

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Andrea Džaić

**MIKROALBUMINURIJA - PROCJENA
OŠTEĆENJA BUBREŽNE FUNKCIJE
KOD DIJABETIČARA**

Završni rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Andrea Džaić

**MIKROALBUMINURIJA - PROCJENA
OŠTEĆENJA BUBREŽNE FUNKCIJE
KOD DIJABETIČARA**

Završni rad

Osijek, 2018.

Rad je ostvaren u Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku u sklopu Kliničkog bolničkog centra Osijek.

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

Rad ima 27 listova, 7 tablica i 4 slike.

Posebna zahvala mentoru doc.dr.sc. Vatroslavu Šeriću na mentorstvu i savjetima prilikom izrade završnog rada.

Velika zahvala svim djelatnicima Zavoda za kliničku laboratorijsku dijagnostiku na iskazanoj pomoći prilikom obavljanja eksperimentalnog dijela.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci i ohrabrivanju.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Glukoza u krvi.....	1
1.2. Šećerna bolest.....	1
1.2.1.. Šećerna bolest tipa I	2
1.2.2. Šećerna bolest tipa II	2
1.3. Klinička slika i dijagnoza.....	3
1.4. Komplikacije šećerne bolesti.....	4
2. HIPOTEZA	7
3. CILJEVI	8
4. MATERIJALI I METODE	9
4.1. Ustroj studije.....	9
4.2.. Ispitanici.....	9
4.3. Metode.....	9
4.3.1. Laboratorijski postupci.....	9
4.3.2. Statističke metode.....	12
5. REZULTATI	13
6. RASPRAVA	20
7. ZAKLJUČAK	22
8. SAŽETAK	23
9. SUMMARY	24
10. LITERATURA	25
11. ŽIVOTOPIS	27

POPIS KRATICA

ACTH - adrenokortikotropni hormon

GLUT4 - transporter glukoze tip 4 (engl. *Glucose transporter type 4*)

ICA - antitijela protiv stanica gušteračnih otočića (engl. *Islet cell antibodies*)

IAA - antitijela protiv inzulina (engl. *Insulin autoantibodies*)

GADA - antitijela protiv dekarboksilaze glutaminske kiseline (engl. *Glutamic acid decarboxylase autoantibodies*)

IA- 2A i IA2 β A -antitijela protiv tirozinske fosfataze (engl. *Tyrosine phosphatase autoantibodies*)

TNF α - tumorski faktor nekroze alfa (engl. *Tumor necrosis factor*)

OGTT - oralni glukoza tolerans test (engl. *Oral Glucose Tolerance Test*)

AGEs - uznapredovali krajnji produkti glikozilacije (engl. *Advanced Glycation End-Product*)

PGE1 - prostaglandin E1

PGI2 - prostaciklin

VEGF- krvožilni endotelijalni faktor rasta (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*)

TGF- β - transformirajući faktor rasta β (engl. *Transforming growth factor β*)

ACE - inhibitori angiotenzin konvertirajućeg enzima (engl. *Angiotensin-converting enzyme inhibitor*)

ARB- blokatori angiotenzinskih receptora (engl. *Angiotensin receptor blocker*)

EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *Ethylenediaminetetraacetic acid*)

1. UVOD

1.1. Glukoza u krvi

Glukoza je ugljikohidrat koji je organizmu najvažniji izvor energije, a kod čovjeka se nalazi slobodna u krvi ili pohranjena u obliku glikogena u jetri i mišićima. Njezina je koncentracija u krvi promjenjiva i ovisi o izmjeni između stanica i plazme. Regulacija normalne razine glukoze u krvi složen je proces, a jedan od najvažnijih regulatora glikemije je inzulin (1). Inzulin je hormon kojeg proizvodi endokrini dio gušterače odnosno β -stanice Langerhansovih otočića. Aktivni oblik inzulina sastoji se od lanaca A i B povezanih disulfidnim vezama, a nastaje iz inaktivnog proinzulina (2). Inzulin, za razliku od glukagona, hormona rasta, adrenalina, adrenokortikotropnog hormona (ACTH), glukokortikoida i tiroksina, smanjuje koncentracije glukoze u krvi te je njegovo lučenje regulirano pozitivnom povratnom spregom (1). Inzulin smanjuje razinu glukoze u krvi na način da povećava unos glukoze u stanice. Glukoza ulazi pasivno u eritrocite, stanice jetre i stanice središnjeg živčanog sustava pa za njihov transport nije potreban inzulin dok je za unos glukoze preko transportera glukoze tip 4 (GLUT4) u stanice mišićnog i masnog tkiva inzulin nužan (3).

1.2. Šećerna bolest

Kada dođe do poremećaja u održavanju normalne koncentracije glukoze u krvi, odnosno apsolutnog ili relativnog nedostatka hormona inzulina, nastaje metabolički sindrom koji se naziva šećerna bolest (lat. *diabetes mellitus*) (1,4). Ovaj poremećaj karakterizira kronična hiperglikemija, a manjak inzulina dovodi do brojnih promjena i poremećaja u metabolizmu ugljikohidrata, masti i proteina (4). Pri nedostatku inzulina, do hiperglikemije dolazi jer je onemogućen ulazak glukoze u stanice mišića i masnog tkiva, a to pojačava razgradnju i inhibira sintezu glikogena. Također, smanjena je glikoliza i inhibirana je sinteza, a pojačana razgradnja masti (1,4). Svjetska zdravstvena organizacija predložila je klasifikaciju ovog endokrinološkog poremećaja na šećernu bolest tipa I i šećernu bolest tipa II (1).

1.2.1. Šećerna bolest tipa I

Šećerna bolest tipa I, zvan o inzulinu ovisni dijabetes ili juvenilni dijabetes, nastaje zbog smanjenog lučenja inzulina u gušterači (5). Apsolutni manjak inzulina nastaje zbog utjecaja autoreaktivnih limfocita T, odnosno reakcije autoantitijela na komponente β -stanica otočića gušterače ili na molekulu inzulina (1). Razaranje β -stanica može neprimjetno napredovati mjesecima i godinama sve dok se masa β -stanica ne smanji na razinu na kojoj količina izlučenog inzulina nije dovoljna za nadzor količine glukoze u krvi. Do pojave simptoma dolazi tek nakon što je uništeno 90% β -stanica (5,6). Kod pacijenata sa šećernom bolesti tipa I utvrđena je imunološka infiltracija pojedinih otočića gušterače, što je potvrdilo sumnju da glavnu ulogu u autoimunoj destrukciji β -stanica imaju CD4 i CD8 T limfociti. Za razliku od pacijenata sa šećernom bolesti tipa I, pacijenti sa šećernom bolesti tipa II imaju povećane sistemske upalne markere, ali nemaju infiltraciju otočića gušterače s T limfocitima (6). Autoantitijela prisutna su u 80-90% pacijenata sa šećernom bolesti tipa I, a postoji nekoliko vrsta tih antitijela, primjerice antitijela protiv stanica gušteračnih otočića (ICA), antitijela protiv inzulina (IAA), antitijela protiv dekarboksilaze glutaminske kiseline (GADA) antitijela protiv tirozinske fosfataze (IA-2A i IA2 β A) (1,4).

Na nastanak šećerne bolesti tipa I mogu utjecati i neki virusi koji imaju sposobnost izravno ili neizravno oštetiti β -stanice. Primjeri takvih virusa su retrovirusi, citomegalovirus, rubeola, *coxsackie* i Epstein-Barrov virus (1,5). Šećerna bolest tipa I najčešće se razvija iznenada u djece i adolescenata, a čini manje od 10% svih slučajeva šećerne bolesti (1,5). Pacijenti sa šećernom bolesti tipa I nakon postavljene dijagnoze moraju nekoliko puta dnevno uzimati injekcije inzulina kako bi smanjili hiperglikemiju. Danas postoje i druge mogućnosti za pacijente koji teško kontroliraju svoju bolest, primjerice transplantacija gušterače. Također, provode se istraživanja s ciljem razvoja organa koji bi oponašao gušteraču i koji bi se mogao oduprijeti autoimunim napadima (7).

1.2.2. Šećerna bolest tipa II

Drugi tip dijabetesa je šećerna bolest tipa II, zvan adultni ili o inzulinu neovisni dijabetes, koji nastaje zbog nedovoljnog lučenja inzulina ili inzulinske rezistencije (1,5). Inzulinska rezistencija poremećaj je koji nastaje kada stanice mišića i masnog tkiva ne odgovaraju na inzulin pa glukoza ne može ući u stanice (1). Kako bi gušterača nadoknadila

smanjeni odgovor stanica na inzulin, proizvodi sve više inzulina, zbog čega su razine inzulina često vrlo visoke osobito na početku bolesti (1). U brojnim slučajevima uzrok smanjenog odgovora stanica nastaje zbog smanjene ekspresije transportera glukoze u membrani stanica mišića (2).

Početak šećerne bolesti tipa II je polagan i napreduje postupno, a otkriva se najčešće slučajno ili ostaje neotkriven. Šećerna bolest tipa II češće je zastupljena kod odraslih te čini 90-95% svih slučajeva šećerne bolesti (1,5). Međutim, kako je danas sve veći broj pretilih djece, povećana je i učestalost šećerne bolesti tipa II u mlađoj životnoj dobi. Šećernu bolest tipa II čini čak 40-50% slučajeva novootkrivenih dijabetesa u djece (5). Genetska predispozicija, pretilost i stil života utječu na nastanak ovog poremećaja. Povećana tjelesna težina znači i veću količinu visceralnog masnog tkiva, koje ima sposobnost povećati razinu plazmatskih slobodnih masnih kiselina uz pomoć tumorskog faktora nekroze alfa (TNF α). Oslobođene masne kiseline ometaju transport glukoze i aktivnost glikogen sintetaze i na taj način dovode do hiperglikemije. Uslijed toga povećava se sinteza triglicerida i glukoneogeneza u jetri (1,5).

1.3. Klinička slika i dijagnoza

Karakteristični simptomi šećerne bolesti uzrokovani su hiperglikemijom, a najčešće se manifestiraju poliurijom i polidipsijom, koje dovode do ortostatske hipertenzije i dehidracije. Također se može javiti mučnina, slabost, povraćanje te gubitak tjelesne težine (5). Prvi korak u postavljanju dijagnoze kod pacijenata s navedenim simptomima je dokazivanje hiperglikemije. Glukoza se u plazmi može određivati natašte, odnosno nakon osam do dvanaest sati gladovanja, ali i neovisno o vremenu proteklom od obroka (1,5). Drugi test koji je osjetljiviji od određivanja glukoze natašte je oralni glukoza tolerans test (OGTT). Prilikom izvođenja tog testa, pacijent popije koncentriranu otopinu glukoze i tijekom dva sata mjeri se razina glukoze u krvi i mokraći (1). Ne preporučuje se raditi OGTT za postavljanje dijagnoze šećerne bolesti tipa I i II već za dijagnosticiranje gestacijskog dijabetesa i kod pacijenata kod kojih vrijednosti glukoze natašte ne prelaze 7 mmol/L (1,8).

Uz navedene dvije pretrage kod dijabetičara određuje se i HbA1c. HbA1c je glikozilirani hemoglobin, koji nastaje posttranslacijskom modifikacijom adultnog hemoglobina. Preciznije, nastaje kovalentnim vezanjem glukoze na aminoskupine globinskih lanaca (1,8). Pokazuje prosječnu koncentraciju glukoze u krvi u posljednja dva do tri mjeseca,

odnosno za vrijeme života eritrocita (8). Vrijednosti veće od >6% ukazuju na abnormalno visoke razine glukoze jer je količina HbA1c razmjerna koncentraciji glukoze. Manje je pouzdan od prethodna dva testa, ali je zlatni standard za praćenje šećerne bolesti i što je viša njegova razina to je veći rizik za razvoj komplikacija šećerne bolesti (1,5). Vrijednosti koje upućuju na šećernu bolest, najbolje su prikazane u tablici 1.

Tablica 1. Dijagnostički kriterij za pomoć u postavljanju dijagnoze šećerne bolesti (tablica napravljena prema podacima iz Štrausove medicinske biokemije (1) i MSD priručnika (5)).

GUK (mmol/L)		OGTT u 120 min	HbA1c
natašte	nasumično	mmol/L	%
>7	>11,1	>11,1	>6

Ako pacijent ima zadovoljen bilo koji od kriterija navedenih u tablici 1., sljedeći dan mora se provesti potvrdno određivanje. Kod pacijenata s nedvosmislenom hiperglikemijom i akutnom metaboličkom dekompenzacijom nije nužno provoditi potvrdno određivanje (1).

1.4. Komplikacije šećerne bolesti

Komplikacije šećerne bolesti dijele se na akutne i kronične. Akutne komplikacije nastaju naglo i zahtijevaju hitnu intervenciju, dok se kronične razvijaju čak i godinama, polagano bez simptoma, ali mogu trajno oštetiti organe (1). U akutne komplikacije ubrajaju se hipoglikemija, dijabetička ketoacidoza, laktatna acidoza i hiperosmolalna koma (1,4). Zbog slabe kontrole bolesti nastaju kronične komplikacije koje se dijele na mikroangiopatije i makroangiopatije. U mikroangiopatije ubrajaju se retinopatije, nefropatije, neuropatije, a u makroangiopatije moždani udar, ishemijska srčana bolest i periferne vaskularne bolesti (1). Kako je danas u općoj populaciji učestalost šećerne bolesti sve veća, povećava se i učestalost komplikacija dijabetesa. Velik problem u razvijenim zemljama svijeta stvara dijabetička nefropatija koja je glavni uzrok završne faze kronične bubrežne bolesti (10). Brojni su faktori rizika koji pospešuju nastanak dijabetičke nefropatije, poput hiperglikemije, hipertenzije,

pušenja, genetske predispozicije, povišenih serumskih lipida i povećanog unosa proteina (10,11).

Dijabetička nefropatija jedan je od glavnih rizičnih čimbenika za nastanak kardiovaskularnih i srčano-žilnih bolesti te povećava rizik smrtnosti od navedenih bolesti. Karakterizirana je albuminurijom, hipertenzijom i smanjenom brzinom glomerularne filtracije (9,10). Kod dijabetičara oštećenje bubrega uzrokuje hiperglikemija koja dovodi do oštećenja mezangijskih stanica i endotela krvnih žila (5). Takvo oštećenje nastaje zbog glikoziliranja proteina, odnosno procesa u kojem se višak glukoze veže s tkivnim bjelančevinama ili esencijalnim aminokiselinama u cirkulaciji (5,10). Glikozilacija proteina dovodi do stvaranja uznapredovalih krajnjih produkata glikozilacije (AGEs), koji dovode do oštećenja krvnih žila vežući se za kolagen (10). U stanju kronične hiperglikemije dolazi i do aktivacije protein kinaze C koja dovodi do pojačanog lučenja vazodilatativnih prostaglandina, prostaglandina E1 (PGE1) i prostaciklina (PGI2), a prostaglandini povećavaju propusnost glomerularne membrane za albumin (9,10). Također, propusnost glomerularne membrane povećana je zbog smanjene ekspresije proteina nefrina, koji kontrolira propustljivost glomerularne membrane i proliferaciju podocita (10).

U dijabetičkoj nefropatiji dolazi do glomeruloskleroze i tubulointersticijske fibroze, kao posljedica hiperglikemije, koja povećava ekspresiju krvožilnog endotelijalnog faktora rasta (VEGF) u podocitima, a to uzrokuje oštećenje krvnih žila i nagomilavanje matriksa (9,10). Sustav renin-angiotenzin, VEGF, transformirajući faktor rasta β (TGF- β), prostanoidi i dušikov oksid odgovorni su za nastanak hemodinamskih promjena u bubrezima. Usljed njihove promjene poremećena je autoregulacija krvnog protoka kroz bubrege, zatim dolazi do vazodilatacije aferentne arteriole i vazokonstrukcije eferentne arteriole, što rezultira povećanjem hidrostatskog tlaka u kapilarama glomerula. Posljedica povišenog tlaka u kapilarama glomerula je hiperfiltracija i hiperperfuzija (9). Posljedica hiperfiltracije i hiperperfuzije je pojava albumina u urinu.

U većine pacijenata albumini u urinu prvi su znak dijabetičke nefropatije i rani su pokazatelj progresije bubrežnih bolesti te se najčešće određuju u pacijenata sa šećernom bolesti ili hipertenzijom (11). Upravo zbog toga, uz mjerenje glomerularne filtracije, određivanje albumina prvi je korak u postavljanju dijagnoze dijabetičke nefropatije. Količina albumina u urinu može se izraziti kao mg/L, mg/24 h ili kao omjer albumina i kreatinina (5). Svaki nalaz albuminurije treba se potvrditi u dva od tri uzorka urina u razdoblju od tri do šest

mjeseci. Hematurija, vrućica, nedavno bavljenje fizičkom aktivnošću, dehidracija te infekcije mokraćnog sustava mogu uzrokovati lažno povišene razine albumina (10).

Albumini se mogu određivati u 24-satnoj mokraći, prvom jutarnjem urinu i jednokratnom slučajnom uzorku urina. Unatoč tome što je određivanje albuminurije u 24-satnom urinu referentni postupak, zbog poteškoća prilikom prikupljanja 24-satnog uzorka, preporučuje se samo za potvrdu kod specijalističkih obrada. Zbog male intra-individualne varijabilnosti i dobre korelacije s kvantitativnom albuminurijom, preporučeni uzorak je prva jutarnja mokraća. Ako jutarnji uzorak nije moguće uzeti, prihvatljivo je određivanje omjera albumin/kreatinin u slučajnom uzorku. Albumin se u urinu može određivati pomoću reagens traka i imunokemijskim metodama. Trakice se ne koriste za postavljanje dijagnoze već za probir i samokontrolu pacijenata (8). Normalna količina albumina u urinu je do 30 mg/24 h, količina albumina od 30 do 300 mg/24 h upućuje na mikroalbuminuriju i na ranu bolest bubrega, dok količina albumina iznad 300 mg/24 h ukazuje na makroalbuminuriju i na napredovanje bubrežnog oštećenja (11). Za sprječavanje i usporavanje progresije dijabetičke nefropatije koriste se inhibitori angiotenzin konvertirajućeg enzima (ACE inhibitori) i ARB-blokatori angiotenzinskih receptora (ARB), koji djeluju zaštitno na bubrege jer snižavaju krvni tlak i usporavaju progresiju bubrežne bolesti. Njihovo uzimanje preporučuje se odmah nakon utvrđivanja mikroalbuminurije (5).

2. HIPOTEZA

Povećana razina albumina u urinu kod dijabetičara upućuje na progresiju bubrežne bolesti.

3. CILJEVI

Ciljevi ovog istraživanja bili su sljedeći:

- odrediti koncentracije glukoze u krvi i mokraći ispitanika te odrediti koncentracije HbA1c u krvi, usporediti dobivene vrijednosti zdravih ispitanika s novootkrivenim dijabetičarima tipa II
- odrediti koncentraciju albumina u mokraći ispitanika
- procijeniti težinu oštećenja bubrežne funkcije ispitanika na temelju izmjerene razine albumina u mokraći

4. MATERIJALI I METODE

4.1. USTROJ STUDIJE

Ovo istraživanje temelji se na presječnoj studiji deskriptivne prirode kojom se mjeri prevalencija određene bolesti ili nekog rizičnog čimbenika u populaciji. Presječno istraživanje je opazajni tip epidemioloških istraživanja kojima se istodobno ili u kratkom vremenskom razdoblju mjeri udio bolesnika u populaciji. Često je korištena zbog jednostavnosti, malih troškova i kratkog vremena istraživanja. Prevalencija bolesti ili nekog rizičnog čimbenika za razvoj bolesti su konačan rezultat presječne studije (13).

4.2. ISPITANICI

U istraživanju je sudjelovalo 60 ispitanika, od kojih 31 muškarac i 29 žena. Ispitanici su starosne dobi između 34 i 91 godine. Uzorci su prikupljeni od 30 zdravih ispitanika (kontrolna skupina) i 30 pacijenata sa šećernom bolesti tipa II. Za potrebe ovog istraživanja korišteni su uzorci krvi i urina, koji su prikupljeni i obrađeni u Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku u sklopu Kliničkog bolničkog centra Osijek. U obje skupine ispitanika, u uzorku krvi određeni su glukoza i HbA_{1c}, a u uzorku urina glukoza i albumin.

4.3. METODE

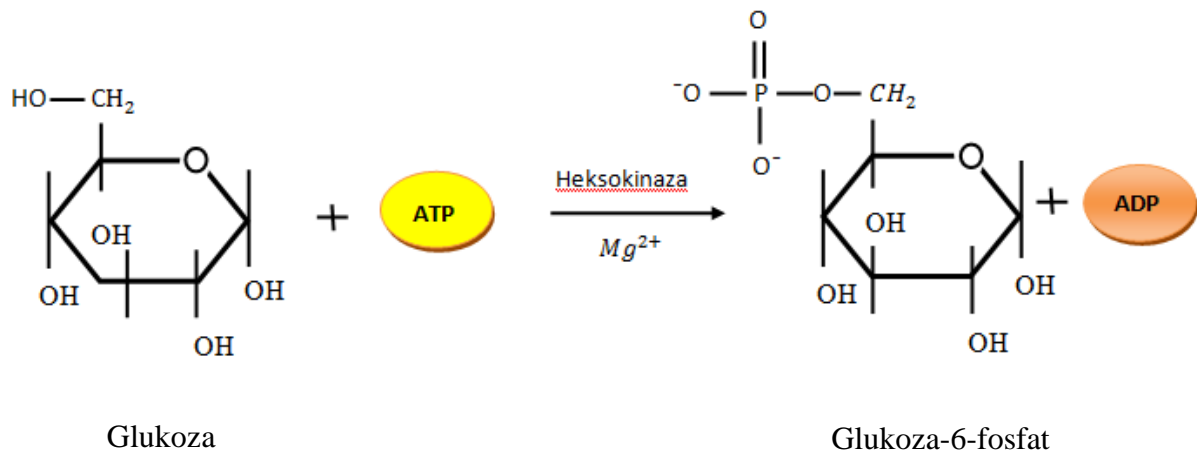
4.3.1. Laboratorijski postupci

Uzorak krvi u kojem se određuje glukoza, uzima se u epruvete s crvenim ili sivim čepom. Za mjerenje se može koristiti serum ili plazma te uzorak ne smije biti hemolitičan. Važno je da osoba bude natašte kako se nebi dobile lažno povišene vrijednosti. Kod određivanja glukozurije može se koristiti jednokratni ili 24-satni urin.

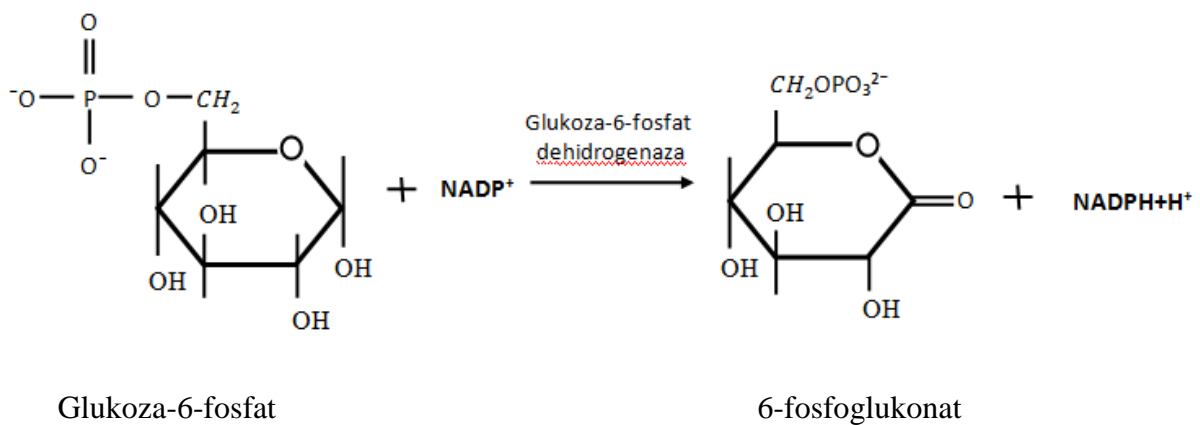
Koncentracija glukoze određena je pomoću enzimatske metode s heksokinazom u krvi i mokraći pacijenata s dijabetesom tipa II i zdravih ispitanika.

Princip metode određivanja glukoze u krvi i urinu: Glukoza se u prisutnosti ATP-a djelovanjem heksokinaze i Mg²⁺ fosforilira u glukoza-6-fosfat, koja se djelovanjem glukoza-6-fosfat dehidrogenaze i NADP⁺ oksidira u 6-fosfoglukonat. Nakon toga mjeri se povećanje

koncentracije NADPH na 340 nm. (Slika 1. i 2.) Analiza je obavljena na instrumentu *Beckman Coulter AU680* (Slika 3.), a korišten je reagens tvrtke Beckman Coulter.



Slika 1. Reakcija fosforilacije glukoze uz prisutnost enzima heksokinaze (shema napravljena prema podacima iz Štrausove medicinske biokemije (1)).



Slika 2. Reakcija oksidacije glukoza-6-fosfata uz prisutnost enzima glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (shema napravljena prema podacima iz Štrausove medicinske biokemije) (1).



Slika 3. Beckman Coulter AU680 uređaj

Princip metode određivanja HbA1c u krvi: HbA1c određuje se u punoj krvi koja je prikupljena u epruvetu s ljubičastim čepom u kojoj se nalazi antikoagulans etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA). HbA1c određen je imunoturbidimetrijskom metodom na instrumentu *Dimension ExL* (Slika 4.), tvrtke Siemens, također koristeći njihov reagens. *Dimension* uređaj mjeri i HbA1c i ukupni hemoglobin. Kod mjerenja ukupnog hemoglobina, uzorak pune krvi dodaje se u kivetu u kojoj se nalazi lizirajući reagens. Taj reagens lizira eritrocite i tako omogućuje izlazak hemoglobina iz eritrocita. Zatim se alikvot lizirane krvi prebacuje u drugu kivetu u kojoj se mjeri koncentracija ukupnog hemoglobina spektrofotometrijski na 405 i 700 nm. Za mjerenje HbA1c koristi se isti alikvot lizirane pune krvi kao i kod mjerenja ukupnog hemoglobina. U drugoj kiveti nalazi se anti-HbA1c antitijelo s kojim HbA1c stvara topljivi antigen-antitijelo kompleks. Zatim se u kivetu dodaje polihapten reagens s epitopima za HbA1c. Polihapten reagira sa suviškom anti-HbA1c antitijelima i stvara netopive komplekse koji se mjere turbidimetrijski na valnoj duljini 340 nm. Koncentracija HbA1c izražava se kao omjer HbA1c i koncentracije ukupnoga hemoglobina.

Princip metode određivanja albumina u urinu: Imunoturbidimetrijskom metodom određen je albumin u uzorku urina na instrumentu *Beckman Coulter AU680* i uz reagens *Tina-quant MAU, Roche Diagnostics*. (Slika 3.) Imunoturbidimetrijska metoda temelji se na reakciji između albumina iz uzorka i antitijela albumina antihumanog seruma. Tako nastaju imuni kompleksi koji raspršuju svjetlost, a zatim se mjeri promjena apsorbancije na 380 nm, koja je proporcionalna koncentraciji albumina u uzorku.



Slika 4. Dimension ExL uređaj, tvrtke Siemens

4.3.2. STATISTIČKE METODE

Dobiveni rezultati obrađeni su u statističkom programu *MedCalc* (*MedCalc Software, Mariakerke, Belgium*). Kolmogorov-Smirnov testom provjerena su odstupanja mjerenih kontinuiranih varijabli od normalne raspodjele. Izmjerenim vrijednostima određen je medijan i interkvartilni raspon, a pomoću Mann-Whitney U testa ispitane su razlike među skupinama. Razlike među kategoričkim varijablama ispitane su Fisherovim egzaktnim testom.

5.REZULTATI

Tablica 2. Izmjerene vrijednosti kod pacijenata sa šećernom bolesti tipa II.

	DOB	SPOL	Glukoza u krvi mmol/L	HbA1c %	Albumini u urinu mg/L	Glukoza u mokraći poz/neg
P1	52	Ž	9,8	7,9	8,5	neg(0)
P2	39	M	7,0	6,9	28,6	poz(1)
P3	34	M	8,9	7,8	261,0	neg(0)
P4	78	M	9,2	7,8	91,0	neg(0)
P5	72	M	8,7	6,8	107,7	neg(0)
P6	63	M	8,1	7,0	53,2	neg(0)
P7	82	Ž	14,2	12,5	94,6	poz(4)
P8	75	Ž	10,2	11,2	153,6	poz(1)
P9	44	M	15,1	11,9	28,8	poz(4)
P10	65	Ž	9,2	8,1	18,9	neg(0)
P11	78	M	7,8	8,0	181,4	neg(0)
P12	62	Ž	10,4	11,1	33,6	poz(1)
P13	43	M	9,8	7,9	15,9	poz(1)
P14	62	Ž	8,3	6,7	50,6	neg(0)
P15	62	Ž	10,5	11,6	12,0	poz(1)
P16	38	Ž	15,3	11,1	79,4	poz(4)
P17	54	M	13,6	9,9	33,7	poz(4)
P18	66	Ž	8,9	6,6	183,9	neg(0)
P19	72	Ž	10,3	9,9	40,6	poz(1)
P20	61	M	15,0	8,3	267,1	poz(4)
P21	91	M	12,8	11,6	20,6	poz(3)
P22	72	M	9,1	6,2	150,5	neg(0)
P23	42	M	8,1	7,0	56,0	neg(0)
P24	74	Ž	7,9	8,2	126,7	neg(0)
P25	68	Ž	13,9	9,4	61,0	poz(4)
P26	65	Ž	8,6	11,9	94,9	neg(0)
P27	72	Ž	11,2	8,4	46,3	poz(2)
P28	38	M	7,8	9,1	76,4	neg(0)
P29	67	M	12,1	7,3	45,8	poz(3)
P30	70	Ž	9,4	8,8	86,1	neg(0)

Tablica 3. Izmjerene vrijednosti kod zdravih osoba (kontrolna skupina)

	DOB	SPOL	Glukoza u krvi mmol/L	HbA1c %	Albumini u urinu mg/L	Glukoza u mokraći poz/neg
K1	66	Ž	4,2	5,1	12,2	neg(0)
K2	55	M	4,8	5,3	13,3	neg(0)
K3	47	Ž	5,4	5,7	7,9	neg(0)
K4	61	M	5,2	5,5	12,6	neg(0)
K5	64	M	5,9	5,2	15,3	neg(0)
K6	44	M	6,3	5,9	23,1	neg(0)
K7	71	Ž	4,5	5,8	12,1	neg(0)
K8	36	Ž	4,7	5,2	3,7	neg(0)
K9	60	M	5,6	5,7	8,4	neg(0)
K10	68	M	5,3	5,0	5,6	neg(0)
K11	64	Ž	4,7	5,0	10,1	neg(0)
K12	52	Ž	6,1	5,7	8,2	neg(0)
K13	36	M	5,4	5,7	11,7	neg(0)
K14	53	M	5,9	4,9	20,7	neg(0)
K15	61	M	6,1	5,5	17,1	neg(0)
K16	41	Ž	6,3	5,4	9,5	neg(0)
K17	51	Ž	5,1	5,6	12,4	neg(0)
K18	71	M	4,7	6,0	16,8	neg(0)
K19	37	M	6,2	5,6	13,4	neg(0)
K20	59	Ž	5,3	5,9	8,9	neg(0)
K21	63	Ž	4,9	5,3	5,6	neg(0)
K22	44	M	6,3	5,0	13,9	neg(0)
K23	65	Ž	5,6	5,2	7,5	neg(0)
K24	41	M	5,4	5,3	15,3	neg(0)
K25	47	Ž	5,2	5,0	13,4	neg(0)
K26	36	Ž	6,3	5,3	15,1	neg(0)
K27	68	Ž	6,1	5,9	7,3	neg(0)
K28	74	M	6,0	5,4	10,4	neg(0)
K29	56	M	6,4	6,0	21,1	neg(0)
K30	72	M	4,4	4,9	22,0	neg(0)

Istraživanje je provedeno na 60 ispitanika (31 muškarac i 29 žena), od kojih je 30 dijabetičara i 30 zdravih ispitanika (kontrolna skupina).

Tablica 4. Rezultati Kolmogorov-Smirnov testova za kontinuirane varijable uključene u obradu

Varijabla	Podskupina	Kolmogorov-Smirnov		
		KS	df	P*
Dob	Zdravi	0,172	30	0,024
	Dijabetičari	0,116	30	0,200
Glukoza u krvi (mmol/L)	Zdravi	0,180	30	0,015
	Dijabetičari	0,139	30	0,142
HbA1c (%)	Zdravi	0,169	30	0,028
	Dijabetičari	0,117	30	0,200
Albumini u urinu (mg/L)	Zdravi	0,169	30	0,029
	Dijabetičari	0,094	30	0,200

Rezultati provedenih Kolmogorov-Smirnovih testova (Tablica 4.) upućuju na statistički značajno odstupanje od normalne raspodjele kod varijabli dobi, glukoze u krvi, HbA1c, albumina u urinu za skupinu zdravih sudionika. Iz tog razloga, u svrhu provjere razlike među skupinama, koristit će se neparametrijski testovi.

Tablica 5. Raspodjela ispitanika prema spolu i promatranim skupinama (Fisherov egzaktni test)

Spol ispitanika	Broj (%) ispitanika			P*
	Kontrolna skupina (zdravi)	Dijabetičari	Ukupno	
Muškarci	16 (53)	15 (50)	31 (52)	1
Žene	14 (47)	15 (50)	29 (48)	
Ukupno	30 (100)	30 (100)	60 (100)	

Fisherov egzaktnim testom provjerena je razlika u zastupljenosti kontrolne skupine zdravih sudionika i dijabetičara na temelju spolnih razlika. (Tablica 5.) Provedeni test nije pronašao odstupanja od očekivanih frekvencija ($P = 1$).

Tablica 6. Dob ispitanika, te vrijednosti glukoze i HbA1c u krvi i albumina u mokraći (Mann-Whitney U test)

	Medijan (interkvartilni raspon)		P*
	Kontrolna skupina	Dijabetičari	
Dob ispitanika (godine)	58 (44 – 65)	65 (52 – 72)	0,040
Glukoza u krvi (mmol/L)	5,4 (4,9 – 6,1)	9,6 (8,6 – 12,1)	< 0,001
HbA1c (%)	5,4 (5,2 – 5,7)	8,25 (7,3 – 11,1)	< 0,001
Albumini u urinu (mg/L)	12,3 (8,4 – 15,3)	58,5 (33,6 – 107,7)	< 0,001

Razlika u dobi između dijabetičara i ispitanika kontrolne skupine pokazala se statistički značajnom Mann-Whitney U testom (65 god. vs 58 god., $P = 0,043$). Izmjerene vrijednosti glukoze u krvi (9,6 mmol/L vs 5,4 mmol/L, $P < 0,001$), HbA1c (8,25% vs 5,4%, $P < 0,001$) i albumina u urinu (58,5 mg/L vs 12,3 mg/L, $P < 0,001$) statistički su značajno više u skupini dijabetičara u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 6.).

Tablica 7. Kontingencijska tablica podskupine sudionika (zdravi i dijabetičari) s glukozom u krvi, HbA1c, albuminom u mokraći te glukozom u mokraći (Fisherov egzaktni test)

	Broj (%) ispitanika			P*
	Kontrola (zdravi)	Dijabetičari	Ukupno	
Glukoza u krvi				
4,2-6,4 mmol/L	30 (100)	0	30 (50)	<0,001
>6,4 mmol/L	0	30 (100)	30 (50)	
HbA1c				
<6 %	28 (93)	0	28 (47)	<0,001
≥6 %	2 (7)	30 (100)	32 (53)	
Albumini u mokraći				
<25 mg/L	30 (100)	5 (17)	35 (58)	<0,001
>25 mg/L	0	25 (83)	25 (42)	
Glukoza u mokraći				
negativno	30 (100)	15 (50)	45 (75)	<0,001
pozitivno	0	15 (50)	15 (25)	
Ukupno	30 (100)	30 (100)	60 (100)	

Rezultati glukoze u krvi podijeljeni su u dvije skupine, na rezultate od 4,2 do 6,4 mmol/L i na rezultate više od 6,4 mmol/L. Fisherovim egzaktnim testom provjerene su razlike u zastupljenosti visoke, odnosno niske glukoze između zdravih pacijenata i dijabetičara. Rezultati provedenog testa pokazali su da dijabetičari statistički značajno češće imaju visoku glukozu u krvi ($P < 0,001$).

Rezultati HbA1c podijeljeni su u dvije skupine, na rezultate manje, odnosno veće od 6%. Fisherovim egzaktnim testom provjerene su razlike u zastupljenosti visoke odnosno niske vrijednosti HbA1c između zdravih pacijenata i dijabetičara. Rezultati provedenog testa pokazali su da dijabetičari statistički značajno češće imaju visok HbA1c ($P < 0,001$).

Rezultati albumina u urinu podijeljeni su u dvije skupine, na rezultate manje odnosno veće od 25 ml/L. Fisherovim egzaktnim testom provjerene su razlike u zastupljenosti visoke, odnosno niske prisutnosti albumina u urinu između zdravih pacijenata i dijabetičara. Rezultati provedenog testa pokazali su da dijabetičari statistički značajno češće imaju visoku prisutnost albumina u mokraći ($P < 0,001$).

Fisherovim egzaktnim testom provjerene su razlike u zastupljenosti negativnog, odnosno pozitivnog nalaza glukoze u mokraći između zdravih pacijenata i dijabetičara. Rezultati provedenog testa pokazali su da dijabetičari statistički značajno češće imaju pozitivan nalaz glukoze u mokraći ($P < 0,001$) (Tablica 7.).

6. RASPRAVA

Usporedbom dobivenih nalaza, može se utvrditi da prisutnost glukoze u mokraći, povećane vrijednosti glukoze i HbA1c u krvi te albumina u urinu upućuju na prisutnost bolesti kod pacijenata. Vrijednosti su značajno veće u odnosu na kontrolnu skupinu i dokazuju da pacijenti imaju šećernu bolest. Kao što se hipotezom pretpostavilo, mikroalbuminurija može se koristiti za procjenu oštećenja bubrežne funkcije kod dijabetičara budući da su albumini u urinu nađeni samo kod dijabetičara, a kod zdravih ispitanika nisu pronađeni. Albumini u urinu dijabetičara upućuju na oštećenje bubrega, a najveće oštećenje bubrega imaju pacijenti s najvećim koncentracijama albumina u urinu.

Danas se više ne preporučuje uporaba naziva mikroalbuminurije već albuminurije jer se smatra da već one niske, ali detektibilne razine albumina u urinu, nose znatan rizik za razvoj kronične bubrežne bolesti i kardiovaskularnih oboljenja. Rizik pacijenata sa šećernom bolesti za razvitak dijabetičke nefropatije i kardiovaskularnih oboljenja povećava se kako se povećava razina izlučenog albumina u urinu (14). Rano otkrivanje mikroalbuminurije može pomoći u odgađanju razvitka dijabetičke nefropatije, stoga je važno da dijabetičari prate stanje albuminurije kako bi na vrijeme započeli s terapijom. Agresivan tretman donosi dobre rezultate kod onih dijabetičara koji su kraće vrijeme imali mikroalbuminuriju, nisku razinu glikoziliranog hemoglobina, nizak sistolički tlak, kolesterol i trigliceride (14). Tijekom praćenja stanja pacijenta sa šećernom bolesti važan faktor rizika za razvoj komplikacija šećerne bolesti je količina HbA1c. Što je veća količina HbA1c u krvi, to je veći rizik za razvoj komplikacija (1,5).

Prema preporukama Američke udruge za dijabetes, probir na albuminuriju u osoba sa šećernom bolesti tipa II, treba provesti odmah nakon postavljene dijagnoze i ponavljati jednom godišnje, dok se kod osoba sa šećernom bolesti tipa I probir provodi pet godina nakon postavljanja dijagnoze dijabetesa i ponavlja se jednom godišnje (12). Kako bi se spriječile ili usporile komplikacije dijabetesa i poboljšala prognoza bolesnika s dijabetičkom nefropatijom, preporučuje se korekcija čimbenika rizika, što podrazumijeva strogu kontrolu glikemije, kontrolu krvnog tlaka i njegovo održavanje ispod 140/85 mm Hg te održavanje proteinurije ispod 1 g/dan (10,12). Također, od velikog značaja je i bavljenje fizičkom aktivnošću, pravilna i zdrava prehrana te prestanak pušenja. Na taj način smanjuje se rizik za razvoj dijabetičke nefropatije i kronične bubrežne bolesti koji su vodeći razlozi za nadomještanje bubrežne funkcije, dijalizom i transplantacijom bubrega. Preživljenje pacijenata s dijabetičkom nefropatijom i kroničnom bubrežnom bolesti je loše jer tijekom pet godina čak

dvije trećine osoba umire. Stoga je određivanje albumina u urinu, uz reguliranje hiperglikemije i hipertenzije od iznimne važnosti jer može produžiti život pacijenta, odgoditi razvoj komplikacija i poboljšati kvalitetu njihova života (15).

7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- vrijednosti glukoze i HbA1c u krvi te albumina u urinu značajno su veće kod dijabetičara nego kod zdravih ispitanika
- niti jedan zdravi ispitanik nema glukozu u mokraći, dok većina dijabetičara ima pozitivnu glukozu u mokraći
- niti jedan zdravi ispitanik nema albumina u mokraći, dok svi dijabetičari imaju albumine u mokraći što upućuje na štetan utjecaj dugotrajne hiperglikemije na glomerule bubrega
- mikroalbuminurija može se koristiti za procjenu oštećenja bubrežne funkcije kod dijabetičara jer pod utjecajem dugotrajne hiperglikemije dolazi do prekomjernog izlučivanja albumina u urin zbog oštećenih glomerula.

8. SAŽETAK

Uvod: Najčešća kronična komplikacija dijabetesa je dijabetička nefropatija. Hiperglikemija i hemodinamske promjene u glomerulima odgovorne su za nastanak dijabetičke nefropatije. Dijabetička nefropatija jedan je od glavnih rizičnih čimbenika za nastanak kardiovaskularnih i srčano-žilnih bolesti te povećava rizik smrtnosti od navedenih bolesti. Karakterizira ju albuminurija, hipertenzija i smanjena brzina glomerularne filtracije. Albuminurija se najčešće određuje u pacijenata s dijabetesom ili hipertenzijom.

Ciljevi: Procijeniti stupanj oštećenja bubrežne funkcije ispitanika na temelju izmjerene razine albumina u urinu.

Nacrt studije: Presječna studija

Materijali i metode: U istraživanju je sudjelovalo 60 ispitanika, 30 zdravih i 30 pacijenata sa šećernom bolesti. Za potrebe ovog istraživanja korišteni su uzorci krvi i urina, koji su prikupljeni u Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku u sklopu Kliničkog bolničkog centra Osijek. Koncentracija glukoze određena je na instrumentu *Beckman Coulter AU680*, pomoću enzimatske metode s heksokinazom. HbA1c određen je u uzorku krvi imunoturbidimetrijskom metodom na instrumentu *Dimension ExL*, tvrtke Siemens. Imunoturbidimetrijom određen je i albumin u urinu, ali na instrumentu *Beckman Coulter AU680*.

Rezultati: Izmjerene vrijednosti glukoze i HbA1c u krvi te albumina u urinu značajno su povećane kod dijabetičara u odnosu na kontrolnu skupinu, što je izmjereno Mann-Whitney U testovima. ($P < 0,001$ za sve tri mjerene vrijednosti). Također, značajno više dijabetičara ima pozitivan nalaz glukoze u mokraći, u odnosu na kontrolnu skupinu ($P < 0,001$), što je izmjereno Fisherovim egzaktnim testom.

Zaključak: Pacijenti sa šećernom bolesti tipa II imaju veće koncentracije albumina u urinu što upućuje na oštećenje njihovih bubrega uslijed dugotrajne hiperglikemije.

Ključne riječi: diabetes mellitus, dijabetička nefropatija, mikroalbuminurija

9. SUMMARY

MICROALBUMINURIA - AN ESTIMATE OF KIDNEY FUNCTION IMPAIRMENT IN DIABETICS

Introduction: The most common chronic complication in patients with diabetes mellitus is diabetic nephropathy. Hyperglycemia and hemodynamic changes in glomeruli are responsible for the development of diabetic nephropathy. Diabetic nephropathy is one of the main risk factors for the development of cardiovascular diseases and it increases the risk of mortality from these diseases. Albuminuria, hypertension and reduced glomerular filtration rate are characteristic for this disorder. Albuminuria is mostly diagnosed in patients with diabetes or hypertension.

Objectives: To evaluate the degree of renal impairment based on the measured urine albumin level.

Study Design: Cross-sectional study

Materials and methods: The study included 60 respondents, 30 healthy and 30 diabetic patients. For the purposes of this study, blood and urine samples were collected at the Department of Clinical Laboratory Diagnosis within Osijek Clinical Hospital Center. The glucose concentration was determined on the Beckman Coulter AU680 instrument, using the enzyme method with hexokinase. Immunoturbidimetric method is used to determine HbA1c in the blood sample on the Siemens Dimension ExL instrument. The same method was used to determine albumin in the urine sample, but on the Beckman Coulter AU680 instrument.

Results: Measured blood glucose and HbA1c values and albumin in urine were significantly increased in diabetics compared to the control group, measured in Mann-Whitney U tests. ($P < 0.001$ for all three measured values). Also, significantly more diabetics have a positive urinary glucose concentration compared to the control group ($P < 0.001$), as measured by Fisher's exact test.

Conclusion: Patients with type II diabetes have higher concentrations of urinary albumin, which would suggest that the kidney damages was caused due to long-lasting hyperglycemia.

Keywords: diabetes mellitus, diabetic nephropathy, microalbuminuria

10. LITERATURA

1. Barišić K, Čepelak I, Čvorišćec D, Dodig S, Đurić K, Fumić K, i sur. Štrausova Medicinska biokemija. 3.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.
2. Kimball JW. Hormones of the Pancreas. Dostupno na adresi: <http://www.biology-pages.info/P/Pancreas.html>. Datum pristupa: 01.08.2018.
3. Otero YF, Mulligan KX, Barnes TM, Ford EA, Malabanan CM, Zong H i sur. Enhanced glucose transport, but not phosphorylation capacity, ameliorates lipopolysaccharide-induced impairments in insulin stimulated-muscle glucose uptake. *Shock*. 2016; 45: 677–685.
4. Severinski S, Butorac Ahel I, Božinović I. Šećerna bolest tipa 1 u dječjoj dobi. *Medicina fluminensis*. 2016; Vol. 52, No. 4, p. 467-476.
5. Ivančević Ž, Rumboldt Z, Bergovec M, Silobrčić V, Kuzman I, Štimac D, i sur., ur. MSD priručnik dijagnostike i terapije- The Merck Manual. 2. hrv. izd. Split: Placebo d.o.o.; 2010.
6. Martinov T, Fife BT. T Cell-Mediated Beta Cell Destruction: Autoimmunity and Alloimmunity in the Context of Type 1 Diabetes. *Front Endocrinol*. 2017; 8:343.
7. Hwa AJ, Weir GC. Transplantation of macroencapsulated insulin-producing cells. *Curr Diab Rep*. 2018; 18:50.
8. Vučići Lovrenčić M. Laboratorijska medicina u šećernoj bolesti: Conditio sine qua non kvalitetnog standarda zdravstvene zaštite. *Hrvatski časopis za javno zdravstvo*. 2016; Vol 12, Broj 46:28-39.
9. Janković RI, Lovčić V, Magaš S, Šklebar D, Kes P. The novella about diabetic nephropathy. *Acta Clin Croat*. 2015; 54:83-91.
10. Kos I, Prkačin I. Dijabetička nefropatija kao uzrok kronične bubrežne bolesti. *Acta Med Croatica*. 2014; 68: 375-381.
11. Basi S, Fesler P, Mimran A, Lewis JB. Microalbuminuria in Type 2 Diabetes and Hypertension. *Diabetes Care*. 2008; 31: 194-201.
12. Tziomalos K, Athyros VG. Diabetic nephropathy: New risk factors and improvements in diagnosis. *Rev Diabet Stud*. 2015; 12: 110–118.

13. Antoljak N, Biloglav Z, Kolčić I, Gjenero- Margan I, Polašek O, Vorko-Jović A i sur. Epidemiologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2012.
14. Koroshi A. Microalbuminuria, is it so important? Hippokratia. 2007; 11: 105–107.
15. Ahmad T, Ulhaq I, Mawani M, Islam N. Microalbuminuria in Type-2 Diabetes Mellitus; the tip of iceberg of diabetic complications. Pak J Med Sci. 2017; 33: 519–523.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime:

Andrea Džaić

Datum i mjesto rođenja:

02. srpnja 1996., Osijek

Obrazovanje:

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