjujoče za bolnika. Pri določanju ECC lahko pride do zavajajočih rezultatov zaradi nedoslednosti bolnika pri zbiranju celodnevnega seča. Da bolnikom ne bi bilo treba zbirati seča, poskušamo odkriti enostavnejši in hitrejši način ugotavljanja ledvične funkcije. Cistatin C je serumska beljakovina, ki jo uvrščamo med inhibitorje cisteinskih proteaz. Nastaja v vseh jedrnih celicah. Njegova serumska koncentracija je neodvisna od spola, stanja prehranjenosti, akutnih in kroničnih bolezni ter raka. Ker se v večini izloča skozi glomerule, njegova serumska koncentracija korelira z glomerulno filtracijo (GFR). Namen naloge je bil ugotoviti, ali koncentracija serumskega cistatina C korelira z GFR oziroma z ECC.

V raziskavi smo analizirali 117 vzorcev pri 56 bolnikih. Kreatinin v serumu in seču smo določali z metodo, ki temelji na Jafféjevi reakciji, ECC smo izračunali iz volumskega pretoka seča, telesne površine in razmerja med koncentracijo kreatinina v serumu in seču, cistatin C smo določili s turbidimetrično analizo tehniko PET.

Podatke smo statistično obdelali s programom SimStat. Korelacijske koeficiente smo računali po Pearsonu v 95 % intervalu zaupanja. Pri primerjavi vrednosti serumskega kreatinina in cistatina C smo ugotovili visoko povezanost ( $r = 0,736$ ) za celotno koncentracijsko območje. Odnos med vrednostmi cistatina C in ECC je določen s korelacijskim koeficientom  $r = 0,792$ .

Pri 117 vzorcih se je cistatin C razlikoval od ECC v 8 primerih (6,8 %). Metodi se statistično pomembno ne razlikujeta v deležu patoloških rezultatov ( $\chi^2 = 0,86$ ,  $p = 0,35$ ). Zvišana koncentracija cistatina C se ujema z znižanjem ECC v vsaj 93 %.

Raziskava je pokazala, da serumska koncentracija cistatina C lahko z veliko gotovostjo nadomesti dolgotrajno preiskavo ECC pri ugotavljanju zgodnje ledvične okvare.

---

## ABSTRACT

**KEY WORDS:** cystatins – blood, kidney function tests, creatinine, antineoplastic agents – adverse effects

Many cytotoxic agents used in antitumor therapies can cause a kidney damage. Therefore there is a necessity for regular kidney function monitoring before and during chemotherapy. Clearance tests have been proven to be the most accurate indicators for clinical assessment of glomerular filtration (GFR). Because of inconvenience of exogene markers (inulin, <sup>51</sup>Cr-EDTA), endogenous creatinine clearance (ECC) is used in everyday routine work.

---

<sup>1</sup> Levin Vrhovec, štud. med., Onkološki inštitut, Zaloška 2, 1000 Ljubljana.

<sup>2</sup> Objavljeno delo je bilo nagrajeno s Prešernovo nagrado za študente v letu 1997.

Results obtained from ECC analysis can often be misleading due to inaccurate urine collecting. In order to avoid the inconvenient urine collecting, we are trying to find an easier and faster way of kidney function assessment.

Cystatin C is a serum protein, which is a member of the cysteine proteinase inhibitors. It is produced by all nuclear cells and its production rate is independent of sex, nutrition status, acute and chronic diseases and cancer. Because it is freely filtered at the glomerulus, its serum concentration correlates with glomerular filtration rate.

The purpose of this research was to find out if the serum cystatine C concentration correlates with GFR and ECC respectively.

We analysed 117 serum samples taken from 56 patients. Serum and urine creatinine concentrations were determined by method based on Jaffé reaction, ECC was calculated from urine flow, surface area and the ratio between serum and urine creatinine concentrations. We used particle enhanced turbidimetric immunoassay (PET) for cystatin C determination.

Data were statistically analysed with SimStat computer program. We used Pearson correlation method with 95% confidence interval. A good correlation coefficient ( $r = 0.736$ ) between the values of serum creatinine and cystatine C was established within the whole concentration interval. The relation between cystatin C and ECC values was determined with correlation coefficient  $r = 0.792$ .

Cystatin C differed from ECC values in 8 of 117 samples (6.8%). Methods don't show significant statistical difference in pathological results ( $\chi^2 = 0.86$ ,  $p = 0.35$ ). An increased cystatin C concentration corresponds to decreased ECC values in 93%.

We showed that serum cystatine C concentration can replace with great certainty the ECC method for clinical assessment of early kidney damage.

## UVOD

### Delovanje ledvic

Ledvice so parni, retroperitonealno ležoč organ, katerega primarna naloga je vzdrževanje konstantnega volumna in osmolarnosti ekstracelularne tekočine z uravnoteženo filtracijo in resorpcijo vode in natrijevih ionov. Ostale, prav tako pomembne naloge so odstranjevanje produktov metabolizma in telesu tujih snovi, regulacija krvnega in celičnega pH z izločanjem vodikovih ionov, regulacija koncentracije kalija ter številne metabolne in hormonalne funkcije. Funkcionalna enota ledvic je nefron, ki ga sestavljata glomerul in ledvični tubul, ki se deli na proksimalni tubul, Henlejevo zanko in distalni tubul. Slednji se konča v ledvičnem zbiralcu, ta pa se izlije v ledvično papilo oziroma pelvis, iz katerega poteka navzdol proti sečnemu mehurju po en sečevod iz vsake ledvice. Potek tubulov, žilje in intersticij dajejo ledvici na frontalnem prerezu značilen videz: korteks, ki ga sestavljajo proksimalni tubuli in številni glomeruli z obdanimi kapilarami (Bowmanova kapsula), ter medula, po kate-

ri potekajo distalni tubuli, Henlejeve zanke in vasa recta. Nastanek urina je posledica glomerulne filtracije, tubulne resorpcije in tubulne sekrecije.

Prvi korak pri tvorbi seča je ultrafiltracija krvi skozi večplastni semipermeabilni filter, ki ga sestavljajo plast podocitov, bazalna membrana in endotelij glomerulne kapilare. Tvori se glomerulni filtrat oz. primarni seč, ki se zlije v Bowmanovo kapsulo. Celotni proces poteka na podlagi reguliranega učinkovitega filtracijskega tlaka, ki je rezultat hidrostatskega in osmotskega tlaka plazme v glomerulu na eni strani ter hidrostatskega tlaka v Bowmanovi kapsuli na drugi strani. Ta tlak je ključnega pomena za glomerulno filtracijo, zato je strogo reguliran z avto vazokonstrikcijo aferentnih arteriol. Prepustnost in površino filtracijske membrane opišemo skupaj kot filtracijski koeficient (Kf). Glomerulna filtracija (GFR), ki nam pove, koliko krvi se je prečistilo skozi vse glomerule na enoto časa, je produkt Kf in učinkovitega filtracijskega tlaka (33).

V normalnih pogojih se prefiltrira 20% krvne plazme, ki pride do ledvic (RPF). To imenujemo filtracijska frakcija (FF) in je definirana kot razmerje med GFR in RPF.

Iz Bowmanove kapsule gre primarni seč naprej v proksimalni tubul, kjer pride do obilgatne resorpcije vode (80%). Tekočina v tubulih ostane izoosmolarna, saj voda sledi resorpciji nizkomolekularnih snovi (Na, K, glukoza, aminokislina). Proti dnu Henlejeve zanke se seč močno skoncentrira, kar omogočajo  $\text{Cl}^-$  – črpalke v steni ascendentnega kraka zanke in sistem protitočnega pomnoževalnika. S tem se vzdržuje hiperosmolarost medule ledvice, kar je pomembno za resorpcijo vode v kasnejšem poteku tubula. Celice stene distalnih tubulov in zbiralcev so podvržene regulaciji preko antiidiuretskega hormona (ADH), zato resorpcija v tem predelu nefrona ni konstantna in je odvisna od osmolarne stanja in volumna telesnih tekočin. To imenujemo fakultativna resorpcija, od katere je odvisna koncentriranost in volumen končnega seča. V različnih bolezenskih stanjih je lahko ta sistem regulacije moten, kar se odraža v nenormalnem izločanju seča.

Ledvični očistek je teoretični volumen krvne plazme, ki se popolnoma očisti določene snovi na enoto časa. Temelji na dejstvu, da je hitrost izločanja snovi iz krvne plazme enaka hitrosti izločanja te snovi v seč, in se izračuna po naslednji enačbi:

$$C_x = \frac{U_x \times \phi}{P_x}$$

$C_x$	očistek snovi [ml/s]
$U_x$	koncentracija snovi v urinu [mol/L]
$P_x$	koncentracija snovi v plazmi [mol/L]
$\phi$	pretok urina [ml/s]

## Presnova kreatinina

Prekurzor kreatinina je kreatin, ki se sintetizira v jetrih in se sprosti v krvni obtok, iz katerega ga aktivno prevzamejo mišice in v nizkih koncentracijah tudi ostala tkiva (jetra, ledvice, možgani itd.). V mišicah, ki vsebujejo večino zaloge kreatina (98%), je le-ta v obliki fosfokreatina (70%), ki je pomemben vir energije pri mišični krčivti. Z neencimsko dehidracijo se tvori kreatinin (3). Mišična masa je glavni dejavnik, ki določa zalogo kreatina in s tem produkcijo kreatinina, zato je ta odvisna tudi od spola, starosti in proteinske prehrane. Produkcija in izločanje kreatinina sta pri zdravih osebah z normalno prehrano konstantna, vendar lahko v bolezen-

skih stanjih in ob nepopolni prehrani pride do odmikov od pričakovanih vrednosti. Tako lahko dobimo odmike od realnih vrednosti GFR, tudi če je delovanje ledvic normalno.

## Testi za ugotavljanje funkcijske sposobnosti ledvic

### Radiološke preiskave

Ehsonografija in rentgenska slika trebuha nam pokažeta velikost, obliko in položaj ledvic.

Pri intravenski urografiji intravensko vbrizgamo jod vsebujočo raztopino, ki na rentgenski sliki pokaže sence ledvičnih čašic, pelvisa in sečevoda.

Nefrotomografija je kombinacija intravenskega vbrizganja kontrastnega sredstva in tomografije. Uporablja se pri diagnostiki cist in tumorjev.

Retrogradna pielografija se uporablja pri morfološki analizi ledvičnih čašic. Kontrastno sredstvo se vbrizga s pomočjo katetra v končni del uretra.

Ledvična angiografija nam pokaže stanje ledvičnega žila. Kontrastno sredstvo vbrizgamo v trebušni del aorte nad iztočiščem renalnih arterij s pomočjo katetra preko femoralne arterije.

Radioizotopna renografija predstavlja grafični prikaz očistka paraaminohipurne kisline (PAH). Po intravenskem vbrizganju z jodom označene PAH detektorji  $\gamma$ -žarčenja beležijo celoten potek PAH v krivulji, ki jo imenujemo renogram.

Scintigrafija ledvic služi za morfološko in topografsko analizo ledvičnega parenhima. Temelji na vnosu izotopov živega srebra, katerega nabiranje v parenhimu je sorazmerno ledvični funkciji.

### Fizikalno-kemijski testi

Kvalitativni pregled seča je prvi in osnovni test za funkcijo ledvic. Za oceno delovanja so pomembni izgled, barva, vonj in makroskopski pregled sedimenta.

Poskus koncentracije in dilucije nam pove, koliko so ledvice sposobne koncentrirati oziroma razredčevati seč glede na osmolarno stanje telesnih tekočin.

Titribilna kislost seča pokaže sposobnost sekrecije vodikovih ionov distalnega tubula.

Testi očištkov so najpomembnejši za oceno delovanja ledvic. Uporabljajo se snovi, ki se najbolj približajo lastnostim idealnih filtracijskih označevalcev. Prvotno so se uporabljali testi očištkov sečnine, vendar ta metoda zaradi nihanj koncentracij sečnine v različnih stajnih organizma ni bila zanesljiva. Najbolj natančne rezultate dobimo z eksogenimi filtracijskimi označevalci (inulin,  $^{51}\text{Cr}$ -etilendiamin-tetraoetna kislina,  $^{125}\text{I}$ -Iotalamat,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -dietilentriamin-pentaoetna kislina), ki pa so se izkazali za nepraktične v rutinski uporabi, zato jih uporabljamo samo v raziskovalne namene. Za rutinsko uporabo se tako uporabljajo testi očištkov endogenih označevalcev. S takim testom lahko ugotovimo nivo GFR, količino resorpcije vode in drugih snovi v tubulu ter nivo tubulne sekrecije.

### Določanje glomerulne filtracije ledvic

GFR je glavni pokazatelj delovanja ledvic. Očištek idealnih filtracijskih označevalcev je enak sami vrednosti GFR, zato lahko zapišemo:

$$GFR = \frac{U_x \times \phi}{P_x}$$

$GFR$  glomerulna filtracija [ml/s]  
 $U_x$  koncentracija snovi v urinu [mol/L]  
 $P_x$  koncentracija snovi v plazmi [mol/L]  
 $\phi$  pretok urina [ml/s]

Če v tubulih ne bi bilo procesov resorpcije in sekrecije, bi bil očištek za določeno snov kar enak GFR, vendar je večina snovi v tubulni tekočini podvržena vsaj enemu od teh procesov. Očištek snovi, ki se v tubulih resorbirajo (npr. glukoza), je manjši od GFR, in obratno: očištek snovi, ki se izločajo (npr. PAH), je večji od GFR.

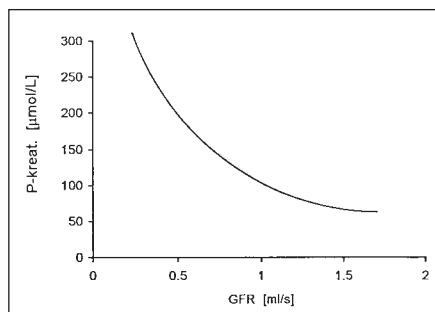
Idealni filtracijski označevalci so snovi, ki se ne resorbirajo, izločajo, niso podvržene metabolizmu, so nevezane, netoksične in inertne. Njihov očištek je enak GFR, ki je dober pokazatelj delovanja ledvic. Eden takih označevalcev je inulin. Ker je eksogenega izvora, je za ugotavljanje GFR potrebno neprekinjeno intravensko dajanje inulina, zato se uporablja samo v raziskovalne namene, kljub temu da je najboljši pokazatelj celotne funkcije ledvic (1, 2).

Poleg inulina se kot eksogeni označevalci uporabljajo še nekateri radiofarmaceuti-

ki:  $^{51}\text{Cr}$ -etilendiamin-tetraoetna kislina ( $^{51}\text{Cr}$ -EDTA),  $^{125}\text{I}$ -iotalamat in  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -dietilentriamin-pentaoetna kislina ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA).

Uporaba serumskega kreatinina kot označevalca za GFR izvira iz raziskav Rehberga, ki je leta 1926 preučeval ledvični očištek eksogenega kreatinina (4). Po letu 1938, ko je bila na voljo ustrezna metodologija, so se začele številne študije, ki so preučevale odnos serumskega kreatinina in očiščka endogenega kreatinina (ECC) do GFR (5). Če predpostavimo, da je kreatinin idealni filtracijski označevalec, potem je serumski kreatinin obratno sorazmeren GFR. Žal kreatinin ne izpolnjuje vseh pogojev idealnega označevalca (3). Dokazano je, da je zaradi tubulne sekrecije kreatinina njegov očištek povečan za 10–40% glede na očištek inulina (6). Poleg tega pa lahko pride tudi do tubulne resorpcije v primeru počasnega pretoka seča po ledvičnem tubulu. Tako je kreatinin nepopolni filtracijski označevalec za glomerulno filtracijo in lahko pokaže samo grobo sliko o delovanju ledvic (3). Zaradi tega in nepraktičnosti eksogenih označevalcev danes preučujejo nove generacije označevalcev GFR (7).

Iohexsol je neionska, netoksična, kontrastna učinkovina, ki ima podobne farmakokinetične lastnosti kot  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA. Ker je lažje določljiv in ne zahteva konstantne infuzije, je idealni eksogeni označevalac za GFR (8, 9), vendar vseeno predstavlja tudi z enkratno aplikacijo obremenitev za bolnika. Endogeni in klinično največ uporabljan označevalac je kreatinin, katerega serumske koncentracije so informativne samo pri velikih okvarah ledvic, ne pokaže pa manjših sprememb (7). Nekateri drugi nizkomolekularni proteini, kot sta



Slika 1. Vpliv glomerulne filtracije na koncentracijo kreatinina v serumu oz. plazmi.

$\beta_2$ -mikroglobulin in  $\alpha_1$ -mikroglobulin, se niso izkazali kot zanesljivi indikatorji GFR zaradi vpliva nerenalnih dejavnikov, ki spreminjajo njihovo koncentracijo (18). Nov, obetajoč endogeni označevalec funkcije ledvic je serumska koncentracija cistatina C. Primerjave serumskih koncentracij cistatina C in kreatinina z GFR kažejo, da je cistatin C boljše označevalec za GFR kot kreatinin (17).

### **Okvare ledvic pri zdravljenju z nefrotoksičnimi učinkovinami**

Pri zdravljenju večine solidnih malignih tumorjev ima cisplatin osrednjo vlogo. Uvrščamo ga v skupino alkilirajočih citotoksičnih učinkovin. Kemično je cisdiaminodiklorplatinat ( $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ ), v vodi topna kompleksna spojina platine, pri kateri ima vsaka molekula dve mesti za reakcijo z nukleotidi. Pri prehodu skozi plazmalemo v celico molekule cisplatina disociirajo na kloridne ione in kompleksne topne ione platine, ki se kelatno vežejo na molekule deoksiribonukleinske kisline (DNK) (3). Ta interakcija povzroči inhibicijo sinteze DNK in posledično apoptozo. Cisplatin se ne resorbira iz prebavnega trakta, zato ga vbrizgamo intravensko. Po začetni razporeditvi v vsa tkiva se začne nabirati v ledvicah, jetrih, mišicah in koži. Izloča se s sečem, v zelo majhnih količinah tudi z blatom.

Žal ima ob dobrem protitumorskem delovanju tudi mnoge hude neželene učinke. Poleg mielosupresivnega delovanja, okvare sluha, okvare jeter, gastrointestinalne toksičnosti in nevrotoksičnosti je najpomembnejša okvara ledvic. Odvisna je od velikosti odmerka in od stopnje diureze, zato je za zmanjšanje nefrotoksičnih učinkov treba izvajati forsirano diurezo. Okvara nastane zaradi nekroze tubulnih celic. Prizadeti so predvsem odseki tubulov na prehodu ledvičnega korteksa v medulo, kar je posledica nabiranja cisplatina v intersticiju. Možna je tudi okvara glomerulov. Pri zmanjšani GFR se plazemska koncentracija cisplatina zviša, ob čimer se poveča tudi okvara tubulov. Z zmanjševanjem odmerka in forsirano diurezo lahko to preprečimo.

### **Cistatin C**

Cistatin C je neglikozilirana bazična nizkoproteinska molekula, ki jo uvrščamo med inhibitorje cisteinskih proteaz. Obstaja v več

različnih izoelektričnih oblikah v razponu od pI 7,8 (22) do pI 9,5 (23). Oblike z nižjo izoelektrično točko nastanejo z odcepitvijo ene ga ali več baznih ostankov na N-terminalnem delu proteina (24).

V človeški cerebrospinalni tekočini ga je prvi odkril Clausen leta 1961 in ga imenoval  $\gamma$ -CSF (10). V seču bolnikov s proteinurijo so ga zasledili približno istočasno in ga poimenovali post- $\gamma$ -globulin (11). Pozneje so ga našli še v človeški plazmi, ascitesu in plevralni tekočini in ga zaradi elektroforetske gibljivosti imenovali  $\gamma$ -tracce (12). Normalno je prisoten tudi v slini (13) in spermi (14). Kvantitativno ga je začel določati Loefberg (15) z uvedbo encimsko imunskega testa (ELISA). Na osnovi nizke plazemske koncentracije glede na koncentracijo v cerebrospinalni tekočini je mogoče sklepati, da nastaja v centralnem živčnem sistemu (15). Ta predpostavka je bila dopolnjena s kasnejšimi odkritji intracelularne lokalizacije v nevroendokrinih celicah sredice nadledvične žleze (25), A-celicah otočkov trebušne slinavke (26), ščitnici (27) in hipofizi (28). V končni fazi se je izkazalo, da ga proizvajajo vse celice z jedrom (19). Povprečna vrednost koncentracije v likvorju je 5,8 mg/l, v slini 1,8 mg/l, v normalnem seču 0,095 mg/l in 1,1 mg/l v plazmi. Tako nizke koncentracije zahtevajo zelo občutljivo analitično metodo.

Zaradi nizke molekularne mase (13 kDa) se cistatin C lahko filtrira skozi glomerule in se v končni fazi resorbira in razgradi v tubulnih celicah. Tako se pri konstantni sintezi cistatina C njegova serumska koncentracija odraža na GFR. Visoka koncentracija serumskega cistatina pri bolnikih z akutno ali kronično ledvično okvaro je rezultat nepopolnega katabolizma v ledvičnih tubulih, pri bolnikih z avtoimunimi boleznimi, ki okvarjajo ledvice (glomerulonefritis pri sistemskem lupusu eritematozusu) pa je koncentracija tudi do 10-krat večja v primerjavi z normalno plazmo (16). Možno je tudi, da se v patološkem stanju odvija tudi dodatna sinteza in sekrecija v celicah tubulov, na kar kaže podatek, da se v seču nahaja intaktna daljša oblika (pI 9,2), medtem ko je v plazmi dominantna krajša oblika (pI 7,8) (16).

Serumska koncentracija cistatina C je neodvisna od spola, okužbe, prehranjevalnega

stanja, jetrnih bolezni in malignosti (20, 21). Ena izmed raziskav je pokazala, da do odmi- kov od normalnih vrednosti sicer lahko pride, vendar pri redkejših in ekstremnih patoloških stanjih, kot je zavrnitev pri ledvični transplantaciji, ki ji sledi imunosupresivno zdravljenje ter huda sistemska skleroza (19). Zaradi svojih lastnosti je cistatin C lahko alternativa določanju ECC pri ugotavljanju zgodnje okvare ledvic (17).

Kot zanesljivi in hitri metodi za kvantita- tivno določanje cistatina C sta se uveljavili ELISA in PETIA.

### **Namen raziskave**

Namen naše raziskave je bil:

- ugotoviti, ali serumska koncentracija cista- tina C korelira z glomerulno filtracijo (GFR),
- ugotoviti, ali je serumska koncentracija cistatina C zgodnji pokazatelj okvare led- vične funkcije,
- preveriti, ali lahko določanje koncentraci- je cistatina C v serumu zamenja neprak- tično in nezanesljivo določanje ECC,
- ugotoviti, ali se med zdravljenjem s cito- statiki vrednost cistatina C spreminja.

## **MATERIALI IN METODE**

### **Izbira bolnikov in vzorčenje krvi in seča**

V raziskavo smo vključili 56 bolnikov (22 z mela- nomom, 23 z rakom na jajčnikih in 11 z napre- dovanim rakom želodca), ki so se zdravili s kombinirano kemoterapijo s cisplatinom. Od tega jih je bilo 15 moškega in 41 ženskega spo- la. Stari so bili od 29 do 79 let, srednja starost je bila 59 let. Pred zdravljenjem s citostatiki mi učinkovinami smo pri vseh bolnikih dolo- čili ECC. Iz ostanka seruma, ki smo mu prej določili kreatinin, smo izmerili koncentraci- jo cistatina C. Pri 31 bolnikih smo določili ECC, serumski kreatinin in cistatin C pred vsa- kim ciklusom kemoterapije (največ 6-krat). Pri 25 bolnikih smo te vrednosti določili samo enkrat. Bolniki, ki so imeli znižan ECC, niso bili zdravljeni s kemoterapijo s cisplatinom. Skupaj smo analizirali 117 vzorcev pri 56 bol- nikih.

Bolniki so pred zdravljenjem s citostati- ki zbirali 24-urni seč za kontrolo glomerulne- ga očistka kreatinina. Istočasno jim je bila odvzeta venozna kri za določitev kreatinina in drugih biokemičnih parametrov. Vzorci krvi in homogeniziranega 24-urnega seča so bili analizirani v biokemičnem laboratoriju Onkološkega inštituta. Vsi vzorci serumov in sečev so bili ustrezno zamrznjeni in hranje- ni pri  $-20^{\circ}\text{C}$  do izvedbe analiz cistatina C.

### **Določanje kreatinina v serumu in seču**

#### **Seč**

Za ugotavljanje koncentracij kreatinina v 24-urnem seču smo uporabili spektrome- trično kinetično metodo na biokemičnem analizatorju Hitachi 911 z reagenti firme Boehringer Mannheim, Nemčija. Analiza temelji na Jafféjevi reakciji, ki je bila prvič opi- sana leta 1886 (29). V alkalnem mediju pri- de do reakcije med kreatininom in pikratnim ionom. Nastane pikrat-kreatinin kompleks (Janovsky kompleks), ki da raztopini rde- če-oranžno barvo. Za reakcijo je pH raztopi- ne bistvenega pomena, saj hidroksilni ioni določajo hitrost reakcije in vplivajo na spek- ter absorbance produkta. Absorbanco meri- mo pri valovni dolžini 505 do 520 nm.

#### **Serum**

Kreatinin v serumu smo določali v biokemič- nem laboratoriju z rutinskim testom, ki ima za osnovo isto reakcijo kot pri določanju kon- centracije v seču. Zaradi nekreatininskih reaktivnih kromogenov, ki jih vsebuje kri (proteini, glukoza, acetat,  $\alpha$ -ketokislina), dobi- mo z osnovno Jafféjevo reakcijo višje vredno- sti. Tej motnji se izognemo s kinetično metodo, ki temelji na ugotovitvi, da se nekreatininski kromogeni vežejo s pikratom v prvih 20 sekun- dah in po 80 sekundah, tako da vmes ostane časovni interval, v katerem je hitrost tvorbe nekreatininskih kompleksov zanemarljiva. Absorbanco merimo v tem intervalu večkrat v enakih časovnih presledkih.

### **Določanje očistka endogenega kreatinina**

Za izračun očistka endogenega kreatinina (ECC) potrebujemo serumsko in sečno kon-

centracijo kreatinina, volumski pretok seča ter površino telesa.

$$C_x = \frac{U_x \times \phi}{P_x} \times \frac{1,73 \text{ m}^2}{A}$$

$C_x$	očistek kreatinina [ml/s]
$U_x$	koncentracija snovi v urinu [mol/L]
$P_x$	koncentracija snovi v plazmi [mol/L]
$\phi$	pretok urina [ml/s]
$A$	površina telesa [m <sup>2</sup> ]

Za natančen rezultat je potreben faktor 1,73 m<sup>2</sup>/A, ker je sekrecija kreatinina odvisna od telesne površine, ki je sorazmerna z mišično maso. Povprečna telesna površina je 1,73 m<sup>2</sup>, dejansko telesno površino pa razberemo iz nomograma ali pa jo izračunamo po naslednji enačbi:

$$\log A = (0,425 \log W) + (0,725 \log H) - 2,144$$

$W$	teža v kg
$H$	višina v m

Koncentracijo serumskega in sečnega kreatinina smo merili v laboratoriju po že opisani metodi, volumski pretok seča pa izračunali iz izmerjenega volumna in časa zbiranja seča.

### Določanje cistatina C

Cistatin C smo določali iz vzorcev serumov, ki smo jim prej že izmerili koncentracijo kreatinina in jih shranili pri -20°C do izvedbe analiz.

Uporabili smo turbidimetrično analizo tehniko na biokemičnem analizatorju Hitachi 911. Reagenčni komplet DAKO Cistatin C PET Kit (DAKO A/S, Glostrup, Danska) vsebuje polistirenske delce enotne velikosti, na katere so vezana zajčja protitelesa proti človeškemu cistatinu C. Reakcija med temi delci z imunoreaktivnostjo in cistatinom C v vzorcu preiskovanja povzroči aglutinacijo s spremljajočo spremembo absorbance pri valovni dolžini 340 nm. Reakcija poteka v puferški raztopini pri pH = 7,2 in pri kon-

stantni temperaturi 37°C. Koncentracija cistatina C v vzorcu je določena z interpolacijo na kalibracijski krivulji.

### Vrednotenje rezultatov

V Republiki Sloveniji uporabljamo orientacijske referenčne vrednosti, ki jih je sprejel Republiški strokovni kolegij za klinično kemijo in klinično biokemijo. Vrednosti so enake ne glede na spol in starost.

Ker je določanje cistatina C nova preiskava, smo pri vrednotenju rezultatov uporabili priporočilo izdelovalca reagenta DAKO.

Podatke smo statistično obdelali s programom SimStat. Korelacijske koeficiente smo računali po Pearsonu v 95% intervalu zaupanja.

## REZULTATI

### Primerjava vrednosti kreatinina in cistatina C

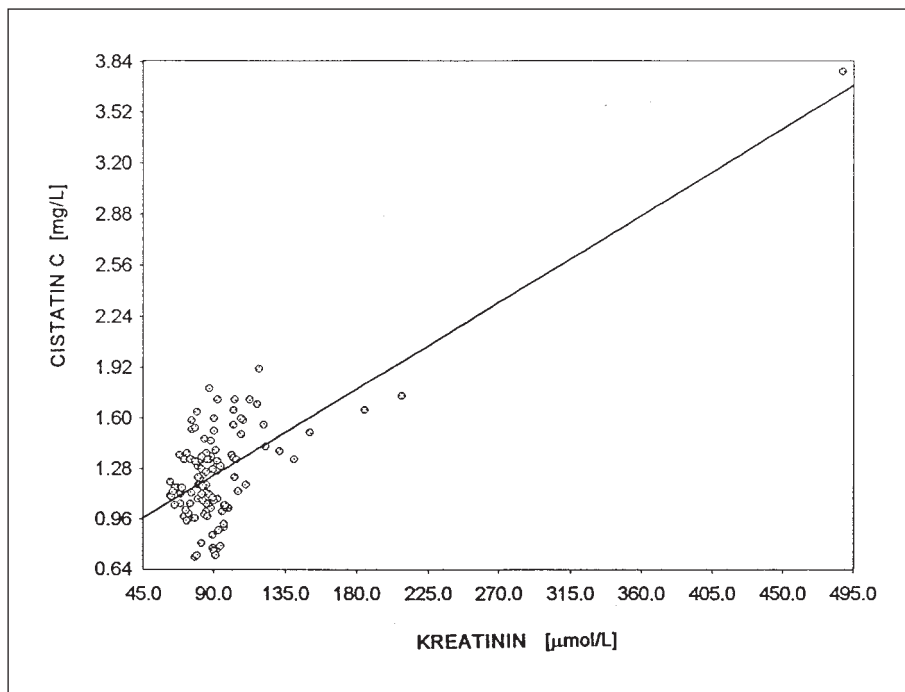
Odnos med vrednostmi serumskega kreatinina in cistatina C smo ugotavljali v 117 vzorcih pri 56 bolnikih. Pri normalnih vrednostih serumskega kreatinina (44–97 μmol/l) smo ugotovili veliko variabilnost rezultatov cistatina C (0,64–1,72 mg/l). V 26 vzorcih je bil cistatin C povišan, vrednosti serumskega kreatinina pa so bile v normalnem območju. Grafično so vrednosti prikazane na sliki 2.

Na sliki 3 so prikazane vrednosti cistatina C in serumskega kreatinina pri 112 vzorcih, kjer je bil serumski kreatinin manjši od 140 μmol/l. Vrednosti cistatina C so bile pri 71 vzorcih v normalnem območju, povišane pa so bile pri 41 vzorcih. Znižane vrednosti cistatina C nismo ugotovili.

V diagramu na sliki 4 je prikazan odnos med serumskim kreatininom in cistatinom C pri 5 vzorcih, pri katerih je bila koncentracija kreatinina višja od 140 μmol/l. Vrednosti cistatina C so med 1,34 in 3,78 mg/l in zelo dobro korelirajo s serumskim kreatininom, katerega vrednosti so od 140 do 488 μmol/l.

Tabela 1. Orientacijske referenčne vrednosti.

Preiskava	SI-enote	Konvencionalne enote
Serumski kreatinin	44–97 μmol/l	0,5–1,1 mg/dl
Glomerulni očistek kreatinina	1,3–2,0 ml/s	78–120 ml/min
Serumski cistatin C	0,63–1,33 mg/l	0,63–1,33 mg/l



Slika 2. Odnos med kreatininom in cistatinom C ( $N = 117$ ,  $r = 0,736$ ).

40

### Primerjava vrednosti cistatina C z očištkom endogenega kreatinina

Prednost določanja ECC v primerjavi z določanjem serumskega kreatinina je v zgodnejšem odkrivanju zmanjšane glomerulne filtracije. Za ugotovitev odzivnosti cistatina C na zmanjšanje GFR smo primerjali vrednost cistatina C in recipročne vrednosti ECC. Recipročno vrednost smo uporabljali zaradi preglednejše grafične predstavitve rezultatov. Na sliki 5 je prikazan odnos med cistatinom C in  $1/ECC$  za 117 vzorcev. Zelo visoke vrednosti  $1/ECC$  (nizke vrednosti ECC) pri 5 vzorcih nakazujejo drugačno korelacijo s cistatinom C kot ostalih 112 vzorcev.

Ker se na sliki 5 nakazujeta dva različna trenda korelacije med cistatinom C in ECC, smo ločili vzorce v dve skupini enako kot pri primerjavi s serumskim kreatininom. Na sliki 6 je prikazana odvisnost vrednosti cistatina C in vrednosti  $1/ECC$  pri 112 vzorcih, pri katerih je bila koncentracija kreatinina nižja od  $140 \mu\text{mol/l}$ . Vrednosti cistatina C so bile pri 71 vzorcih v normalnem območju, pri 41 vzorcih pa smo določili povišane vredno-

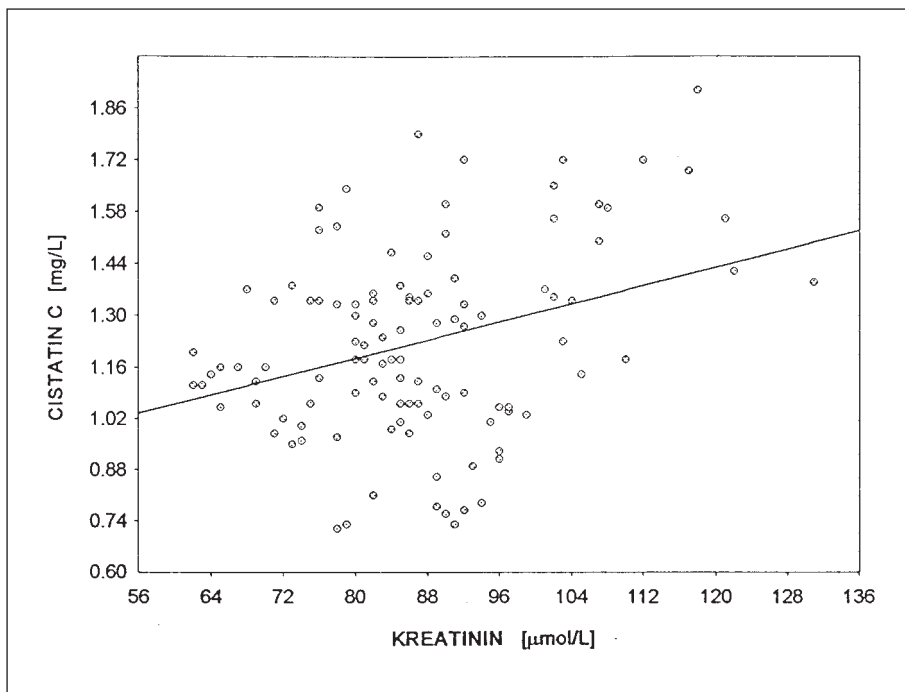
sti. ECC je bil pri 63 vzorcih v normalnem območju, pri 49 vzorcih pa smo ugotovili znižane vrednosti ECC. Pri 8 vzorcih je bil ECC znižan ob normalnih vrednostih cistatina C.

Na sliki 7 je prikazan odnos med cistatinom C in ECC za 5 vzorcev, ki imajo serumske koncentracije kreatinina nad  $140 \mu\text{mol/l}$ . Vrednosti cistatina C so med 1,34 in 3,78 mg/l in dobro korelirajo z vrednostmi ECC ( $1/ECC = 2,5-7,14$ ).

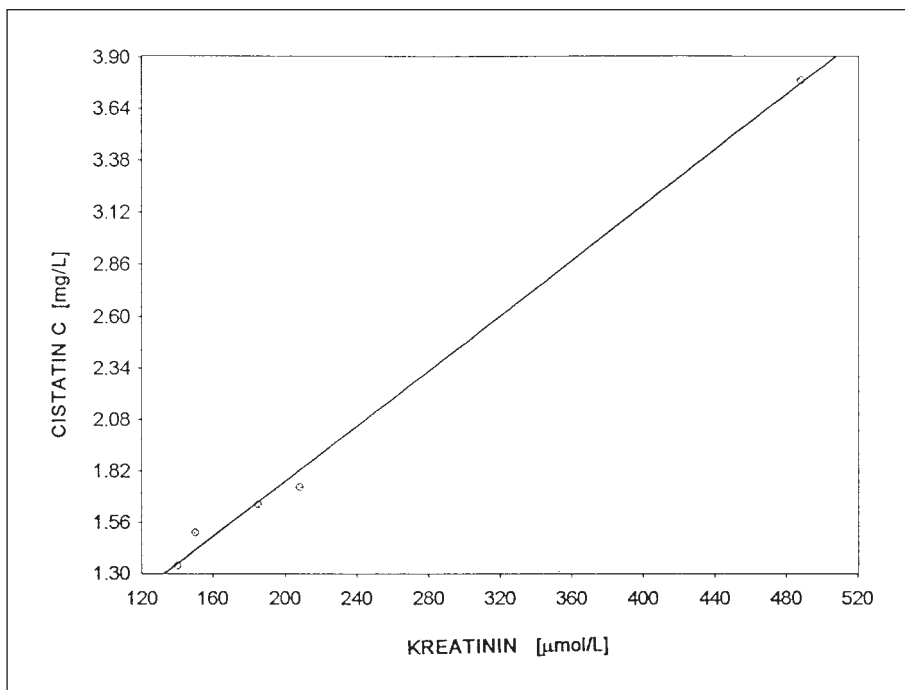
### Vrednosti kreatinina, očiška endogenega kreatinina in cistatina C med kemoterapijo

Pri 3 od 56 bolnikov, ki so bili zdravljeni s kemoterapijo, smo ugotovili znižan ECC in okvaro ledvične funkcije. Bolnica Š. Š. je imela normalne vrednosti serumskega kreatinina do 4. ciklusa kemoterapije. Povišano vrednost kreatinina smo določili pred 5. obdobjem kemoterapije. Vrednost cistatina C je bila v območju normalnih vrednosti samo pri 1. obdobju kemoterapije. Pred vsakim naslednjim obdobjem smo določili povišane vrednosti. Prav tako je bil ECC v okviru referenčnih

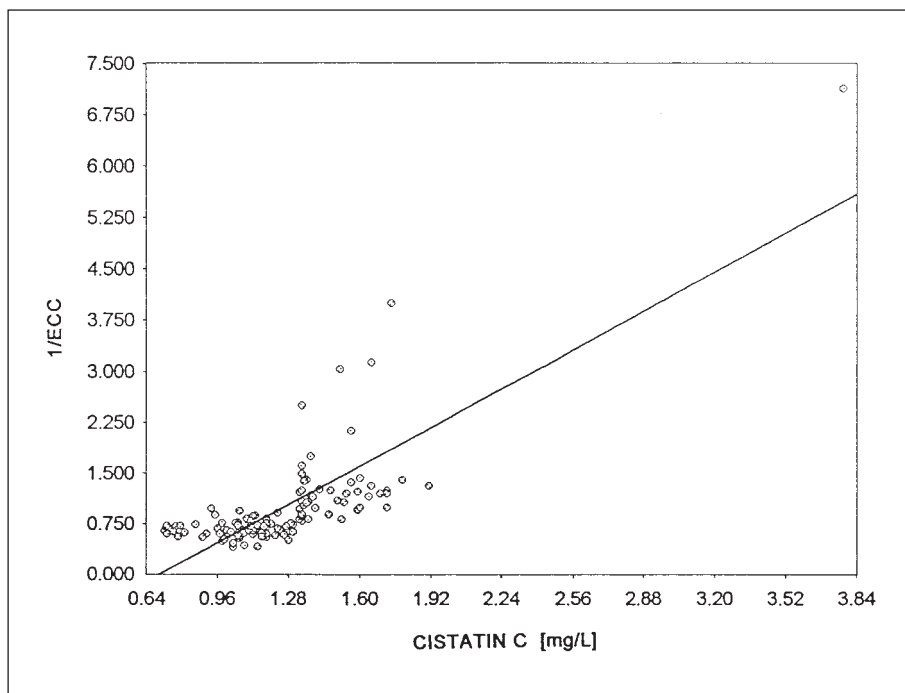




Slika 3. Odnos med kreatininom in cistatinom C (kreatinin < 140 μmol/l, n = 112, r = 0,332)

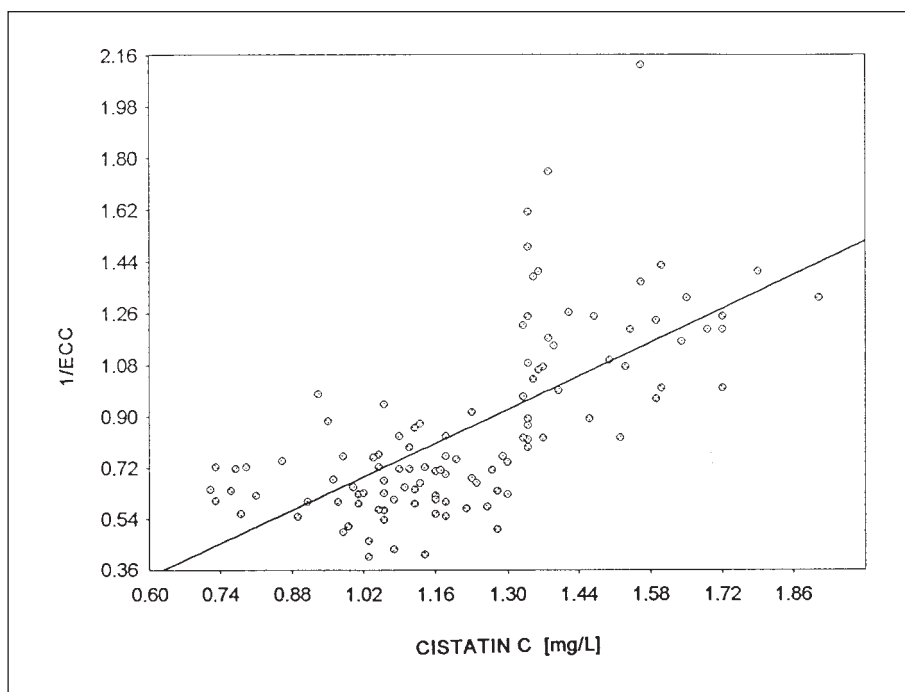


Slika 4. Odnos med kreatininom in cistatinom C (kreatinin > 140 μmol/l, n = 5, r = 0,987).

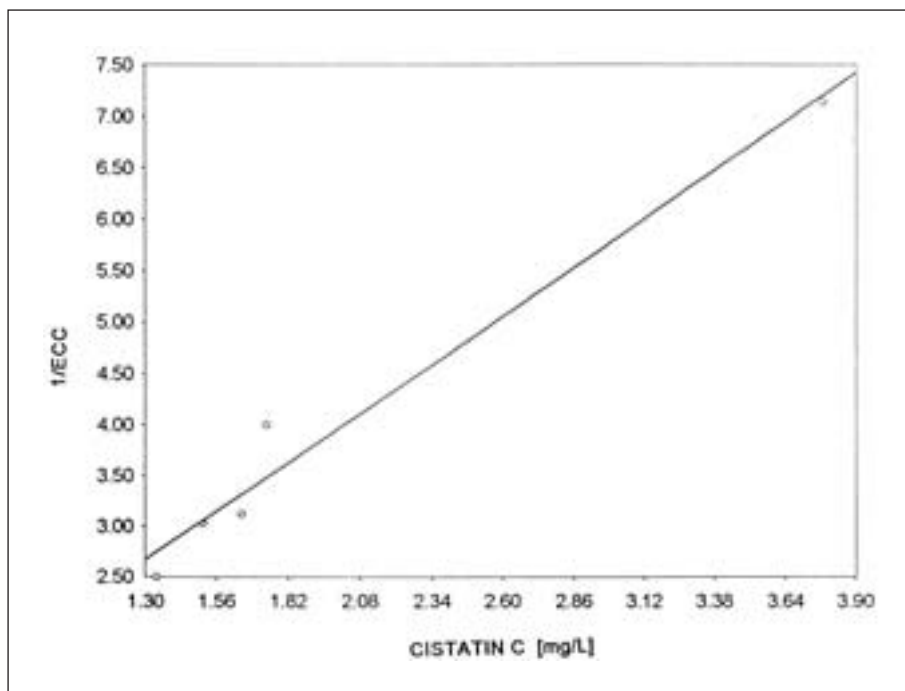


Slika 5. Odnos med cistatinom C in 1/ECC ( $n = 117$ ,  $r = 0,792$ ).

42



Slika 6. Odnos med cistatinom C in 1/ECC (kreatinin < 140  $\mu\text{mol/l}$ ,  $n = 112$ ,  $r = 0,682$ ).



Slika 7. Odnos med cistatinom C in  $1/ECC$  (kreatinin  $> 140 \mu\text{mol/l}$ ,  $n = 5$ ,  $r = 0,990$ ).

vrednosti pred 1. obdobjem kemoterapije, pred vsakim naslednjim obdobjem pa so bile vrednosti ECC znižane.

Bolnik B. M. je imel vrednosti kreatinina, cistatina C in ECC v normalnem območju pred 1., 2., 3., 4. in 5. obdobjem kemoterapije. Vrednosti vseh treh parametrov so bile pred 6. obdobjem v patološkem območju.

Bolnik P. D. je imel normalne vrednosti kreatinina, cistatina C in ECC pred 1. in 2. obdobjem kemoterapije. Vse tri biokemične parametre je imel pred 3. obdobjem v patološkem območju.

### **Pregled ovrednotenih rezultatov kreatinina, cistatina C in očistka endogenega kreatinina**

V 117 vzorcih 56 bolnikov smo vrednotili koncentracijo serumskega kreatinina, cistatina C in ECC z ozirom na orientacijske referenčne vrednosti.

Vsi trije parametri so bili v območju referenčnih vrednosti pri 60 vzorcih. Pri 26 vzorcih je bil kreatinin v območju referenčnih vrednosti, cistatin C in ECC sta bila v pato-

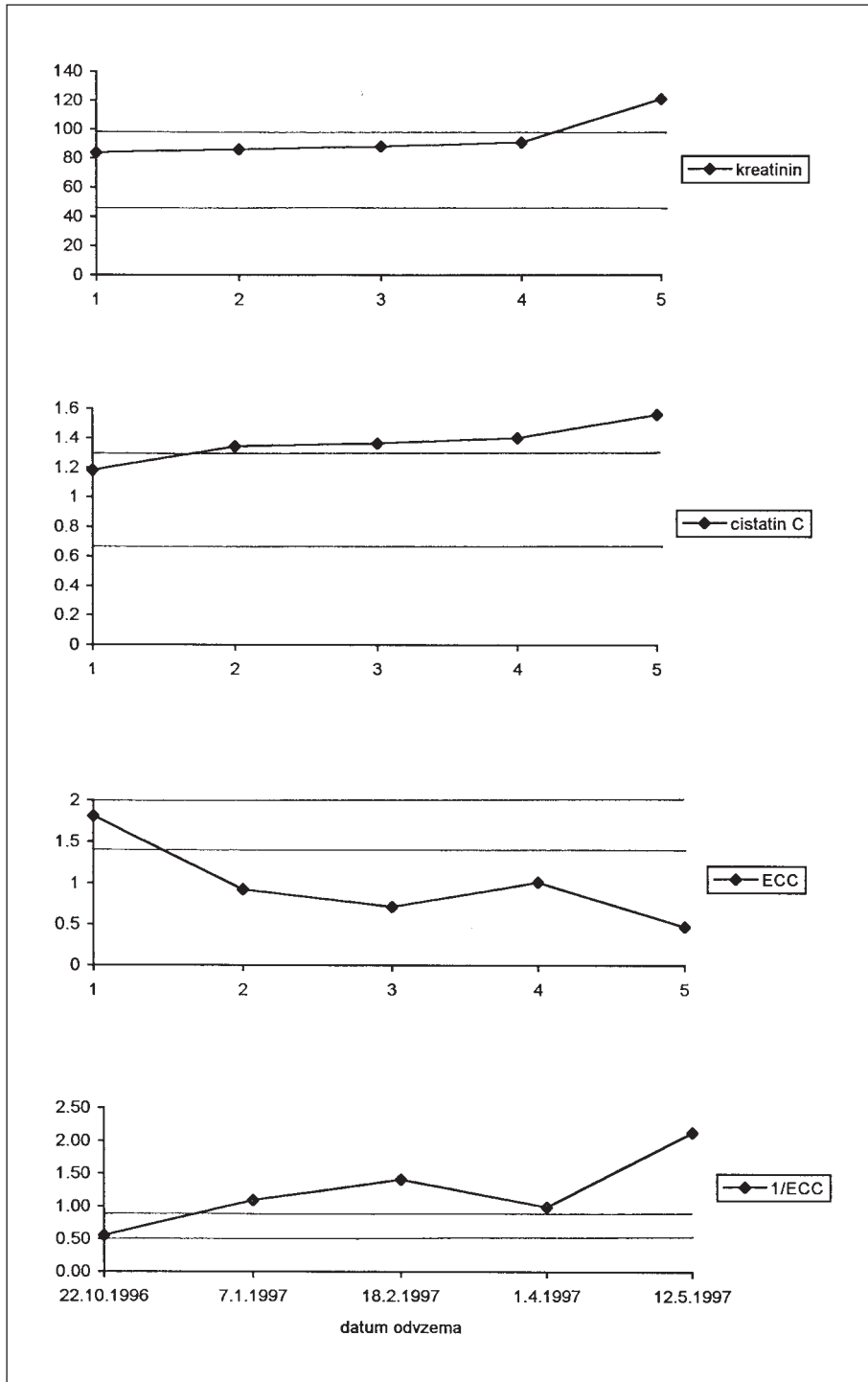
loškem območju. Vsi trije parametri so bili v patološkem območju v 20 primerih. Pri 8 vzorcih je bil znižan samo ECC, kreatinin in cistatin C sta bila v normalnem območju. Pri 3 vzorcih smo določili patološke vrednosti kreatinina, cistatina C in ECC sta bila v območju normalnih vrednosti.

Pregled teh kombinacij je zbran v tabeli 2.

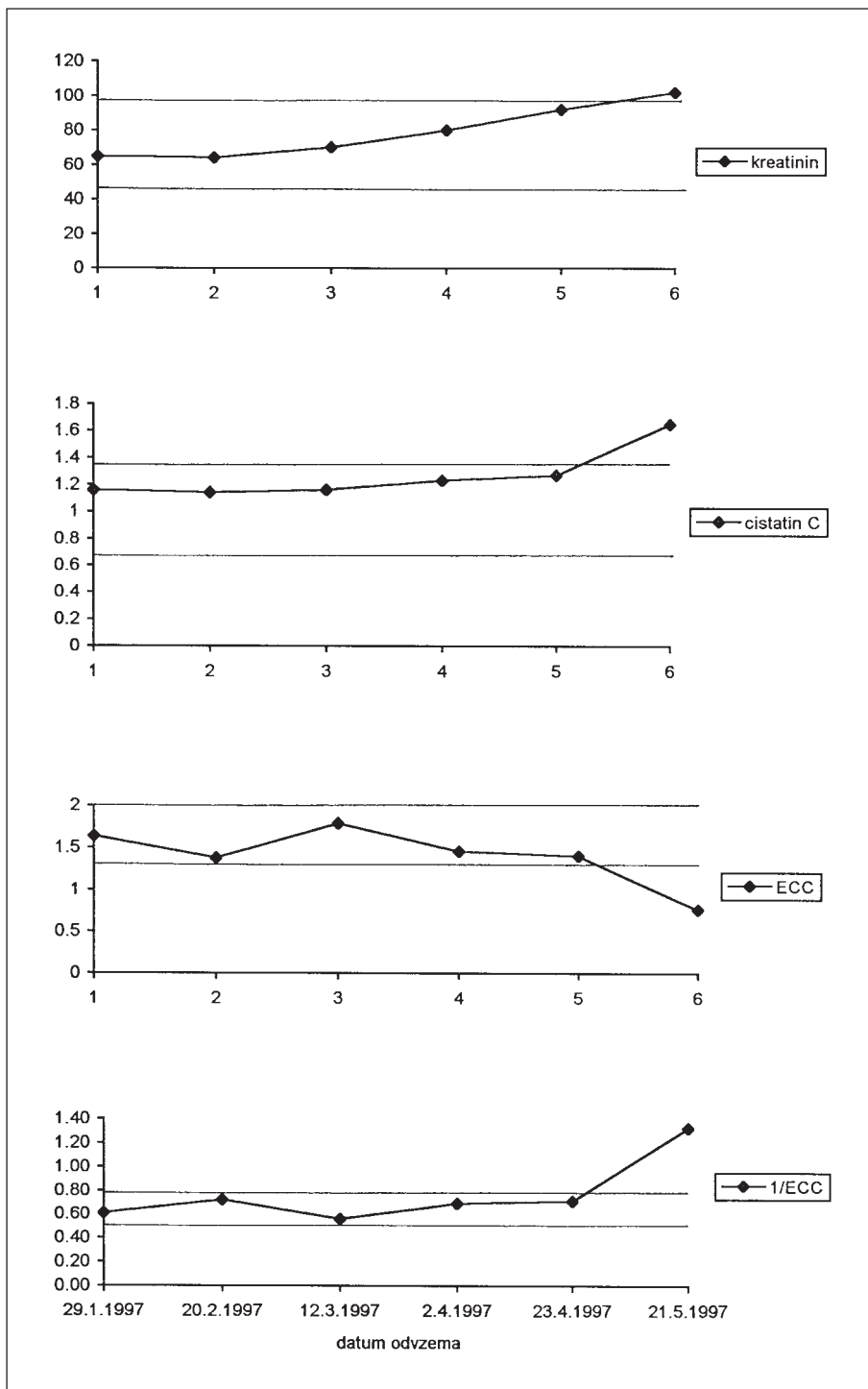
Določanje cistatina C in ECC se kot metodi za oceno GFR v deležu patoloških rezultatov statistično pomembno ne razlikujeta ( $\chi^2 = 0,86$ ,  $p = 0,35$ ).

### **RAZPRAVLJANJE**

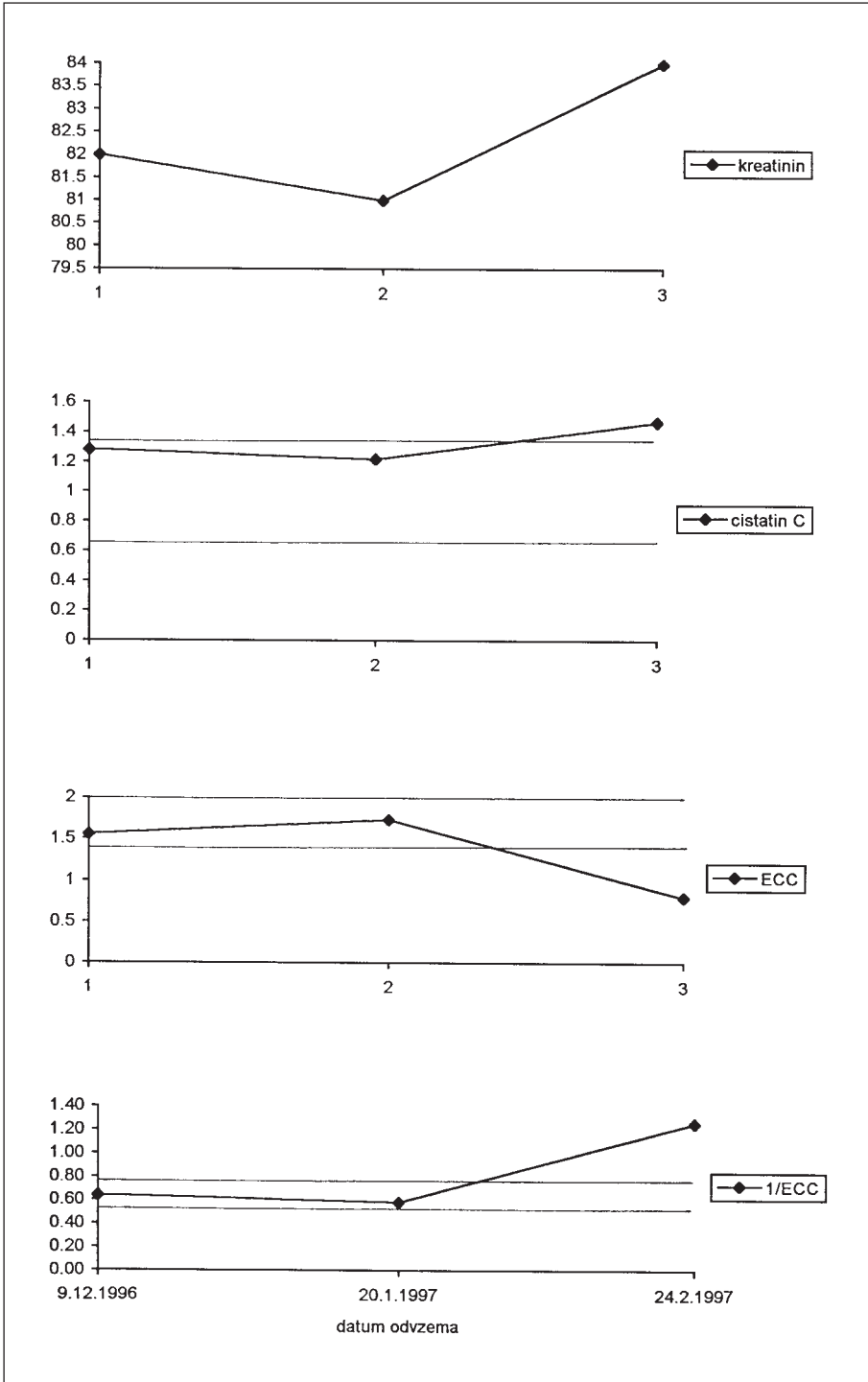
Zdravljenje bolnikov, ki prejemajo citotoksične učinkovine, zahteva skrben zdravniški nadzor, ker se le tako lahko izognemo hujšim akutnim in kroničnim ledvičnim okvaram. Dokazano je, da je najboljši pokazatelj delovanja ledvic določitev glomerulne filtracije z eksogenim označevalcem, vendar je taka preiskava za bolnika preveč obremenjujoča. V rutinskem delu se zato uporabljajo preiskave z označevalci endogenega izvora, kot je kreatinin, ki sicer nima vseh lastnosti



Slika 8. Primerjava vrednosti kreatinina, cistatina C in ECC (očistek endogenega kreatinina) kot pokazatelja glomerulne filtracije med potekom kemoterapije pri bolnici Š. Š.



Slika 9. Primerjava vrednosti kreatinina, cistatina C in ECC (očistek endogenega kreatinina) kot pokazatelja glomerulne filtracije med potekom kemoterapije pri bolnici B. M.



Slika 10. Primerjava vrednosti kreatinina, cistatina C in ECC (očistek endogenega kreatinina) kot pokazatelja glomerulne filtracije med potekom kemoterapije pri bolniku P.D..

Tabela 2. Pregled kombinacij pojavljanja rezultatov kreatinina, cistatina C in očistka endogenega kreatinina (ECC) v normalnem in patološkem območju.

Kreatinin	Cistatin c	ECC	N	%
↔	↔	↔	60	51,3
↔	↑	↓	26	22,2
↑	↑	↓	20	17,1
↔	↔	↓	8	6,8
↑	↔	↔	3	2,5
↑	↑	↔	0	0
↔	↑	↔	0	0

idealnega filtracijskega označevalca, a kljub temu ob skrbni izvedbi preiskave vseeno pokaže grobo in klinično uporabno sliko funkcije ledvic. Ocenjujeta se dva parametra kreatinina, ki sta v idealnih pogojih obratno sorazmerna: serumska koncentracija kreatinina in ECC. Vzporedna uporaba obeh naj bi zmanjšala možnost napake in podala večjo oporo pri vrednotenju rezultatov.

Koncentracija serumskega kreatinina se običajno določa za oceno funkcijske sposobnosti ledvic, kadar ni dovolj časa za izvedbo drugih testov. Sinteza kreatinina je močno odvisna od mišične mase, načina prehrane, spola, starosti in zdravstvenega stanja. Pri zdravih ljudeh z normalno prehrano je stalna. Pri nepopolni prehrani in nekaterih bolezenskih stanjih pa lahko pride do občutnih sprememb. Tako lahko dobimo spremenjene vrednosti tudi pri normalnem delovanju ledvic.

S serumskimi koncentracijami kreatinina lahko zaznamo spremenjeno funkcijo ledvic z zakasnitvijo, ko je ta okvarjena že 40–50% (30).

Kreatinin ne izpolnjuje vseh pogojev idealnega filtracijskega označevalca, saj lahko v določenih primerih pride do tubulne sekrecije in je njegov očistek povečan za 10–40% glede na očistek inulina (6). V primeru počasnega pretoka po ledvičnem tubulu pa lahko pride do njegove tubulne resorpcije.

Pri določanju ECC za oceno GFR moramo zanesljivo zbrati ves izločen seč. Ker zbirajo bolniki seč običajno brez neposrednega nadzora zdravstvenega delavca, so pogosto nedosledni. Da bi se izognili napakam pri določanju ECC, se lahko uporablja dvodnevni (2-krat 24-urni) seč. S tem je preiskava še dolgo trajnejša in obremenitev bolnika večja. Pri takem načinu se določi ECC za dva zaporedna dne-

va in izračuna srednja vrednost. Pri pravilnem zbiranju seča sta ECC obeh zaporednih dnevov približno enaka. V resnici pa se vrednosti pogosto močno razlikujeta, ker se običajno razlikujeta tudi volumna 24-urnega seča, ki ju uporabimo za izračun obeh ECC (30).

Ker dobimo le pri pravilni in dosledni izvedbi ECC klinično relevantne rezultate, smo v našo raziskavo vključili samo tiste vzorce, za katere smo lahko dovolj zanesljivo preverili, da je bil seč pravilno zbran in vzorčen. S tem smo skušali odstraniti najpomembnejši vzrok odstopanja ECC od realnih vrednosti.

Čeprav se zavedamo vseh pomanjkljivosti določanja ECC, smo pri našem delu za vse ugotovitve predpostavljali, da je ECC za klinično uporabo dovolj zanesljiva preiskava, ki jo želimo nadomestiti, ker je izvedba nepraktična in dolgotrajna.

Alternativa določanju ECC pa bi lahko bil zaradi svojih lastnosti cistatin C. Nizka molekulska masa mu omogoča, da se lahko filtrira skozi glomerule. Tako je pri konstantni sintezi njegova serumska koncentracija verjetno dovolj dobro merilo GFR, saj je neodvisna od spola, okužbe, prehrane, jetrnih boleznin in malignosti. Ugotovitev, da je serumska koncentracija cistatina C v soodvisnosti z GFR, je vzpodbudila raziskovalce, da bi ugotovili zanesljivost določanja cistatina C kot merilo GFR. Pri večini takih raziskav so za določitev GFR uporabljali metodo s <sup>51</sup>Cr-EDTA kot eksogenim označevalcem. S to metodo je Grubb s sodelavci že leta 1985 dobil visoko korelacijo med GFR in koncentracijo cistatina C (21). Na voljo je že dovolj zelo podobnih raziskav, ki so ugotovile smiselnost določanja cistatina C za oceno GFR kot zamenjavo za določanje serumskega kreatinina ali določitve

kateregakoli glomerulnega očistka idealnih filtracijskih označevalcev (19–21). Ker je pri uporabi cisplatina in analogov za to vrsto zdravljenja obvezno določanje ECC za oceno GFR, bi z določanjem serumskega cistatina C razbremenili veliko skupino onkoloških bolnikov neprijetnega natančnega zbiranja 24-urnega ali celo 48-urnega seča.

V uporabljeni literaturi se tako imenovane normalne vrednosti, ali kot jih imenujemo z ustrežnejšim izrazom orientacijske referenčne vrednosti, precej razlikujejo. Prav tako najdemo različne vrednosti tudi v literaturi iz klinične kemije (30–32), ki jih zaradi večje natančnosti interpretacije rezultatov delijo še po spolu in starosti. V tej nalogi smo za vrednotenje rezultatov uporabili orientacijske referenčne vrednosti, ki jih uporabljamo pri rutinskem delu v Sloveniji. Zaradi preglednejše grafične predstavitve rezultatov smo za ECC uporabljali njegove recipročne vrednosti.

Pri primerjavi vrednosti serumskega kreatinina in cistatina C (slika 2–4) smo ugotovili visoko povezanost ( $r = 0,736$ ) za celotno koncentracijsko območje vseh 117 vzorcev (kreatinin 62–488  $\mu\text{mol/l}$ , cistatin C 0,73–3,78  $\text{mg/l}$ ) in je celo boljši od korelacijskega količnika ( $r = 0,67$ ), ki so ga določili Newman in sodelavci. Ta povezanost pa je nižja ( $r = 0,332$ ) pri vzorcih, ki imajo koncentracijo kreatinina pod 140  $\mu\text{mol/l}$ , in skoraj idealna ( $r = 0,987$ ) pri vzorcih s koncentracijo kreatinina nad 140  $\mu\text{mol/l}$ . Razlika nastane najverjetneje zaradi odvisnosti serumske koncentracije kreatinina od mišične mase, prehrane, spola in starosti bolnikov. Pri zdravih in malo okvarjenih ledvicah so ti dejavniki lahko prevladujoči, pri večjih okvarah pa je njihov vpliv relativno veliko manjši. Na serumsko koncentracijo cistatina C naštetih dejavniki ne vplivajo.

Primerjavo vrednosti cistatina C in ECC (na slikah kot 1/ECC) pa lahko vidimo iz slik 5, 6 in 7. Prav tako smo ugotovili visoko povezanost ( $r = 0,792$ ) za celotno koncentracijsko območje 117 vzorcev (cistatin C 0,73–3,78  $\text{mg/l}$ , ECC 2,46–0,14  $\text{ml/s}$ ). Ta korelacijski količnik je zelo podoben količniku ( $r = 0,77$ ), ki so ga ugotovili Grubb in sodelavci (21) med cistatinom C in GFR (označevalec  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ ). Tudi ta je nekoliko nižji ( $r = 0,682$ ) pri normalnih in malo okvarjenih ledvicah (kreatinin < 140  $\mu\text{mol/l}$ ) in

zelo visok ( $r = 0,990$ ) pri vzorcih s koncentracijo kreatinina nad 140  $\mu\text{mol/l}$ .

Čeprav je v skupini le 5 vzorcev s tako povišano koncentracijo kreatinina, je tako visoka soodvisnost v tej skupini presenetljiva, ker je podobna korelacija tudi med cistatinom C in kreatininom. Tako visoke korelacije v literaturi na večjem številu vzorcev nismo zasledili in je ne moremo upoštevati kot pomembno ugotovitev. Gotovo pa kaže na zanesljivost in odzivnost cistatina C tudi pri večjih okvarah ledvic.

Podobno zanesljivost določanja kreatinina, cistatina C in ECC za oceno GFR lahko opazimo tudi pri spremljanju vrednosti teh parametrov med kemoterapevtskim zdravljenjem posameznih bolnikov. Pri bolnici Š.Š. (slika 8) je vrednost kreatinina zvišana šele pri petem vzorcu, cistatin C in ECC pa sta izven normalnih vrednosti že od drugega odvzema naprej. Ti rezultati se ujemajo s podatkom iz literature (30), da so vrednosti kreatinina v patološkem območju šele pri zelo okvarjeni ledvici. Dobro odzivnost cistatina C med zdravljenjem z nefrotoksičnimi učinkovinami opazimo tudi pri bolnici B. M. (slika 9) in bolniku P. D. (slika 10). Cistatin C veliko bolje sledi gibanju vrednosti ECC od kreatinina.

Vse te ugotovitve lahko potrdimo še s pregledom kombinacij pojavljanja rezultatov kreatinina, cistatina C in ECC v normalnem in patološkem območju. Pri 8 vzorcih smo dobili znižane vrednosti ECC in normalne vrednosti kreatinina in cistatina C (tabela 2). Odstopanja od referenčnih vrednosti niso velika (vrednosti ECC so od 1,06  $\text{ml/s}$  do 1,26  $\text{ml/s}$ , povprečna vrednost = 1,15  $\text{ml/s}$ ) in predstavljajo v povprečju 11 % znižanje vrednosti ECC. Pri teh določitvah ECC lahko še vedno sumimo na nepopolno zbiranje 24-urnega seča, ki ga nismo mogli dokazati.

Trije vzorci so pokazali zvišano vrednost kreatinina, medtem ko sta bila cistatin C in ECC normalna. Vsi trije vzorci so bili od iste ga bolnika moškega spola. Najvišja vrednost kreatinina je bila 110  $\mu\text{mol/l}$ , kar spada po nekaterih priporočilih (30) še v območje normalnih vrednosti za moške.

Iz tabele 2 lahko vidimo, da se je pri 117 določitvah cistatin C razlikoval od ECC v 8 primerih (6,8%). Metodi se statistično pomembno ne razlikujeta v deležu patološ-



kih rezultatov ( $\chi^2 = 0,86$ ,  $p = 0,35$ ). Iz teh ugotovitev sledi, da se zvišana koncentracija cistatina C v vsaj 93 % ujema z znižano vrednostjo glomerulnega očistka kreatinina. Korelacija med cistatinom C in ECC je 0,792 v 95 % intervalu zaupanja.

## ZAKLJUČKI

Na osnovi ugotovitev te raziskave lahko zaključimo:

Serumska koncentracija cistatina C korelira z glomerulnim očistkom kreatinina s korelacijskim koeficientom 0,792 v 95 % intervalu zaupanja.

Serumska koncentracija cistatina C je enako zanesljiv zgodnji pokazatelj zmanjšane glomerulne filtracije (GFR) kot očitek endogenega kreatinina (ECC) in zgodnejši pokazatelj okvare ledvične funkcije kot serumski kreatinin.

Serumska koncentracija cistatina C lahko zamenja nepraktično in nezanesljivo določanje ECC z vsaj 93 % zanesljivostjo.

Med zdravljenjem s citostatskimi učinkovinami se koncentracija serumskega cistatina C ne spreminja, če to zdravljenje ne povzroči okvare ledvic.

Na osnovi teh ugotovitev smo v nadaljevanju naloge potrdili, da je koncentracija serumskega cistatina C neodvisna od prisotnosti metastaz, zato je najprimernejši pokazatelj delovanja ledvične funkcije tudi pri rakavih bolnikih (34).

## ZAHVALA

Raziskovalno delo sem opravil na Onkološkem inštitutu v Ljubljani.

Mentorju doc. dr. Borutu Štabucu se zahvaljujem za strokovno pomoč, nasvete in kritike pri nastajanju te naloge.

Posebno zahvalo sem dolžan osebju oddelka B II in biokemičnega laboratorija, ki je opravilo rutinske postopke za spremljanje poteka citostatskega zdravljenja in omogočilo uspešno izvedbo te naloge.

## LITERATURA

1. Smith HW. The kidney-structure and function in health and disease. New York: Oxford U Pr; 1951. pp. 39-62, 143-202.
2. Levinsky NG, Levy M. Clearance techniques. In: Orloff J, Berliner RW. *Handbook of physiology, section 8: renal physiology*. Washington DC: American Physiological Society; 1973. pp. 103-17.
3. Perrone RD, Madias NE, Levey AS. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. *Clin Chem* 1992; 38: 1933-53.
4. Rehberg PB. Studies on kidney function. The rate of filtration and reabsorption in the human kidney. *Biochem J* 1926; 20: 447-60.
5. Miller BF, Winkler AW. The renal excretion of endogenous creatinine in man. Comparison with exogenous creatinine and inulin. *J Clin Invest* 1938; 17: 31-40.
6. Shannon J. The renal excretion of creatinine in man. *J Clin Invest* 1935; 14: 403-10.
7. Nilsson-Ehle P, Grubb A. New markers for the determination of GFR: Iohexol clearance and cystatin C serum concentration. *Kidney Int* 1994; Supl 47: S17-S19.
8. Krutzen E, Back SE, Nilsson-Ehle I, Nilsson-Ehle P. Plasma clearance of a new contrast agent, iohexol: A method for the determination of glomerular filtration rate. *J Lab Clin Med* 1984; 104: 955-61.
9. Bäck SE, Krutzen E, Nilsson-Ehle P. Contrast media as markers for glomerular filtration: A pharmacokinetic comparison of four agents. *Scand J Clin Lab Invest* 1988; 48: 247-53.
10. Clausen J. Proteins in normal cerebrospinal fluid not found in serum. *Proc Soc Exp Biol Med* 1961; 107: 170-2.
11. Butler EA, Flynn FV. The occurrence of post- $\gamma$  protein in urine: a new protein abnormality. *J Clin Pathol* 1961; 14: 172-8.
12. Hochwald GM, Thorbecke GJ. Use of an antiserum against cerebrospinal fluid in demonstration of trace proteins in biological fluids. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962; 109: 91-5.
13. Cejka J, Fleischmann LE. Post- $\gamma$  globulin: isolation and physiochemical characterisation. *Arch Biochem Biophys* 1973; 157: 168-76.
14. Colle A, Guinet R, Leclercq M, Manuel Y. Occurrence of beta 2 microglobulin and post-gama globulin in human semen. *Clin Chim Acta* 1976; 67: 93-7.
15. Löfberg H, Grubb AO. Quantitation of  $\gamma$ -trace in human biological fluids: indication for production in the central nervous system. *Scand J Clin Lab Invest* 1979; 39: 619-26.
16. Brzin J, Popovič T, Turk V, Borchart U, Machleidt W. Human cystatin, a new protein inhibitor of cysteine proteinases. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 118: 103-9.

17. Khyse-Andersen J, Schmidt C, Nordin G, Andersson B, Nilsson-Ehle P, Lindstrom V, Grubb A. Serum cystatin C, determined by a rapid, automated particle-enhanced turbidimetric method, is a better marker for glomerular filtration rate than serum creatinine. *Clin Chem* 1994; 40: 1921-6.
18. Ayatse JO, Kwan JTC. Relative sensitivity of serum and urine retinol binding protein and alpha 1 microglobulin in the assessment of renal function. *Ann Clin Biochem* 1991; 28: 514-16.
19. Newman DJ, Thakkar H, Edwards RG, Wilkie M, White T, Grubb AO, Price CP. Serum cystatin C measured by automated immunoassay: A more sensitive marker of changes in GFR than serum creatinine. *Kidney Int* 1995; 47: 312-18.
20. Simonsen O, Grubb A, Thysell H. The blood serum concentration of cystatin C ( $\gamma$  trace) as a measure of the glomerular filtration rate. *Scand J Clin Lab Invest* 1985; 45: 97-101.
21. Grubb A, Simonsen O, Sturtfelt G, Truedsson L, Thysell H. Serum concentration of cystatin C, factor D and  $\beta_2$ -microglobulin as a measure of glomerular filtration rate. *Acta Med Scand* 1985; 218: 499-503.
22. Turk V, Brzin J, Lenarčič B, Šali A, Machleidt W. Human stefins and cystatins: their properties and structural relationships. In: *Cysteine proteinase and their inhibitors*. Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1986. p. 429-41.
23. Laurenzi MA, Link H. Localization of the immunoglobulins G, A and M,  $\beta$ -trace protein and  $\gamma$ -trace protein on isoelectric focusing of serum and cerebrospinal fluid by immunofixation. *Acta Neurol Scand* 1978; 58: 141-7.
24. Tonnelle C, Colle A, Fougeraue M, Manuel Y. Partial amino acid sequence of two forms of human post- $\gamma$ -globulin. *Biochem Biophys Res Commun* 1979; 86: 613-9.
25. Löfberg H, Nilsson KE, Stroemblad LG, Lasson A, Olsson SO. Demonstration of  $\gamma$ -trace in normal endocrine cells of the adrenal medulla and in pheochromocytoma. An immunohistochemical study in monkey, dog and man. *Acta Endocrinol* 1982; 100: 595-8.
26. Löfberg H, Stroemblad LG, Grubb AO, Olsson SO. Demonstration of  $\gamma$ -trace in normal and neoplastic endocrine A-cells of the pancreatic islets: an immunohistochemical study in monkey, rat and man. *Biomed Res* 1981; 2: 527-35.
27. Löfberg H, Grubb A, Davidsson L, Kjellander B, Stroemblad LG, Tibblin S, Olsson SO. Occurrence of  $\gamma$ -trace in the calcitonin-producing C-cells of simian thyroid gland and human medullary thyroid carcinoma. *Acta Endocrinol* 1983; 104: 69-76.
28. Löfberg H, Grubb AO, Jornvau H, Moeller CA, Stroemblad LG, Olsson SO.  $\gamma$ -trace in human pituitary adenoma-23-mas. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 59: 113-8.
29. Jaffé M. Über den Niederschlag; welchen Pikrinsäure in normalen Harn erzeugt und über eine neue Reaktion des Kreatinins. *Z Physiol Chem* 1886 10: 391.
30. Whelton A, Watson AJ, Rock RC. Nitrogen metabolites and renal function. In: Burtis CA, Ashwood ER. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 2<sup>nd</sup> ed. Pennsylvania: WB Saunders Company, 1994. p. 1513-39.
31. Jesenovc N in sod. *Laboratorijski vodnik*. Ljubljana: Univezitetni inštitut za klinično kemijo in klinično biokemijo, 1988.
32. Čvorišček D, Stavljenič-Rukavina. *Priručnik o procjeni laboratorijskih nalaza iz medicinske biokemije*. Zagreb: Medicinska naklada, 1993.
33. Stanton BA, Koeppen BM. The kidney. In: Berne RM, Levy MN. *Physiology*. 3<sup>rd</sup> ed. Missouri: Mosby-Yearbook Inc, 1993: 719-813.
34. Stabuc B, Vrhovec L, Stabuc-Silih M, Cizej TE. Improved prediction of decreased creatinine clearance by serum cystatin C: Use in cancer patients before and during chemotherapy. *Clin Chem* 2000; 46:193-7.

Prispelo 10. 11. 1999