

Uloga cistatina C u procjeni brzine glomerularne filtracije

Džaić, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:010722>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Andrea Džaić

**ULOGA CISTATINA C U PROCJENI
BRZINE GLOMERULARNE
FILTRACIJE**

Diplomski rad

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Andrea Džaić

**ULOGA CISTATINA C U PROCJENI
BRZINE GLOMERULARNE
FILTRACIJE**

Diplomski rad

Osijek, 2020.

Rad je ostvaren u: Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku u sklopu Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Mentor rada: doc. dr. sc. Vatroslav Šerić, spec. med. biochem.

Rad ima 26 listova, 4 tablice i 5 slika.

ZAHVALA

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru doc. dr. sc. Vatroslavu Šeriću na mentorstvu, pruženoj pomoći, strpljenju i savjetima prilikom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem i svim djelatnicima Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku na iskazanoj pomoći prilikom obavljanja eksperimentalnog dijela.

A posebno, veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na strpljenju i pruženoj podršci tijekom mog obrazovanja.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Općenito o bubregu.....	1
1.1.1. Građa i funkcija bubrega.....	1
1.2. Laboratorijska dijagnostika bubrežnih oštećenja.....	2
1.2.1. Brzina glomerularne filtracije.....	3
1.2.2. Kreatinin i poteškoće pri određivanju klirensa kreatinina.....	3
1.3. Cistatin C.....	6
2. CILJEVI.....	7
3. MATERIJALI I METODE.....	8
3.1. Ustroj studije.....	8
3.2. Ispitanici.....	8
3.3. Metode.....	8
3.3.1. Princip metode određivanja cistatina C.....	9
3.3.2. Princip metode određivanja kreatinina.....	10
3.4. Statističke metode.....	12
4. REZULTATI.....	13
5. RASPRAVA.....	18
6. ZAKLJUČAK.....	21
7. SAŽETAK.....	22
8. SUMMARY.....	23
9. LITERATURA.....	24
10. ŽIVOTOPIS.....	26

POPIS KRATICA

AUC – engl. *area under the curve*

CKD-EPI – engl. *Chronic Kidney Disease – Epidemiology Collaboration*

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

eGFR – procijenjena brzina glomerularne filtracije (engl. *estimated glomerular filtration rate*)

FTJP – faktor tjelesne površine

GFR – brzina glomerularne filtracije (engl. *Glomerular filtration rate*)

HMMPS – N-(3-sulfopropil)-3-metoksi-5-metilnilin

KBC – Klinički bolnički centar

KEK – klirens endogenog kreatinina

KIM-1 – engl. *Kidney injury molecule-1*

L-FABP – jetreni protein koji veže masne kiseline (engl. *liver-type fatty acid binding protein*)

MDRD – engl. *Modification of Diet in Renal Disease*

N-GAL – engl. *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin*

POD – peroksidaza

ROC – engl. *Receiver Operating Characteristic*

1. UVOD

1.1. Općenito o bubregu

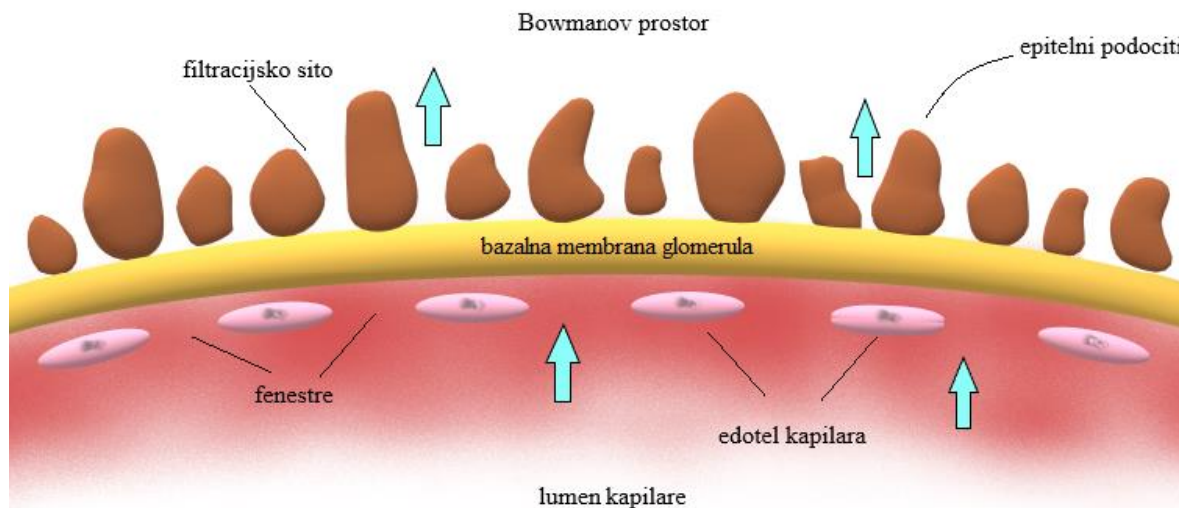
Bubrežne bolesti danas su vrlo važan javnozdravstveni problem kojemu se ne pridaje dovoljno pažnje i opća populacija nije svjesna učestalosti ove bolesti. Pretpostavlja se da od bubrežne bolesti u čitavom svijetu boluje više od 750 milijuna ljudi, a da otprilike 2,4 milijuna ljudi umre od posljedica kroničnih bubrežnih bolesti (1, 2). Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, smatra se da u Hrvatskoj oko 300 000 ljudi ima neki stupanj bubrežnog oštećenja (2). Dijabetičari i osobe s hipertenzijom imaju veći rizik za razvoj bubrežnih bolesti (1). Upravo zbog velikog broja slučajeva i neprimjetnog početka bolesti važno je na vrijeme prepoznati bubrežno oštećenje i spriječiti daljnje pogoršanje (2).

1.1.1. Građa i funkcija bubrega

Kada se govori o bubregu, većini je poznata njegova uloga stvaranja mokraće i uklanjanja štetnih tvari iz organizma. Međutim, bubreg je vrlo važan parni organ koji ima ekskretorne, endokrine i metaboličke funkcije ključne za život svakog čovjeka (3, 4). Stvaranjem mokraće postiže se izlučivanje metaboličkih razgradnih produkata, štetnih tvari i viška tekućine te regulacija ravnoteže vode i elektrolita. Bubrezi su odgovorni i za regulaciju osmolarnosti, arterijskog tlaka i acidobazne ravnoteže, proizvodnju eritropoetina, važnog za stvaranje eritrocita, za metabolizam hormona i stvaranje aktivnog oblika vitamina D3 (4-6).

Bubrezi su dio urinarnog trakta smješteni uz stražnju stijenku abdomena, odnosno u retroperitonealnoj šupljini. Okruženi su fibroznom čahuricom i masnim tkivom koji imaju zaštitnu ulogu. Osnovna funkcionalna jedinica ovog parnog organa jest nefron. U svakom bubregu ima oko milijun nefrona, a njihova funkcija je proizvodnja mokraće. Nažalost, nefroni se ne mogu regenerirati, a godinama se zbog starenja i bolesti njihov broj smanjuje (3-5). Svaki nefron čini glomerul, koji je zapravo splet glomerularnih kapilara, na koji se zatim nastavlja proksimalni tubul, silazni i uzlazni krak Henleove petlje, distalni tubul i kortikalni sabirni tubul (4, 7). Uloga glomerula je filtracija krvne tekućine koja do bubrega dopijeva preko aferentnih arteriola, zatim ulazi u kapilare glomerula te prolaskom kroz negativno nabijenu ultrafiltracijsku barijeru nastaje glomerularni filtrat (3, 7). Ultrafiltracijska barijera djeluje selektivno, odnosno propušta vodu, ione i niskomolekularne tvari, a sprječava prolaz proteinima većim od 60 kDa (kilodaltona), stanicama i negativno nabijenim molekulama. Zbog

toga se u urinu zdravih osoba ne mogu pronaći crvene i bijele krvne stanice te trombociti (3, 4, 6, 7). Ultrafiltracijsku barijeru čine tri sloja. Prvi sloj filtracijske barijere čini endotel glomerularnih kapilara s brojnim fenestrama, odnosno porama. Drugi je sloj bazalna membrana izgrađena od spleta kolagenskih i proteoglikanskih vlaknaca između kojih se provlači voda i male otopljene tvari. Zadnji sloj glomerularne kapilarne membrane čine epitelne stanice, tzv. podociti, koji sa svojim izdancima obuhvaćaju vanjsku površinu kapilara (Slika 1) (4, 7).



Slika 1. Ultrafiltracijska barijera glomerula (shema napravljena prema podacima iz Medicinske fiziologije) (4).

Količina krvi koja prođe kroz glomerule uvjetuje količinu stvorenog glomerularnog filtrata. Dnevno oko 180 L tekućine prolazi kroz glomerule stvarajući glomerularni filtrat, koji u sebi, osim vode, sadrži i glukozu, aminokiseline te anorganske ione poput kalija, natrija i klora (4, 7). Budući da, osim štetnih tvari, nastali glomerularni filtrat sadrži i korisne tvari, 99 % filtrata reapsorbira se u tubulima, a samo jedan posto izluči se putem urina (6, 7).

1.2. Laboratorijska dijagnostika bubrežnih oštećenja

Za procjenu bubrežne funkcije u kliničkoj praksi radi se, u prvom redu, kompletna krvna slika i kompletni pregled urina, u kojem je od velikog značaja određivanje koncentracije proteina, osobito albumina, te omjer albumin-kreatinin. U serumu se određuju koncentracije ureje i kreatinina, a klirens endogenog kreatinina (KEK) izražava se na osnovu koncentracija kreatinina izmjerenih u krvi i 24-satnom urinu. Dodatno se rade i pretrage kao što su koncentracija elektrolita, acidobazni status te radiološke i radioizotopne metode (3, 8, 9).

1.2.1. Brzina glomerularne filtracije

Do danas se u kliničkoj praksi kao najosjetljiviji i najspecifičniji pokazatelj bubrežne funkcije pokazala brzina glomerularne filtracije (GFR), koja predstavlja količinu krvne plazme koja se filtrira u glomerulima u jedinici vremena. Vrlo često promijenjen GFR bude prvi pokazatelj oštećenja bubrega (5, 8, 10, 11). Većina metoda za određivanje GFR-a temelji se na određivanju klirensa endogenih i egzogenih tvari za koje je važno da se filtriraju u glomerulima, a da se u tubulima ne reapsorbiraju (3, 5, 10). Prema navedenim kriterijima, inulin je najidealniji marker za određivanje GFR-a. Međutim, njegova primjena u praksi nije idealna zbog većeg broja nedostataka. Unatoč tome što je "zlatni standard" za određivanje GFR-a, inulin se ne koristi u dijagnostičke svrhe jer je egzogeni spoj i jer je njegovo primjenjivanje skupo, dugotrajno i neugodno za pacijente. Zbog toga je za procjenu GFR-a praktičnije koristiti endogene tvari koje su već prisutne u krvotoku i nije ih potrebno unositi u organizam infuzijom. Takve tvari su kreatinin, ali i cistatin C čiji se potencijal još uvijek ispituje (5, 10).

1.2.2. Kreatinin i poteškoće pri određivanju klirensa kreatinina

Kreatinin je nusproizvod metabolizma koji se stvara u mišićima, a nastaje iz kreatina gubitkom vode. Kreatin dopijeva u mišiće i druga tkiva putem krvi nakon što se sintetizira u jetri i bubrezima. U mišićnim stanicama kreatin se fosforilira, čime stanice dobivaju izvor energije, kreatin-fosfat. Spontanom razgradnjom kreatin-fosfata u mišićima se ponovno stvara kreatinin (3, 5). Kreatinin se zatim uklanja iz organizma glomerularnom filtracijom i tubularnom sekrecijom (4, 10). Dnevna količina kreatinina koja nastaje iz kreatina ovisi o masi, dobi i spolu pacijenta (3). Koncentracija kreatinina u serumu koristila se za procjenu glomerularne funkcije bubrega, budući da ponajprije ovisi o glomerularnoj filtraciji (3, 5, 12). Kada je bubrežna funkcija očuvana, koncentracija kreatinina u serumu, ali i mokraći je konstantna. Kada dođe do oštećenja bubrežne funkcije, dolazi do porasta koncentracije kreatinina u serumu, ali tek kada se GFR spusti na 60-40 mL/min/1,73 m² (3, 5). Za određivanje koncentracije kreatinina često se koristi Jaffeova reakcija koja se temelji na reakciji kreatinina i pikrata u alkalnom mediju pri čemu nastaje crvenonarančasto obojenje. Međutim, problem je što velik broj tvari u serumu interferira u reakciji i daje jednako obojenje. Zbog toga su razvijene različite verzije Jaffeove reakcije kojima se nastoje ukloniti interferencije. Danas se ipak preporučuju enzimске metode i spektrofotometrijska „kontinuirana“ metoda s alkalnim pikratom (3, 5, 8).

Iako je koncentracija kreatinina u serumu koristan dijagnostički pokazatelj bubrežne funkcije, nije dovoljno osjetljiva pretraga jer sve promjene u stvaranju ili izlučivanju kreatinina rezultiraju promjenom serumskih koncentracija kreatinina, time i osobe s urednim vrijednostima kreatinina mogu imati smanjenu bubrežnu funkciju (5, 8). Na primjer, uzimanje kreatinskih dodataka povećava koncentraciju kreatinina u serumu, što ukazuje na slabljenje bubrežne funkcije iako je ona stabilna. Iz tog razloga u laboratorijsku rutinu uveden je klirens endogenog kreatinina koji se može izračunati iz sljedeće jednadžbe:

$$C = \frac{U \times V \times 1,73m^2}{S \times A}$$

pri čemu je C – klirens kreatinina; U – koncentracija kreatinina u mokraći (mmol/L); V – minutni volumen mokraće; S – koncentracija kreatinina u serumu (mmol/L); A – površina tijela pacijenta izražena u m².

Klirens ovisi o veličini bubrega, a time i površini tijela pacijenta koja se očitava iz nomograma te uvrštava u jednadžbu za klirens. Budući da se postojeći referentni intervali odnose na osobe s prosječnom površinom tijela od 1,73 m², kod osoba s premalom ili prevelikom tjelesnom težinom i kod djece potrebno je korigirati klirens kreatinina množeći ga s 1,73/A (5). U svrhu procjene bubrežne funkcije, određivanje KEK-a pouzdanija je i osjetljivija pretraga od koncentracije kreatinina u serumu. Budući da KEK ovisi o pravilno prikupljenom uzorku 24-satnog urina te o njegovom volumenu koji se uvrštava u jednadžbu, česti propusti tijekom uzorkovanja urina uzrokuju pogrešan nalaz KEK-a (3).

Upravo zbog velike učestalosti pogrešaka tijekom prikupljanja uzorka 24-satnog urina, koje mogu dovesti do pogrešnog postavljanja dijagnoze, važno je strogo se pridržavati svih uputa za pravilno uzorkovanje (7). Jedna od najčešćih poteškoća prilikom prikupljanja uzorka urina s kojom se pacijenti susreću je ne prikupljanje cijelog volumena izmokrenog urina tijekom 24 sata ili pak, zbog nejasnih uputa i neznanja, prikupljanje previše mokraće (13). Također, velik problem je i nepravilno skladištenje urina ili curenje uzorka iz neodgovarajućeg spremnika ili loše zatvorene boce. Uzorak urina prilikom 24-satnog perioda prikupljanja treba čuvati u hladnjaku kako bi se smanjio lažan rezultat koji nastaje kao posljedica djelovanja enzimskih reakcija, a koje ovise o temperaturi (13, 14). Osim toga, pacijenti bi trebali izbjegavati fizičku aktivnost dan prije uzorkovanja te pripaziti na prehranu. Stoga je najbolje da se pacijentima pruže usmene i pisane upute o pripremi za uzorkovanje te o načinu prikupljanja urina tijekom 24 sata. Nadalje, treba pripaziti da pružene informacije ne budu

previše stručne za opću populaciju jer tada je veća mogućnost pogreške pri uzorkovanju (7). Urin može poprimiti neobičnu boju poput zelene, crne ili ljubičaste, što se može dogoditi uslijed konzumacije različitih lijekova. U tom slučaju laboratorijsko osoblje treba provjeriti povijest bolesti te lijekove koje pacijent konzumira kako bi se mogle isključiti određene bolesti, poput porfirije te izbjeći interferencije (15).

Kako bi se izbjegle pogreške koje se događaju prilikom određivanja KEK-a, danas se primjenjuju formule pomoću kojih se na jednostavan, brz i pouzdan način odredi procijenjena brzina glomerularne filtracije (eGFR). Formule u izračun, osim koncentracije kreatinina u serumu uključuju i antropometrijske podatke kao što su dob, spol, visina, težina pa čak i rasa pacijenta (3, 16, 17). Od velikog broja formula koje su razvijene, danas se najčešće koriste MDRD (engl. *Modification of Diet in Renal Disease*) i CKD-EPI kreatinin jednadžba (engl. *Chronic Kidney Disease- Epidemiology Collaboration*) (3, 5). Međutim, novija jednadžba CKD-EPI cistatin C u kojoj se umjesto koncentracije kreatinina koristi koncentracija cistatina C, pokazala se kao bolje mjerilo bubrežne funkcije kod pacijenata s manjom tjelesnom težinom. Najnovija i najtočnija jednadžba, koja daje bolje rezultate u odnosu na formule u koje se uvrštava vrijednost samo jednog markera je CKD-EPI kreatinin-cistatin C. Za njezin izračun koriste se koncentracije kreatinina i cistatina C. Za izračun eGFR-a kod djece primjenjuje se Schwartzova jednadžba (3).

Unatoč činjenici da se kreatinin pokazao kao nepouzdan biljeg za postavljanje dijagnoze bubrežnog oštećenja u ranom stadiju i dalje se rutinski koristi jer ne postoji dijagnostički osjetljiv i specifičan biljeg koji bi ga mogao zamijeniti. Problem stvara i činjenica da se dijagnostička specifičnost i osjetljivost drugih biljega određuju prema vrijednostima kreatinina (8, 16). Među nove potencijalne biljege koji bi mogli zamijeniti kreatinin spada N-GAL (engl. *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*), L-FABP (engl. *liver-type fatty acid binding protein*) i KIM-1 (engl. *kidney injury molecule-1*). Njima treba pridodati i cistatin C za koji je do sada utvrđen veliki potencijal, najveća osjetljivost i specifičnost pa se njegovo određivanje preporučuje i u smjernicama (3, 5).

1.3. Cistatin C

Cistatin C bazni je neglikozilirani protein male molekularne mase (12, 8 kD) koji se smatra važnim fiziološkim inhibitorom endogene cisteinske proteaze (11, 17, 18). To se ponajviše odnosi na proteaze koje su porijeklom iz lizosoma oštećenih ili mrtvih stanica. Cistatin C sintetizira se kao preprotein kojeg kodira gen smješten na dvadesetom kromosomu. Nativni oblik proteina izgrađen je od 120 aminokiselina te u svojoj strukturi sadrži dva disulfidna mosta (18). Zbog iznimno male molekularne mase te visoke izoelektrične točke lako prolazi kroz bazalnu membranu glomerula, reapsorbira se i metabolizira u proksimalnim tubulima te se ne vraća u cirkulaciju (3, 8, 11). Trajno i ujednačenom brzinom sintetiziraju ga sve stanice ljudskog tijela koje sadrže jezgru, a njegova koncentracija u serumu postaje konstantna nakon prve godine života (3, 8). Upravo ta svojstva potpune filtracije u glomerulima te njegova konstantna sinteza u organizmu čine ga potencijalnom zamjenom kreatinina u svrhu procjene GFR-a (8, 18).

Za razliku od kreatinina, na koncentraciju cistatina C ne utječe mišićna masa, dijeta, dob niti spol pacijenta (8, 11). Jedino što je do sada otkriveno da utječe na koncentraciju cistatina C su hormoni štitnjače (8). Koncentracija cistatina C u krvi usko je povezana s GFR-om (3). Njihov odnos obrnuto je razmjeran, što znači da smanjenjem GFR-a dolazi do porasta vrijednosti cistatina C u serumu (17). Točnije, dokazano je da pad GFR-a na oko 80 mL/min/1,73 m² uzrokuje porast koncentracije cistatina C u serumu što je raniji porast vrijednosti u odnosu na koncentraciju kreatinina koja se povećava tek kada se GFR spusti na otprilike 40 mL/min/1,73 m² (8). Cistatin C osjetljiv je pokazatelj GFR-a te njegova koncentracija u serumu rano i značajno raste što je od velikog značaja u početnim stadijima bubrežnih bolesti, kada je vrlo važno na vrijeme otkriti slabljenje bubrežne funkcije i prevenirati daljnje pogoršanje. Još jedna prednost u odnosu na kreatinin je njegovo jednostavno određivanje imunoturbidimetrijskim i imunonefeleometrijskim metodama kojima se osigurava analitička specifičnost te izbjegavanje interferencija kojima često podliježe kreatinin (3, 8).

2. CILJEVI

Ciljevi ovog istraživanja bili su odrediti koncentraciju kreatinina i cistatina C u serumu, KEK te GFR. Zatim, dobivene podatke usporediti te procijeniti daje li cistatin C korisne i dostatne dijagnostičke informacije koje se mogu koristiti za procjenu GFR-a umjesto do sada korištenog KEK-a.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ustroj studije

Istraživanje je ustrojeno po načelu presječne studije (*cross-sectional*) kojom se mjeri prevalencija bolesti ili nekog rizičnog čimbenika u populaciji. Takva vrsta istraživanja pripada opazajnom tipu epidemioloških istraživanja. Presječna studija koristi se za analizu podataka koji su dobiveni u određenom trenutku te je vrlo često korištena zbog jednostavnog izvođenja, malih troškova i kratkog vremena istraživanja (19).

3.2. Ispitanici

U istraživanju je sudjelovalo 50 pacijenata s oslabljenom bubrežnom funkcijom i s bolestima koje predstavljaju rizik za razvoj bubrežnih bolesti (npr. dijabetes). Ispitanici su bili oba spola od čega je bilo 19 muškaraca i 31 žena u dobi od 19 do 89 godina. Uzorci krvi pacijenata prikupljeni su u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Osijek, u periodu od lipnja do kolovoza 2020. godine. Pacijenti su pri dolasku u Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Osijek dostavili uzorke 24-satnog urina kojeg su prikupili kod kuće u protekla 24 sata. Uzorci su zatim obrađeni u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku. U uzorku krvi ispitane su koncentracije cistatina C te kreatinina, dok je u uzorku 24-satnog urina određena koncentracija kreatinina. Korištenjem CKD-EPI formule dobivena je vrijednost GFR-a, a KEK je izračunat na osnovu koncentracija kreatinina u serumu i urinu. Za provođenje ovog istraživanja dobiveno je odobrenje etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Osijeku.

3.3. Metode

Uzorci krvi pacijenata prikupljeni su u epruvete s crvenim čepom u kojima se nalaze poliesterske smole za izdvajanje seruma. Za određivanje koncentracije cistatina C može se još koristiti i EDTA/heparinizirana plazma. Preporučuje se analiza što svježijih uzoraka unatoč tome što je cistatin C pokazao stabilnost do 26 dana na sobnoj temperaturi i u hladnjaku. Također, prije provođenja analize vrlo je važno uzorke dobro promiješati (20).

Za određivanje koncentracije kreatinina koriste se serum ili heparinizirana plazma te 24-satni urin pri čijem prikupljanju nije korišten konzervans. Prilikom prikupljanja 24-satne mokraće ključno je bilo prikupiti svaku kap mokraće u tom periodu. Mokraća se prikupljala u suhe i čiste boce ili u spremnike dobivene u laboratoriju. Najbolje je s prikupljanjem započeti ujutro nakon buđenja kada pacijent treba potpuno isprazniti mjehur te izmokrenu mokraću baciti. Pacijent ima obavezu zabilježiti točno vrijeme kada je prvi put mokrio. Nakon toga, cijelu količinu mokraće koju pacijent izmokri tijekom tog dana i noći, uključujući i onu mokraću drugi dan ujutro, prikuplja u bocu ili spremnik. Kako bi se procijenila ispravnost skupljanja uzorka 24-satne mokraće određen je koeficijent kreatinina. Faktor tjelesne površine (FTJP) korišten je za standardizaciju rezultata KEK-a na tjelesnu površinu od 1,73 m² (5, 7).

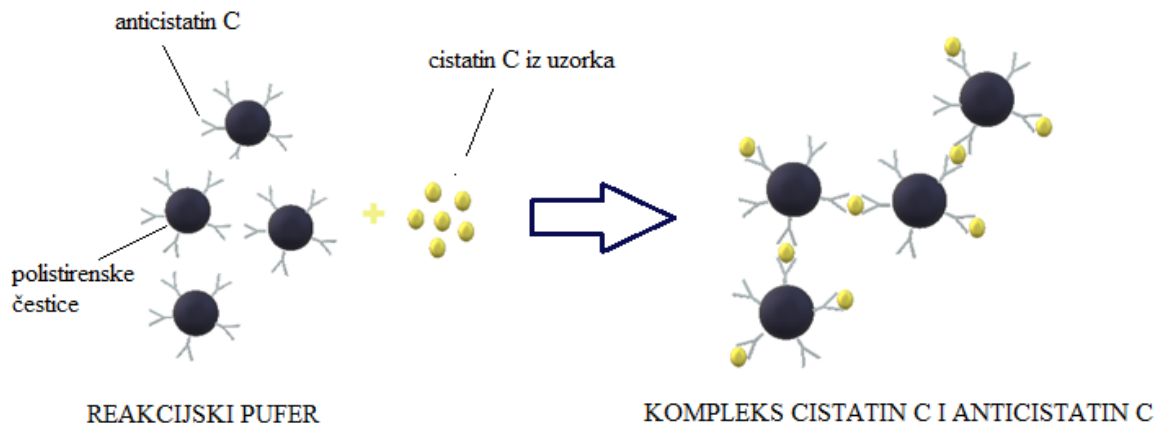
3.3.1. Princip metode određivanja cistatina C

Cistatin C određen je u uzorku krvi imunoturbidimetrijom na instrumentu *Beckman Coulter AU680* (Slika 2), koristeći reagens tvrtke Gentian.



Slika 2. Biokemijski analizator tvrtke *Beckman Coulter*, KBC Osijek

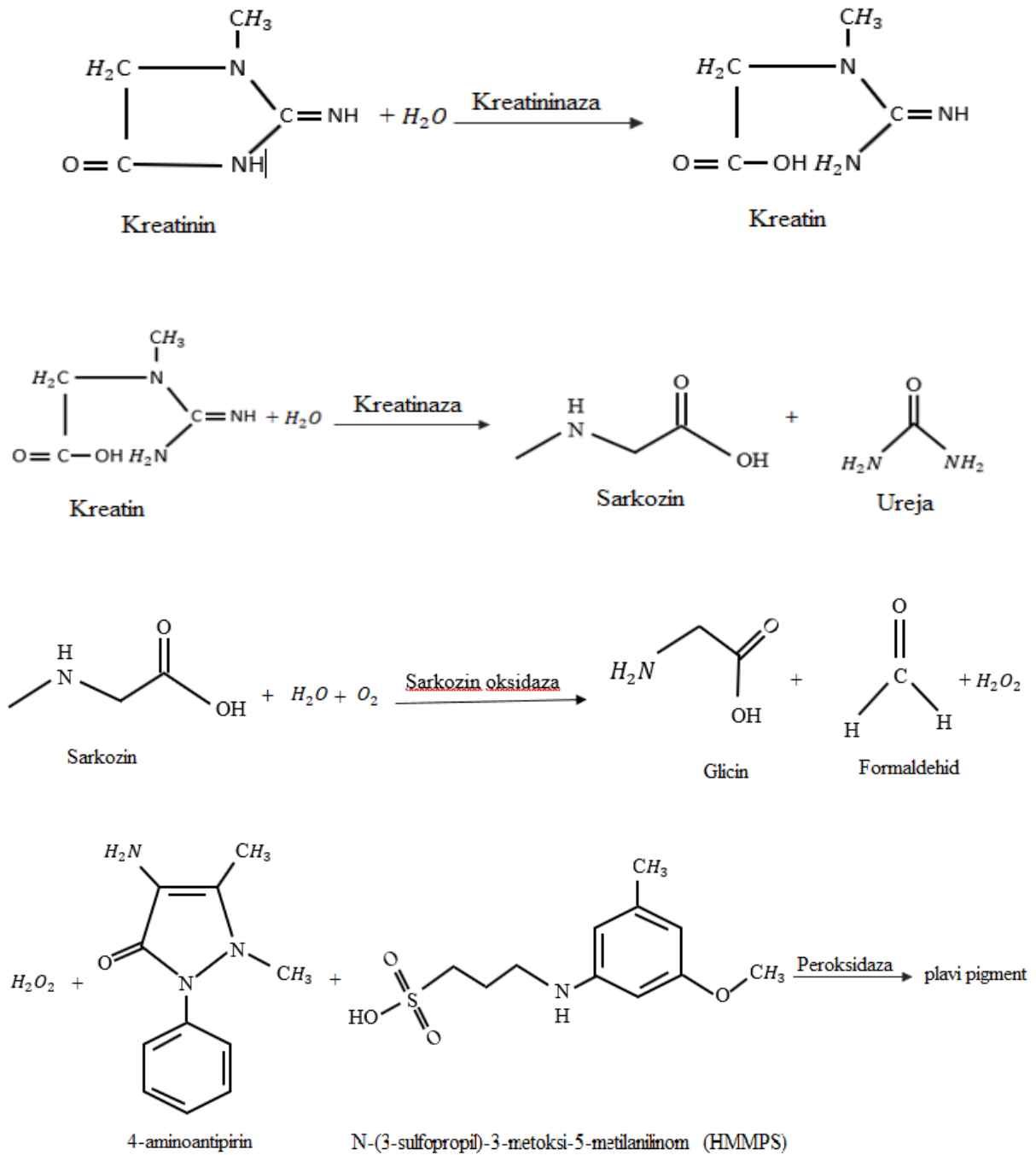
Reakcijski pufer koji se koristi za određivanje koncentracije cistatina C sadrži čestice polistirena prekrivene anticistatinom C. Miješanjem reakcijskog pufera s uzorkom krvi dolazi do formiranja kompleksa cistatina C iz krvi i anticistatina C iz reakcijskog pufera. Tako nastale složene čestice apsorbiraju svjetlost, a turbidimetrijski se odredi količina te apsorbirane svjetlosti koja je proporcionalna koncentraciji cistatina C u uzorku (Slika 3) (20.)



Slika 3. Princip metode određivanja cistatina C imunoanalizom (shema napravljena prema podacima iz uputa za analizu cistatina C) (20).

3.3.2. Princip metode određivanja kreatinina

Koncentracija kreatinina u uzorku 24-satnog urina te serumu ispitana je enzimatskom metodom na instrumentu *Beckman Coulter AU680* (Slika 2), koristeći reagense tvrtke Beckman Coulter. Kreatinin se hidrolizira u kreatin djelovanjem enzima kreatininaze. Zatim se nastali kreatin hidrolizira u sarkozin i ureju djelovanjem enzima kreatinaze. Nakon toga enzim sarkozin oksidaza katalizira oksidativnu demetilaciju sarkozina pri čemu nastaju glicin, formaldehid i vodik peroksid. Nastali vodikov peroksid u prisutnosti enzima peroksidaze (POD) reagira kvantitativnom oksidacijskom kondenzacijom s N-(3-sulfopropil)-3-metoksi-5-metilanilinom (HMMPS) i 4-aminoantipirinom dajući plavi pigment (Slika 4). Koncentracija kreatinina razmjerna je promjeni apsorbancije pri 600/700 nm (21).



Slika 4. Shema kemijske reakcije (shema napravljena prema podacima s internetske stranice Pubchem (22)).

3.4. Statističke metode

Kategorijski podaci predstavljani su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Numerički su podaci opisani medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Ocjena povezanosti dana je Spearmanovim koeficijentom korelacije Rho. ROC (engl. *Receiver Operating Characteristic*) analiza primijenila se za određivanje optimalne granične vrijednosti, površine ispod ROC krivulje (engl. *area under the curve*, AUC), specifičnosti i osjetljivosti ispitivanih parametara. Za ocjenu statističke značajnosti dobivenih rezultata uzeo se $P < 0,05$. Za statističku analizu koristio se statistički program *MedCalc Statistical Software version 19.4.1* (*MedCalc Software Ltd*, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2020) i *IBM SPSS Statistics 23* (*IBM Corp.* Released 2015. *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0*. Armonk, NY: *IBM Corp.*).

4. REZULTATI

Istraživanje je provedeno na 50 ispitanika, od kojih je 19 muškaraca i 31 žena. Dob ispitanika je između 19 i 89 godina, a medijan dobi je 63 godine. Indeks tjelesne mase ispitanika kreće se od 19,03 kg/m² do 45,29 kg/m², a vrijednost medijana iznosi 28,87 kg/m² (Tablica 1).

Tablica 1. Osnovna obilježja ispitanika

	Medijan (interkvartilni raspon)
Spol (n) žena/muškarac	31/19
Dob (godine)	63 (54 – 72)
Visina (cm)	165 (160 – 174)
Težina (kg)	83 (70 – 92)
Indeks tjelesne mase (kg/m ²)	28,87 (26,51 – 33,63)

Najmanja vrijednost GFR-a iznosila je 6 ml/min/1,73 m², a najveća 123 ml/min/1,73m² uz vrijednost medijana od 64,5 ml/min/1,73m². Vrijednost medijana za KEK iznosi 1,35 ml/s/1,73m². Najmanja vrijednost KEK-a koju su pacijenti imali je 0,14 ml/s/1,73 m², a najveća 2,48 ml/s/1,73 m². Minimalna koncentracija cistatina C iznosi 0,58 mg/L, a maksimalna 4,02 mg/L uz vrijednost medijana od 1,18 mg/L (Tablica 2).

Tablica 2. Klinički parametri izmjereni kod pacijenata

	Medijan (interkvartilni raspon)	Minimum- maksimum
Kreatinin [$\mu\text{mol/L}$]	89 (65 – 127)	51 – 581
Brzina glomerularne filtracije [ml/min/1,73m ²]	64,5 (42,75 – 88,25)	6 – 123
Faktor tjelesne površine (FTJP) [m ²]	1,87 (1,73 – 2,07)	1,5 – 2,47
Koeficijent kreatinina [$\mu\text{mol/24h/kg}$]	136 (106,5 – 164,75)	62 – 227
Klirens endogenog kreatina [ml/s/1,73 m ²]	1,35 (0,8 – 1,71)	0,14 – 2,48
Cistatin C [mg/L]	1,18 (0,86 – 1,95)	0,58 – 4,02

Spearmanovim koeficijentom korelacije ocijenjena je povezanost dobi, indeksa tjelesne mase i laboratorijskih vrijednosti. Uočava se da je dob u negativnoj korelaciji s GFR-om, FTJP-om, koeficijentom kreatinina i KEK-om, dok ispitanici većeg indeksa tjelesne mase imaju i više vrijednosti FTJP-a ($Rho = 0,635$), a niže vrijednosti koeficijenta kreatinina ($Rho = -0,342$). Vrijednosti kreatinina u serumu više su kada su vrijednosti KEK-a niže ($Rho = -0,721$), a vrijednosti cistatina C više ($Rho = 0,856$). GFR značajno korelira s KEK-om ($Rho = 0,855$), odnosno uz više vrijednosti GFR-a ispitanici imaju i više vrijednosti KEK-a i niže vrijednosti cistatina C ($Rho = -0,893$). KEK je u značajnoj negativnoj vezi s cistatinom C, odnosno ispitanici s višim vrijednostima cistatina C imaju niže vrijednosti KEK-a i obrnuto ($Rho = -0,858$) (Tablica 3).

Tablica 3. Povezanost dobi i indeksa tjelesne mase s biokemijskim pokazateljima bubrežne funkcije te međusobna povezanost biokemijskih pokazatelja bubrežne funkcije (Spearmanov koeficijent korelacije)

	Spearmanov koeficijent korelacije Rho (P vrijednost)						
	Dob	Indeks tjelesne mase	Kreatinin	Brzina glomerularne filtracije	Faktor tjelesne površine	Koeficijent kreatinina	Klirens endogenog kreatinina
Kreatinin [μmol/L]	0,066 (0,650)	0,096 (0,510)	-				
Brzina glomerularne filtracije [ml/min/1,73m ²]	-0,365 (0,009)	-0,019 (0,890)	-0,881 (< 0,001)	-			
Faktor tjelesne površine [m ²]	-0,414 (0,003)	0,635 (< 0,001)	0,227 (0,110)	-0,006 (0,970)	-		
Koeficijent kreatinina [μmol/24h/kg]	-0,406 (0,003)	-0,342 (0,020)	0,157 (0,280)	0,026 (0,860)	0,023 (0,880)	-	
Klirens endogenog kreatinina [ml/s/1,73 m ²]	-0,418 (0,003)	-0,031 (0,83)	-0,721 (< 0,001)	0,855 (< 0,001)	0,040 (0,78)	0,394 (0,005)	-
Cistatin C [mg/L]	0,211 (0,14)	0,079 (0,58)	0,856 (< 0,001)	-0,893 (< 0,001)	0,091 (0,53)	-0,106 (0,46)	-0,858 (< 0,001)

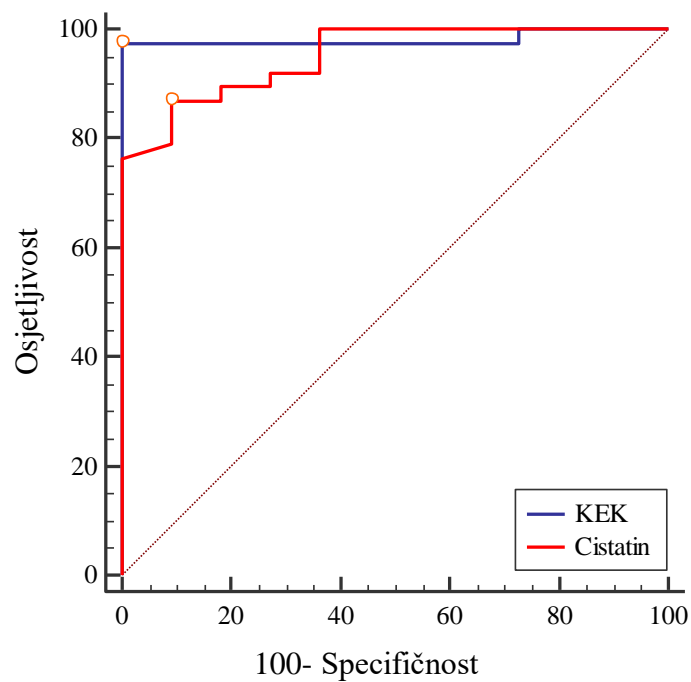
Fisherovim Z-testom provjerena je statistička značajnost razlike među dobivenim korelacijama. Između koeficijenata korelacije KEK-a i cistatina C s GFR-om nije utvrđena statistički značajna razlika ($z = -0,79$, $P = 0,430$).

Da bi se procijenile vrijednosti pojedinih parametara, korištena je metoda izračuna ROC krivulje kojom se stupnjevito mijenjaju vrijednosti koje razlučuju ispitanike s obzirom na stanje bubrežne funkcije. Ispitanici su razlučeni prema vrijednostima GFR-a pri čemu ispitanici s GFR-om $> 90 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ imaju očuvanu bubrežnu funkciju, a ispitanici s GFR-om $< 90 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ imaju oslabljenu bubrežnu funkciju. Mijenjana je granična vrijednost (engl. *cut-off point*) posebno za dio ispitanika s očuvanom bubrežnom funkcijom i posebno za one s oslabljenom bubrežnom funkcijom kako bi se stvaranjem ROC krivulje moglo objektivno utvrditi koja vrijednost najbolje razlučuje ispitanike sa smanjenom bubrežnom funkcijom od ispitanika s normalnom bubrežnom funkcijom.

Prema podacima iz ROC krivulje vidljivo je da se KEK pokazao boljim parametrom od cistatina C za procjenu bubrežne funkcije (AUC = 0,981; osjetljivost = 97,37; specifičnost = 100), ali se međusobno ne razlikuju značajno s obzirom na dijagnostičku ulogu u prepoznavanju oslabljene bubrežne funkcije (razlika u površini 0,03 uz 95 % raspon pouzdanosti od -0,03 do 0,09; P = 0,300) (Tablica 4 i Slika 5).

Tablica 4. Osjetljivost, specifičnost i AUC klirensa endogenog kreatinina i cistatina C

Parametri	Površina		Osjetljivost	Specifičnost	Točka razlučivanja (<i>cut off</i>)	Youden indeks	P
	ispod krivulje (AUC)	95 % CI					
Klirens endogenog kreatinina	0,981	0,894 – 0,999	97,37	100	$\leq 1,7$	0,97	< 0,001
Cistatin C	0,951	0,848 – 0,992	86,84	90,91	$> 0,94$	0,78	< 0,001



Slika 5. ROC analiza senzitivnosti, specifičnosti i graničnih vrijednosti klirensa endogenog kreatinina i cistatina C

5. RASPRAVA

Unatoč lako dostupnim laboratorijskim testovima, nije jednostavno postaviti dijagnozu akutnog oštećenja bubrega, osobito u početnom stadiju bolesti. Takve poteškoće nastaju zbog toga što se serumske koncentracije do sada korištenih markera bubrežnog oštećenja i brzina glomerularne filtracije mijenjaju tek nakon što se bubrežna funkcija smanji za 25-50 % (8). Uzrok tomu je vrlo dobar funkcionalni kapacitet nefrona i činjenica da čovjek može normalno živjeti i s polovičnim brojem nefrona, odnosno s jednim bubregom. Iz tog razloga, koncentracija kreatinina u serumu nije dovoljno osjetljiva za dijagnosticiranje blago do umjereno smanjene bubrežne funkcije koju je vrlo važno prepoznati na vrijeme. Rano dijagnosticiranje bubrežnog zatajenja osobito je važno kod starijih osoba kod kojih, unatoč smanjenoj bubrežnoj funkciji koja se gubi starenjem, vrijednosti kreatinina u serumu ne rastu zbog istodobnog gubitka mišićne mase (3).

Boljom pretragom za procjenu glomerularne funkcije od serumskog kreatinina pokazao se klirens endogenog kreatinina. Međutim, brojni su problemi vezani uz prikupljanje 24-satnog urina u svrhu određivanja KEK-a. Potreba da se prikupi cjelokupan volumen čini tu metodu vrlo nepraktičnom, osobito kod djece, ali i kod odraslih za koje je prikupljanje urina tijekom 24-sata također vrlo izazovno (10). Kako bi se ispitala svjesnost pacijenata o važnosti prikladnog prikupljanja 24-satnog urina, Miler i Šimundić proveli su istraživanje u Kliničkom bolničkom centru Sestre milosrdnice u Zagrebu (13). Rezultati njihova istraživanja ukazali su na činjenicu da unatoč tomu što je velika većina (85 %) pacijenata izjavila da su dobili jasne upute za prikupljanje urina, više od pola ispitanika nije prikupilo uzorak na ispravan način. Upravo to govori koliko pacijenti nisu svjesni da pravilno prikupljanje uvjetuje točan rezultat pretrage. Zbog toga ova vrsta uzorka, 24-satni urin, postaje sve nepouzdanija kada se govori o ispitivanju bubrežne funkcije na temelju klirensa kreatinina te je od iznimne važnosti da se pronade zamjenska pretraga kojom bi se izbjeglo komplicirano prikupljanje urina (13). Nedostatak pretrage klirensa kreatinina je što na određivanje kreatinina utječu lijekovi koji mogu smanjiti ili povećati glomerularnu filtraciju te uzrokovati analitičke interferencije tijekom postupka mjerenja enzimatskom metodom (3). Zbog svega navedenog, ovim istraživanjem nastojalo se utvrditi može li cistatin C postati zamjenska pretraga koja bi s jednakom pouzdanošću poput KEK-a utvrdila bubrežnu funkciju. Iako se do sada cistatin C pokazao kao dobra alternativa kreatininu, njegovo određivanje još uvijek nije uvedeno u kliničku praksu. Prepreka uvođenju cistatina C u laboratorijsku rutinu je nedostatak pouzdanih referentnih

vrijednosti, ali i manjak iskustva kada se govori o primjeni na široj populaciji s različitim bubrežnim oštećenjima. Kod pacijenata s bolestima štitnjače određivanje koncentracija cistatina nije pouzdano zbog utjecaja hormona štitnjače. Cistatin C lakše je odrediti jer ne interferira s hemoglobinom, bilirubinom niti lijekovima za razliku od kreatinina (9).

Primjenom statističkih metoda utvrđeni su odnosi između promatranih parametara. Varijable cistatina C i KEK-a negativno su povezane, odnosno s porastom KEK-a dolazi do porasta GFR-a, a s porastom cistatina C dolazi do pada GFR-a. Spearmanovim koeficijentom korelacije ispitana je povezanost cistatina C i KEK-a s GFR-om. Koeficijent korelacije (Rho = 0,855) i značajnost koeficijenta korelacije ($P < 0,0001$) ukazuju na izvrsnu korelaciju između KEK-a i GFR-a. Koeficijent korelacije (Rho = -0,893) i značajnost koeficijenta korelacije ($P < 0,0001$) ukazuju na još bolju korelaciju između cistatina C i GFR-a. Dobiveni koeficijenti korelacije potvrđuju da su i cistatin C i KEK dobri pokazatelji bubrežne funkcije te skoro jednako dobro koreliraju s GFR-om.

Usporedbom dobivenih koeficijenata korelacije Fisherovim Z-testom provjerena je statistička značajnost razlike između dobivenih korelacija. U svrhu procjene GFR-a, između cistatina C i KEK-a nije utvrđena statistički značajna razlika ($z = -0,79$, $P = 0,43$). Iako se provedenom ROC analizom pokazalo da KEK ima veću osjetljivost (97,37) i specifičnost (100) od cistatina C čija su osjetljivost (86,84) i specifičnost (90,91) nešto manje, cistatin C može se koristiti za procjenu GFR-a budući da razlika u površini ispod krivulja promatranih parametara iznosi 0,03 i P vrijednost iznosi 0,300, što također upućuje na nepostojanje statistički značajne razlike između KEK-a i cistatina C. Ipak, ta statistički vrlo mala razlika među promatranim parametrima nema prevelik dijagnostički značaj. Odnosno, korištenjem bilo kojeg parametra za procjenu oslabljene bubrežne funkcije, cistatina C ili KEK-a, dobiju se rezultati koji imaju jednako značenje i oba govore o funkcionalnom stanju bubrega. ROC analizom utvrđene su i granične vrijednosti za KEK i cistatin C pomoću kojih se može odrediti tko ima oštećenu bubrežnu funkciju. Pa tako osobe koje imaju $KEK \leq 1,7$ ml/s/1,73 m² ili vrijednosti cistatina C $> 0,94$ mg/L imaju lošiju bubrežnu funkciju. S obzirom na dobivene rezultate, može se utvrditi da bi cistatin C mogao zamijeniti do sada korišten KEK u svrhu procjene bubrežne funkcije budući da daje dostatne dijagnostičke informacije koje su vrlo slične onima koje pruža KEK.

Iako se KEK pokazao boljim markerom bubrežne funkcije, ne može se zaključiti da je nužno bolji i u praksi. Naime, prema koeficijentu kreatinina, koji je bio određen svim pacijentima, provjerena je ispravnost prikupljenog 24-satnog urina, odnosno provjereno je je li prikupljena mokraća doista 24-satna. Čak 20 % vrijednosti koeficijenta kreatinina bilo je izvan ili na granici referentnih intervala, što upućuje na činjenicu da dobar dio uzoraka nije prikupljen na odgovarajući način. Stoga treba razmišljati o mogućim rezultatima koje bi dobili u slučaju da su svi uzorci prikupljeni na ispravan način. Ukoliko je pacijent prilikom prikupljanja uzorka ispustio i vrlo malu količinu urina, uzorak nije pravilno prikupljen, a to može rezultirati lažno sniženim vrijednostima klirensa kreatinina. Lažno snižene vrijednosti KEK-a dovode do zaključka da je bubrežna funkcija oslabljena iako je ona normalna, što zatim dovodi do pogrešnog postavljanja dijagnoze. Kako bi se ti problemi izbjegli, kao idealno rješenje nudi se određivanje cistatina C u serumu. Međutim, kako bi se još kvalitetnije procijenilo koji marker je bolji pokazatelj bubrežne funkcije, treba provesti istraživanje u koje bi bili uključeni samo ispitanici s ispravno prikupljenim uzorkom 24-satnog urina.

Budući da je broj pacijenata s bubrežnim oštećenjem u porastu, od velike je važnosti na vrijeme prepoznati slabljenje bubrežne funkcije. Uvođenje cistatina C u laboratorijsku praksu bilo bi od velike koristi jer bi uvelike olakšalo posao laboratorijskom osoblju, ali i pacijentima koji bi na taj način izbjegli zamorno uzorkovanje 24-satnog urina jer on nije potreban za određivanje cistatina C. Najvažnije od svega je činjenica da bi se na taj način smanjio broj pogrešnih rezultata i krivo postavljenih dijagnoza.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se izvesti zaključak da cistatin C daje korisne i dostatne dijagnostičke informacije za procjenu GFR-a te se može uvesti u kliničku praksu umjesto KEK-a kako bi se izbjegli problemi vezani uz prikupljanje 24-satnog urina.

7. SAŽETAK

Uvod: Bubrež je vrlo važan organ s brojnim funkcijama, ključnim za život svakog čovjeka. Zbog toga je oštećenje bubrežne funkcije vrlo važno na vrijeme otkriti. Danas se u tu svrhu određuje GFR pomoću KEK-a. Međutim, zbog korištenja 24-satnog urina kao uzorka za određivanje KEK-a, čije je prikupljanje komplicirano te često rezultira pogrešnim rezultatima, danas se traga za boljim markerom bubrežne funkcije. Velik potencijal ima cistatin C za čije određivanje nije potreban 24-satni urin.

Ciljevi: Procijeniti daje li cistatin C korisne i dostatne dijagnostičke informacije koje se mogu koristiti za procjenu GFR.

Nacrt studije: Presječna studija

Materijali i metode: Istraživanje je obuhvatilo 50 pacijenata s oslabljenom bubrežnom funkcijom i s bolestima koje predstavljaju rizik za razvoj bubrežnih bolesti. Uzorci krvi prikupljeni su u KBC-u Osijek. Pacijenti su uzorke 24-satnog urina prikupljali kod kuće. Koncentracija cistatin C u serumu pacijenata određena je imunoanalizom na instrumentu *Beckman Coulter AU680*. Na istom instrumentu, enzimatskom metodom, ispitana je koncentracija kreatinina u serumu i u 24-satnom urinu. Statistička obrada napravljena je koristeći programe *Medcalc* i *IBM SPSS Statistics*.

Rezultati: Koeficijent korelacije ($Rho = -0,893$) ukazuje na izvrsnu korelaciju između cistatina C i GFR-a. Koeficijent korelacije ($Rho = 0,855$) ukazuje na još bolju korelaciju između KEK-a i GFR-a. Fisherovim z testom provjerena je statistička značajnost razlike između dobivenih korelacija. Nije utvrđena statistički značajna razlika ($P = 0,43$) između cistatina C i KEK-a.

Zaključak: Cistatin C može se koristiti za procjenu GFR-a umjesto do sada korištenog KEK-a.

Ključne riječi: bubrež, cistatin C, klirens endogenog kreatinina, 24-satni urin

8. SUMMARY

THE ROLE OF CYSTATIN C IN THE ASSESSMENT OF GLOMERULAR FILTRATION RATE

Introduction: The kidneys are a very important pair of organs and have many functions crucial for the life of every human being. Therefore, it is very important to detect renal impairment in time. Today, for this purpose the glomerular filtration rate is determined using endogenous creatinine clearance. However, due to the use of 24-hour urine as a sample to determine endogenous creatinine clearance, whose collection is complicated and often causes wrong results, it is being searched for a new, more sensitive and specific marker of renal function. Cystatin C has great potential and for its determination 24-hour urine collection is not required.

Objectives: To estimate whether cystatin C provides useful and sufficient diagnostic information that can be used to assess GFR.

Study Design: Cross-sectional study

Materials and Methods: The study included 50 patients with impaired renal function and patients with risk of developing kidney disease, 31 of which were woman and 19 men. For the purposes of this study, blood samples were collected in Clinical Hospital Center Osijek. Patients collected 24-hour urine samples at their home. Cystatin C was determined in the blood sample of patients using the immunoassay method on the Beckman Coulter AU680 instrument. The concentrations of creatinine in the serum and in 24-hour urine sample were determined with the enzymatic method on the same instrument.

Results: The correlation coefficient ($Rho = -0,893$) indicates an excellent correlation between cystatin C and GFR. The correlation coefficient ($Rho = 0,855$) indicates an even better correlation between the endogenous creatinine clearance and GFR. The statistical significance of the difference between the obtained correlations was checked using the Fisher-Z transformation. No statistically significant difference ($P = 0,43$) was found between cystatin C and endogenous creatinine clearance.

Conclusion: Cystatin C can be used to assess GFR instead of the endogenous creatinine clearance, which was used so far.

Keywords: kidney, cystatin C, endogenous creatinine clearance, 24-hour urine.

9. LITERATURA

1. Crews Deidra C, Bello Aminu K, Saadi Gamal. World Kidney Day Editorial - burden, access, and disparities in kidney disease. *J. Bras. Nefrol.* 2019; 41 (1): 1-9.
2. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. 2020. Svjetski dan bubrega. Dostupno na adresi: <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/svjetski-dan-bubrega-12-ozujka-2020/>. Datum pristupa: 25.08.2020.
3. Topić E, Primorac D, Janković S, Štefanović M, i sur. *Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi*. 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018.
4. Guyton AC, Hall JE. *Medicinska fiziologija*. 13. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2017.
5. Barišić K, Čepelak I, Čvorišćec D, Dodig S, Đurić K, Fumić K, i sur. *Štrausova Medicinska biokemija*. 3. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.
6. Paunić Z, Pandja S, Vavic N, Matijašević-Cavrić G, Petrović Z. *Sačuvajte svoje bubrege*. Rajkot: Samarpan kidney foundation; 2017.
7. Nikolac Gabaj N, i sur. *Ekstravaskularni uzorci u laboratorijskoj medicini*. Zagreb: Medicinska naklada; 2019.
8. Kes P, i sur. *Akutno oštećenje bubrega*. Zagreb: Medicinska naklada; 2019.
9. Vučak J, Vučak E, Balint I. Dijagnostički pristup pacijentima s kroničnom bubrežnom bolešću. *Acta Med Croatica.* 2016; 70: 289-294.
10. Pasala S, Carmody JB. How to use... serum creatinine, cystatin C and GFR. *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 2017; 102: 37–43.
11. Risović I, Popović-Pejičić S, Vlatković V. Primjena cistatina C u određivanju jačine glomerularne filtracije kod oboljelih od tipa 2 dijabetes melitusa. *Biomedicinska istraživanja.* 2015; 6(2): 99-105.
12. Kim S, Hwang S, Jang HR, Sohn I, Ahn HS, Park HD, i sur. Creatinine- and cystatin C-based estimated glomerular filtration rate slopes for the prediction of kidney outcome: a comparative retrospective study. *BMC Nephrology.* 2019; 20:214.

13. Miler M, Šimundić AM. Low level of adherence to instructions for 24-hour urine collection among hospital outpatients. *Biochem Med.* 2013; 23: 316–320.
14. Nabavizadeh P, Ghadermarzi S, Mohammad F. New Method to Make 24-Hour Urine Collection More Convenient: A Validity Study. *Int J Nephrol.* 2014.
15. Sun D, Huang SH. Green urine. *CMAJ.* 2018; 190.
16. Bergman Marković B. Kardiorenalni sindrom: klinička slika, pravovremena dijagnoza i liječenje u obiteljskoj medicini. *Acta Med Croatica,* 2016; 207-216.
17. Sertić J, i sur. Klinička kemija i molekularna dijagnostika u kliničkoj praksi. Zagreb: Medicinska naklada; 2015.
18. Newman DJ. Cystatin C. *Ann Clin Biochem* 2002; 39: 89-104.
19. Antoljak N, Biloglav Z, Kolčić I, Gjenero- Margan I, Polašek O, Vorko-Jović A, i sur. *Epidemiologija.* Zagreb: Medicinska naklada; 2012.
20. Gentian Improving Clinical Accuracy. Cistatin C. Uputa o lijeku za imunoanalizu cistatina C na sustavima serije AU društva Beckman Coulter® (AU5800, AU680, AU480, AU2700, DxC 700 AU).
21. © 2015 Beckman Coulter: AU ® Upute za uporabu – CREATININE.
22. National Library of Medicine. Pubchem. Explore Chemistry. Dostupno na adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Datum pristupa: 30.08.2020.

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime:

Andrea Džaić

Datum i mjesto rođenja:

2. srpnja 1996., Osijek

Obrazovanje:

2018. – 2020. Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika na Medicinskom fakultetu Osijek

2015. – 2018. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Osijek

2011. – 2015. II. gimnazija Osijek

2003. – 2011. Osnovna škola Svete Ane u Osijeku