

Dijagnostička vrijednost NGAL i hepcidina u ranom otkrivanju bubrežnog oštećenja u novorođenčadi

Mikulić, Vinka

Doctoral thesis / Disertacija

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:904488>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Vinka Mikulić

**DIJAGNOSTIČKA VRIJEDNOST NGAL I
HEPCIDINA U RANOM OTKRIVANJU
BUBREŽNOG OŠTEĆENJA U
NOVOROĐENČADI**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023.



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Vinka Mikulić

**DIJAGNOSTIČKA VRIJEDNOST NGAL I
HEPCIDINA U RANOM OTKRIVANJU
BUBREŽNOG OŠTEĆENJA U
NOVOROĐENČADI**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

prof. dr. sc. Dunja Rogić

izv. prof. dr. sc. Ivanka Mikulić

Zagreb, 2023.



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Vinka Mikulić

**DIAGNOSTIC MEANING OF NGAL AND
HEPCIDIN IN EARLY DETECTION OF
RENAL DAMAGE IN NEWBORNS**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Professor Dunja Rogić, Ph.D.

Associate Professor Ivanka Mikulić, Ph.D.

Zagreb, 2023

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Rad je izrađen u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Sveučilišne kliničke bolnice Mostar u Mostaru u sklopu doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Ovaj je doktorski rad izrađen pod voditeljstvom prof. dr. sc. Dunje Rogić i izv. prof. dr. sc. Ivanke Mikulić, u sklopu Sveučilišnoga poslijediplomskog doktorskog studija Farmaceutsko-biokemijske znanosti pri Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALA

Prije svega najiskrenije zahvaljujem svojim mentoricama prof. dr. sc. Dunji Rogić i izv. prof. dr. sc. Ivanki Mikulić na svim nesebičnim znanstvenim, stručnim i životnim savjetima, poticanju, podršci i pomoći, ali i na iskazanom povjerenju kroz sve faze stručnog i znanstvenog usavršavanja.

Hvala svim suradnicima i kolegama koji su pomogli pri izradi ovog rada na prenesenom znanju i iskustvu te ugodnom društvu, razgovorima i podršci.

Obitelji dugujem zahvalnost na dugogodišnjoj potpori. Hvala mom suprugu što je bio uz mene na ovom putu, na bezgraničnom strpljenju i podršci, a mojim najmanjima Nikoli, Davidu i Dori, rođenima u vrijeme pohađanja doktorskog studija i izrade doktorskog rada, na strpljenju i ljubavi.

Za kraj, na poseban način želim zahvaliti mojoj braći na svim riječima ohrabrenja i podrške kroz život, a najveće hvala mojoj majci koja je nakon prerane očeve smrti podigla nas troje te naučila da se rad i trud uvijek isplate.

Rad posvećujem mojim roditeljima, jer sam zbog njih ono što jesam i tu gdje jesam.

SAŽETAK

Uvod: Nedostatak specifičnoga ranog biokemijskog biljega velik je problem u dijagnostici i liječenju bubrežnih oštećenja, u prvom redu akutnoga bubrežnog oštećenja (ABO) novorođenčadi. Laboratorijska dijagnostika bubrežnih oštećenja još uvijek se dobrim dijelom oslanja na promjene koncentracije kreatinina u serumu. Međutim, kreatinin kao biljeg oštećenja bubrega ima brojne nedostatke, od kojih je najveći nedovoljna dijagnostička osjetljivost. Stoga se kontinuirano istražuju rani biokemijski biljezi koji bi bili od pomoći u ranom otkrivanju i prevenciji bubrežnih oštećenja.

Materijali i metode : U ovom istraživanju izmjerene su koncentracije biljega u urinu hepcidina i lipokalina povezanog s neutrofilnom gelatinazom (NGAL) te su uspoređene s biljezima općeg statusa bubrežne funkcije koji su trenutačno u upotrebi (kreatinin, ureja, cistatin C, eGFR). Radi što boljeg definiranja dijagnostičke točnosti izabranih biljega bubrežne funkcije ispitanici su bili podijeljeni u tri skupine: terminski zdrava novorođenčad (N-Z, N = 120), novorođenčad s akutnim bubrežnim oštećenjem (N-ABO, N = 20) te skupina s drugim bubrežnim oštećenjima i bolestima (N-DBB, N = 23).

Rezultati: Utvrđene su veće koncentracije biljega u urinu NGAL-a i hepcidina u novorođenčadi s ABO-om u odnosu na zdravu novorođenčad. Koncentracije NGAL-a u skupini pacijenata N-DBB statistički su značajno veće u odnosu na skupinu N-Z, dok za hepcidina nije opaženo značajno povećanje koncentracije. Skupina N-ABO imala je statistički manje vrijednosti eGFR-a u odnosu na skupinu N-Z primjenom svih triju prediktivnih jednadžbi. Korištenjem cistatin C jednadžbe i CKID jednadžbe utvrđena je statistički značajna razlika u vrijednostima eGFR-a između skupine s N-ABO i N-DBB. U procjeni dijagnostičke točnosti za novorođenčad u skupini N-ABO, NGAL se pokazao najboljim izborom uz vrlo uvjerljive rezultate temeljene na ROC analizi. Dobivena je visoka vrijednost područja ispod krivulje koja je pri graničnoj vrijednosti 67,3 ng/mL iznosila 0,987, uz osjetljivost 97 % i specifičnost od 93,6 %. S druge strane, AUC vrijednost za hepcidin iznosila je 0,855, gdje granična vrijednost od 52,1 ng/mL ostvaruje jako dobru osjetljivost od 81 %, ali znatno slabiju dijagnostičku specifičnost 70 %.

Zaključak: Na temelju rezultata ovog istraživanja u novorođenčadi s ABO-om rano povećanje koncentracije navedenih biljega u urinu te mogućnost brzoga, jednostavnog, standardiziranog i automatiziranog mjerenja, u prvom redu NGAL-a, može doprinijeti realnom uključenju ovoga neinvazivnog biljega u svakodnevnu kliničku praksu.

Ključne riječi: lipokalin povezan s neutrofilnom gelatinazom (NGAL), hepcidin, cistatin C, procjena glomerularne filtracije (eGFR), bubrežno oštećenje.

ABSTRACT

Introduction

The lack of a specific early biochemical marker is a major problem in the diagnosis and treatment of kidney damage, particularly acute kidney injury (AKI) in newborns. The laboratory diagnosis of kidney damage still largely relies on changes in serum creatinine concentration. However, creatinine as a marker of kidney damage has several drawbacks, the most significant of which is insufficient diagnostic sensitivity. Consequently, there is delayed diagnosis and also limited early therapeutic intervention. Therefore, ongoing research is focused on early biochemical markers that could aid in the early detection and prevention of kidney damage. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (uNGAL) is currently underexplored but holds potential as a diagnostically important biochemical marker of acute kidney injury. Although it is not exclusively produced by one type of cells, which would make it an ideal marker, existing research suggests its high diagnostic sensitivity and specificity for early detection of kidney diseases. Another underexplored biomarker of kidney disease is hepcidin. Iron-catalyzed damage is considered one of the earliest events in the cascade of pathophysiological processes leading to reduced kidney function. Preliminary studies have highlighted the predictive properties of urine concentrations of NGAL and hepcidin in the development of acute kidney injury. Based on their proven presence in urine and the discovery in epithelial cells of the renal tubules and cortex, hepcidin, alongside NGAL, could assist in the early detection of kidney damage in the newborn population.

Materials and methods

The study was conducted at the University Clinical Hospital Mostar and included term-born newborns. The participants were divided into three groups: term healthy newborns (N-H, N = 120), newborns with acute kidney injury (N-AKI, N = 20), and a group with other kidney disorders and diseases (N-OKD, N = 23). For the purpose of this research, only the remaining amount of serum after routine laboratory tests was used, and urine samples were collected within 72 hours after birth. In this study, the concentrations of urinary biomarkers, such as NGAL and hepcidin, were measured and compared with the commonly used markers of overall renal function (creatinine, ureja, cystatin C). The concentration of NGAL in urine samples was quantitatively determined using a chemiluminescent immunochromatographic method (CMIA) with the Urine NGAL reagent (Abbott, Ireland) on the Architect plus ci8200 analyzer (Abbott, USA).

The concentration of hepcidin in urine (hepcidin-25) was quantitatively determined using a competitive ELISA test from DRG Instruments GmbH, Germany, with results read on the EZ Read 800 Plus analyzer from Biochrom, USA. The Architect Cystatin C reagent kit (Architect Cystatin C, Sentinel CH, Italy) was used to measure cystatin C on the Architect plus ci8200 analyzer (Abbott, Chicago, USA). Architect Cystatin C is a turbidimetric immunochromatographic test with Particle-Enhanced Turbidimetric Immunoassay (PETIA). In the study, three equations were used to estimate the glomerular filtration rate (eGFR): Schwartz equation (2009), equation based on cystatin C (2012), and CKiD equation (2012).

Results

The results of this study determined higher concentrations of urinary biomarkers NGAL and hepcidin in newborns with acute kidney injury compared to healthy newborns. The concentrations of uNGAL in patients with other kidney diseases were also significantly higher compared to healthy newborns, while no significant increase in hepcidin concentration was observed. The concentrations of uNGAL and hepcidin in urine of healthy newborns were not dependent on gestational age, postnatal age, Apgar score, or birth weight. An increase in the concentrations of uNGAL and hepcidin was observed on the first postnatal day in the group of newborns with AKI, while creatinine showed the highest concentration increase on the third day. A weak correlation between urinary biomarkers NGAL and hepcidin was also observed. Newborns with acute kidney injury had statistically lower eGFR values compared to healthy newborns using all three predictive equations. When using the cystatin C equation and CKiD equation, a statistically significant difference in eGFR values was found between the N-AKI and N-OKD groups. In terms of diagnostic accuracy for newborns in the N-AKI group, uNGAL proved to be the best choice in this study, with highly convincing results based on ROC analysis. The obtained high area under the curve (AUC) value for uNGAL was 0,987, with a cutoff value of 67,3 ng/mL, achieving a sensitivity of 97% and a specificity of 93.6%. On the other hand, the AUC value for hepcidin was 0,885, with a cutoff value of 52,1 ng/mL, resulting in a high sensitivity of 81% but significantly lower diagnostic specificity of 70%.

Conclusion

Early diagnosis of kidney diseases in newborns, especially acute kidney injury, could be significantly improved by using urinary biomarkers considering that it is a non-invasive and readily available biological sample that best reflects the state of the kidneys and urinary system. Based on the results of this study, the early increase in urinary biomarker concentrations and

the possibility of rapid, simple, standardized, and automated measurement, particularly of uNGAL, can in newborns with acute kidney injury contribute to the practical integration of this non-invasive biomarker into daily clinical practice.

Keywords: neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), hepcidin, cystatin C, estimated glomerular filtration rate (eGFR), renal damage.

SADRŽAJ

1. UVOD	10
1.1. Građa i funkcija bubrega	11
1.2. Fiziološke značajke novorođenčeta	13
1.3. Dijagnostika bubrežne bolesti u novorođenčadi	14
1.4. Akutno bubrežno oštećenje u novorođenčadi	17
1.5. Lipokalin povezan s neutrofilnom gelatinazom	21
1.5.1. Dijagnostičko značenje lipokalina povezanog s neutrofilnom gelatinazom	24
1.5.2. Značenje lipokalina povezanog s neutrofilnom gelatinazom a u dijagnostici bubrežne bolesti	25
1.5.3. Metode određivanja koncentracije lipokalina povezanog s neutrofilnom gelatinazom	27
1.6. Hepcidin	31
1.6.1. Dijagnostičko značenje hepcidina	34
1.6.2. Hepcidin u dijagnostici bubrežne bolesti	36
1.6.3. Metode određivanja koncentracije hepcidina	36
1.7. Cistatin C	37
1.7.1. Dijagnostičko značenje cistatina C	39
1.7.2. Cistatin C u dijagnostici bubrežne bolesti	39
1.7.3. Metode određivanja koncentracije cistatina C	40
1.8. Kreatinin kao kasni biljeg akutnoga bubrežnog oštećenja	41
1.8.1. Dijagnostičko značenje kreatinina	42
1.8.2. Metode određivanja koncentracije kreatinina	42
1.9. Prediktivne jednadžbe procjene glomerularne filtracije	43
2. OBRAZLOŽENJE TEME	46
2.1. Hipoteza i ciljevi istraživanja	47
3. MATERIJALI I METODE	49
3.1. Ispitanici	50
3.2. Uzorci	51
3.3. Metode	52
3.4. Statistička analiza	54
4. REZULTATI	56
4.1. Osnovne kliničke karakteristike ispitanika	57
4.2. Koncentracije biokemijskih biljega po skupinama	60
4.3. Procjena brzine glomerularne filtracije	64

4.4.	Provjera značajnosti razlika u koncentraciji biljega i vrijednosti eGFR-a među trima skupinama	68
4.5.	Ispitivanje međusobne povezanosti koncentracija izmjerenih biljega.....	70
4.6.	Dijagnostička točnost NGAL-a i hepcidina.....	74
4.7.	Referentni interval.....	79
5.	RASPRAVA	80
6.	ZAKLJUČCI	100
7.	LITERATURA.....	103
8.	POPIS KRATICA	124
9.	ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA.....	128
10.	PRILOG	130

1. UVOD

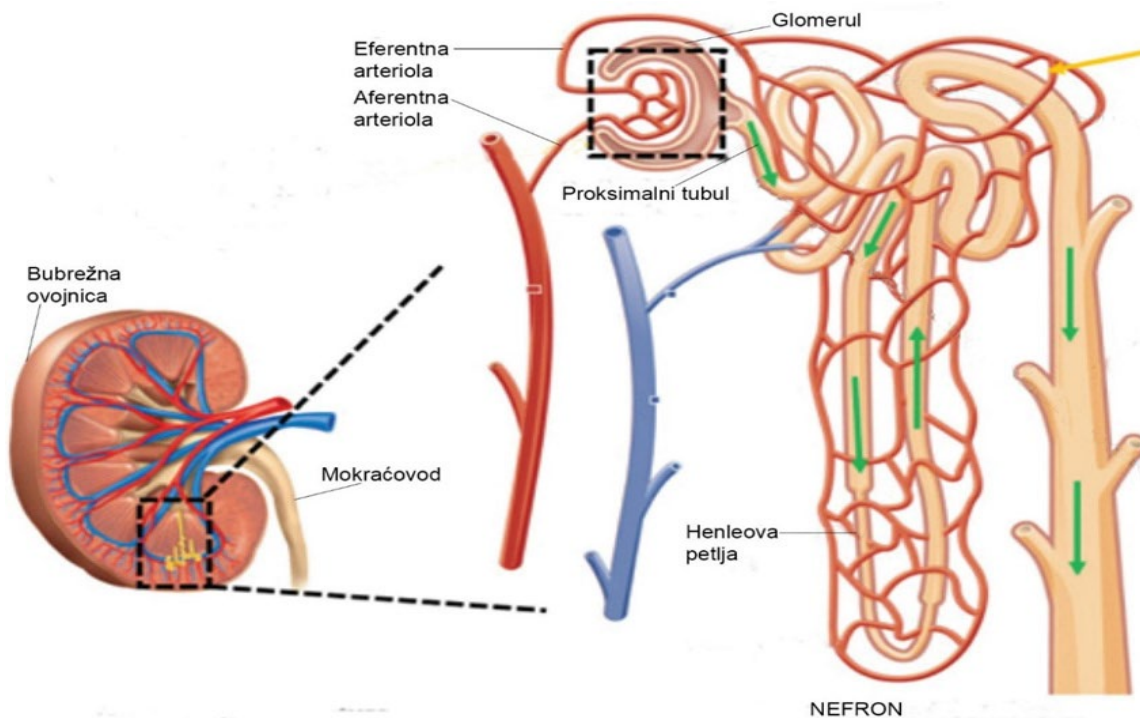
1.1. Građa i funkcija bubrega

Tijekom embrijskog razvoja čovjeka razlikuju se tri faze razvoja bubrega (lat. *ren*, gr. *nephro*) koje se vremenski djelomice podudaraju. Prva je od njih rudimentarna i afunkcionalna, u drugoj fazi između 5. i 8. tjedna razvoja može se kratko izlučivati urin, a oko 12. tjedna fetalnog života bubreg počinje normalno funkcionirati. Urin se odvodi u amnijsku šupljinu gdje se miješa s amnijskom tekućinom. Fetus je guta, a bubrezi ponovno stvaraju urin (1). Tijekom fetalnog života bubrezi ne izlučuju otpadne tvari jer tu funkciju obavlja posteljica. Bubrezi zapravo nakon poroda poprimaju ekskrecijsku, endokrinu i metaboličku funkciju. Glavna je funkcija ekskrecijska i ona je zaslužna za održavanje stalnog sastava i volumena tjelesnih tekućina. Endokrina je funkcija izlučivanje hormona eritropoetina, renina, prostaglandina, kinina te 1,25-dihidroksikolekalciferola ili aktivnog oblika vitamina D. Glavna je uloga metaboličke funkcije izlučivanje određenih toksičnih tvari (npr. amonijaka), kao i u inaktivaciji pojedinih biološki aktivnih tvari (inzulin, gastrin) (2,3).

Bubrezi su parni organi u obliku zrna graha smješteni retroperitonealno u lumbalnom dijelu između 12. torakalnog i 3. lumbalnog kralješka (Slika 1.). Površina bubrega glatka je i crvenosmeđa te obavijena vezivnom čahuricom, tzv. *capsula fibrosa*. Oko vezivne čahure nalazi se sloj masnog tkiva, tzv. *capsula adiposa*. Iznad masne čahure nalazi se perirenalna ovojnica, *fascia renalis* (Gerotova fascija). Ona ima dva lista, prednji i stražnji. Bubreg je s prednje strane prekriven i potrbušnicom (peritoneumom), a sa stražnje se strane nalazi pararenalno masno tkivo. Na medijalnom je rubu bubrega udubina koja se zove bubrežna nakapnica kroz koju prolaze bubrežna arterija, vena, limfne žile, živci i mokraćovod (4). Bubrežna srž građena je od bubrežnih piramida čiji vršci strše u zatone bubrežne čašice. U oba bubrega ulazi bubrežna arterija koja se grana do aferentnih arteriola nastavljajući se u glomerularne kapilare. Distalni krajevi kapilara u svakom se glomerulu udružuju i čine eferentnu arteriolu koja se nastavlja u peritubularne kapilare koje okružuju bubrežne kanaliće (5).

Osnovna građevna jedinica bubrega je nefron. Broj nefrona postupno se smanjuje zbog bubrežnog oštećenja, bolesti ili normalnog procesa starenja te se nefroni ne mogu ponovno stvarati ili regenerirati. Građa nefrona prikazana je na Slici 1. Svaki se nefron sastoji od klupka kapilara koje se naziva glomerul i sustava dugačkih kanalića tubula. Krv ulazi u glomerul aferentnom arteriolom, a odlazi iz njega eferentnom arteriolom. Glomerularne kapilare prekrivene su epitelnim stanicama, a cijeli je glomerul uložen u Bowmanovu čahuru. Glomerularna membrana funkcionalno se ponaša kao porozna membrana, s porama promjera 7 – 10 nm, kroz koju se iz plazme, osim vode, filtriraju i druge molekule. Dakle, u filtriranoj

tekućini koja prelazi iz glomerularnih kapilara u lumen Bowmanove čahure pa u lumen tubula nalaze se svi sastojci plazme osim proteina veće molekularne mase. Filtracija je određena filtracijskim tlakom koji čini gradijent između tlaka u glomerularnim kapilarama i Bowmanovoj čahuri, umanjen za koloidno-osmotski tlak proteina plazme. Koncentracija tvari u krvi koje se iz organizma izlučuju urinom (ureja, kreatinin) izravno je ovisna o brzini glomerularne filtracije. Zatim se krv dalje filtrira u proksimalni kanalić.



Slika 1. Građa bubrega i nefrona. *Preuzeto i prilagođeno prema Wang.J i sur.(3)*

Iz proksimalnog kanalića slijedi prijelaz u Henleovu petlju i distalni kanalić. Distalni kanalići slijevaju se u sabirne kanaliće u kojima dolazi do reapsorpcije korisnih i važnih tvari koje se ne izlučuju iz organizma. U bubrežnim se tubulima aktivnim i pasivnim procesom neke tvari iz glomerularnog filtrata reapsorbiraju gotovo u potpunosti (glukoza, aminokiseline, albumini), neke većim dijelom (Na, K, Ca, Cl itd.), neke slabo (ureja, mokraćna kiselina), a neke vrlo slabo ili nikako (kreatinin, strane tvari poput nekih lijekova, inulin i sl.), a reapsorbira se i veći dio vode. Bubrežni kanalići skupljaju se u bubrežnu čašicu koja se ulijeva u bubrežnu nakapnicu te se nastavljaju u mokraćovod. Završni filtrat koji je nastao prolaskom kroz tubule naposljetku postaje urin koji mokraćovodima dolazi do mokraćnog mjehura.

Osim što izlučuju štetne i nepotrebne tvari iz organizma, bubrezi reguliraju acidobazični status. Bubrežni kompenzacijski mehanizam sprječava da organizam ostane bez bikarbonata te tako

čuva organizmu potrebne baze. Nadzor nad pH provodi se reguliranjem količine reapsorbiranih bikarbonatnih iona i izlučenog H^+ (5, 6).

1.2. Fiziološke značajke novorođenčeta

Novorođenče je prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije dijete u prvih 28 dana života. To je razdoblje u kojem se dijete svim organskim sustavima prilagođava životu izvan majčina tijela. Terminski zdravim novorođenčetom¹ smatra se novorođenče rođeno između 37. i 42. tjedna trudnoće koje fiziološkim funkcijama te rastom i razvojem kao i ustaljenim mjerama opsega lubanje, tjelesne mase i duljine odgovara standardima populacije te ne pokazuje malformacije niti metaboličke smetnje. U prvoj minuti nakon porođaja takvo novorođenče dobiva tzv. Apgar ocjenu 8 – 10. Zapravo Apgar ocjena predstavlja sustav bodovanja procjene vitalnosti novorođenčeta. Uključuje pet elemenata. Svakoj sastavnici se dodjeljuje nula, jedan, ili dva boda, što se u konačnici zbroji. Najveća Apgar ocjena je deset, a najmanja nula. Standardno je postupak vitalnosti napraviti dva puta, nakon prve i pete minute. Bodovanje se provodi prema Apgar-ljestvici: disanje, srčana akcija, boja, refleksna podražljivost, tonus mišića. Apgar ocjena 5-7 znak je umjerene asfiksije. Ocijena 3, 4 znak je teške asfiksije koja obično zahtijeva reanimaciju. Ocjena 0, 1 i 2 znak je najtežeg oblika asfiksije koji zahtijeva agresivnu reanimaciju. Poslije presijecanja pupčane vrpce dijete počinje samostalno disati. Zdravo eutrofično novorođenče rađa se s težinom između 3000 i 4200 g. Duljina terminski donešenog novorođenčeta kreće se između 49 i 52 cm. Tijekom prvih tri do pet dana poslije rođenja dijete u prosjeku izgubi 7 % svoje rodne težine zbog izbacivanja mekonija, urina i zbog premalog unosa tekućine u odnosu na gubitke. Gubici tekućine urinom, mekonijem i nevidljivom perspiracijom veći su od unosa sisanjem. Taj fiziološki pad uspostavom laktacije nadoknađuje se u pravilu između 10. i 14. dana života. Novorođenačka dob obilježena je promjenama kojima je cilj prilagođavanje novorođenčeta izvanmaterničnim uvjetima života, tj. prilagođavanje vitalnih funkcionalnih sustava kao što je disanje, protok krvi, termoregulacija i probava. Za to je potrebno određeno vrijeme: za ventilaciju pluća nekoliko minuta, za cirkulaciju oko 24 sata, za ekstrakciju bilirubina nekoliko dana, a za metaboličke i imunosne funkcije i nekoliko mjeseci. Da bi pluća preuzela svoju funkciju, tekućina koja je do trenutka rođenja ispunjavala pluća mora biti uklonjena, plućne se alveole moraju trajno ispuniti zrakom,

¹ "Terminsko i zdravo novorođenče je začeto od strane zdravih roditelja, iz trudnoće koja je imala uredan tijek, dovršena na vrijeme (između 37. i 42. tjedna trudnoće), porodom koji je spontan, vaginalan i koji je protekao bez komplikacija", Mardešić D. Pedijatrija. Školska knjiga. Zagreb, 1989.

protok krvi kroz pluća mora se povećati šest do deset puta, centri za disanje u mozgu moraju preuzeti svoju funkciju. Novorođenčad rođena poslije 36. tjedna trudnoće bolje su prilagođena održavanju acidobazične ravnoteže zbog zrelijih regulacijskih mehanizama. Imaju stabilno prilagođen fiziološki prijelaz iz fetalnog života u vanjski okoliš, a acidobazična ravnoteža najviše se održava respiracijskim bržim sustavom te sporijim puferskim sustavima u bubrezima. Prijelazna faza novorođenačkog krvotoka obično traje od 4 do 12 sati. Obilježena je uspostavom funkcionalnoga plućnog krvotoka, tj. povećanjem parcijalnog tlaka kisika, snižavanjem parcijalnog tlaka ugljikova dioksida te mehaničkim širenjem plućnih kapilara koje nastaje otvaranjem alveola. Definitivno prilagođavanje krvotoka počinje zatvaranjem Botallova duktusa oko 24 sata nakon rođenja.

Novorođenče mokri u pravilu neposredno nakon rođenja, a poslije toga mogu proći i 24 sata da ne bude mikcije i ta je pojava normalna. Urin novorođenčeta sadržava često veće količine kristala urata koji mogu rezultirati ciglasto-crvenkastom bojom urina, što nema kliničkog značenja i nije razlog za zabrinutost. Crijeva novorođenčeta ispunjena su ljepljivom bezmirisnom crno-zelenom masom, tzv. mekonijem, koji bude izlučen u prvih 12 sati nakon poroda. Tijekom prvih 24 sata potreban je pojačani nadzor nad novorođenčetom koji obuhvaća: kontrolu pupka (zbog krvarenja), mjerenje tjelesne temperature (moguća povišena temperatura ili pothlađivanje), kontrolu eventualnog povraćanja (moguće povraćanje progutane sluzi, sekreta i plodove vode, pa postoji opasnost od aspiracije), promatranje i mjerenje disanja – tip i frekvencija, kontrola izbacivanja mekonija – prve stolice, kontrola mokrenja, te praćenje dojenja (2).

1.3. Dijagnostika bubrežne bolesti u novorođenčadi

Bubrezi novorođenčeta razlikuju se morfološki i fiziološki od zrelog organa. Sistemske krvne tlak kod rođenja je nizak, a intravaskularna rezistencija visoka zbog čega je vrlo niska perfuzija bubrega. Hipoperfuzija u kombinaciji s ograničenom površinom za filtraciju glavni je razlog vrlo smanjene glomerularne filtracije (engl. *glomerular filtration rate*, GFR) koja se kod novorođenčadi kreće oko 20 mL/min/1,73 m². Sve to ograničava bubrežne funkcije, posebice homeostazu vode i elektrolita te izlučivanje otpadnih tvari. Tubularna funkcija brže sazrijeva i učinkovitija je u toj dobi (7). Pri rođenju bubrezi preuzimaju funkciju, ali treba vremena da „sazriju“. Volumen urina u novorođenčeta do 2. dana života iznosi 15 – 60 ml/dan. Osim prirođenih anomalija, kod novorođenčadi je česta urinska infekcija koja je rezultat ulaska crijevne flore u mokraćni sustav preko uretre ili ponekad majčine urinske infekcije (8). Bolesti

bubrega novorođenčadi mogu se očitovati specifičnim, ali i nespecifičnim kliničkim znakovima, zbog čega je ključna pravodobna rana dijagnostika bolesti. U današnjoj kliničkoj praksi proces postavljanja dijagnoze akutnoga bubrežnog oštećenja (ABO) između ostalog svakako uključuje mjerenje koncentracije serumskog kreatinina te procjenu glomerularne filtracije (engl. *estimated glomerular filtration rate*, eGFR)(9).

Laboratorijske pretrage i radiološki pregledi upućuju na dijagnozu bolesti bubrega. Pregled urina daje podatke za dijagnostiku različitih bubrežnih poremećaja. Laboratorijska obrada obuhvaća fizički i kemijski, mikroskopski te mikrobiološki pregled urina. Početak laboratorijske dijagnostike uvijek je kvalitativni pregled urina: fizikalni, kemijski (test-traka) i mikroskopski pregled. Test-traka za procjenu funkcije bubrega najčešće uključuje određivanje pH, relativnu gustoću urina, dokazivanje hemoglobina, proteina te leukocita, nitrita, ketonskih tijela i urobilinogena. Pregled urinskog sedimenta, pripremljenoga i pregledanog na standardiziran način, doprinosi potvrdi prisutnosti bubrežnoga oštećenja.

Funkcija bubrega može se ispitati rutinskim biokemijskim pretragama u uzorcima seruma i urina te procijenom GFR-a. Biokemijski testovi u urinu podrazumijevaju određivanje elektrolita, kreatinina i albumina. Procjena brzine GFR-a podrazumijeva određivanje koncentracije kreatinina u serumu i urinu. Nažalost, kreatinin je iz više razloga, odgođeni/kasni i nepouzdan pokazatelj GFR-a. Naime, na koncentraciju kreatinina u serumu utječe nekoliko nebubrežnih čimbenika kao što su: dob, spol, mišićna masa, metabolizam mišića, lijekovi, hidratacija i tubularna sekrecija, a osim kod oštećenja bubrega koncentracija se mijenja i u stanju šoka, dehidracije, eklampsije i rabdomiolize (10). Zatim, akutna i kronična patološka bubrežna stanja mogu postojati bez porasta koncentracije kreatinina u serumu, zbog koncepta bubrežne rezerve (procjenjuje se da više od 50 % funkcije bubrega mora biti izgubljeno prije nego što se poveća koncentracija kreatinina u serumu) (9). Treće, koncentracije kreatinina u serumu ne odražavaju istinsko smanjenje GFR-a u akutnom okruženju jer mora proći nekoliko sati ili dana kako bi se uspostavila nova ravnoteža između pretpostavljene stalne sinteze i smanjenog izlučivanja kreatinina. Četvrto, povećanje koncentracije kreatinina u serumu kasni je pokazatelj funkcionalne promjene GFR-a jer zaostaje za bitnim strukturnim promjenama koje se javljaju u bubrezima tijekom rane faze oštećenja bubrega (11).

Slikovne dijagnostičke metode koje se koriste za otkrivanje poremećaja strukture i/ili funkcije bubrega uključuju ultrazvučni pregled mokraćnog sustava. Ultrazvuk je često zastupljena metoda za dijagnostiku bolesti bubrega jer ne zahtijeva pripremu i nema ionizirajućeg zračenja. Mogu se dijagnosticirati urođene anomalije, tumori te različite ozljede. *Color doppler* u novije vrijeme također ima zapaženu ulogu u dijagnostici bolesti bubrega u novorođenčadi. Rabi se u

dijagnostici i praćenju hemolitičko-uremičkog sindroma, u razlikovanju opstruktivne od neopstruktivne dilatacije kanalnog sustava te za procjenu renalne vaskularne rezistencijete za samu procjenu prokrvljenosti tumora bubrega. Konvencionalnim ultrazvukom može se procijeniti postojanje dilatacije kanalnog sustava, no ne može se razlikovati opstruktivna od česte neopstruktivne dilatacije nastale zbog vezikoureteralnog refluksa ili pijelonefritisa.

Jedan od dodatnih pokazatelja bubrežne funkcije jest i ureja. Koncentracija ureje u serumu također se mijenja u različitim stanjima koja nisu nužno povezana s bubrežnom funkcijom, poput gastrointestinalnih krvarenja, hipovolemije, dehidracije i šoka (12).

Pojava proteina u urinu naziva se proteinurija i posljedica je povećane propusnosti glomerula. Proteinurija je osjetljivi biljeg progresije ABO-a u kroničnu bubrežnu bolest (KBB), osobito ako se kombinira s eGFR-om. Povećano izlučivanje albumina u urinu utvrđeni je predviđatelj progresije bolesti i može upozoravati i na glomerularno i na tubulointersticijsko oštećenje. Kombiniranjem albuminurije s eGFR-a postoji mogućnost da se predvidi progresija kronične bubrežne bolesti u krajnji stadij bolesti (13).

Koncentracija mokraćne kiseline povećana je u KBB-u i može imati ulogu u patofiziologiji progresije KBB-a kroz endotelnu disfunkciju, proliferaciju stanica vaskularnog sustava glatkih mišića, povećanu sintezu interleukina-6 (IL-6) i rezistenciju na inzulin. Postoji mogućnost povezanosti mokraćne kiseline s prevalencijom i progresijom KBB-a, što nije u potpunosti potvrđeno (11).

Razvojem novih analitičkih metoda otkriveno je nekoliko novih gena i proteina koji se mogu prihvatiti kao biljezi bubrežnih bolesti, posebice ABO-a. Postignut je bitan napredak u preciznosti i brzini određivanja proteina u biološkim tekućinama, što je omogućilo početak korištenja nekih novijih biljega u urinu i ostalim fiziološkim, ljudskim i životinjskim uzorcima, koji su sažeto prikazani u Tablici 1. (12-15).

Tablica 1. Biokemijski biljezi koji se predlažu za rano prepoznavanje akutnoga bubrežnog oštećenja

Biljeg	Ozljeda s kojom je povezan
cistatin C	proksimalni tubuli
KIM-1	ishemija i nefrotoksini
NGAL	ishemija i nefrotoksini
citokini (IL-6, IL-8, IL-18)	toksična, odgođena funkcija presatka
N-acetil-beta-D-glukozaminidaza	tubuli
aktin-aktin depolimerizirajući faktor	ishemija i odgođena funkcija presatka
alfa-glutation-S-transferaza	proksimalni tubuli, akutno odbacivanje
pi-glutation-S-transferaza	distalni tubuli, akutno odbacivanje
L-FABP	ishemija i nefrotoksini
kemokini podrijetlom iz keratina	ishemija i odgođena funkcija presatka

KIM-1 (molekula bubrežnog oštećenja 1); NGAL (lipokalin povezan s neutrofilnom gelatinazom); IL (interleukin); L-FABP (jetreni protein koji veže masne kiseline)

1.4. Akutno bubrežno oštećenje u novorođenčadi

Definicija ABO-a u novorođenčeta složena je zbog brojnih specifičnosti neonatalnog razdoblja, prije svega zbog dosezanja zrelosti bubrežne funkcije te hormonske i metaboličke prilagodbe. ABO može biti posljedica bilo kojeg stanja koje smanjuje opskrbu bubrega krvlju, sprječava protok urina nakon istjecanja iz bubrega ili nastaje zbog ozljede samih bubrega. ABO je brzi pad bubrežne sposobnosti da pročišćava krv od štetnih tvari, što vodi do nagomilavanja metaboličkih otpadnih tvari u krvi. Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) 2004. godine objavljuje konsenzusnu definiciju akutnoga bubrežnog oštećenja te su ustanovljeni prvi kriteriji koji standardiziraju i klasificiraju ABO, poznati kao RIFLE kriteriji (Risk, Injury, Failure, Loss, and End-stage Kidney) (16). Zatim je provedena prva modifikacija kriterija za pedijatrijsku populaciju pod nazivom pRIFLE (17). Nakon toga ponovno su modificirani RIFLE kriteriji koje je objavila AKIN mreža, pa su poznati kao AKIN kriteriji (18).

Najnovija izmjena, koju je provela organizacija Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO), harmonizirala je RIFLE, AKIN i pRIFLE kriterije (19). Prema KDIGO definiciji, ABO označava porast serumskog kreatinina od osnovne izmjerene koncentracije za $\geq 0,3$ mg/dL ($\geq 26,52$ $\mu\text{mol/L}$), unutar 48 sati ili porast serumskog kreatinina za 1,5 mg/dL (132

$\mu\text{mol/L}$) unutar sedam dana ili diurezu manju od 0,5 mL/kg/h za šest sati. Svi navedeni kriteriji (RIFLE, AKIN, pRIFLE i KDIGO) jako su korisni za prospektivna i retrospektivna ispitivanja, ali u svakodnevnoj kliničkoj praksi njihova je upotreba ograničena jer su diureza i serumski kreatinin glavni pokazatelji akutne disfunkcije bubrega. Iako je svaka nova modifikacija nudila jedan vid dorade, nijedna se definicija zapravo nije pokazala superiornom i ne postoji opći konsenzus o tome koju definiciju i kriterije koristiti za ABO (5, 6). Međutim, dodatni problem javlja se kod novorođenčadi jer se navedeni kriteriji preporučuju za primjenu samo kod djece starije od jednog mjeseca.

Literaturni podaci navode da se incidencija pojavnost ABO-a kod kritično bolesne novorođenčadi u jedinicama intenzivne skrbi kreće u rasponu od 8 do 24 %, s time da se 1/3 slučajeva odnosi na preuranjeno rođenu djecu (20). Drugi podaci navode prevalenciju ABO-a od 17,2 do 61 %, međutim svi se ovi podaci smatraju nepouzdanima jer ne postoji konsenzus oko definicije i klasifikacije ABO-a kod novorođenčadi (21). Jedno od najtežih patoloških stanja, koje dovodi do višeorganskog zatajenja uključivši i ABO, jest sepsa i septički šok (22,23), a ostali različiti uzroci ABO-a u novorođenčadi navedeni su u Tablici 2.

Tablica 2. Uzroci akutnoga bubrežnog oštećenja kod novorođenčadi.

Prerenalno zatajenje	
<p>zmanjenje intravaskularnog volumena</p>	<p>dehidracija gastrointestinalne bolesti bubrežni ili nebubrežni gubitak soli nefrogeni ili centralni dijabetes insipidus gubitci u treći prostor (<i>sepsa, traumatizirano tkivo</i>)</p>
<p>zmanjenje intravaskularnog volumena krvi</p>	<p>kongestivno zatajenje srca perikarditis srčana tamponada</p>
Intrinzično akutno bubrežno oštećenje	
<p>akutna tubularna nekroza</p>	<p>hipoksična/ishemijska ozljeda nefrotoksični lijekovi: aminoglikozidi, nesteroidni antiupalni lijekovi NSAID (<i>non-steroidal anti-inflammatory drugs</i>) endogeni toksini: hemoglobinurija, mioglobinemija</p>
<p>intersticijski nefritis</p>	<p>antibiotici, antikonvulzivi</p>
<p>vaskularne lezije</p>	<p>kortikalna nekroza renalna arterijska/venozna tromboza</p>
<p>infektivni uzroci</p>	<p>sepsa pijelonefritis</p>
Postrenalno zatajenje	
<p>prirodene anomalije bubrega i urinskog trakta (CAKUT, <i>Congenital Anomalies of Kidney and Urinary Tract</i>)</p>	<p>opstrukcija pojedinačnog bubrega bilateralna uretralna opstrukcija</p>

Uzrok razvoja ABO-a *in utero* (prenatalno razdoblje) jest izlaganje nefrotoksičnim lijekovima (npr. inhibitori angiotenzin-konvertirajućeg enzima, blokatori receptora angiotenzina, NSAID) kao i nasljedne bubrežne bolesti. U postnatalnom razdoblju najčešći rizični faktori uključuju perinatalnu asfiksiju, preuranjeni porod, sindrom respiracijskog distresa i sepsu (23).

U nekadašnjoj praksi pratila se samo diureza, a ne i drugi parametri bubrežne funkcije, što je lako vodilo u pogrešnom smjeru te je dolazilo do propuštanja pacijenata s ABO-om. Novorođenčad često razvija neoligurični ABO, pa su Koralkar i sur. sukladno tome predložili modifikaciju AKIN definicije ABO-a koja ne uključuje stupanj diureze kao dijagnostički kriterij (24).

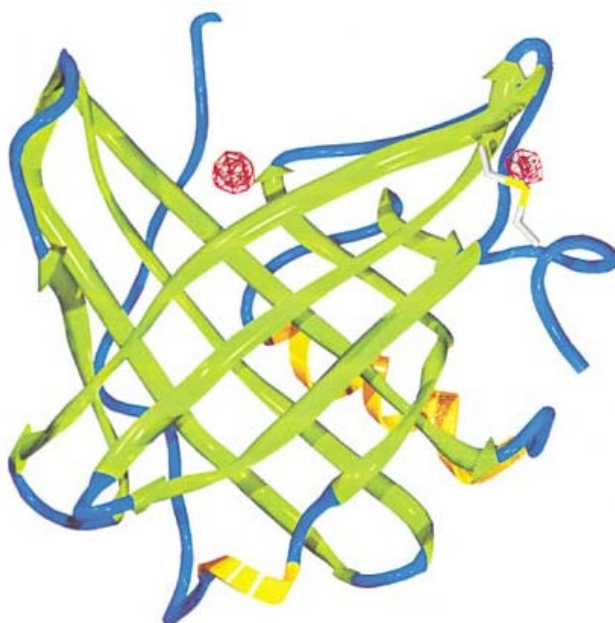
Kod novorođenčadi procjena prisutnosti ABO-a uključuje određivanje kreatinina u serumu. U prvih 48 – 72 sata života koncentracija kreatinina kod novorođenčadi zapravo odražava majčine vrijednosti kreatinina, a kako je kreatinin u serumu kasni biljeg renalne disfunkcije, samim time nepouzdan je pokazatelj akutnih promjena. Međutim, u nedostatku pouzdanijeg biljega i dalje se koristi u dijagnostici. U protekla dva desetljeća provode se intenzivnija istraživanja biljega karakterističnih za bubrežne bolesti koji će, vjeruje se, zamijeniti kreatinin te pomoći u ranoj i specifičnoj dijagnostici. Stoga se kontinuirano traži biljeg koji bi zadovoljio kriterije idealnog biljega koji uključuje (25):

- mogućnost određivanja u uzorku koji se dobiva neinvazivnim postupkom
- visoku osjetljivost detekcije čak i blage renalne disfunkcije
- široki referentni raspon koji dopušta prognozu
- specifičnost za ABO.

Podaci iz dosadašnjih istraživanja pokazuju da je po svojstvima najbliže gore navedenim kriterijima lipokalin povezan s neutrofilnom gelatinazom (engl. *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*, NGAL).

1.5. Lipokalin povezan s neutrofilnom gelatinazom

Tijekom probira genoma za nove, specifičnije biljege bubrežnih bolesti i tijekom istraživanja na embrijskim stanicama, kao rani, visoko osjetljiv i specifičan biljeg otkriven je lipokalin povezan s neutrofilnom gelatinazom (NGAL). Ljudski NGAL (poznat i kao lipokalin-2, LCN2, siderokalin, 24p3) prvobitno je opisan kao protein od 25kDa (178 aminokiselina) kovalentno vezan za gelatinazu sekundarnih granula neutrofila. Pripada obitelji lipokalina, proteina koji prenose male hidrofobne molekule kao što su lipidi, steroidni hormoni i retinoidi (26). Poput ostalih lipokalina, sastavljen je od β -ploče građene od osam β -lanaca, koja je smotana u oblik bačve (Slika 2.) (27).

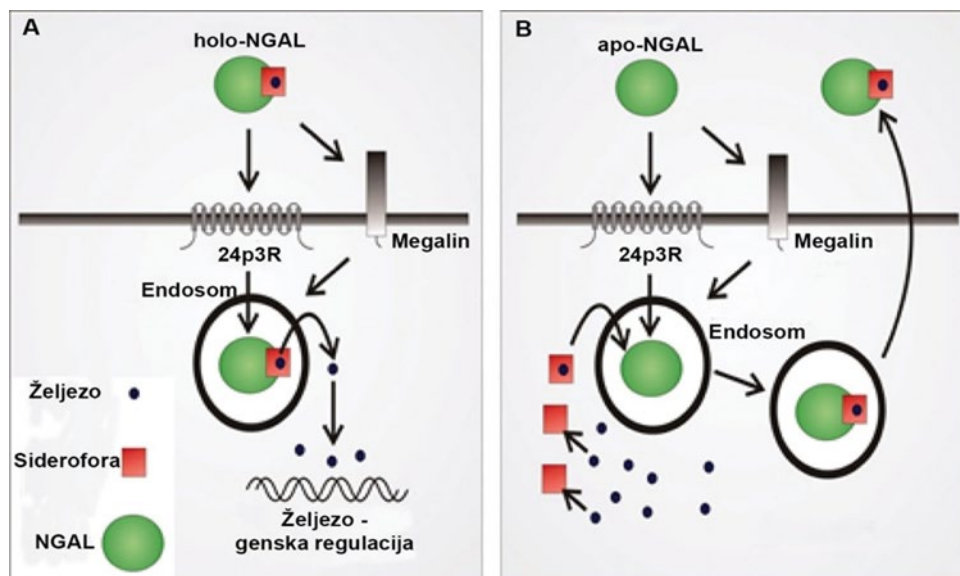


Slika 2. Struktura NGAL. *Preuzeto i prilagođeno prema Goetz, D. H. (27)*

Unutrašnjost β -bačve kod NGAL-a nešto je plića i šira nego kod ostalih lipokalina te ima mali dio s pozitivnim nabojem zbog čega najčešće veže siderofore, male molekule koje vežu željezo (sintetiziraju ih bakterije kako bi vezale željezo iz okruženja osiguravajući tako vlastite zalihe željeza). Budući da s najvećim afinitetom veže siderofore bakterija, NGAL ima bitnu ulogu u urođenoj imunosnoj sustavu. Normalna ekspresija NGAL-a u niskim vrijednostima zabilježena je u različitim tkivima odraslih osoba, primjerice u bubrezima, plućima, želudcu, debelom crijevu, prostati, maternici, jetri. Konstitutivna ili inducibilna

ekspresija NGAL-a u tkivima uključuje postojanost veznih mjesta za brojne transkripcijske faktore (npr. NFκB) na promotorskoj regiji gena za NGAL (28). Gen koji kodira NGAL, *LCN2* gen, lokaliziran je na kromosomskom lokusu 9q34.11 (29).

NGAL je protein akutne faze i njegovo je izlučivanje inducirano u mnogim tkivima koja su izložena mikroorganizmima kao i epitelnim stanicama tijekom infekcije. NGAL se otpušta iz neutrofila na mjestu infekcije, veže bakterijske siderofore te na taj način djeluje bakteriostatski (30). Uključen je i u druge procese, primjerice apoptozu te razvoj nefrona/bubrega (nefrogeneza), a tijekom pojave ozljede bubrega sudjeluje u procesu re-epitelizacije, odnosno doprinosi očuvanju funkcije bubrega, koči apoptozu i potiče diferencijaciju i proliferaciju stanica (31). Ovakav zaštitni učinak ovisan je o NGAL-potpomognutom prometu željeza, odnosno kelatiranju toksičnog željeza iz izvanstaničnog okoliša s jedne strane te isporuci željeza i siderofora do odgovarajućih unutarstaničnih mjesta (32), kako je prikazano na Slici 3. NGAL se internalizira u stanicu kao sam protein ili u kompleksu sa sideroforima koji vežu željezo. Siderofor/željezo povezano s NGAL-om (holo-NGAL) otpušta željezo u stanicu. Posredstvom receptora (24p3R ili megalin, ovisno o vrsti stanice), povezanog sa unosom NGAL-a, kiseli okoliš u endosomu potiče otpuštanje i nakupljanje željeza u citoplazmi, što rezultira regulacijom gena ovisnih o željezu. Siderofor hvata NGAL bez željeza (apo-NGAL) te uz pomoć njega inacelularno željezo transportira u izvanstanični prostor. Endosomski NGAL hvata željezo preko hipotetskih unutarstaničnih siderofora, što je popraćeno recikliranjem u izvanstanični prostor (30).



Slika 3. Shematski model s NGAL-potpomognutog prometa željeza. *Preuzeto i prilagođeno prema Schmidt-Ott KM i sur. (30)*

Bitna funkcija NGAL-a jest i stvaranje kompleksa s matriksnom metaloproteinazom-9 (MMP-9). Time je spriječena razgradnja uz tkivni inhibitor matriksnih metaloproteinaza (TIMP-1). MMP-9 zatim može potaknuti progresiju karcinoma, a konačni je rezultat razgradnja bazalnih membrana i membrana izvanstaničnog matriksa te omogućavanje invazije, angiogeneze i metastaziranja.

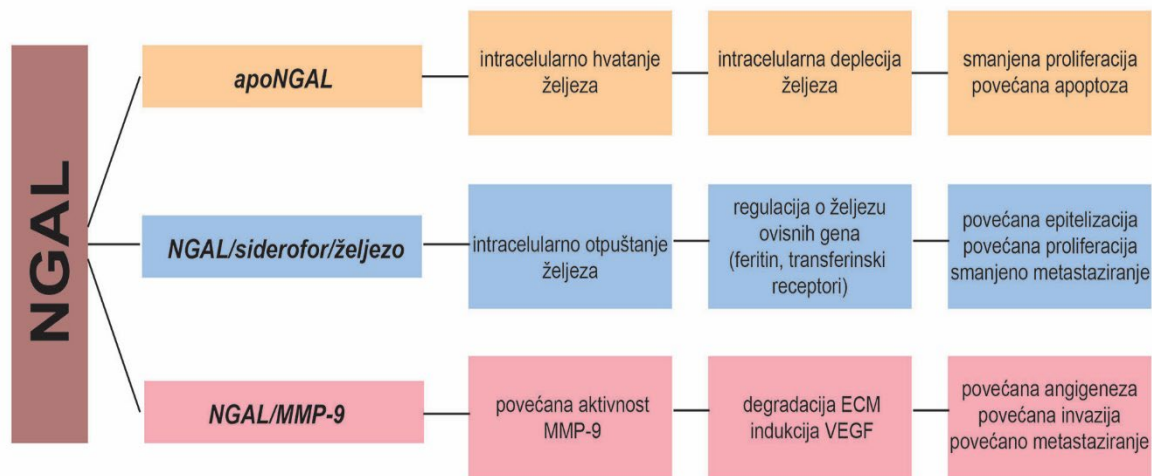
U bubrezima se NGAL sintetizira u distalnim tubulima nefrona i izlučuje se u urin preko uzlaznoga, debelog kraka Henleove petlje i sabirnih kanalića. Zbog svoje male molekularne mase NGAL se slobodno filtrira kroz bubrežne glomerule, gotovo se potpuno reapsorbira u proksimalnim tubulima s pomoću endocitoze ovisne o megalinu. U malim se koncentracijama izlučuje brzo ($t_{1/2}$ 10 – 20 minuta) i može se identificirati u urinu (33). Međutim, u slučaju oštećenja bubrega zbog npr. ishemije, upale, infekcije, nefrotoksina, sepse, akutne bubrežne ozljede ili kroničnih progresivnih promjena, NGAL se izlučuje urinom u velikim koncentracijama već unutar dva sata (34). Ozljeda proksimalnih tubula praćena je izlučivanjem povećanih koncentracija NGAL-a (do 100 x) (31). Povećana koncentracija NGAL-a u plazmi, npr. kod ABO-a, primarno nije podrijetlom iz bubrežnog tkiva, nego iz drugih organa (jetra, pluća) u kojima se znatno poveća ekspresija NGAL mRNA iz aktiviranih neutrofila, makrofaga ili drugih imunskih stanica te pada GFR-a i posljedičnog nakupljanja NGAL-a u sistemske cirkulaciji (35).

Došlo se do spoznaje da je prevladavajući oblik NGAL-a koji se secernira iz ozlijeđenih stanica distalnih tubula monomerni oblik (36), a iz neutrofila se više secernira dimerni oblik NGAL-a. Autori su razvili i metodu kojom je moguće razlikovati monomerni od dimernog oblika, što je važno u stanjima kao što je sepsa ili bakteriurija. U nekim radovima navodi se i postojanost trimernog oblika te kompleksi s drugim proteinima (37). Međutim, smatra se da samo monomerni oblik obrnuto korelira s GFR-om i izravno sa stupnjem atrofije tubula i intersticijske fibroze (36).

1.5.1. Dijagnostičko značenje lipokalina povezanog s neutrofilnom gelatinazom

Rezultati brojnih eksperimentalnih i kliničkih istraživanja pokazuju da određivanje koncentracije NGAL-a u serumu/plazmi i urinu može biti od pomoći u ranom otkrivanju ABO-a, odnosno pravodobnom postavljanju dijagnoze, pravodobnoj terapijskoj intervenciji i zaštiti bubrega od daljnjih patoloških stanja, posebice progresije u KBB. Kod odraslih pacijenata pokazalo se da određivanje NGAL-a u urinu ima visoku dijagnostičku osjetljivost (90 %) i specifičnost (99 %) u postavljanju dijagnoze ABO-a (38), ali može biti korisno i u praćenju drugih bubrežnih bolesti, primjerice lupusa nefritisa, IgA-nefropatije, policistične bolesti bubrega i dr. Također se predlaže i određivanje NGAL-a za rano predviđanje ABO-a nakon definiranih kliničkih ozljeda kao što su kardiopulmonalna prenosnica, primjena kontrasta te transplantacija bubrega. NGAL se također smatra izvrsnim biljekom kod heterogenih kliničkih situacija gdje je vrijeme ozljede bubrega nepoznato, kao i u jedinicama intenzivne njege ili u hitnim slučajevima. Različite koncentracije NGAL-a mogu upozoravati na razliku između ozbiljnih oštećenja bubrega i prerenalne azotemije (35). Rano povećanje koncentracije NGAL-a u plazmi i urinu može upozoravati na potrebu za dijalizom te dužim boravkom u bolnici zbog različitih oblika bubrežne bolesti (39). Međutim, koncentracija NGAL-a mijenja se i u mnogim neubrežnim bolestima, što može biti zbunjujući faktor ili nedostatak u smislu dijagnostike ABO-a. To su, primjerice, sistemske upalne bolesti, anemija, ishemija, bolesti mozga, kardiovaskularne, maligne i druge bolesti (40).

NGAL gen može se inducirati različitim spojevima koji potiču razvoj tumora (npr. forbol-esteri, poliomavirus, glukokortikoidi i dr.), a prekomjerno stvoreni NGAL veže se s MMP-9 sprečavajući njezinu razgradnju, odnosno povećavajući aktivnost. Rezultat je poticanje progresije karcinoma omogućeno angiogenezom, invazijom i metastaziranjem. Stoga bi NGAL mogao biti dobar dijagnostički i prognostički biljeg kod karcinoma (40). Na Slici 4. prikazana je unificirajuća pretpostavka proturječne uloge NGAL u ljudskoj biologiji (35,40).



Slika 4. Uloga NGAL-a u ljudskoj biologiji

ECM (izvanstanični matriks); MMP-9 (matriksna metaloproteinaza-9); apoNGAL (NGAL bez siderofora i željeza); VEGF (vaskularni endotelni faktor rasta)

1.5.2. Značenje lipokalina povezanog s neutrofilnom gelatinazom a u dijagnostici bubrežne bolesti

Lipokalin povezan s neutrofilnom gelatinazom pojavio se kao jedan od obećavajućih biljega ozljede bubrega te je dokazana dijagnostička i prognostička korisnost NGAL-a iz urina i plazme kod pacijenata s ABO, KBB, bubrežnom ozljedom nakon transplantacije bubrega kao i drugim bubrežnim bolestima.

Prethodno spomenuta dijagnostika ABO-a temelji se na povećanju koncentracije kreatinina u serumu i oliguriji. Međutim, kreatinin nije pouzdan biljeg tijekom rane akutne faze bubrežne disfunkcije jer njegova koncentracija u serumu ne mora biti povećana dok se ne izgubi više od 50 % funkcije bubrega. NGAL može pomoći nadvladati ta ograničenja zbog svoje sposobnosti otkrivanja oštećenja tkiva umjesto bubrežne disfunkcije i brzog povećanja kao odgovora na ABO. Istraživanja pokazuju znatna povećanja koncentracije NGAL-a u urinu i serumu s pomoću postupka Western blot-a u odraslih osoba s utvrđenim ABO-om (kod kojih je prethodno otkriveno udvostručenje koncentracije kreatinina u serumu) različitih etiologija, a u usporedbi s kontrolnim skupinama (38). Koncentracije NGAL-a u urinu i serumu povezane su s koncentracijom kreatinina u serumu i bubrežnih biopsija u bolesnika s ABO-om koji znatno

izražavaju NGAL u kortikalnim tubulima, potvrđujući NGAL kao snažan pokazatelj uspostavljenog ABO-a. Nekoliko istraživanja u bolesnika koji su podvrgnuti operacijama srca pokazuju da NGAL u serumu i urinu može biti obećavajući biljeg ABO-a. Poslijeoperacijska koncentracija NGAL-a u serumu nakon operacije srca u djece bitno je povezana s dužinom i ozbiljnošću ABO-a, kao i trajanjem boravka u bolnici i smrtnosti (41 – 43).

Koncentracija NGAL-a nakon ABO-a povećava se do 1000 puta u urinu. Koncentracija NGAL-a u urinu povezana je s opsegom i vremenom bubrežne ishemije i prethodi pojavljivanju drugih biljega, poput N-acetil-beta-D-glukozaminidaze (NAG) i beta-2-mikroglobulina (31). Dodatna istraživanja pokazuju važnu ulogu korelacije između povećane koncentracije NGAL-a i ozbiljnoga kliničkog ishoda, uključujući pogoršanje ABO-a, potrebu za bubrežnom nadomjesnom terapijom (engl. *renal replacement therapy*, RRT) i smrti (43). Koncentracija NGAL u urinu predviđa složene posljedice početne dijalize ili smrti tijekom hospitalizacije te ima izvrsnu korisnost za dijagnosticiranje ABO-a kod kritično bolesnih odraslih osoba u jedinici intenzivne njege. Tijekom istraživanja kod pacijenata u jedinici intenzivne njege s utvrđenim ABO-om došlo je do porasta koncentracije NGAL-a u plazmi od 10 puta i do 100 puta u urinu u usporedbi s normalnim koncentracijama NGAL-a. Koncentracije u plazmi i urinu umnogome su korelirale s koncentracijama kreatinina u serumu. Biopsije bubrega kod ovih bolesnika pokazale su intenzivno nakupljanje imunoreaktivnog NGAL-a u 50 % kortikalnih tubula, što potvrđuje NGAL kao osjetljivi odgovor na ABO (35).

Kod djece kojima je ugrađena kardiopulmonarna prenosnica česta je pojava ABO-a (definirana kao povećanje kreatinina u serumu), ali postavljanje dijagnoze uz pomoć kreatinina u serumu moguća je tek 1 – 3 dana nakon operacije. S druge strane, mjerenje NGAL-a s pomoću Western blot-a kao i imunoenzimskom metodom (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) pokazuje deseterostruko povećanje u urinu i plazmi u roku od 2 do 6 sati od operacije u bolesnika koji su kasnije razvili ABO. NGAL u urinu i u plazmi (pri graničnoj vrijednosti od 50 µg/L) moćan je nezavisni pokazatelj ABO-a, s područjem ispod krivulje (AUC) od 0,998 za NGAL u urinu i 0,91 za NGAL u plazmi. Zapravo, prema rezultatima viševarijantne analize koncentracija NGAL-a u urinu dva sata nakon kardiopulmonalne prenosnice bila je najsnažniji neovisni predviđatelj ABO-a (41). Koncentracija NGAL-a jak je neovisni pokazatelj kliničkog ishoda poput trajanja ABO-a. Dakle, NGAL u urinu i plazmi nametnuo se kao osjetljivi, specifični i visoko prediktivni biljeg ABO-a nakon operacije srca u djece (41, 42). Međutim, na koncentracije NGAL-a može utjecati niz koegzistirajućih varijabli kao što su već postojeća bubrežna bolest, sistemska upala ili infekcija mokraćnog sustava (44). Bubrežni tubuli imaju istaknutu ulogu tijekom ranog razdoblja i tijekom progresije KBB-a. Tubulointercijalna

ozljeda snažan je predviđatelj progresije KBB-a u krajnji stadij bubrežne bolesti (engl. *end-stage renal disease, ESRD*), bez obzira na primarnu etiologiju KBB-a. Patogeni mehanizmi odgovorni za progresivno oštećenje bubrega jesu cjevasta atrofija i hipoksija, gubitak peritubularnih kapilara i intersticijska fibroza. Stupnjevi KBB-a određuju se na temelju eGRF i opsega albuminurije zajedno s nacionalnim smjernicama KDOQI (engl. *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*). Međutim, albuminurija i GFR možda neće točno prepoznati ubrzano pogoršanje bubrežne funkcije. Također, pozornost je usmjerena na prepoznavanje biljega za predviđanje rizika od progresivnog otkazivanja bubrega (45).

Omjer koncentracije NGAL-a i kreatinina u urinu (NGAL/Cr) u prvom je redu povezan s krajnjom točkom svih slučajeva smrtnosti ili početkom RRT unutar dvije godine. Taj podatak upućuje na to da omjer NGAL/Cr može pomoći otkrivanju podskupine bolesnika koji pokazuju brzo smanjenje eGFR-a, ali u kojih proteinurija ostaje relativno snižena (46). Najčešće je albuminurija uzrokovana znatnim glomerularnim propuštanjem koje nadmašuje reapsorpcijsku sposobnost tubula, dok je NGAL u urinu, koji se oslobađa osobito iz oštećenih bubrežnih stanica, proporcionalno povezan s opsegom tubularne atrofije i intersticijske fibroze u biopsijama bubrega. Prema tome, omjer NGAL/Cr i ukupna proteinurija ili albuminurija mogu potencijalno ponuditi važne prognostičke informacije pri čime se izbjegavaju invazivni postupci (46).

Koncentracije NGAL-a u plazmi u negativnoj su korelaciji s GFR-om kod djece s KBB koja je uzrokovana bubrežnom displazijom, opstruktivnom uropatijom te glomerularnom i cističnom bolesti. NGAL nadilazi kreatinin kao pokazatelj zatajenja bubrega kad se funkcija bubrega smanji na < 30 ml/min (31). Koncentracije NGAL-a u serumu i urinu biljeg su bubrežne bolesti i ozbiljnosti KBB-a. Ove informacije upućuju na to da koncentracija NGAL-a može odražavati entitet aktivnog oštećenja bubrega koji je temelj kroničnog oštećenja (47).

1.5.3. Metode određivanja koncentracije lipokalina povezanog s neutrofilnom gelatinazom

Za određivanje koncentracije NGAL-a u urinu i plazmi koriste se uglavnom ELISA metoda te Western-blot postupak. ELISA je imunoenzimska metoda visoke osjetljivosti i specifičnosti. Temelji se na reakciji antigena i antitijela. Ovom metodom moguće je određivati male koncentracije analita, često uz relativno jednostavnu pripremu uzorka i istodobno ispitivanje

velikog broja uzoraka. ELISA se provodi na standardnim mikrotitarskim pločama s velikim brojem jažica (48).

Treba naglasiti da je također razvijen veći broj imunokemijskih metoda za određivanje koncentracije NGAL-a u serumu/plazmi, urinu, punoj krvi ili supernatantu staničnih kultura, a njihov pregled prikazan je u Tablici 3. (48, 49).

Tablica 3. Metode određivanja koncentracije NGAL-a .

	Alere TriageR	Architect NGAL	NGAL Test TM	NGALRapid	NGAL ELISA	Lipocalin2/NGAL
Proizvođač	Biosite Inc/Alere	Abbott Diagnostics	Bioporto	Bioporto	Argutus Medical	R&D/ bioVendor
Metoda	POCT imunokemijska fluorescencija	kemiluminiscentna imunokemijska metoda na mikročesticama (CMIA)	turbidimetrijska imunokemijska (PETIA)	imunoenzimaska (ELISA)	imunoenzimaska (ELISA)	imunoenzimaska (ELISA)
Uzorak	puna krv ili EDTA-plazma	urin	urin, heparin i EDTA-plazma	urin, plazma ili serum	urin, serum, supernatant stanične kulture	urin, plazma ili serum
Volumen	150 – 250 µl	50 µl	5 µl	10 µl/jažici	10 µl/jažici	5 – 10 µl/jažici
Vrijeme mjerjenja	15 min	35 min	10 min	1 sat	3,5 sata	3,5 sata
Raspon mjerjenja	15 – 1300 ng/ml	10 – 1500 ng/ml	25 – 5000 ng/ml	2 – 2000 ng/ml	0,4 – 1000 ng/ml	0,3 – 1000 ng/ml

POCT (engl.*point-of-care testing*, brzi test koji se izvodi uz pacijenta)

EDTA (antikoagulans etilendiamintetraoctena kiselina)

Neke od metoda sada se koriste samo u znanstvenim istraživanjima. Neke su manualne, a neke predviđene i za automatsko određivanje. Prema literaturi najviše se koriste tri komercijalno dostupne metode kojima se rezultati dobivaju u relativno kratkom vremenu (10 – 35 minuta), a uzorak je najčešće serum, plazma ili urin (50). To su *Triage NGAL* metoda (Biosite Inc/Alere), tzv. *point of care* metoda, primjenjiva za određivanje uz bolesnika. Riječ je o imunokemijskoj fluorescentnoj metodi određivanja koncentracije NGAL-a u punoj krvi ili plazmi, a rezultati se dobivaju nakon 15 minuta. Mjerenje se izvodi na Triage-Meter prenosivom fluorescentnom spektrometru, a raspon mjerenja je od 60 do 1300 ng/ml. Ustanovljeno je da vrlo dobro korelira s ELISA metodom.

Druga je Architect NGAL kemiluminiscentna imunokemijska metoda za određivanje NGAL-a u urinu (Abbott Diagnostics) koja omogućuje istodobno mjerenje većeg broja uzoraka na ARCHITECT analizatoru. Metodom se određuje uglavnom monomerni oblik NGAL-a, a istraživanja su pokazala da koncentracije NGAL-a izmjerene ovom metodom znatno koreliraju s koncentracijama dobivenim mjerenjem ELISA (Bioporto) metodom ($r = 0,99$). Ova je metoda jednostavna za izvođenje, bez ručne prethodne pripreme, a prvi rezultat dostupan je unutar 35 minuta i zahtijeva samo 50 μ l urina. Raspon mjerenja je od 10 do 1500 ng/ml (51).

NGAL Test (Bioporto) je imunokemijska, automatizirana turbidimetrijska metoda za određivanje koncentracije NGAL-a u urinu i plazmi. Mjerenje je omogućeno na različitim automatiziranim analizatorima, potrebno je svega 5 μ l uzorka, rezultat se dobiva nakon 10 minuta i šireg je raspona mjerenja (25 – 5000 ng/ml). Koncentraciju NGAL-a moguće je odrediti i s pomoću Western-blot analize. Western-blot analiza jest metoda razdvajanja proteina pod utjecajem električnog polja. Nickolas i sur. ustanovili su da određivanje NGAL-a Western-blot metodom dobro korelira s određivanjem Architect metodom (37).

Plazma i urin, kao najčešći uzorci za ispitivanje, imaju i prednosti i nedostatke. Urin se dobiva neinvazivnim postupkom, sadržava manje proteina koji bi mogli interferirati u postupku, ali koncentracija može biti promijenjena zbog statusa hidratacije organizma ili npr. diuretske terapije. S druge strane, plazma se dobiva invazivnim pristupom te može odražavati povećanu koncentraciju NGAL-a iz drugih izvora (nerenalne bolesti kod kojih je uglavnom podrijetlom iz aktiviranih neutrofila), a ne samo iz bubrežnog tkiva. Međutim, NGAL se jednostavno i brzo može odrediti u punoj krvi ili plazmi spomenutom POCT metodom .

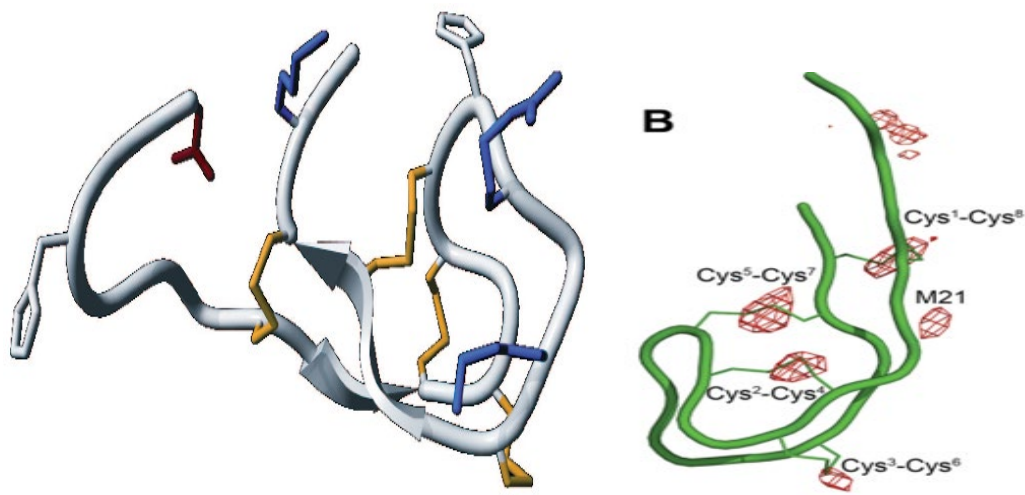
1.6. Heparin

Dosadašnja istraživanja koja su kao ispitanike uključivala pacijente s genetičkim poremećajima metabolizma željeza dovela su do identifikacije gena koji kodiraju prijenosnike željeza, prijenosne oksido-reduktaze te molekule regulacije homeostaze željeza. Ključnu ulogu u homeostazi željeza ima heparin. Otkriven je istodobno u ultrafiltrata ljudske plazme i nazvan LEAP-1 (engl. *liver-expressed antimicrobial peptide*) te u uzorcima urina kao mali baktericidni peptid (defenzin i katelicidin). Ime heparin potječe od mjesta sinteze u hepatocitima (hep-) te njegove antimikrobne aktivnosti (-cidin) (52, 53).

Gen koji kodira heparin (*HAMP*, 19q13) izražen je u jetri, srcu, plućima, bubrezima, mozgu, kralježnici, crijevima, trbuhu, gušterači, adipocitima, skeletnim mišićima, testisima i makrofagima. Geni heparina također su pronađeni kod miševa, svinja, ptica i riba. Heparin ima antibakterijsku (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus spp.*) te antigljivičnu aktivnost (*Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigates*) (54).

Prvi se put ključna uloga u homeostazi željeza pripisala heparinu kada je primijećeno da dolazi do nakupljanja željeza u tkivu kod poremećaja ekspresije gena koji kodira translacijski faktor za Hepc mRNA kod miševa. Nađeno je da se mRNA heparina povećava s većom koncentracijom željeza te opada s manjkom željeza u organizmu, odnosno da metabolizam željeza regulira hormon heparin (55). Heparin smanjuje apsorpciju željeza iz duodenalnih enterocita te otpuštanje željeza iz makrofaga. Glavna uloga heparina u metabolizmu željeza potvrđena je kod životinjskih modela te u *in vitro* istraživanjima (56). Sinteza heparina u hepatocitima mijenja se u stanjima preopterećenja željezom, upale, povećane eritropoeze, hipoksije i anemije (57 – 59).

Kod same sinteze heparina *HAMP* gen kodira prethodnika heparina – preproheparin, 84-aminokiselinski protein koji uključuje 24-aminokiselinski peptid na N-terminalnom kraju, 35-aminokiselinsku proregiju i C-terminalni 20 ili 25-aminokiselinski zreli peptid. Uz pomoć prohormona konvertaze furina preproheparin se cijepa na 60-aminokiselinski proheparin iz kojeg nastaje heparin. Postoje tri oblika heparina, 25-aminokiselinski, 22-aminokiselinski i 20-aminokiselinski peptid. U urinu je moguće detektirati sva tri oblika, no samo su heparin-25 i heparin-20 prisutni u ljudskom serumu. Struktura heparina-25, koji je zapravo aktivni oblik heparina, sadržava osam cisteinskih ostataka povezanih disulfidnim vezama (Slika 5.) (60).



Slika 5. Struktura hepcidina, peptidni kostur (sivo), disulfidne veze (žuto), pozitivno nabijeni argininski i lizinski ostaci (plavo), β -ploče prikazane strelicom. B) povezanost cisteinskih ostataka. *Preuzeto i prilagođeno prema Jordan JB i sur. (60).*

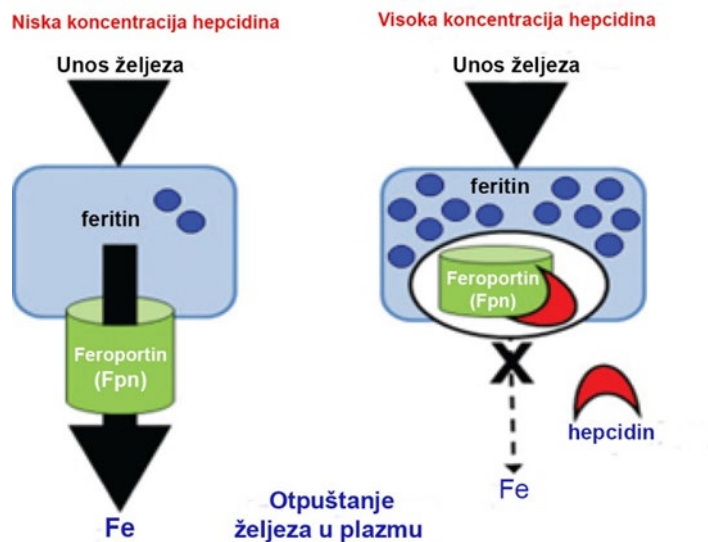
Korištenjem NMR spektroskopije analiza strukture hepcidina pokazala je da ovaj peptid formira jednostavnu „ukosnicu“ stabiliziranu s četiri disulfidne veze između dviju antiparalelnih strana. Pretpostavlja se da bliski disulfidni mostovi pronađeni u blizini zavoja „ukosnice“ imaju važnu funkciju. Korištenjem različitih metoda ustanovljeno je da se način vezanja cisteinskih ostataka razlikuje od prvobitno pretpostavljenog. Dokazano je da su cisteinski ostaci povezani na sljedeći način: Cys1–Cys8, Cys3–Cys6, Cys2–Cys4 i Cys5–Cys7 (Slika 5.) (60).

Otkriveno je da je cirkulirajući hepcidin vezan za α_2 -makroglobulin s relativno visokim afinitetom te za albumin s relativno niskim afinitetom. Na osnovi teorijskih izračuna 11 % hepcidina slobodno cirkulira (61, 62). Nije sigurno utječe li vezanje za molekule prijenosnike na funkcionalna svojstva hepcidina.

Nevezani hepcidin najvjerojatnije slobodno prolazi u glomerularni filtrat zbog male molekularne težine i malog radijusa. U istraživanjima na manjem broju ispitanika zaključeno je da se izlučivanje hepcidina kreće otprilike oko 0 % do 5 % (62, 63). U određenim uvjetima hepcidin se ne reapsorbira u bubrežnim tubulima. Ovaj nedostatak reapsorpcije može igrati bitnu ulogu u nekoliko poremećaja metabolizma željeza kao što su upala, suvišak željeza i malarija (64). Lokalno stvaranje hepcidina u tubulima također se mora uzeti u obzir kod tumačenja rezultata u urinu, ali i u serumu (65 – 68).

Sami mehanizam djelovanja hepcidina ovisi o interakciji hepcidina s feroportinom. Zapravo hepcidin uzrokuje smanjenje koncentracije željeza. Hepcidin, povezan s feroportinom, kontrolira koncentraciju željeza u plazmi: iz duodenalnih enterocita koji apsorbiraju željezo iz prehrane; iz makrofaga uključenih u recikliranje željeza; iz eritrocita i drugih stanica; te iz hepatocita uključenih u skladištenje željeza. Jedini poznati transportni protein koji posreduje u prijenosu željeza iz stanica jest feroportin. Nalazi se u svim tkivima koja prenose željezo u plazmu: hepatociti, bazolateralne membrane duodenalnih enterocita, membrane makrofaga RES-a i stanice posteljice. Vežući se za feroportin inhibira ga te se kompleks endocitozom unosi u stanicu gdje se razgrađuje u endolizosomima, dakle dolazi do blokiranja prijenosa željeza u cirkulaciju. Kada su zalihe željeza velike, dolazi do povećane sinteze hepcidina te se inhibira crijevna apsorpcija željeza, otpuštanje recikliranog željeza iz makrofaga. Kada su zalihe željeza male, sinteza se hepcidina zaustavlja. Dakle, osnovna je uloga hepcidina inhibicija prijenosa željeza u cirkulaciju (69 – 73).

Na molekularnoj se razini hepcidin veže za svoj funkcionalni receptor feroportin čime uzrokuje njegovu internalizaciju, ubikvitinaciju i razgradnju u lizosomima (74). Uklanjanje feroportina s površine stanične membrane dovodi do zadržavanja željeza u stanici i smanjuje izlazak željeza iz makrofaga RES-a, hepatocita i enterocita u krvotok čime se smanjuje dostupnost željeza različitim stanicama u organizmu (Slika 6.).

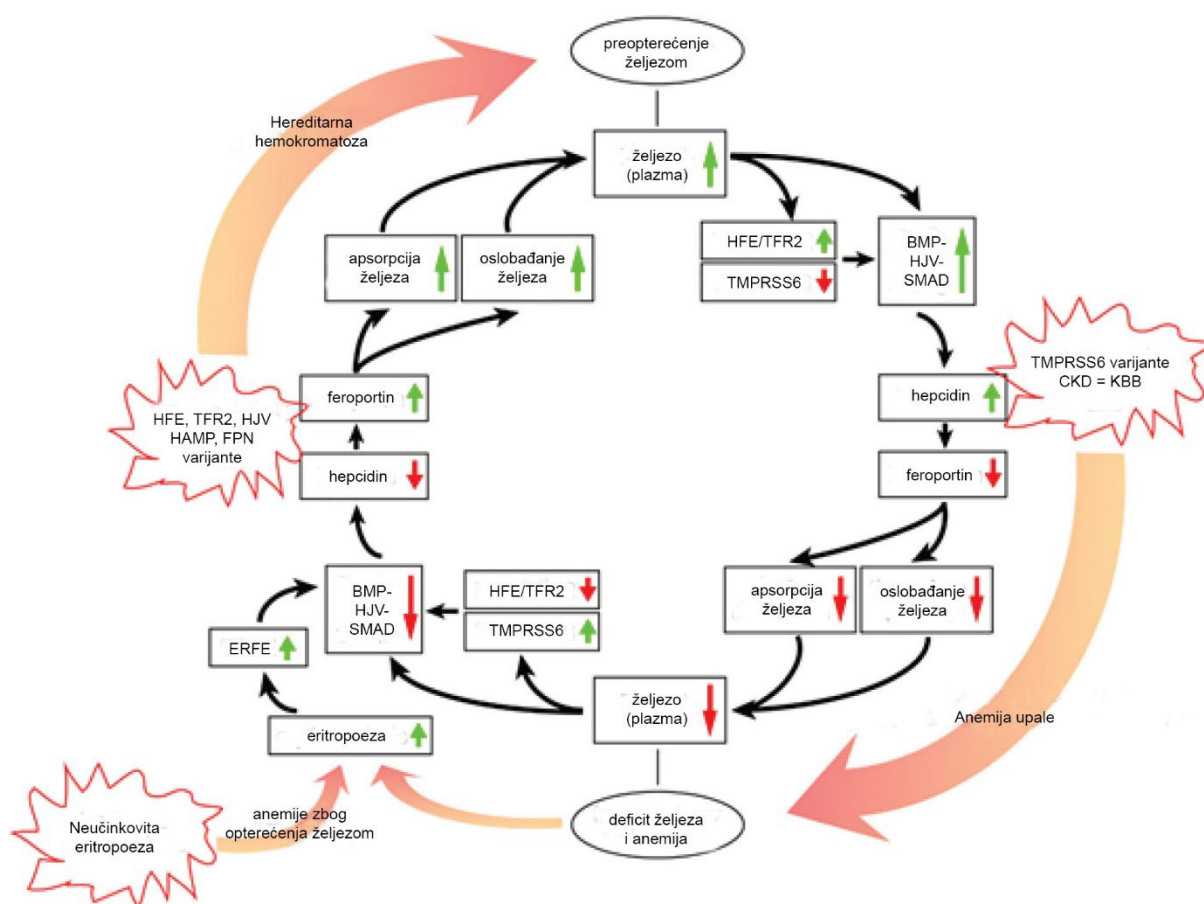


Slika 6. Uloga feroportina. FNP (feroportin)

Preuzeto i prilagođeno prema: Ginzburg, Y. Z (75)

1.6.1. Dijagnostičko značenje hepcidina

U fiziološkim uvjetima deficijenciju te s druge strane nagomilavanje željeza sprječava, odnosno regulira hepcidin. Glavni regulatori koncentracije hepcidina u krvi jesu status željeza, anemija, hipoksija i upala (Slika 7.) (55 – 76).



Slika 7. Regulatori koncentracije hepcidina. Homeostazu željeza regulira hepcidin-feroportin os. HFE/TFR2 (homeostatskog regulatora željeza /transferina receptora 2); BMP/HJV/SMAD (koštani morfogenijski protein/hemojuvelin/ SMAD signali put); ERFE (eritroferon); TMPRSS6 (transmembranska serinska proteaza-6); FPN (feroportin). *Preuzeto i prilagođeno prema Xu Y i sur. (73)*

Povećana koncentracija željeza u plazmi i/ili tkivu dovodi do aktivacije homeostatskog regulatora željeza /transferina receptora 2 (HFE/TFR2). TFR2 regulira hepcidin funkcionalnom interakcijom s koštani morfogenijski protein/hemojuvelin/SMAD signalnim putem (BMP/HJV/SMAD). Hepcidin se veže na feroportin koji ograničava apsorpciju željeza i

oslobađanje željeza, čime se smanjuje koncentracija željeza u plazmi. Nedostatak željeza aktivira transmembransku proteazu, serin 6 (TMPRSS6) i potiskuje HFE/TFR2 i BMP/HJV/SMAD signalni put, čime se smanjuje ekspresija hepcidina, povećava aktivnost feroportina. Anemija potiče eritropoezu. Proliferirajući prethodnici crvenih krvnih stanica luče eritroferon (ERFE) koji inhibira BMP/SMAD signalizaciju za smanjenje hepcidina i povećanje dostupnosti željeza.

Povećane koncentracije hepcidina snižavaju i reguliraju crijevnu apsorpciju željeza štiteći na taj način organizam od nagomilavanja željeza. Željezo vezano za transferin potiče sintezu hepcidina u hepatocitima (77). Koštani morfogenetski protein-6 (BMP-6)/SMAD signalizira put koji uključuje protein HJV, protein HFE te TFR2. Oni posreduju u transkripciji gena za hepcidin i povećanju koncentracije željeza (78). Nedostatak željeza rezultira malim koncentracijama hepcidina. Jetrena transmembranska serin-proteaza, poznata kao TMPRSS6 ili matriptaza-2, potrebna je radi inhibiranja hepcidinskog gena (79). Ova proteaza zapravo cijepa i otapa HJV koji umanjuje signaliziranje BMP-6/SMAD puta (80).

Anemija i hipoksija dovode do inhibicije stvaranja hepcidina kroz odvojene signalne putove. Stimulacija eritropoeze s eritropoetinom smanjuje koncentraciju hepcidina te poboljšava mobilizaciju željeza iz zaliha (81 – 83). S druge strane upalni citokin IL-6 potiče ekspresija hepcidina u uvjetima upale (84). Kratkotrajno povećanje hepcidina onemogućuje otpuštanje željeza iz zaliha, a dugotrajno povećanje može rezultirati nedostatkom željeza. Kronična inflamacija, povećana koncentracija hepcidina uz smanjenu sintezu eritropoetina direktno uzrokuje anemiju kod pacijenta s KBB-om (85). Kod anemičnih dijaliziranih pacijenata kao i pacijenata s KBB-om vidljivo je poboljšanje davanjem intravenoznog željeza uključujući i one s povećanim koncentracijama hepcidina te povećanim koncentracijama C-reaktivnog proteina (CRP) (86, 87). Iako intravenozno primijenjeno željezo naizgled može savladati blokadu željeza posredovanu hepcidinom, postoji nekoliko razloga za zabrinutost. Istraživanja pokazuju prisutnost velikih količina željeza u jetri kod bolesnika na dijalizi koji intravenozno primaju željezo; međutim, dugotrajni učinci intravenozno primljenog željeza te pojačane zalihe željeza još uvijek nisu dovoljno poznati. Naime, slobodno željezo povećava se nakon intravenoznog davanja željeza, što može potaknuti infekcije i oksidacijske poremećaje u situacijama kada je stanično željezo već nakupljeno zbog povećanih koncentracija hepcidina. Smanjenje koncentracije hepcidina ili inhibicija njegovih signalnih putova dovelo bi do otpuštanja željeza iz zaliha, pojačala bi se eritropoeza i produžio život eritrocita. Takav terapijski pristup mogao bi biti mnogo sigurniji od visokih doza stimulirajućih agenasa eritropoeze (ESA), s ponavljajućim parenteralnim davanjem željeza. Davanje antihepcidinskih antitijela prikazano

je na životinjskom modelu u kojem ljudski hepcidin liječi anemiju izazvanu upalom u kombinaciji s ESA tretmanom (88, 89).

1.6.2. Hecpidin u dijagnostici bubrežne bolesti

Osim samog statusa željeza, još dva mehanizma reguliraju koncentraciju hepcidina: eritropoetska aktivnost i sistemska upala. Kod ozljede bubrega višestruki mehanizmi koji uključuju metabolizam hepcidina mogu otežati kliničku interpretaciju. Ekspresiju hepcidina potiču različiti podražaji kao što su upala i povećana koncentracija željeza, a smanjuju je anemija i nedostatak željeza. Bolesnici s KBB-om imaju povećane koncentracije hepcidina u serumu zbog perzistirajuće kronične upale i smanjenoga bubrežnog klirensa (90). Također, povećane koncentracije hepcidina u serumu doprinose disregulaciji homeostaze željeza u bolesnika s KBB-om (91). Liječenje sredstvima koja snižavaju koncentracije hepcidina u serumu ili inhibiraju njegovo djelovanje može biti učinkovit pristup za obnavljanje normalne homeostaze željeza i poboljšanje anemije u bolesnika s KBB-om. Nakon ishemijsko-reperfuzijske ozljede bubrega uočeno je povećanje koncentracije hepcidina-25 u urinu. Smatra se da je ovo povećanje renoprotektivni odgovor na smanjenje oštećenja bubrega (92, 93). Kombinirana uporaba hepcidina-25 s drugim biljezima može olakšati otkrivanje ABO-a (94). Hecpidin-25 u urinu identificiran je kao novi biljeg ABO-a korištenjem proteomskih tehnika, a njegova dijagnostička vrijednost procijenjena je kod kirurških liječenja srčanih bolesnika. Sam model regulacije i lučenja urinskog hepcidina-25 kod čovjeka je nepoznat. Dosad je poznato da se hepcidin lokalno sintetizira u bubrežima, a oslobađa se u distalnom nefronu kod pacijenata s ABO-om. To je u skladu s istraživanjima na kardiokirurškim modelima ABO-a koja su pokazala povećano lučenje hepcidina-25 u urinu kao posljedicu povećane sinteze hepcidina u distalnom nefronu, a kao odgovor na ishemijsko-reperfuzijsku ozljedu bubrega (95, 96).

1.6.3. Metode određivanja koncentracije hepcidina

Dosadašnja istraživanja povećala su spoznaje o karakteristikama hepcidina i njegovoj ulozi u regulaciji metabolizma željeza. Istodobno s otkrićem hepcidina intenzivno se razvijaju i metode za određivanje koncentracije hepcidina koje se koriste u eksperimentalnim i kliničkim istraživanjima. U prvim istraživanjima ove problematike korištena je komercijalna imunometoda kojom se mjerila koncentracija prohepcidina, prethodnika hepcidina, a ne bioaktivni peptid. Imunometode i SELDI-TOF masena spektrometrija prve su korištene metode

za određivanje koncentracija bioaktivnog hepcidina-25. (97, 98). Zatim je došlo do razvoja kompetitivne ELISA metode za određivanje koncentracije hepcidina u serumu te su danas dostupne sljedeće metode za mjerenje koncentracije hepcidina:

- a) LC/MS
- b) imunokemijske metode
- c) ligand-vezujuće metode.

Određivanje koncentracije hepcidina u serumu i urinu imunokemijskim metodama koje se temelje na uporabi specifičnih anti-hepcidin antitijela problematično je zbog dostupnosti pogodnih antitijela (99). Međutim, korištenjem različitih metoda i tehnologija za procjenu koncentracije hepcidina s poremećajima metabolizma željeza otežava tumačenje rezultata mnogih prijavljenih istraživanja.

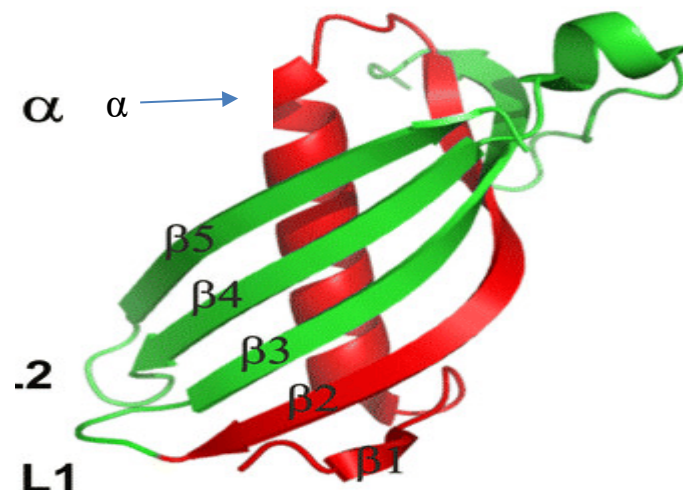
Stoga ne postoji idealna metoda određivanja koncentracije hepcidina i na tom području istraživači i nadalje ulažu velike napore. Međutim, i metodama koje su trenutačno na raspolaganju dobivaju se rezultati koji upućuju na važan dijagnostički potencijal hepcidina u različitim patološkim stanjima.

1.7. Cistatin C

Alan J. Barret je 1981. godine opisao mali protein izoliran iz kokošnjeg jaja sa sposobnošću inhibiranja aktivnosti lizosomskih cistein-proteinaza koji razgrađuju proteine. Kasnija istraživanja pokazala su da proteini velike i male molekularne mase, modulirajuće ili inhibirajuće aktivnosti na cistein-proteinaze, potječu od istog gena te su dodijeljeni u natporodicu cistatina. Povijesno gledano, cistatini su proteini s točno definiranim slijedom motiva koji oblikuju ekvimolarnu, čistu i reverzibilnu vezu s cisteinskim peptidazama stvaranjem enzimski neaktivnog kompleksa. Rasprostranjeni su u životinjama, biljkama i protozoama (100). Utvrđena su tri zajednička dijela svim cistatinima: glicinski ostatak na N-terminalnom dijelu, QXVXG motiv u jednoj petlji i PW motiv u drugoj. Cistatin C (poznat i kao γ -trace) pripada porodici-2 cistatina koja je ujedno i najveća porodica u natporodici cistatina. Cistatin C otkriven u kokošnjem jajiu prototip je cistatina iz porodice-2. Karakteristične veze za ovu obitelj cistatina dvije su disulfidne veze u koje su uronjena četiri cisteinska ostatka. Cistatini se smatraju izvanstaničnim proteinima jer su translatirani slijedom sekvencijskih peptida. Svi cistatini imaju zajedničko svojstvo inhibicije cistein-proteinaza koje je očuvano tijekom fiziološke evolucije. Njihova je fiziološka uloga reguliranje aktivnosti endogenih proteinaza koje se često izlučuju ili propuštaju iz lizosoma umirućih ili oboljelih stanica.

Cistatini se vrlo čvrsto, ali reverzibilno vežu na svoje ciljne peptidaze. Cistatini vjerojatno imaju obrambenu ulogu u borbi protiv mikroba. Pokazuju antimikrobnu aktivnost protiv Gram-negativnih bakterija i sposobnost inhibiranja replikacije virusa (101).

Cistatin C (Slika 8.) osnovni je protein male molekularne mase (13 kDa; 120 aminokiselina) građen u glavnini od jednoga polipeptidnog, neglikoziliranog lanca koji sadržava četiri karakteristična cisteinska ostatka. Pripada natporodici cistatin-reverzibilnih inhibitora cistein-proteinaza (102). Sintetizira se stalnom brzinom u svim stanicama s jezgrom i nalazi se u različitim tjelesnim tekućinama, uključujući i krv. Sinteza ljudskog cistatina C regulirana je *CST3* genom koji je lociran na kromosomu 20p11,2 i poznat je kao „housekeeping“ gen. Obuhvaća oko 4,3 kb i sadržava tri eksona koji su prekinuti sekvencama introna od 2252 i 1254 baznih parova, dajući ukupnu veličinu gena od približno 4500 parova baza (103).



Slika 8. Monomerna struktura ljudskog cistatina C.

Preuzeto i prilagođeno prema Prądzińska M i sur.(104)

Unutarstanična raspodjela cistatina C pretežno je lokalizirana u endoplazmatskoj mrežici (ER) i Golgijevu tijelu; linearno lučenje i relativno kratak unutarstanični poluživot (72 min) upućuju na konstitutivno izlučeni protein (105). Tijekom sazrijevanja u ER, cistatin C da bi spriječio interakciju s cistein-proteinazom na putu sekrecije tvori prolazni dimer. Ta dimerizacija također može biti uvjet za prolazak cistatina C iz ER u Golgijevo tijelo. Dimerizirani cistatin kasnije disocira u aktivni monomer prije ili tijekom lučenja. Cistatin C razgrađuje se u lizosomima, gdje se cistatin unosi endocitozom i dolazi do redimerizacije. Ljudski cistatin C je monomer u svome prirodnom funkcionalnom stanju, a znatne količine izvanstaničnih dimera prisutne su

samo u patološkim uvjetima (106). Glavne funkcije cistatina C, kao i ostalih cistatina tipa 2, mogu se grupirati u četiri opće kategorije:

- izravna inhibicija endogenih ili egzogenih cisteinskih peptidaza
- modulacija imunskog sustava
- antibakterijska i antivirusna aktivnost koja nije povezana s inhibicijom cisteinskih peptidaza
- odgovor na ozljedu mozga.

1.7.1. Dijagnostičko značenje cistatina C

Cistatin C slobodno se filtrira u bubrežnim glomerulima, zatim se reapsorbira i potpuno katabolizira stalnom brzinom nakon endocitoze na apikalnoj četkastoj prevlaci stanica tubula, bez bitnog lučenja (107). Nakupine sićušnih krvnih žila, glomeruli, bubrežima dopremaju vodu, otopljene tvari, dopuštaju izlazak otpadnih tvari kroz stijenke, a služe i za filtraciju cistatina C. Bubrezi iz te tekućine apsorbiraju glukozu, cistatin C i druge tvari. Reapsorbirani cistatin C razgrađuje se i ne vraća u krv. Preostali dio tekućine prenosi se u mokraćni mjehur i izlučuje iz organizma. Sukladno tomu koncentracija cistatina C u serumu odražava GFR, a koncentracija cistatina C u urinu disfunkciju tubula (102). Cistatin C je među nisko molekularnim cistatinima najviše zastupljen u izvanstaničnoj tekućini. Opisane su njegove biološke uloge, primjerice ima antivirusna i antibakterijska svojstva, sudjeluje u resorpciji kosti, modulaciji upalnog odgovora, staničnoj proliferaciji i rastu, metastaziranju tumora, diferencijaciji astrocita te ima ključnu ulogu i u patogenezi nekih bolesti, primjerice neurodegenerativnih, kardiovaskularnih i razvoju tumora (108). Koncentracija cistatina C u serumu/plazmi kod zdravih ljudi varira s obzirom na metode određivanja, ali je u rasponu od 0,8 do 1,2 mg/L. Tijekom posljednjeg desetljeća provedena su mnoga klinička ispitivanja o ulozi cistatina C kao pokazatelja bubrežne funkcije.

1.7.2. Cistatin C u dijagnostici bubrežne bolesti

Nekoliko je prednosti određivanja cistatina C u serumu u odnosu na određivanje koncentracije kreatinina. Jedna od njih je konstantnost stvaranja cistatina C u organizmu. Do danas je identificirano samo nekoliko čimbenika koji utječu na njegovo stvaranje. To su veće doze glukokortikoida koje potiču stvaranje te blaga hiperfunkcija štitnjače što treba imati na umu kada se cistatin C koristi kao biljeg GFR-a (108). Serumski cistatin C pokazao se kao rani biljeg KBB-a koji je osobito koristan u pacijenata za koje je kreatinin neadekvatan biljeg ili za koje

su metode mjerenja GFR-a nepraktične (109). Cistatin C bolji je pokazatelj procjene GFR-a u novorođenčadi od kreatinina u serumu jer ne prolazi posteljicu, što je dokazano nepostojanjem korelacije između cistatin C u krvi majke i krvi iz pupkovine. Koncentracija cistatina C neovisna je, kako je spomenuto, o spolu, dobi, mišićnoj masi i nutritivnom statusu (110). Zbog svega toga bolje odražava sazrijevanje i funkciju bubrega i predložen je kao „idealniji“ biljeg GFR-a od kreatinina u serumu. Cistatin C također je bolji biljeg za otkrivanje blagih promjena GFR-a kojim se bubrežne promjene otkrivaju ranije. Prednosti cistatina C kao biljega GFR-a jesu: bolja korelacija s GFR-om, veća osjetljivost i specifičnost, bolja dijagnostička točnost (koncentracije cistatina C u serumu se povećavaju već kod GFR-a od 80 ml/min/1,73 m²), a također je pokazano da je bolji pokazatelj smrtnosti (111, 112).

1.7.3. Metode određivanja koncentracije cistatina C

Fizikalno-kemijska svojstva cistatina C omogućila su dokazivanje njegove prisutnosti u staničnim i izvanstaničnim odjeljcima primjenom metoda kao što su elektroforeza i inhibicija papainom. Kasnije je imunoelktroforezom, tehnikom koja se temelji na odvajanju proteina u kombinaciji s imunom reakcijom s antitijelima na ljudske proteine, dokazan cistatin C u ljudskim tekućinama. Cistatin C je identificiran kao sporija frakcija nego gamaglobulini i s različitom antigenskom aktivnošću od imunoglobulina. Godine 1979. Lofberg i Grubb razvili su prvu imunokemijsku metodu za kvantitativno određivanje cistatina C, tzv. enzimski pojačanu pojedinačnu radijalnu imunodifuziju (engl. *single radial immunodiffusion assay*, SRID). Zbog niske osjetljivosti ove metode razvili su novu tehniku takozvanu kompetitivnu enzimsku imunometodu (engl. *enzyme immunoassays*, EIA) koja ima osjetljivost 10 puta veću od SRID-a, ali zbog inkubacije koja se odvijala preko noći ni ova metoda nije zaživjela u laboratorijskoj praksi. Radioimunoanaliza (engl. *radioimmunoassay*, RIA), kao nova tehnika za određivanje koncentracije cistatina C, uvedena je 1982. godine, a korišteni su mišja monoklonska antitijela. Kasnije je metoda poboljšana primjenom poliklonskih antitijela kunića i zamoraca (113).

Novije generacije metoda za određivanje cistatina C podrazumijevaju metodu PETIA (engl. *particle-enhanced turbidimetric immune-assay*) – turbidimetrijska imunometoda na lateks-česticama koji su opisali Kyhse-Andersen i sur. PETIA se temelji na reakciji cistatina C iz seruma i zečjih antitijela koji su kovalentno obloženi modificiranim lateks-česticama. Kalibracijska krivulja pokriva raspon koncentracija od 0,4 do 14,1 mg/L. Aglutinacija koja dovodi do povećanja apsorbancije mjerena je na $\lambda = 340$ nm te je izmjerena nakon 240 s i to je

krajnja točka vrijednosti (114). Zbog pouzdanoga analitičkog ispitivanja i kratkoga analitičkog vremena PETIA je uvedena kao rutinska metoda za određivanje cistatina C u laboratorijima.

PENIA (engl. *particle-enhanced nephelometric immune assay*) – nefelometrijska imunoanaliza je novija metoda gdje su polistirenske čestice obložene antitijelima specifičnim za humani cistatin C. Intenzitet raspršenog svjetla nastalog kompleksa proporcionalan je koncentraciji cistatina C u uzorku. Granica detekcije je 0,17 mg/L. Test je osjetljiv na lipemične i hemolitične uzorke. Razlika između metoda PENIA i PETIA jest u antitijelima, a osim toga PENIA je bolja metoda za određivanje koncentracija cistatina C u serumu jer je imunoagregate lakše otkriti nefelometrijom (115).

U novijem istraživanju Tanka i sur. objavili su novu metodu za određivanje serumskog cistatina C kao biljega GFR pod nazivom SPIA (engl. *sol particle immuno-assay*). Metoda se temelji na imunosnoj reakciji zečjeg anti-ljudskog cistatina C i antitijelima, obloženih koloidnim česticama zlata, i uzorka seruma. Reakcija između čestica i cistatina C u serumu dovodi do aglutinacije i promjene u signalu apsorbancije nakon pet minuta od početka reakcije na dvije valne duljine $\lambda = 660 \text{ nm}$ i 540 nm . Bilirubin, antikoagulansi i reumatoidni faktor ne interferiraju s ovom metodom. (116)

1.8. Kreatinin kao kasni biljeg akutnoga bubrežnog oštećenja

Kreatinin je spoj koji nastaje spontanom, neenzimskom razgradnjom kreatina. Kreatin se sintetizira u jetri i bubrezima i nakon sinteze prelazi u krv iz koje ga odmah preuzimaju stanice mišića i drugih tkiva. Djelovanjem enzima kreatin-kinaze kreatin se reverzibilno fosforilira stvarajući visokoenergijski spoj fosfokreatin ili kreatin-fosfat. Neenzimskom, nepovratnom reakcijom, odnosno gubitkom molekule vode iz kreatin-fosfata u mišićnim stanicama nastaje kreatinin koji se krvlju prenosi do bubrega i potom izlučuje urinom (117, 118,119). Kreatinin je, dakle, anhidrid kreatina molekularne mase 113 Da. Koncentracija kreatinina u serumu korelira s mišićnom masom jer je kreatinin nusproizvod metabolizma mišića, a iz krvi se uklanja ponajviše bubrezima, tj. glomerularnom filtracijom. Koncentracija kreatinina u serumu tako ovisi ponajprije o glomerularnoj filtraciji, pa stoga i odgovarajuće upućuje na ovu funkciju bubrega. Dnevno se urinom izlučuje oko 2 % ukupnog kreatinina (tzv. koeficijent kreatinina). Ako je smanjena filtracija u glomerulima, koncentracija se kreatinina u krvi povećava. Zbog toga se koncentracija kreatinina u serumu i urinu može koristiti za računanje klirensa kreatinina koji je u korelaciji s GFR-om (119, 120).

Koncentracija kreatinina u serumu novorođenčeta promjenjiva je tijekom prvih postnatalnih tjedana. Serumski kreatinin povećan je pri rođenju i smanjuje se tijekom prvog tjedna života. Koncentracija se ustali nakon petog dana života kod novorođenčadi rođene poslije 36. tjedna trudnoće, a kod prijevremeno rođene djece koncentracije serumskog kreatinina ustale se kasnije. Također, povećana koncentracija serumskog kreatinina pri rođenju odraz je majčina kreatinina koji dolazi u dodir s novorođenčetom preko posteljice (121).

1.8.1. Dijagnostičko značenje kreatinina

Koncentracija kreatinina u serumu nepouzdan je, međutim, indikator akutnih promjena bubrežne funkcije u prvom redu zbog znatne ovisnosti kreatinina o dobi, spolu, mišićnoj masi i mišićnom metabolizmu te hidracijskom statusu (121). Isto se odnosi i na klirens kreatinina, posebice kod bolesnika koji se nalaze u jedinicama intenzivne njege (122). Koncentracija kreatinina u serumu pruža jednostavan način provjere stanja bubrega, međutim povećava se samo u teškoj disfunkciji bubrega kada je više od 50 % nefrona nefunkcionalno. Trenutačno se u dijagnostici bubrežnih bolesti kreatinin uvelike primjenjuje kod procjene GFR-a uz korištenje empirijskih jednadžbi temeljenih na izmjerenoj koncentraciji kreatinina u serumu (120). Zbog jednostavnog određivanja i niske cijene i dalje je određivanje koncentracije kreatinina zadržano kao rutinska pretraga iako postoje bolje i točnije metode za određivanje GFR-a.

1.8.2. Metode određivanja koncentracije kreatinina

Koncentracija kreatinina može se odrediti fotometrijskom ili enzimskom metodom. Najpoznatija je fotometrijska metoda Jaffeova metoda. Jaffeova reakcija odvija se u alkalnom mediju između kreatinina i pikrinske kiseline te nastaje narančasto obojenje reakcijske smjese. Zbog niske specifičnosti u slučaju prisutnosti ikterije, hemolize i lipemije dodane su neke modifikacije u Jaffeovu metodu. U serumu također mogu biti prisutni proteini, aceton ili askorbinska kiselina koji reagiraju s pikrinskom kiselinom i tako lažno povećavaju koncentraciju kreatinina u serumu. Novija matematička modifikacija fotometrijske metode po Jaffeu je kompenzirana kinetička metoda. U kompenziranoj Jaffeovoj metodi smanjenje interferencije proteina postiže se namještanjem kalibratora i kalibracijske krivulje (122).

U novije vrijeme sve je više u upotrebi i enzimska metoda za kvalitativno određivanje kreatinina, a sama metoda zasniva se na djelovanju enzima kreatininaze koji hidrolizira kreatinin u kreatin (123). Određivanje kreatinina poboljšano je metodama HPLC (visokotlačna

tekućinska kromatografija, engl. *high performance liquid chromatography*) te GC-IDMS (plinska kromatografija s izotopnom dilucijskom masenom spektrometrijom, engl. *gas chromatography isotope dilution mass spectrometry*) koje su visoke osjetljivosti i specifičnosti.

1.9. Prediktivne jednadžbe procjene glomerularne filtracije

Mjerenje GFR-a jedna je od glavnih pretraga za procjenu funkcije glomerula, odnosno procjenu cjelokupnoga funkcionalnog stanja bubrega. Ono zapravo označava volumen tekućine filtrirane iz glomerularnih kapilara u Baumanovu čahuru po jedinici vremena (124). Dva su tipa metoda određivanja GFR-a: metode mjerenja egzogenih (klirens inulina, I-iothamlamata, ioheksola, Tc-99m-DTPA, J-jodoacetata, Cr-EDTA) i endogenih spojeva (uobičajeno klirens kreatinina). Zbog brojnih izvora varijabilnosti klirens testova preporučuje se procjena GFR-a korištenjem empirijskih jednadžbi temeljenih na koncentraciji endogenog spoja kao što je kreatinin, u novije vrijeme cistatin C u serumu, uz dodatne podatke što su dob, spol, tjelesna masa, rasa itd. Poznato je da postoji dobra korelacija eGFR-a s razvojem komplikacija kronične bubrežne bolesti te s povećanim rizikom komplikacija kao što su kardiovaskularne bolesti (125).

Od 1957. godine, kada je Effersoe postavio prvu jednadžbu (126), do sada je razvijeno više od 46 inačica prediktivnih jednadžbi koje uključuju različite kliničke varijable i antropometrijske parametre. Neke od prediktivnih jednadžbi temeljene su na koncentraciji kreatinina u serumu, neke na koncentraciji cistatin C u serumu dok se neke temelje na kombinaciji kreatinina, cistatina C i ureje u serumu. U pedijatrijskoj populaciji najčešće se koristi Schwartzova ili modificirana Schwartzova jednadžba temeljena na koncentraciji kreatininu u serumu.

Schwartzova jednadžba

Schwartzova jednadžba za djecu izvedena je u usporedbi s klirensom inulina, a kreatinin je izmjeren modificiranom Jaffeovom metodom. Osim serumskog kreatinina bitna je i visina djeteta pomnožena s faktorom ovisnom o dobi djeteta (127).

$$eGFR = \frac{TV \times F}{s}$$

TV – tjelesna visina, S – koncentracija kreatinina u serumu, F – faktor novorođenčad 0,45

Godine 2009. izvorna je Schwartzova formula osuvremenjena i danas je poznata kao „Bedside Schwartz“ formula. Trenutačno se smatra jednom od najboljih metoda za izračunavanje eGFR-a kod djece. Uključuje određivanje koncentracije kreatinina sljedeće s IDMS-om. (128 – 130).

$$eGFR = 0,41x(visina/S)$$

ako je visina izražena u centimetrima; S –koncentracija kreatinina u serumu

Kako bi se izbjegle nepreciznosti jednadžbi temeljenih na kreatininu razvijen je i veći broj jednadžbi temeljenih na samom cistatin C u serumu; te jednadžbe temeljene su na cistatinu C uz demografske faktore i koncentraciju kreatinina u serumu (131). Neke od njih jesu:

Fillerova jednadžba

Filler i sur. opisali su 2003. godine prediktivnu jednadžbu GFR-a za pedijatrijsku populaciju temeljenu na recipročnoj koncentraciji cistatina C, a neovisnu o spolu, dobi, tjelesnoj masi ili visini. (132)

$$\log(GFR) = 1,962 + [1.123 X \log(1/CysC)]$$

Cys C - cistatin C u serumu

Jednadžba temeljena na cistatinu C

Za pedijatrijsku populaciju može se koristiti kad eGFR na temelju serumskog kreatinina nije dovoljna za određivanje stanja bubrega (133, 134).

$$eGFR = 70,69 X (Cys C)^{-0,931}$$

Cys C - cistatin C u serumu

Kreatinin – cistatin C CKID jednadžba

Godine 2012. osmišljena je jednadžba sa standardiziranim koncentracijama kreatinina i standardiziranim koncentracijama cistatina C koja može dati više informacija o stanju bolesnika (133, 134).

$$eGFR = 39.8 \times [ht/Scr]^{0,456} \times [1.8/cysC]^{0,418} \times [30/BUN]^{0.079} \times [1,076\text{male}]$$
$$[1,00\text{female}] \times [ht/1,4]^{0,179}$$

eGFR = mL/min/1,73 m²; S_{Cr} – kreatinin u serumu; S_{cys} – cistatin C u serumu; BUN – urejau serumu; ht – visina

2. OBRAZLOŽENJE TEME

2.1. Hipoteza i ciljevi istraživanja

Unatoč napretku u kliničkoj skrbi novorođenčeta, smrtnost povezana s bubrežnim oštećenjima i dalje je visoka u prvoj godini nakon otpuštanja iz bolnice. Najnoviji podatci naglašavaju da je oporavak bubrega često nepotpun te da kod oko 50 % bolesnika dolazi do nastanka KBB-a u razdoblju od 3 do 5 godina nakon ustanovljenoga ABO-a. Problem liječenja ABO-a novorođenčadi ponajprije je u tome što se ovaj poremećaj teško i relativno kasno otkriva zbog nedostatka specifičnoga ranog biokemijskog biljega (135). Danas se u tom smislu laboratorijska dijagnostika bubrežnih oštećenja još uvijek dobrim dijelom oslanja na promjene koncentracije kreatinina u serumu. Međutim, kreatinin kao biljeg oštećenja bubrega ima brojne nedostatke, od kojih je najveći nedovoljna dijagnostička osjetljivost. Stoga ne prestaje potraga za ranim biokemijskim biljegom koji bi bio od pomoći u ranom otkrivanju i prevenciji bubrežnih oštećenja (136 – 138).

NGAL u urinu potencijalno je dijagnostički važan biokemijski biljeg ABO-a ali je trenutačno nedovoljno istražen u najranijem životnom razdoblju . Iako se ne stvara samo u jednom tipu stanica što bi ga činilo idealnim biljegom, dosadašnja istraživanja (41, 139) upućuju na visoku dijagnostičku osjetljivost i specifičnost za rano otkrivanje bubrežnih bolesti.

Drugi nedovoljno istraženi biljeg bolesti bubrega jest hepcidin. Naime, željezom katalizirano oštećenje smatra se jednim od najranijih događaja u kaskadi patofizioloških procesa koji vode smanjenju bubrežne funkcije (67, 82). Preliminarna istraživanja upozorila su na prediktivna svojstva vrijednosti koncentracija NGAL-a i hepcidina u urinu za razvoj ABO-a. Posljedica pojačane ekspresije hepcidina u bubrežnim epitelnim stanicama nakon ishemije jest smanjenje ekspresije ferroportina, što rezultira blokadom otpuštanja slobodnog željeza (140 – 143). Na temelju dokazane prisutnosti u urinu i otkrića u epitelnim stanicama tubula i kore bubrega, hepcidin bi uz NGAL mogao pomoći u ranom otkrivanju bubrežnih oštećenja kod novorođenačke populacije.

Hipoteza:

NGAL i hepcidin biokemijski su biljezi čije će određivanje u urinu doprinijeti razumijevanju te bržem otkrivanju bubrežnog oštećenja u najranijoj novorođenačkoj dobi.

Cilj:

Da bismo razlikovali patološka stanja povezana s porastom NGAL-a i hepcidina u urinu, potrebno je najprije definirati referentne intervale za novorođenačku populaciju jer oni do sada nisu opisani u literaturi. Usporediti koncentracije mjerenih parametara u zdrave novorođenačadi naspram onih u koje je dokazano bubrežno oštećenje.

Specifični ciljevi uključuju:

Odrediti koncentraciju NGAL u urinu (uNGAL) zdrave novorođenačadi te utvrditi razliku u koncentraciji uNGAL-a i općih karakteristika novorođenačadi kao što su gestacijska zrelost, porođaja tjelesna težina, postnatalna dob.

Odrediti koncentraciju hepcidina u urinu zdrave novorođenačadi te utvrditi razliku u koncentraciji hepcidina i općih karakteristika novorođenačadi.

Odrediti koncentracije uNGAL-a i hepcidina u urinu u skupini novorođenačadi s bubrežnim oštećenima i usporediti s koncentracijama u zdrave novorođenačadi.

Utvrditi eventualne međuovisnosti koncentracija NGAL-a i hepcidina.

Utvrditi eventualne međuovisnosti NGAL-a i hepcidina, te svakog od dvaju analita, s biljezima općeg statusa i bubrežnog oštećenja koji se koriste u svakodnevnom radu (kreatinin, ureja, cistatin C) u svim ispitanim skupinama.

Procijeniti GFR svih ispitanika koristeći jednadžbe za eGFR u novorođenačkoj populaciji.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

Broj ispitanika (veličina uzorka) potreban za istraživanje za tri skupine novorođenčadi (skupina s akutnim bubrežnim oštećenjem, skupina s drugim bubrežnim oštećenjima i bolestima te kontrolna skupina koju čini zdrava novorođenčad) procijenjen je uz pomoć programa G*Power (Faul, Erdfelder, Lang i Buchner, 2007; inačica 3.1.9.2.). Uzevši u obzir istraživački cilj i planirane statističke obrade, za izračunavanje razlika u koncentracijama uNGAL-a i hepcidina u urinu odnosno veličine učinka korišteni su podaci o koncentracijama uNGAL-a i hepcidina u urinu utvrđeni u drugim istraživanjima. Na temelju preuzetih deskriptivnih parametara zadani su bili nešto stroži kriteriji za izračun veličine uzorka, s pretpostavljenom $\alpha = 0,05$ i snagom istraživanja od 90 %. Prema zadanim kriterijima bilo je potrebno minimalno 48 ispitanika, sa po 16 ispitanika u svakoj od skupina, dok je u istraživanju sudjelovalo 120 terminski zdrave novorođenčadi (Z-N), 20 terminske novorođenčadi s akutnim bubrežnim oštećenjem (N-ABO) te 23 novorođenčeta s drugim bubrežnim oštećenjima i bolestima (N-DBB).

U ovom istraživanju koristila se isključivo ostatna količina seruma preostala nakon provedenih rutinskih laboratorijskih pretraga. Uzorak urina bio je analiziran tek nakon pristanka roditelja ili skrbnika za sudjelovanje u istraživanju.

Istraživanje je provedeno od 1. srpnja 2016. do 1. srpnja 2020. u Odjelu za porodništvo i Odjelu za neonatologiju SKB-a Mostar. U ispitivanje je bila uključena terminski rođena novorođenčad rođena u Sveučilišnoj kliničkoj bolnici Mostar, Bosna i Hercegovina. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Sveučilišne kliničke bolnice Mostar (broj etičkog odobrenja 2272/12) i Povjerenstvo za etičnost eksperimentalnog rada, Farmaceutsko-biokemijski fakultet u Zagrebu (klasa: 643-02/18-01/02, Ur. broj: 251-62-03-18-40), u skladu s Helsinškom deklaracijom. Roditelji ispitanika pravodobno su obaviješteni o prirodi i ciljevima istraživanja, načinu provođenja istraživanja, pretpostavljenoj koristi i mogućim rizicima te su nakon toga prikupljeni informirani pristanci obaju roditelja.

Kriteriji uključivanja terminski zdrave rođene novorođenčadi nakon kliničkog pregleda bili su:

1. uredan nalaz fizikalno-kemijskog pregleda urina
2. starosna dob novorođenčeta < 25 dana
3. Apgar ocjena u 5 min ≥ 9
4. koncentracija serumskog CRP < 5 mg/L
5. normalan fizikalni i ultrazvučni pregled.

Ako je klinički pregled neposredno nakon rođenja upozorio na prisutnost infekcije, srčanih bolesti, urođenih anomalija i kromosomskog poremećaja, takva je novorođenčad isključena iz istraživanja.

Kriteriji uključanja terminski rođene novorođenčadi s bubrežnim bolestima kao što su akutno bubrežno oštećenje uzrokovano perinatalnom asfiksijom, akutne bubrežne insuficijencije uzrokovane hipoksijom, perinatalne infekcije koje se odražavaju na mokraćni sustav te hidronefroze definirani su kao:

1. patološki rezultat fizikalno-kemijskog pregleda urina
2. koncentracija serumskog kreatinina $> 106 \mu\text{mol/L}$
3. nastanak anurije ili oligurije
4. Apgar ocjena u 5. min ≤ 8
5. koncentracija serumskog CRP $> 5 \text{ mg/L}$.

Pacijenti s navedenim bubrežnim bolestima morali su, da bi bili uključeni u ispitivanje, zadovoljiti kriterij pod brojem 1 ili 2, a mogli su biti prisutni (ne nužno) i ostali navedeni kriteriji.

3.2. Uzorci

U ovom istraživanju koristila se je isključivo ostatna količina seruma preostala nakon provedenih rutinskih laboratorijskih pretraga (npr. CRP, ukupni i direktni bilirubin). Pri uzorkovanju pune krvi i urina korišteni su zatvoreni sustavi uzimanja krvi te specifični spremnici za jednokratnu upotrebu kako slijedi:

Uzorci seruma dobiveni su prikupljanjem 1,1 mL venske krvi u mikroepruvete s gelom (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka) korištenjem igle 23 G (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka) unutar 72 sata nakon rođenja. Prikupljeni uzorci centrifugirani su na 3000 o/min 15 minuta te nakon rutinski provedenih pretraga ostatni dio seruma je bio pohranjeni na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ do analize.

Uzorci urina (3 – 5 mL) uzeti su unutar 72 sata nakon rođenja uz pomoć pedijatrijskoga sterilnog sakupljača urina za novorođenčad s porođajnom težinom preko 2000 g (B. Braun Medical, Francuska) i centrifugirani na 1500 o/min tijekom pet minuta te pohranjeni na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ do analize. U uzorku urina određena je koncentracija hepcidina i uNGAL-a.

3.3. Metode

U Tablici 4. prikazani su biokemijski biljezi čija je koncentracija mjerena u ovom istraživanju. Koncentracija NGAL-a u uzorcima urina kvantitativno je određena korištenjem reagensa Urine NGAL proizvođača Abbott, Irska na Architect plus ci8200 analizatoru (Abbott, Chicago, SAD). Urine NGAL zasniva se na dvostupanjskoj kemiluminiscentnoj imunokemijskoj metodi (CMIA). Mikročestice su obložene monoklonskim antitijelima za određivanje NGAL-a. NGAL iz uzorka veže se na mikročestice obložene anti-NGAL antitijelima. Nakon ispiranja dodaje se akridinom obilježeni anti-NGAL konjugat kako bi se dobila reakcijska smjesa. Dodavanjem predaktivacijske i aktivacijske otopine aktivira se kemiluminiscentna reakcija. Koncentracija NGAL-a u uzorku proporcionalna je vrijednosti RLU².

Koncentracija hepcidina-25 kvantitativno je određena korištenjem kompetitivne ELISA metode proizvođača DRG, Instruments GmbH, Njemačka, uz očitavanje rezultata na analizatoru EZ Read 800 Plus (Biochrom, USA). Jažice su obložene monoklonskim antitijelima usmjerenim prema hepcidinu-25. Endogeni hepcidin-25 iz uzorka pacijenta natječe se s konjugatom koji sadržava kompleks hepcidin-25-biotina. Nakon inkubacije mikrotitarska se ploča ispere kako bi se zaustavila reakcija. U sljedećoj inkubaciji vezani biotin detektira se streptavidin-peroksidazom (enzimski kompleks). Nakon inkubacije ploča se ispere drugi put te se dodaje otopina supstrata. Intenzitet razvijene boje obrnuto je proporcionalan koncentraciji hepcidina-25 u uzorku pacijenta.³

Architect Cystatin C komplet reagensa (Architect Cystatin C, Sentinel CH, Italija) korišten je za mjerenje cistatina C na Architect plus ci8200 analizatoru (Abbott, Chicago, SAD). Architect Cystatin C zasniva se na turbidimetrijskoj imunokemijskoj metodi s potpomognutim česticama (PETIA). Lateks-čestice obložene su antitijelima na humani cistatin C te pomjena u apsorpciji uzrokovana aglutinacijom reakcijske smjese proporcionalna je koncentraciji cistatina C u uzorku.⁴

² Urine NGAL, Instruction for use. Abbott, Irska, 10/2015.

³ Hecpidin 25, Instruction for use. DRG Instruments GmbH, Njemačka, 7/2017.

⁴ Architect Cystatin C, Instruction for use. Sentinel CH, Italija, 10/2012.

Tablica 4. Biljezi korišteni u ovom istraživanju

Biljezi	Jedinice	Princip metode	Proizvođač	Analizator
NGAL	ng/mL	imunokemijska analiza s kemiluminiscentnim obilježivačem	Abbott	Architect plus ci8200
Hepcidin 25	ng/mL	ELISA	DRG	EZ Read 800 Plus
Cistatin C	mg/L	Imunoturbidimetrija	Abbott	Architect plus ci8200
CRP	mg/L	Imunoturbidimetrija	Beckman Coulter	Beckman Coulter Chemistry Analyzer AU680
Kreatinin	μmol/L	kompensirana spektrofotometrijska metoda po Jaffeu	Beckman Coulter	Beckman Coulter Chemistry Analyzer AU680
Ureja	mmol/L	spektrofotometrijska – kinetička metoda s očitanjem signala u UV području	Beckman Coulter	Beckman Coulter Chemistry Analyzer AU680
Željezo	μmol/L	spektrofotometrijska metoda s očitanjem signala u vidljivom području spektra	Beckman Coulter	Beckman Coulter Chemistry Analyzer AU680

Koncentracija CRP-a određena je u serumu korištenjem CRP Latex reagensa (Beckman Coulter, Irska) na Beckman Coulter Chemistry Analyzer AU680 (Beckman Coulter, SAD). CRP specifično reagira s antitijelima na ljudski CRP na česticama lateksa te daje netopive agregate. Smanjanje transmisije proporcionalno je koncentraciji CRP-a u uzorku.⁵

⁵ CRP Latex, Instraction for use. Beckman Coulter, Irska, 09/2007

Kompenzirana Jaffeova spektrofotometrijska metoda korištena je za kvantitativno određivanje kreatinina u ljudskom serumu. Kreatinin stvara žuto-narančasti spoj s pikrinskom kiselinom u alkalnom mediju. Promjena apsorpcije proporcionalna je koncentraciji kreatinina u uzorku.⁶

Za određivanje koncentracije ureje u serumu korištena je kinetička UV metoda. Ureja se hidrolizira u prisutnosti vode i ureaze i stvara se amonijak i ugljikov dioksid. Amonijak stvoren u prvoj reakciji veže se s 2-oksoglutaratom i NADH u prisutnosti glutamat-dehidrogenaze (GLDH). Smanjenje apsorpcije NADH mjereno u UV području spektra u jedinici vremena proporcionalno je koncentraciji ureje.⁷

Koncentracija željeza u serumu kvantitativno je određena korištenjem spektrofotometrijske metode za kvantitativno određivanje željeza u serumu i plazmi. Metoda rabi TPTZ [2,4,6-Tri-(2-piridil)-5-triazin] kao kromogen, a u kiselom mediju željezo vezano uz transferin razlaže se na slobodne ione željeza i apo-transferin. Kloridna kiselina i natrijev askorbat reduciraju ferio-ione željeza u fero-ione željeza. Fero-ioni željeza reagiraju s TPTZ-om i stvaraju plavo obojeni kompleks koji je moguće biokromatski izmjeriti pri 600/800 nm. Povećanje apsorpcije izravno je proporcionalno količini prisutnog željeza.⁸

3.4. Statistička analiza

Analiza podataka provedena je s pomoću SPSS 20 programskog paketa (IBM Corp., Armonk, NY, SAD). Korišteni su neparametarski testovi jer dobiveni podatci nisu zadovoljavali kriterije normalne raspodjele (Shapiro-Wilkov test). Podatci mjerenja naznačeni su kao medijan i interkvartilni raspon [od prvog (Q1) do trećeg (Q3) kvartila], osim gestacijske dobi koja je prikazana kao medijan i minimalno-maksimalno. Kod usporedbe razlika u medijanima između dviju nezavisnih skupina korišten je neparametarski Mann-Whitneyev U-test, a za ispitivanje razlika više podskupina varijabli korišten je neparametarski Kruskal-Wallisov test. Razina statističke značajnosti za sve testove postavljena je na 0,05, a dobivene P vrijednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajnima. Za procjenu dijagnostičke točnosti primijenjena je ROC analiza (engl. *receiver operating characteristic*). Korelacijski odnosi ispitani su Spearmanovim testom. Dobiveni koeficijent korelacije tumačili smo prema Coltonu (144) i to:

- $r = 0$ do 0,25 ili 0 do -0,25 (nema povezanosti)

⁶ Creatinine, Instruction for use. Beckman Coulter, Irska, 05/2009

⁷ Urea, Instruction for use. Beckman Coulter, Irska, 02/2009

⁸ Iron, Instruction for use. Beckman Coulter, Irska, 07/2009

- $r = 0,26$ do $0,50$ ili $-0,26$ do $-0,50$ (slaba povezanost)
- $r = 0,51$ do $0,75$ ili $-0,51$ do $-0,75$ (umjerena do dobra povezanost)
- $r = 0,76$ do 1 ili $-0,76$ do -1 (vrlo dobra do izvrsna povezanost)

4. REZULTATI

4.1. Osnovne kliničke karakteristike ispitanika

Ispitanici uključeni u istraživanje bili su podijeljeni u tri skupine kako slijedi : terminski zdrava novorođenčad, novorođenčad s akutnim bubrežnim oštećenjem te skupina s drugim bubrežnim oštećenjima i bolestima. U prvim minutama života mjereni su im osnovni vitalni pokazatelji koji su odraz životnih funkcija i sposobnosti prilagodbe organizma na nove fiziološke uvjete. Terminska zdrava novorođenčad (Z-N) čini prvu skupinu (N = 120) od kojih 49 ženskog i 71 novorođenče muškog spola. S obzirom na to da podaci nisu slijedili normalnu razdiobu, prikazani su medijanom i interkvartilnim rasponom. Medijan gestacijske dobi novorođenčadi iznosio je 38 tjedana za ispitanike ženskog spola, a 39 za ispitanike muškog spola. U Tablici 5. navedene su osnovne kliničke karakteristike skupine N-Z razdijeljene po spolu (gestacijski tjedan rođenja, porođajna težina, porođajna dužina i Apgar ocjena). U općim karakteristikama s obzirom na spol nije bilo statistički značajnih razlika kod N-Z skupine.

Tablica 5. Osnovne kliničke karakteristike terminski zdrave novorođenčadi

Parametar	Ž		M		P
	Medijan	IQ1 – IQ3	Medijan	IQ1 – IQ3	
N	49		71		
Gestacijski tjedan rođenja	38,6	37,2 – 40	39	38 – 40,1	0,923
Težina (kg)	3,350	2,900 – 3,800	3,485	3,050 – 3,865	0,630
Dužina (cm)	54	54 – 56	55	53 – 56	0,770
Apgar ocjena (5 min.)	10	10 – 10	10	10 – 10	1,000

Ž (novorođenčad ženskog spola), M (novorođenčad muškog spola).

Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon, osim gestacijskog tjedna rođenja koji je prikazan kao medijan i raspon (minimalno – maksimalno). Mann-Whitneyjev U-test,

*Statistički značajne P vrijednosti ($P < 0,05$)

U istraživanje je uključeno 20 terminski rođene novorođenčadi s ABO-om i to 9 novorođenčadi ženskoga i 11 muškog spola. Dakle, kao što je vidljivo iz Tablice 6. ne postoji statistički značajna razlika između varijabli (gestacijski tjedan rođenja, težina, dužina i Apgar ocjena) i spola kod novorođenčadi s ABO-om.

Tablica 6. Osnovne kliničke karakteristike terminske novorođenčadi s akutnim bubrežnim oštećenjem

Parametar	Ž		M		P
	Medijan	IQ1 – IQ3	Medijan	IQ1 – IQ3	
N	9		11		
Gestacijski tjedan rođenja	38,2	37,2 – 40	38,3	37,15 – 39,6	0,923
Težina (kg)	3,250	2,960 – 3700	3,275	3,050 – 3,865	0,630
Dužina (cm)	54	50 – 56	54,5	52,5 – 55	0,772
Apgar ocjena (5 min.)	3	2 – 5	3	1 – 4	0,810

Ž (novorođenčad ženskog spola), M (novorođenčad muškog spola).

Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon, osim gestacijskog tjedna rođenja koji je prikazan kao medijan i raspon (minimalno – maksimalno). Mann-Whitneyjev U-test,

*Statistički značajne P vrijednosti ($P < 0,05$)

Treću skupinu N-DBB (N = 23) činila su terminska novorođenčad s drugim bubrežnim oštećenjima i bolestima (urinska infekcija, hidronefroza). U Tablici 7. prikazani su osnovni klinički podatci za gore navedenu skupinu (gestacijski tjedan rođenja, porođajna težina, porođajna dužina i Apgar ocjena) po spolu. U osnovnim karakteristikama s obzirom na spol nije bilo statistički značajnih razlika u skupini N-DBB.

Tablica 7. Osnovne kliničke karakteristike terminske novorođenčadi s drugim bubrežnim oštećenjima i bolestima

Parametar	Ž		M		P
	Medijan	IQ1 – IQ3	Medijan	IQ1 – IQ3	
N	8		15		
Gestacijski tjedan rođenja	38,1	37,15 – 38	38,5	37,7 – 39,1	0,528
Težina (kg)	2,950	2,550 – 3,275	3,150	2,800 – 3,600	0,165
Dužina (cm)	52	50 – 53,5	53	51 – 54	0,137
Apgar ocjena (5 min.)	9	6 – 10	9	6 – 10	1,000

Ž (novorođenčad ženskog spola), M (novorođenčad muškog spola).

Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon, osim gestacijskog tjedna rođenja koji je prikazan kao medijan i raspon (minimalno – maksimalno). Mann-Whitneyjev U-test,

*Statistički značajne P vrijednosti ($P < 0,05$)

Kako bismo utvrdili postoji li statistički značajna razlika u općim karakteristikama među tri skupine koristili smo se Kruskal-Wallisovim testom. Usporedbom kliničkih karakteristika novorođenčadi u tri skupine utvrđena je statistička značajna razlika kod Apgar ocjene i težine. Iz Tablice 8. vidljivo je da najmanju Apgar ocjenu ima novorođenčad u skupini N-ABO dok novorođenčad iz skupine N-DBB ima najmanju tjelesnu težinu.

Tablica 8. Razlika među osnovnim karakteristikama novorođenčadi u tri skupine

Parametar	N-Z		N-ABO		N-DBB		P
	Medijan	Q1 – Q3	Medijan	Q1 – Q3	Medijan	Q1 – Q3	
N	120		20		23		
Gestacijski tjedan rođenja	39	39 – 40	38,2	37,2 – 40	38	37,2 – 39,1	0,418
Težina (kg)	3,45	3,10 – 3,80	3,25	3,00 – 3,73	3,00	2,55 – 3,60	0,028*
Dužina (cm)	53	50 – 54	54	52 – 56	53	50 – 54	0,391
Apgar ocjena (5 min)	10	10 – 10	3	1 – 5	9	6 – 10	0,018*

N-Z (terminska zdrava novorođenčad), N-ABO (terminska novorođenčad s akutnim bubrežnim oštećenjem), N-DBB (terminska novorođenčad s drugim bubrežnim oštećenjima i bolestima). Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon, osim gestacijskog tjedna rođenja koji je prikazan kao medijan i raspon (minimalno – maksimalno). Kruskal-Wallisov test

*Statistički značajne P vrijednosti ($P < 0,05$)

Koncentracija CRP-a u serumu prikazana je u Tablici 9. gdje je između skupina utvrđena statistički značajna razlika u koncentraciji CRP-a ($P = 0,027$). Najveća koncentracija CRP-a zabilježena je u skupini N-DBB. Također, iz Tablice 9. je vidljivo da nije zabilježena statistički značajna razlika u izmjerenoj koncentraciji CRP-a po spolu unutar određene skupine.

Tablica 9. Koncentracija C –reaktivnog proteina po skupinama i po spolu

Skupine	CRP (s)							
	mg/L							
	Cijela skupina			Ž		M		P
	Medijan	IQ1 –IQ3	P	Medijan	IQ1 – IQ3	Medijan	IQ1 – IQ3	
N-Z	2,9	0,6 – 4,2	0,027 ^{a,*}	2,9	0,4 – 4,3	3	1,8 – 4	0,902 ^b
N-ABO	9	3,2 – 110		7	2,7 – 81,1	11,5	3,65 – 123	0,700 ^b
N-DBB	12,3	13 – 120,5		11,45	0,9 – 175,5	13,6	0,7 – 75,6	0,561 ^b

Ž (novorođenčad ženskog spola), M (novorođenčad muškog spola). N-Z (terminska zdrava novorođenčad), N-ABO (terminska novorođenčad s akutnim bubrežnim oštećenjem), N-DBB (terminska novorođenčad a drugim bubrežnim oštećenjima i bolestima), s(serum). Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. ^aMann-Whitneyjev U-test, ^bKruskal-Wallisov test, *Statistički značajne P vrijednosti ($P < 0,05$)

4.2. Koncentracije biokemijskih biljega po skupinama

Koncentracije biokemijskih biljega NGAL-a i hepcidina mjerene su u uzorcima urina, dok su ostali biokemijski biljezi mjereni iz ostatnog dijela uzorka seruma preostalog nakon rutinski zatraženih pretraga (kretinin, ureja, cistatin C, željezo). U Tablici 10. prikazane su koncentracije biokemijskih biljega za skupinu Z-N. Uočena je statistički značajna razlika u medijanu koncentracija hepcidina u urinu ($P = 0,038$) i željeza ($P = 0,012$) ovisno o tjelesnoj težini. Podskupina novorođenčadi tjelesne mase manje od 2,99 kg imala je najmanje koncentracije hepcidina u urinu i željeza u serumu, dok je najveća koncentracija hepcidina u urinu i željeza u serumu bila kod novorođenčadi u podskupini porođajne težine veće od 3,5 kg. Sukladno postnatalnoj dobi koncentracije željeza u serumu ($P = 0,022$) statistički su se znatno razlikovale te je najmanja koncentracija željeza u serumu utvrđena kod novorođenčadi stare jedan dan. Također je vidljiva poznata i očekivana statistički značajna razlika u koncentraciji kreatinina u serumu tijekom postnatalne dobi ($P = 0,048$) gdje je novorođenčad starosti tri dana imala najmanje koncentracije kreatinina u serumu kao posljedicu eliminacije kreatinina podrijetlom iz krvi majke.

U skupini novorođenčadi s ABO-om (Tablica 11.) utvrđena je statistički značajna razlika u izmjerenoj koncentraciji hepcidina u urinu ($P = 0,026$), kreatinina u serumu ($P = 0,001$), željeza u serumu ($P = 0,018$) u ženske i muške novorođenčadi. Prema postnatalnoj dobi, također je utvrđena statistički značajna razlika u koncentraciji hepcidina u urinu ($P = 0,024$), kreatinina u serumu ($P = 0,007$) i željeza u serumu ($P = 0,025$) u prva tri dana života. Uočena je i statistički značajna razlika u koncentraciji željeza u serumu ($P = 0,044$) ovisno o tjelesnoj težini, pri čemu su najveće koncentracije uočene u novorođenčadi tjelesne težine iznad 3,5 kg. Kako su ispitanici podijeljeni u dvije podskupine sukladno Apgar ocjeni, podskupina s Apgar ocjenom manjom od 4 imala je statistički znatno veće koncentracije kreatinina ($P = 0,018$), hepcidina ($P = 0,032$) i manje koncentracije željeza ($P = 0,048$).

U Tablici 12. prikazane su izmjerene koncentracije biljega u skupini novorođenčadi s drugim bubrežnim bolestima te je utvrđena statistički značajno veća koncentracija uNGAL-a u podskupini novorođenčadi s Apgar ocjenom < 7 ($P = 0,001$). Također je uočena statistički značajna razlika u koncentraciji hepcidina u urinu po spolu ($P = 0,024$), pri čemu je novorođenčad ženskog spola imala manje koncentracije hepcidina u urinu od novorođenčadi muškog spola u skupini N-DBB.

Tablica 10. Koncentracija izmjerenih biokemijskih analita u skupini terminski zdrave novorođenčadi

	NGAL (u) ng/mL		Hepcidin (u) ng/mL		Cistatin C (s) mg/L		Kreatinin (s) μmol/L		Željezo (s) μmol/L		Ureja (s) mmol/L	
	Medijan (IQ1-IQ3)	P	Medijan (IQ1-IQ3)	P	Medijan (IQ1-IQ3)	P	Medijan (IQ1-IQ3)	P	Medijan (IQ1-IQ3)	P	Medijan (IQ1-IQ3)	P
Spol												
Ženski (N = 49)	21,4 (16 – 33)	0,751 ^a	24,82 (17,5 – 36,7)	0,358 ^a	1,96 (1,46 – 2,84)	0,251 ^a	75 (47 – 90)	0,412 ^a	12,4 (1,9 – 28,5)	0,067 ^a	3,7 (3,1 – 4,2)	0,291 ^a
Muški (N = 71)	23,9 (16 – 30)		28,70 (18,4 – 39,6)		2,02 (1,30 – 2,92)		72 (51 – 93)		10,4 (5,1 – 20,5)		3,5 (2,8 – 4,17)	
Postnatalna dob												
1. dan (N = 38)	21,4 (15 – 34)	0,957 ^b	25,48 (12,3 – 56,3)	0,065 ^b	2,03 (1,59 – 2,92)	0,082 ^b	75 (51 – 99)	0,048 ^{b,*}	11,1 (5,0 – 22,3)	0,022 ^{b,*}	3,5 (2,8 – 4)	0,073 ^b
2. dan (N = 68)	22,9 (17 – 30)		29,95 (12,3 – 78,7)		1,95 (1,30 – 2,84)		79 (47 – 101)		11,8 (3,9 – 28,5)		4 (3,2 – 4,3)	
3. dan (N = 14)	20,3 (15 – 31)		26,93 (12,3 – 55,5)		2,01 (1,49 – 2,57)		63 (49 – 81)		17,5 (7,4 – 20,9)		3,25 (2,5 – 3,9)	
Težina (kg)												
< 2,99 (N = 16)	22,4 (13 – 42)	0,239 ^b	22,96 (12,3 – 45,6)	0,038 ^b	2,05 1,59-2,92	0,061 ^b	73,5 (55 – 95)	0,082 ^b	8 (5,0 – 27,2)	0,012 ^{b,*}	3 (2,25 – 3,87)	0,264 ^b
3 – 3,49 (N = 68)	24,5 (17 – 32)		28,30 (12,3 – 66,7)		1,95 (1,54 – 2,84)		75,5 (51 – 103)		6,4 (6,0 – 28,5)		3,8 (3,42 – 4,24)	
> 3,5 (N = 36)	19 (15 – 27)		32,09 (12,3 – 78,5)		1,98 1,30 – 2,52		74,5 (47 – 99)		12,3 (5,0 – 28,9)		3,7 (3,15 – 4,2)	
Apgar ocjena (5 min)												
9 (N = 11)	22,9 (20 – 39)	0,359 ^a	31,20 (12,3 – 48,1)	0,058 ^a	2,06 (1,30 – 2,929)	0,076 ^a	77 (51 – 92)	0,069 ^a	9,85 3,1 – 24,3)	0,070 ^a	3,5 (3,1 – 4,3)	0,710 ^a
10 (N=109)	20 (16 – 30)		27,99 (12,3 – 78,7)		1,97 (1,49 – 2,84)		71 (47 – 89)		12,2 (5,1 – 38,5)		3,65 (2,8 – 4,2)	

s (serum), u (urin)

Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. ^aMann-Whitneyjev U-test, ^bKruskal-Wallisov test

*Statistički značajne P vrijednosti (P < 0,05)

Tablica 11. Koncentracija izmjerenih biokemijskih analita u skupini terminske novorođenčadi s akutnim bubrežnim oštećenjem

	NGAL (u) ng/mL		Hepcidin (u) ng/mL		Cistatin C (s) mg/L		Kreatinin (s) μmol/L		Željezo (s) μmol/L		Ureja (s) mmol/L		
	Medijan (IQ1 – IQ2)	P	Medijan (IQ1-IQ2)	P	Medijan (IQ1-IQ2)	P	Medijan (IQ1-IQ2)	P	Medijan (IQ1-IQ2)	P	Medijan (IQ1-IQ2)	P	
Spol	ženski (N = 9)	222,7 (156 – 561)	0,963 ^a	71,3 (63,4 – 91)	0,026 ^{a,*}	2,77 (1,64 – 5,7)	0,189 ^a	147 (100 – 189)	0,001 ^{a,*}	14 (4,3 – 15,2)	0,018 ^{a,*}	4,1 (3,8 – 6,9)	0,200 ^a
	Muški (N=11)	251,5 (121 – 593)		84,95 (73,3-95)		2,66 (2,03 – 5,00)		110 (90 – 139)		7,3 (28 – 23,0)		3,85 (3,6 – 4,82)	
Postnatalna dob	1. dan (N = 6)	222,7 (156 – 662)		92,3 (82 – 94,6)		3,18 (2,23 – 5,00)		106 (75 – 127)		7,7 (4,2 – 17,2)		5 (3,8 – 6,9)	
	2. dan (N = 9)	318,3 (144 – 595)	0,210 ^b	82,6 (70,1 – 91,4)	0,024 ^{b,*}	2,77 (2,03 – 5,70)	0,054 ^b	99 (94 – 147)	0,007 ^{b,*}	10,2 (2,8 – 23,1)	0,025 ^{b,*}	4,15 (3,9 – 6,7)	0,926 ^b
	3. dan (N = 5)	148,3 (107 – 368)		56,71 (50,1 – 77,2)		2,28 (5,6 – 7,3)		158 (97 – 189)		14 (4,3 – 15,2)		4,1 (3,25 – 5,7)	
Težina (kg)	< 2,99 (N = 4)	323,3 (247 – 547)		79,86 (58,8 – 91,6)		2,97 (2,03 – 5,7)		111 (79 – 147)		10,75 (4,3 – 23,1)		6,9 (6,27 – 7,57)	
	3 – 3,49 (N = 6)	166,1 (166 – 325)	0,315 ^b	83,42 (56,7 – 95)	0,185 ^b	2,69 (2,02 – 5,0)	0,312 ^b	106,5 (79 – 189)	0,160 ^b	8,95 (2,8 – 25,2)	0,044 ^{b,*}	4,15 (3,95 – 6,25)	0,098 ^b
	> 3,5 (N = 10)	298,3 (125 – 570)		94,95 (71,3 – 93,2)		2,61 (1,64 – 5,0)		127 (85 – 150)		12,1 (4,22– 3,0)		3,8 (3,05 – 4,02)	
Apgar ocjena (5min)	< 4 (N = 13)	298,3 (174 – 586)	0,130 ^a	84,43 (70,1 – 93,1)	0,032 ^{a,*}	3,02 (1,8 – 4,0)	0,086 ^a	112 (90 – 189)	0,018 ^{a,*}	8,72 (1,6 – 28,4)	0,048 ^{a,*}	4,6 (3,87 – 6,95)	0,385 ^a
	≥ 4 (N = 7)	127,1 (58 – 465)		75,42 (60,4 – 89,8)		1,96 (1,59 – 2,64)		90 (79 – 129)		13,1 (5,01 – 39,7)		4,1 (3,1 – 4,15)	

s (serum), u (urin),

Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. ^aMann-Whitneyjev U-test , ^bKruskal-Wallisov test

*Statistički značajne P vrijednosti (P < 0,05)

Tablica 12. Koncentracija izmjerenih biokemijskih analita u skupini terminske novorođenčadi s drugim bubrežnim oštećenjima i bolestima

Spol	NGAL (u) ng/mL		Hepcidin (u) ng/mL		Cistatin C (s) mg/L		Kreatinin (s) μmol/L		Željezo (s) μmol/L		Ureja (s) mmol/L	
	Medijan (IQ1 – IQ3)	P	Medijan (IQ1-IQ3)	P	Medijan (IQ1-IQ3)	P	Medijan (IQ1-IQ3)	P	Medijan (IQ1-IQ3)	P	Medijan (IQ1-IQ3)	P
	Ženski (N = 8)	43,1 (28,8 – 62,3)	0,074 ^a	18,99 (8,61 – 67,26)	0,024 ^{a,*}	1,86 (1,2 – 3)	0,167 ^a	77 (58 – 125)	0,327 ^a	5,1 (2,6 – 18,6)	0,068 ^a	3,65 (2,7 – 4,1)
Muški (N = 15)	34,2 (17,8 – 42)	34,08 (14,45 – 55,0)		2,0 (1,3 – 3)		71 (66 – 127)		7,1 (1,0 – 18,2)		4 (3,1 – 4,6)		
Postnatalna dob	1. dan (N = 9)	25,4 (16 – 42)	28,95 (4,86 – 9,04)	1,95 (1,3 – 2,9)	71 (58 – 125)	5,7 2,6 – 18,6	3,2 (2,8 – 3,7)					
	2. dan (N=8)	42,9 (30,9 – 1,8)	40,07 (10,29 – 63,23)	1,85 (1 – 3,0)	75,5 (61 – 127)	5,15 (1,0 – 12,1)	3,45 (2,32 – 4,45)					
	3. dan (N=6)	47,95 (35,9 – 65,7)	31,51 (12,60 – 71,98)	2,11 (1,4 – 3,0)	75 (65 – 110)	8,2 (3,2 – 14,6)	4,3 (4,15 – 4,9)					
Težina (kg)	<2,99 (N=11)	34,9 (16,2 – 47,4)	39,04 (6,96 – 67,26)	1,95 (1,2 – 3,0)	80 (58 – 125)	4,9 (2,6 – 18,6)	3,8 (3,0 – 4,3)					
	3-3,49 (N=4)	37,9 (23,0 – 43,5)	25,19 (10,19 – 49,82)	1,96 (1,2 – 2,8)	67,5 (66 – 96)	7,8 (5,4 – 10,7)	3,15 (2,7 – 3,65)					
	>3,5 (N=8)	49,55 (32,9 – 71,8)	28,99 (14,42 – 59,03)	1,92 (1,3 – 3,0)	78,5 (69 – 127)	6,62 (1,0 – 18,29)	4,15 (2,9 – 5,25)					
Apgar ocjena (5min)	<7(N=6)	53,9 (34,2 – 72,2)	18,99 (7,06 – 55,07)	2,18 (1,4 – 3,1)	76 (54 – 112)	8,17 (5,1 – 12)	4,2 (2,6 – 4,6)					
	≥7(N=17)	36,85 (20,8 – 44,9)	34,08 (10,22 – 61,13)	1,92 (1,2 – 2,9)	82 47 – 113	14,7 (4,2 – 18,1)	3,7 (3,02 – 4,3)					

s (serum), u (urin)

Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. ^aMann-Whitneyjev U-test, ^bKruskal-Wallisov test

*Statistički značajne P vrijednosti (P < 0,05)

4.3. Procjena brzine glomerularne filtracije.

U ovom istraživanju korištene su tri jednadžbe za procjenu brzine glomerularne filtracije: Schwartzova jednadžba (2009), jednadžba temeljena na cistatinu C (2012) i CKiD jednadžba (2012). Vrijednosti eGFR izračunanih prema Schwartzovoj jednadžbi u terminske i zdrave novorođenčadi razlikovale su se ovisno o Apgar ocjeni ($P = 0,048$). Vrijednosti eGFR-a bile su znatno veće u novorođenčadi s Apgar ocjenom 10 u prvoj minuti života od novorođenčadi koja je imala Apgar ocjenu 9 (Tablica 13.). Kod cistatin C i CKiD jednadžbi za procjenu glomerularne filtracije nije bilo statistički značajne razlike između kliničkih opažanja i vrijednosti eGFR-a u terminske i zdrave novorođenčadi.

Korištenjem Schwartzove jednadžbe utvrđene su statistički značajne razlike kod vrijednosti eGFR-a po spolu ($P = 0,046$), težini ($P = 0,050$) i Apgar ocjeni ($P = 0,041$) u skupini N-ABO (Tablica 14.). Iz rezultata je vidljivo da je novorođenčad s ABO-om ženskog spola imala manje vrijednosti eGFR-a od novorođenčadi muškog spola. Novorođenčad tjelesne mase manje od 2,99 kg imala je najmanje vrijednosti eGFR-a, a također manje vrijednosti eGFR-a imala je novorođenčad s manjom Apgar ocjenom. Vrijednosti eGFR-a dobivene korištenjem cistatin C i CKiD jednadžbi za procjenu brzine glomerularne filtracije statistički su se značajno razlikovale po spolu ($P = 0,038$ i $P = 0,032$) i postnatalnoj dobi ($P = 0,039$ i $P = 0,045$). Kao i kod Schwartzove jednadžbe, novorođenčad ženskog spola imala je manje vrijednosti eGFR-a od novorođenčadi muškog spola. Što se tiče postnatalne dobi, dobiveni su različiti rezultati eGFR-a ovisno o korištenim jednadžbama. U novorođenčadi starosti jedan dan najmanje vrijednosti eGFR-a dobivene su cistatin C jednadžbom, dok su u novorođenčadi starosti tri dana najmanje vrijednosti dobivene CKiD jednadžbom.

Korištenjem Schwartzove, cistatin C i CKiD jednadžbe nije uočena statistički značajna razlika kod vrijednosti eGFR-a izračunanog s navedenim jednadžbama s obzirom na spol, težinu, dob i Apgar ocjenu u skupini N-DBB (Tablica 15.).

Tablica 13. eGFR izračunan različitim jednadžbama s obzirom na spol, težinu, dob i Apgar ocjenu u terminski zdrave novorođenčadi

		Schwartzova jednadžba mL/min/1,73 m ²			Cistatin C jednadžba mL/min/1,73 m ²			CKID jednadžba mL/min/1,73 m ²		
		Medijan	IQ1 – IQ3	P	Medijan	IQ1-IQ3	P	Medijan	IQ1 – IQ3	P
Spol	ženski (N = 49)	26	19 – 44	0,871 ^a	37	21 – 49	0,165 ^a	29	20 – 43	0,064 ^a
	muški (N = 71)	25,5	19 – 40		36,5	26 – 47		26,5	20 – 34	
Postnatalna dob	1. dan (N = 38)	26	19 – 40		37	26 – 46		28	20 – 36	
	2. dan (N = 68)	25	19 – 44	0,136 ^b	37	21 – 47	0,074 ^b	28	20 – 39	0,091 ^b
	3. dan (N = 14)	29,5	25 – 44		36,5	29 – 49		30	24 – 43	
Težina (kg)	< 2,99 (N = 16)	26,5	19 – 39		36,58	26 – 46		26,5	20 – 34	
	3 – 3,49 (N = 68)	25	19 – 40	0,064 ^b	37	27 – 47	0,387 ^b	28	20 – 36	0,093 ^b
	> 3,5 (N = 36)	27	20 – 44		37	21 – 49		28,5	23 – 43	
Apgar ocjena (5 min)	9 (N = 11)	25	19 – 40		36	26 – 41		28	20 – 33	
	10 (N = 109)	28	19 – 44	0,048 ^{a,*}	37,5	21 – 49	0,089 ^a	28	20 – 43	0,980 ^a

Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. ^aMann-Whitneyjev U-test, ^bKruskal-Wallisov test

*Statistički značajne P vrijednosti (P < 0,05).

Tablica 14. eGFR izračunan različitim jednadžbama s obzirom na spol, težinu, dob i Apgar ocjenu u terminske novorođenčadi s akutnim bubrežnim oštećenjem

		Schwartzova jednadžba mL/min/1,73 m ²			Cistatin C jednadžba mL/min/1,73 m ²			CKID jednadžba mL/min/1,73 m ²		
		Medijan	IQ1-IQ3	P	Medijan	Q1-Q3	P	Medijan	Q1-Q3	P
Spol	ženski (N = 9)	15	10 – 36	0,046 ^{a,*}	27	13 – 35	0,038 ^{a,*}	18	12 – 29	0,032 ^{a,*}
	muški (N = 11)	20,5	14 – 25		33,5	16 – 40		23,5	16 – 28	
Postnatalna dob	1. dan (N=6)	18	15 – 25		25	16 – 34		23	16 – 27	
	2.dan (N=9)	15	15 – 25	0,128 ^b	30	16 – 34	0,039 ^{b,*}	21	16 – 27	0,045 ^{b,*}
	3.dan (N=5)	13	11 – 33		29	16 – 33		18	13 – 29	
Težina (kg)	<2,99 (N=4)	14	11 – 15		26	13 – 37		16	12 – 21	
	3-3,49 (N=6)	23	10 – 36	0,050 ^{b,*}	31,5	16 – 40	0,271 ^b	25,5	13 – 29	0,089 ^b
	>3,5 (N=10)	18	13 – 33		29	16 – 37		23	18 – 26	
Apgar ocjena (5 min)	<4(N=13)	24	18 – 44		38	27 – 42		27	21 – 32	
	≥4 (N=7)	29	18 – 55	0,041 ^{a,*}	39	22 – 48	0,092 ^a	25	20 – 42	0,100 ^a

Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. ^aMann-Whitneyjev U-test , ^bKruskal-Wallisov test

*Statistički značajne P vrijednosti (P < 0,05)

Tablica 15. eGFR izračunan različitim jednadžbama s obzirom na spol, težinu, dob i Apgar ocjenu u terminske novorođenčadi s drugim bubrežnim oštećenima i bolestima

		Schwartzova jednadžba mL/min/1.73 m ²			Cistatin C jednadžba mL/min/1.73 m ²			CKID jednadžba mL/min/1.73 m ²		
		Medijan	Q1 – Q3	P	Medijan	Q1-Q3	P	Medijan	Q1-Q3	P
Spol	ženski (N = 8)	22,50	15 – 31	0,067 ^a	38,5	22 – 42	0,071 ^a	25,21	22 – 29	0,189 ^a
	muški (N = 15)	20	13 – 27		36	27 – 48		24	21 – 27	
Postnatalna Dob	1.dan (N=9)	21	15 – 31	0,231 ^b	36	22 – 42	0,091 ^b	24	22 – 36	0,069 ^b
	2.dan (N=8)	20,75	13 – 27		39	29 – 49		27	23 – 29	
	3.dan (N=6)	18,5	15 – 26		34,5	27 – 47		24	21 – 29	
Težina (kg)	<2,99 (N=11)	20	15 – 31	0,098 ^b	37	22 – 43	0,059 ^b	24	21 – 29	0,259 ^b
	3-3,49 (N=4)	21,5	15 – 27		36,5	29 – 38		27	25 – 29	
	>3,5 (N=8)	24,5	13 – 27		38	28 – 48		24	22 – 29	
Apgar ocjena (5 min)	<7(N=6)	26	12 – 35	0,092 ^a	36	21 – 40	0,061 ^a	26	21 – 27	0,092 ^a
	≥7(N=17)	22	14 – 28		39	25 – 37		25	20 – 26	

Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. ^aMann-Whitneyjev U-test, ^bKruskal-Wallisov test

*Statistički značajne P vrijednosti (P < 0,05)

4.4. Provjera značajnosti razlika u koncentraciji biljega i vrijednosti eGFR-a među trima skupinama

U svrhu provjere razlika u parametrima među triju skupina proveden je Kruskal-Wallisov χ^2 test (Tablica 16.). Nakon utvrđivanja statistički značajni razlika proveden je *post-hoc* test posebno za po dvije skupine novorođenčadi. Utvrđene su razlike u koncentraciji uNGAL-a između tri analizirane skupine ($P < 0,001$), pri čemu N-ABO skupina ima najveće koncentracije uNGAL-a u odnosu na N-Z ($P < 0,001$) i N-DBB ($P < 0,001$).

Tablica 16. Razlika u parametrima među trima skupinama

Parametar	N-Z		N-DBB		N-ABO		P
	Medijan	IQ1– IQ3	Medijan	IQ1-IQ3	Medijan	IQ1-IQ3	
NGAL (u) (ng/mL)	22,90	16,0 – 31,2	38,80	25,4 – 56,5	222,70	148,4 – 561,4	< 0,001 ~, ^
Hepcidin (u) (ng/mL)	26,13	18,5 – 39,6	26,54	10,2 – 58,7	82,60	70,1 – 92,8	< 0,001 ~, ^
Cistatin C (s) (mg/L)	1,99	1,9 – 2,2	1,95	1,8 – 2,3	2,77	2,2 – 3,5	<0,001 ~, ^
Kreatinin (s) (μ mol/L)	75,0	66,0 – 88,5	76,00	68 – 110	116,00	90,0 – 139,0	<0,001 ^, ~
Željezo (s) (μ mol/L)	11,60	8,6 – 20,7	5,70	3,7 – 12,1	9,10	5,6 – 18,2	0,002 ~, ^
Ureja (s) (mmol/L)	3,60	2,9 – 4,2	3,80	3,0 – 4,3	4,10	3,8 – 7,0	0,026 ~
Schwartzova jednadžba mL/min/1.73 m ²	26,00	22,0 – 31,0	23,00	16,0 – 28,5	17,00	14,0 – 24,5	0,020 ~
CistatinC jednadžba mL/min/1.73 m ²	37,00	34,0 – 40,0	36,0	32,2 – 39,1	29,00	20,5 – 34,5	<0,001 ~, ^
CKID jednadžbe mL/min/1,73 m ²	28,00	26,0 – 31,0	25,80	23,4–27,5	21,00	17,0 – 25,5	0,010 ~, ^

P < 0,05 (statistički značajna razlika); s (serum); u (urin);

~ statistički značajna razlika između skupina: N-Z i N-DBB

≈ statistički značajna razlika između skupina: N-Z i N-ABO

^ statistički značajna razlika između skupina: N-DBB i N-ABO

Također je utvrđena statistički značajna razlika između skupine N-Z i N-DBB ($P=0,011$), pri čemu skupina N-Z ima znatno manju koncentraciju uNGAL-a. Za hepcidin u urinu je utvrđena najveća koncentracija kod skupine s N-ABO u odnosu na skupinu N-Z ($P < 0,001$) te skupinu N-DBB ($P < 0,001$). Također je utvrđeno da nema statistički značajne razlike između skupina N-Z i N-DBB ($P = 0,905$).

Cistatin C pokazuje sličan obrazac poput hepcidina u urinu te nisu utvrđene statistički značajne razlike između N-Z i N-DBB ($P = 1,000$). S druge strane, utvrđene su statistički značajne razlike između N-ABO skupine u odnosu na skupinu N-Z ($P < 0,001$) te N-DBB ($P < 0,001$) pri čemu N-ABO skupina ima najveće koncentracije cistatina C.

Za koncentraciju kreatinina u serumu utvrđene su statistički značajne razlike između N-Z i N-ABO skupine ($P = 0,017$) te N-DBB i N-ABO ($P = 0,031$). Iz rezultata vidljivo da skupina N-ABO ima najveće koncentracije kreatinina u serumu dok N-Z skupina nema statistički značajno manje koncentracije kreatinina od skupine N-DBB ($P = 0,712$).

Utvrđene su statistički značajne razlike u koncentraciji željeza u serumu između skupine N-DBB i N-Z ($P < 0,001$). Skupina N-DBB ima znatno manje koncentracije željeza u serumu u odnosu na zdrave. Između skupina N-ABO i N-Z nije bilo statistički značajne razlike ($P = 0,810$) kao ni između skupina N-ABO i N-DBB ($P = 0,155$).

Za koncentracije ureje u serumu utvrđene su statistički značajne razlike između skupina N-Z i N-ABO ($P = 0,020$), pri čemu N-ABO skupina ima znatno veće koncentracije ureje. Razlike između skupine N-Z i skupine N-DBB ($P = 0,951$) te N-DBB i N-ABO skupine ($P = 0,194$) nisu se pokazale statistički značajnu razliku.

U skupini N-Z, vrijednosti eGFR-a izračunate Schwartzovom jednadžbom statistički se značajno razlikuje od skupine N-ABO skupine ($P = 0,002$). Vidljivo je da skupina N-Z ima i veće vrijednosti eGFR-a od N-ABO, dok između skupina N-Z i N-DBB ($P = 0,532$) te N-ABO i N-DBB ($P = 0,332$) nije zabilježena statistički značajna razlika.

Za cistatin C jednadžbu utvrđene su statistički značajne razlike u eGFR-u između skupine s N-ABO i N-Z ($P < 0,001$) te N-ABO i N-DBB ($P = 0,005$). S druge strane, statistički značajna razlika nije zabilježena između skupina N-Z i N-DBB ($P = 0,921$).

eGFR vrijednosti N-Z skupine izračunate CKID jednadžbom statistički su se značajno razlikovala od skupine N-ABO ($P < 0,001$) i N-DBB ($P < 0,031$). Skupina N-Z ima veće vrijednosti eGFR-a od druge dvije skupine. Između skupina N-ABO i N-DBB nisu utvrđene statistički značajne razlike u vrijednostima eGFR-a izračunanim uz pomoć CKID jednadžbe ($P = 0,506$).

4.5. Ispitivanje međusobne povezanosti koncentracija izmjerenih biljega

Korelacijskom analizom ispitana je povezanost između mjerenih parametra terminski zdrave novorođečadi (Tablica 17.). Spearmanov test korelacije pokazao je pozitivnu slabu povezanost između koncentracije uNGAL-a i hepcidina u urinu. Rezultati upućuju na slabu pozitivnu povezanost između cistatina C i kreatinina u serumu te je ustanovljena i slaba negativna povezanost između cistatina C i eGFR-a izračunatog Schwartzovom jednadžbom.

U skupini ispitanika N-ABO (Tablica 18.) koncentracija uNGAL-a pokazala je slabu pozitivnu povezanost s koncentracijom hepcidina u urinu. Rezultati upućuju i na slabu negativnu povezanost hepcidina u urinu i koncentracije željeza u serumu kao i slabu pozitivnu povezanost hepcidina u urinu i Schwartzove jednadžbe. Utvrđeno da koncentracija cistatina C ima umjerenu slabu povezanost s koncentracijom ureje u serumu kao i slabu pozitivnu povezanost sa koncentracijom željeza u serumu. Iz rezultata je također vidljiva slaba pozitivna povezanost koncentracije ureje u serumu i vrijednosti eGFR izračunate Schwartzovom jednadžbom

Korelacijskom analizom utvrđena je slaba pozitivna povezanost kod skupine N-DBB između uNGAL-a i hepcidina u urinu, uNGAL-a i koncentracije ureje u serumu kao i slaba negativna povezanost uNGAL-a i koncentracije željeza u serumu. Uočena je i slaba pozitivna povezanost izmjerenih biljega u serumu cistatina C, ureje i kreatinina s hepcidinom u urinu. Kao i kod skupine N-ABO i u skupini N-DBB vidljiva je slaba negativna povezanost između ureje i vrijednosti eGFR izračunate Schwartzovom jednadžbom. Također je samo u ovoj skupini ispitanika uočena slaba negativna povezanost kreatinina i željeza u serumu (Tablica 19.).

Tablica 17. Koeficijenti korelacije s pripadajućom statističkom značajnosti izmjerenih koncentracija analita u terminski zdrave novorođenčadi

		NGAL (u)	Hepcidin (u)	Cistatin C (s)	Ureja (s)	Kreatinin (s)	Željezo (s)	Schwartzova jednadžba	Cistatin C jednadžba	CKID jednadžba
NGAL (u)	r	1	0,358	0,063	0,140	0,071	0,060	-0,082	-0,067	-0,131
	P		P = 0,001	P = 0,584	P = 0,223	P = 0,538	P = 0,613	P = 0,471	P = 0,565	P = 0,256
Hepcidin (u)	r		1	-0,009	0,090	-0,015	0,172	0,012	0,056	0,033
	P			P=0,938	P=0,437	P=0,896	P=0,146	P=0,919	P=0,631	P=0,775
Cistatin C (s)	r			1	-0,040	0,260	0,017	-0,253	-0,924	-0,569
	P				P=0,731	P=0,022	P=0,885	P=0,026	P=0,001	P=0,001
Ureja (s)	r				1	0,199	-0,061	-0,175	0,042	-0,212
	P					P=0,082	P=0,068	P=0,127	P=0,717	P=0,625
Kreatinin (s)	r					1	-0,163	-0,979	-0,260	-0,834
	P						P=0,167	P=0,001	P=0,048	P=0,001
Željezo (s)	r						1	0,147	-0,002	0,173
	P							P=0,448	P=0,988	P=0,216
Schwarztova jednadžba	r							1	0,218	0,857
	P								P=0,058	P<0,001
Cistatin C jednadžba	r								1	0,496
	P									P=0,001
CKID jednadžba	r									1
	P									

s (serum); u (urin);

r (koeficijent korelacije); Jačim tiskom otisnuti su statistički značajni koeficijenti korelacije

Statistički značajne P vrijednosti (P < 0,05)

Tablica 18. Koeficijenti korelacije s pripadajućom statističkom značajnosti izmjerenih koncentracija analita u terminske novorođenčadi s akutnim bubrežnim oštećenjem

		NGAL (u)	Hepcidin (u)	Cistatin C (s)	Ureja (s)	Kreatinin (s)	Željezo (s)	Schwartzova jednadžba	Cistatin C jednadžba	CKID jednadžba
NGAL (u)	r	1	0,490	0,109	0,238	-0,179	-0,025	0,063	-0,103	0,011
	P		P = 0,046	P = 0,677	P=0,357	P=0,491	P=0,926	P=0,811	P=0,693	P=0,966
Hepcidin (u)	r		1	0,150	-0,229	-0,060	-0,343	0,418	-0,023	0,242
	P			P=0,567	P=0,378	P=0,819	P=0,177	P=0,095	P=0,929	P=0,350
Cistatin C (s)	r			1	0,562	0,205	0,301	0,023	-0,593	-0,290
	P				P=0,019	P=0,430	P=0,241	P=0,929	P=0,012	P=0,259
Ureja (s)	r				1	0,039	0,213	0,324	-0,621	-0,536
	P					P=0,881	P=0,413	P=204	P=0,008	P=0,027
Kreatinin (s)	r					1	0,173	-0,582	-0,498	-0,620
	P						P=0,506	P=0,014	P=0,042	P=0,008
Željezo (s)	r						1	-0,277	-0,336	-0,344
	P							P=0,282	P=0,178	P=0,177
Schwartzova jednadžba	r							1	0,431	0,842
	P								P=0,084	P<0,001
Cistatin C Jednadžba	r								1	0,671
	P									P=,003
CKID Jednadžba	r									1
	P									

s (serum); u (urin);

r (koeficijent korelacije); Jačim tiskom otisnuti su statistički značajni koeficijenti korelacije

Statistički značajne P vrijednosti (P < 0,05)

Tablica 19. Koeficijenti korelacije s pripadajućom statističkom značajnosti izmjerenih koncentracija analita u terminske novorođenčadi s drugim bubrežnim oštećenjima i bolestima

		NGAL (u)	Hepcidin (u)	Cistatin C (s)	Ureja (s)	Kreatinin (s)	Željezo (s)	Schwartzova jednadžba	Cistatin C jednadžba	CKID jednadžba
NGAL (u)	r	1	0,290	-0,137	0,337	0,174	-0,374	0,130	0,053	0,153
	P		P = 0,214	P = 0,532	P=0,116	P=0,427	P=0,412	P=0,553	P=0,809	P=0,485
Hepcidin (u)	r		1	0,270	0,308	0,256	-0,017	0,070	0,305	0,178
	P			P=0,249	P=0,186	P=0,276	P=0,942	P=0,769	P=0,191	P=0,452
Cistatin C (s)	r			1	-0,054	-0,330	0,259	0,051	-0,093	-0,009
	P				P=0,963	P=0,124	P=0,233	P=0,819	P=0,672	P=0,963
Ureja (s)	r				1	0,048	-0,071	-0,398	-0,096	0,235
	P					P=0,829	P=0,748	P=0,060	P=0,663	P=0,281
Kreatinin (s)	r					1	-0,264	-0,420	0,327	-0,283
	P						P=0,189	P=0,046	P=0,128	P=0,191
Željezo (s)	r						1	-0,238	-0,102	0,077
	P							P=0,274	P=0,643	P=0,729
Schwartzova jednadžba	r							1	-0,166	0,474
	P								P=0,449	P=0,022
Cistatin C jednadžba	r								1	0,121
	P									P=0,581
CKID Jednadžba	r									1
	P									

s (serum); u (urin);

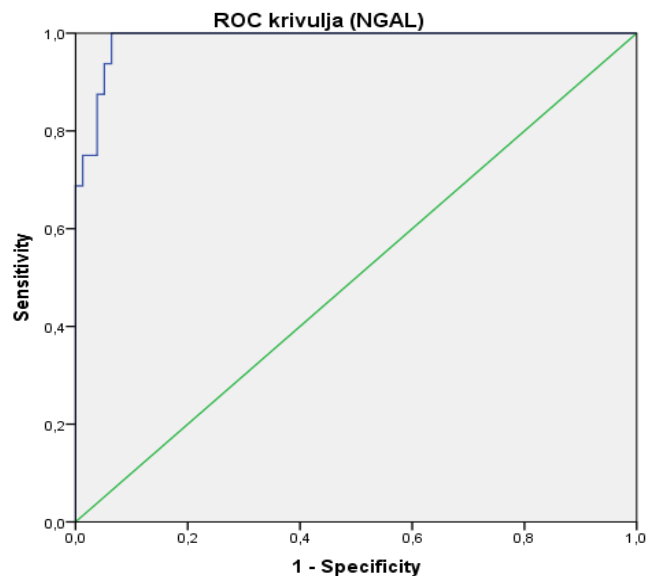
r (koeficijent korelacije); Jačim tiskom otisnuti su statistički značajni koeficijenti korelacije

Statistički značajne P vrijednosti ($P < 0,05$)

4.6. Dijagnostička točnost NGAL-a i hepcidina

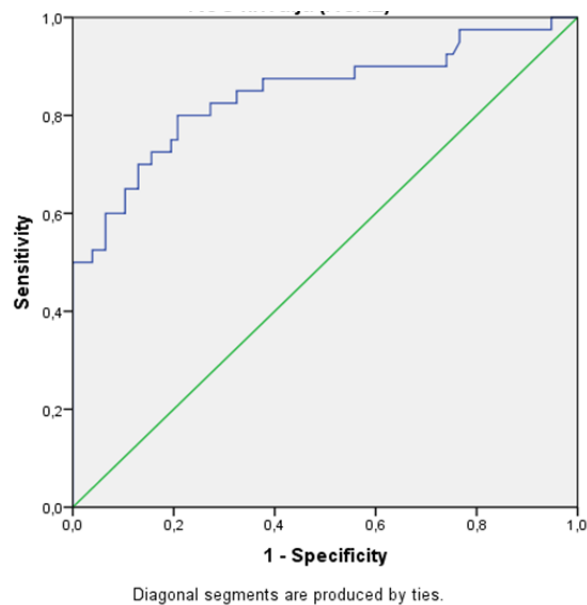
ROC analiza dvodimenzijski je grafički prikaz koji pokazuje odnos između dijagnostičke specifičnosti i osjetljivosti pretrage. Dijagnostička specifičnost pokazatelj je učestalosti negativnih rezultata u osoba za koje je poznato da nemaju bolest ili, točnije, koje su stvarno negativne. Dijagnostička osjetljivost pretrage pokazatelj je učestalosti pozitivnih rezultata u bolesnika za koje se zna da imaju određenu bolest, dakle da su stvarno pozitivne. Optimalna kombinacija osjetljivosti i specifičnosti na ROC krivulji za pojedini test obilježena je točkom najbližom gornjemu lijevom kutu krivulje, a određena je najvećim AUC-om. Veće vrijednosti AUC-a označavaju bolje diskriminacijske sposobnosti testa.

U ovom su dijelu rezultata s pomoću ROC statističke analize krivuljom vizualizirana i klasificirana svojstva određivanja koncentracije uNGAL-a i hepcidina u urinu. ROC analizom ispitana je dijagnostička točnost koncentracije uNGAL-a i hepcidina u urinu odnosno njihova moć diskriminacije ili korektna klasifikacije između skupine zdrave novorođenčadi i skupine novorođenčadi s ABO (Tablica 20.). Pregledom osjetljivosti (98,1 %), specifičnosti (93,6 %) i površine ispod krivulje (engl. *area under the ROC curve*, AUC) od 0,997 za uNGAL može se zaključiti da uNGAL ima izvrsne karakteristike razlikovanja navedene skupine novorođenčadi pri graničnoj vrijednosti od 67,3 mg/mL (Slika 9.).



Slika 9. ROC krivulja NGAL-a u urinu kod akutnoga bubrežnog oštećenja

Hepcidin u urinu (Slika 10.) ima vrlo dobru dijagnostičku točnost pri usporedbi terminski zdrave i novorođenčadi s ABO-om (AUC = 0,855). Kod granične vrijednosti hepcidina u urinu od 52,1 ng/mL dobivena je osjetljivost od 81,1 % iz čega proizlazi da 81,1 % novorođenčadi s ABO-om ima potvrđenu dijagnozu, ali 18,9 % novorođenčadi s ABO-om može imati lažno negativan rezultat. S druge strane, pri navedenoj je graničnoj vrijednosti specifičnost iznosila 70,2 %, iz čega proizlazi da 29,8 % stvarno zdrave novorođenčadi ima koncentracije hepcidina iznad 52,1 ng/mL.



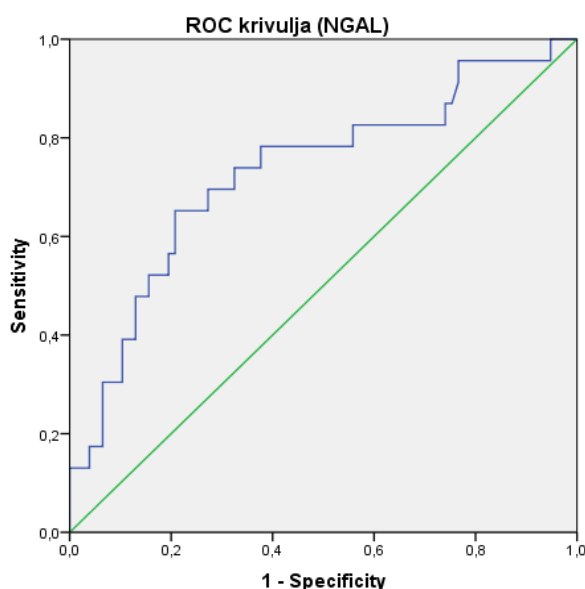
Slika 10. ROC krivulja hepcidina u urinu kod akutnoga bubrežnog oštećenja

Tablica 20. Dijagnostička točnost, ispitana analizom ROC krivulje za koncentracije NGAL-a i hepcidina u urinu kod akutnoga bubrežnog oštećenja

	NGAL (ng/mL)	Hepcidin (ng/mL)
AUC	0,987	0,855
Osjetljivost (%)	98,1	81,1
Specifičnost (%)	93,6	70,2
Granična vrijednost	67,3	52,1
POV	14,7	12,82
NOV	0,02	0,31

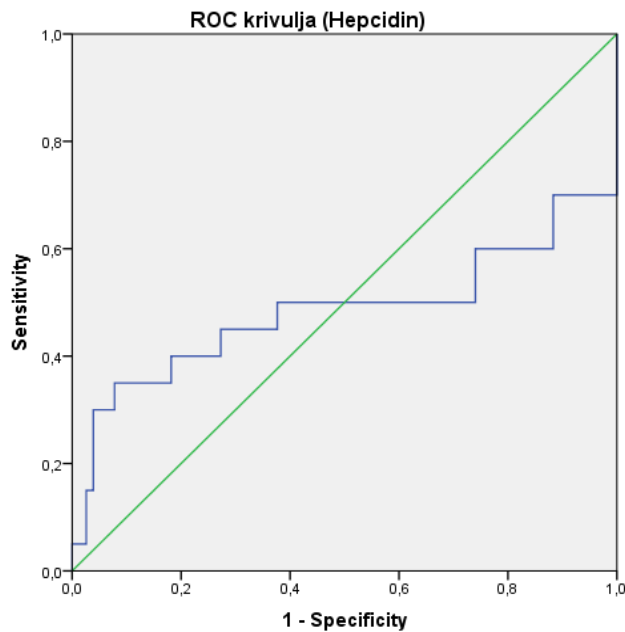
AUC – engl. *area under the curve* = površina ispod krivulje, POV = pozitivan omjer vjerojatnosti: odnos između vjerojatnosti pozitivnog rezultata testa s obzirom na prisutnost bolesti i vjerojatnost pozitivnog rezultata testa s obzirom na odsutnost bolesti; NOV = negativan omjer vjerojatnosti: odnos između vjerojatnosti negativnog rezultata testa s obzirom na prisutnost bolesti i vjerojatnost negativnog rezultata testa s obzirom na odsutnost bolesti;

Primjenom ROC analize utvrđena je dijagnostička točnost uNGAL-a i hepcidina u urinu kod novorđenčadi s drugim bubrežnim oštećenjima i bolestima (urinska infekcija, hidronefroza) u odnosu na zdravu skupinu novorođenčadi (Tablica 21.).



Slika 11. ROC krivulja prikazuje dijagnostičku točnost NGAL-a u urinu u razlikovanju zdrave novorođenčadi od skupine s drugim bubrežnim oštećenjima i bolestima

Rezultati su pokazali dobru dijagnostičku točnost uNGAL-a uz površinu ispod ROC krivulje $AUC = 0,717$ (Slika 11.). Na temelju granične vrijednosti 29,65 ng/mL utvrđena je osjetljivost od 70 % i specifičnost od 72,7 %. S druge strane, hepcidin u urinu (Slika 12.) nije učinkovit test za razlikovanje zdrave novorođenčadi s drugim bubrežnim bolestima (AUC = 0,484) te praktički „razlikuje“ ove skupine po slučaju. Na temelju vrijednosti od 26 ng/mL uspješno se klasificira 50 % bolesne i oko 50 % zdrave novorođenčadi.



Slika 12. ROC krivulja prikazuje dijagnostičku točnost hepcidina u urinu u razlikovanju zdrave novorođenčadi od skupine s drugim bubrežnim oštećenjima i bolestima

Tablica 21. Dijagnostička točnost ispitana analizom ROC krivulje za koncentracije NGAL-a i hepcidina u urinu u razlikovanju zdrave novorođenčadi od skupine s drugim bubrežnim oštećenjima i bolestima

	NGAL (ng/mL)	Hepcidin (ng/mL)
AUC	0,717	0,484
Osjetljivost	70,0	50,0
Specifičnost	72,7	50,6
Granična vrijednost	29,65	26
POV	2,57	1,13
NOV	0,41	0,99

AUC – engl. *area under the curve* = površina ispod krivulje, POV = pozitivan omjer vjerojatnosti: odnos između vjerojatnosti pozitivnog rezultata testa s obzirom na prisutnost bolesti i vjerojatnost pozitivnog rezultata testa s obzirom na odsutnost bolesti; NOV = negativan omjer vjerojatnosti: odnos između vjerojatnosti negativnog rezultata testa s obzirom na prisutnost bolesti i vjerojatnost negativnog rezultata testa s obzirom na odsutnost bolesti;

4.7. Referentni interval

Rezultati laboratorijskih pretraga u širokoj su primjeni u donošenju medicinske odluke (postavljanje dijagnoze, procjena rizika te praćenja učinka liječenja i tijeka bolesti) pa sve do probira zdrave populacije u svrhu prevencije određenih bolesti. Stoga smo kod zdrave novorođenčadi odredili 95-postotni interval koji obuhvaća 95 % središnjih koncentracija omeđenih 2,5. i 97,5. percentilom po spolu. Rezultati 95-postotnog intervala za koncentraciju uNGAL-a, hepcidina kao i cistatina C koji još nije u široj kliničkoj primjeni u novorođenačkoj populaciji (Tablica 23.).

Tablica 23. Referentni interval NGAL-a, hepcidina, cistatina C po spolu

Parametri	Cijela skupina	Ž	M
	2,5 - 97,5 percentilom	2,5 - 97,5 percentilom	2,5 - 97,5 percentilom
NGAL (u) ng/ml	5,3 – 47,5	5,3 – 47,1	5,3 – 49,8
Hepcidin (u) ng/mL	12,3 – 57,6	12,3 – 58,1	12,3 – 57,5
Cistatin C (s) mg/L	0,93 – 3,1	0,93 – 3,1	1,5 – 3,16

s (serum); u (urin)

5. RASPRAVA

Puno je otvorenih pitanja i dilema u dijagnostici bubrežnih bolesti i oštećenja u vulnerabilnoj i izrazito specifičnoj skupini kao što je novorođenčad. Uspješno rano prepoznavanje te zbrinjavanje i praćenje tijekom bubrežne funkcije u prvom redu ovisi o pravodobnoj i točnoj laboratorijskoj dijagnostici. Fetalni bubrežni je bitan za normalan rast i razvoj *in utero*, a nakon rođenja osnovna je uloga bubrega održavanje ravnoteže elektrolita i tekućine te uklanjanju nepoželjnih tvari iz organizma. Stoga je bitno što prije dijagnosticirati bubrežna oštećenja i stanja, a potom primijeniti odgovarajuće liječenje u cilju sprječavanja nastanka trajnog oštećenja bubrega koje u adolescentnoj ili odrasloj dobi može dovesti i do kronične bubrežne insuficijencije. Stoga su u svakodnevnom kliničkom radu važni specifični i dostupni laboratorijski biljezi koji će što ranije otkriti promjene u bubrežnoj funkciji.

U ovom su radu izloženi rezultati ispitivanja koncentracije uNGAL-a i hepcidina u urinu u usporedbi s biljezima općeg statusa bubrežne funkcije u serumu koji su trenutačno u upotrebi (kreatinin, ureja, cistatin C), a s ciljem što boljeg razumijevanja i otkrivanja bubrežnog oštećenja u najranijoj, novorođenačkoj dobi.

U kliničkoj praksi tijekom neonatalnog razdoblja nerijetko se susreću infekcije koje se odražavaju na mokraćni sustav, također su moguće abnormalnosti razvoja organa mokraćnog sustava kao što je hidronefroza te u konačnici i brzo gubljenje bubrežne funkcije kod ABO-a. Najčešći faktori rizika za ABO jesu perinatalna asfiksija, nefrotoksičnost brojnih lijekova, neonatalna sepsa, manja Apgar ocjena, zakašnjela reanimacija, način i postotak kisika primijenjenog u reanimaciji, vrijeme potrebno za transport od rodilišta do odjela intenzivne njege, prematuritet i brojni drugi problemi neonatalnog razdoblja. Najčešća posljedica perinatalne asfiksije je ABO. Upravo je perinatalna asfiksija glavni uzrok neonatalnog morbiditeta i smrtnosti koji pogađa 5 – 10 na 1000 živorođenih (145). Sama patofiziologija ABO-a nakon hipoksijskog događaja temelji se na hipoperfuziji bubrega i povećanom oksidacijskom oštećenju (146). Definicija ABO-a novorođenčeta problematična je jer se trenutačne dijagnoze zasnivaju na dva osnovna parametra – kreatininu u serumu i diurezi. Kao i kod odraslih, oba su parametra kasni pokazatelji oštećenja, a ne biljezi samog oštećenja. Međutim, tumačenje koncentracije kreatinina u prvim danima postnatalnog života dodatno je otežano jer kreatinin u serumu novorođenčeta odražava bubrežnu funkciju majke te se može pogrešno procijeniti GFR novorođenčeta zbog eventualnih promjena kinetike eliminacije (121,147).

U dosad objavljenoj literaturi može se naći velik broj radova koji su usmjereni prema određivanju i ispitivanju značenja koncentracije NGAL-a (urin, serum i plazma) kao biljega ABO-a, ali i drugih patoloških stanja u odrasloj populaciji. Kako literaturni podaci upućuju na

vrlo dobru korelaciju određivanja koncentracije NGAL-a i hepcidina u serumu i urinu (143, 148), u ovom je radu za određivanje koncentracije NGAL-a i hepcidina kao uzorak odabran urin koji se dobiva neinvazivnim postupkom. Urin kao uzorak izbora otvara mogućnost da se dijagnoza ABO-a postavi odmah pri prvom mokrenju u prvim satima života, prije očitovanja kliničke slike i prije porasta vrijednosti drugih, prije svega konvencionalnih biljega ABO-a koji su u upotrebi. Iako je biljege u urinu kod novorođenčadi ponekad teško odrediti vrlo rano, neposredno po rođenju ili u prvim satima života zbog problema s prikupljanjem urina, određivanje biljega u prvom izmokrenom urinu moglo bi u budućnosti postati rutinska pretraga u one novorođenčadi gdje za to postoji indikacija. Tako bi rani pokazatelji neonatalnog ABO-a bili dostupni u pravom trenutku u uzorku koji je dobiven neinvazivnim postupkom.

U ovom su istraživanju, radi što boljeg razumijevanja dijagnostičke točnosti izabranih biljega bubrežne funkcije, ispitanici bili podijeljeni u tri skupine (N-Z, N-ABO i N-DBB). U sklopu osnovnih demografskih i kliničkih karakteristika novorođenčadi uključene u istraživanje prikazani su spol, gestacijski tjedan rođenja, porođajna težina, dužina i Apgar ocjena te je uočena statistički značajna razlika u porođajnoj težini ($P = 0,028$) i Apgar ocjeni ($P = 0,018$) gdje je skupina N-DBB imala najmanju težinu, a N-ABO očekivano najmanju Apgar ocjenu. Što se tiče porođajne težine novorođenčadi skupine N-DBB, ona je bila u okvirima prosječne težine zdrave novorođenčadi (2) te je ovo istraživanje potvrdilo rezultate prethodnih istraživanja koja su pokazala da novorođenčad s ABO-om ima manju Apgar ocjenu u prvim minutama života (147,149).

U ovom su istraživanju uočene statistički značajne razlike među skupinama u koncentracijama rutinskih biljega u serumu kao što su kreatinin i ureja koji se trenutačno najviše koriste u kliničkoj praksi u dijagnostici i praćenju ABO-a. Kod osnovnoga konvencionalnog biljega kreatinina u serumu uočen je najmanji medijan koncentracije ($75 \mu\text{mol/L}$) u skupini koju je činila zdrava novorođenčad, a skupina N-ABO imala je najveći medijan koncentracije kreatinina ($116 \mu\text{mol/L}$). Rezultati koje smo dobili za N-Z skupinu nalaze se oko gornje granice referentnog intervala Caliper studije (150). Potrebno je, međutim, naglasiti da se koncentracija kreatinina u Caliper studiji odnosi na novorođenčad starosti do 15 dana, a dobro je poznato da je koncentracija kreatinina u prvim danima života pod utjecajem majčine bubrežne funkcije te da koncentracija kreatinina pada s postnatalnom starosti. Utvrđena je statistički značajna razlika u koncentracijama sukladno postnatalnoj dobi ($P = 0,048$) te je vidljivo da zdrava novorođenčad postnatalne starosti jedan dan ima veću koncentraciju kreatinina od novorođenčadi starosti tri

dana. To zapravo upućuje na dosadašnje spoznaje prema kojima kreatinin prelazi posteljicu te je koncentracija kreatinina u serumu novorođenčeta u prvim danima života izravan odraz majčine koncentracije kreatinina i njezine bubrežne funkcije. Između skupine N-Z i N-DBB nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji kreatinina. S druge strane, bitno je naglasiti da je koncentracija kreatinina u serumu bila najveća kod novorođenčadi s ABO-om i to kod novorođenčadi postnatalne starosti tri dana. Time ovo istraživanje potvrđuje rezultate prethodnih istraživanja gdje je koncentracija kreatinina u serumu kasni pokazatelj ABO-a te je njegov porast vidljiv tek nakon 48 – 72 sata (151 – 153). U skupini N-ABO uočena je statistički značajna razlika u koncentraciji kreatinina po spolu ($P = 0,001$) i Apgar ocjeni ($P = 0,018$), koja nije zabilježena kod skupine N-Z i N-DBB. Iz rezultata je vidljivo da je veće koncentracije kreatinina u N-ABO skupini imala novorođenčad s manjom Apgar ocjenom. Rezultati prethodnoga višecentarskog istraživanja zabilježili su veći broj slučajeva ABO-a kod novorođenčadi ženskog spola (154), a drugo veće istraživanje također je utvrdilo povezanost manje Apgar ocjene s težim bubrežnim oštećenjem (155).

Kako bi se procijenila bubrežna funkcija pacijenta ili utvrdile bubrežne anomalije u kliničkoj se praksi uz kreatinin koristi i određivanje koncentracije ureje u serumu, koja nastaje zbog potrebe za uklanjanjem toksičnih dušikovih metabolita, prije svega amonijaka. Određivanje ureje vrlo je važno za dijagnozu ABO-a u novorođenčadi (156). Usporedbom s Caliper studijom (157), koja predlaže referentni interval u pedijatrijskoj populaciji za ureju po dobi i spolu, medijan koncentracije izmjeren kod naših ispitanika iznosi 3,6 mmol/L, što odgovara predloženom referentnom intervalu Caliper studije. Kod skupine N-Z nije zabilježena statistički značajna razlika u koncentraciji ureje po spolu, postnatalnoj dobi, težini kao ni Apgar ocjeni. Novorođenčad s ABO-om uključena u istraživanje imala je najveću koncentraciju ureje u serumu u usporedbi s druge dvije skupine u prvim danima života, čime ovo istraživanje također potvrđuje rezultate prethodnih istraživanja (156, 158). Kod nekih su istraživanja vidljivi oprečni rezultati. Statistički značajna razlika u koncentraciji ureje u serumu uočena je između zdrave novorođenčadi i asfiksичne novorođenčadi s ABO-om u prvim danima života (156, 158), dok Jalali i sur. nisu utvrdili statistički značajnu razliku u svom istraživanju (159). Također, u istraživanju novorođenčadi s urinskom infekcijom koncentracije ureje u serumu bile su unutar referentnog intervala (160).

Željezo je esencijalan element te je kao takav od iznimnog značenja za ljudski organizam. Uključen je u mnoge bitne biološke procese (eritropoeza, signalizacija hipoksije,

funkcije mitohondrija te sinteza i popravak DNA), a zalihe u organizmu podložne su regulaciji hepcidinom. Prekomjerna ekspresija hepcidina u jetri javlja se kod povećanih koncentracija željeza (161), a dokazano je da bubrežna ishemijsko-reperfuzijska ozljeda uzrokuje povećanje koncentracije serumskoga i nehenskog željeza (162). Na ulogu željeza u oštećenju bubrega upućuju dokazi da željezo i molekule koje sadržavaju željezo mogu uzrokovati izravno oštećenje bubrežnih tubularnih stanica *in vitro* i *in vivo* (163 – 166). Poznato je kako je željezo uključeno u razvoj oksidacijskog stresa, a time i u nastanak štetnih kisikovih radikala (engl. *reactive oxygen species*, ROS). U fiziološkim uvjetima željezo postoji vezano za proteine kao što su transferin, feritin i NGAL te u feri (Fe^{3+}) stanju. Međutim, pod patološkim uvjetima slobodno željezo može lako proći kroz jednu reakciju prijenosa elektrona i pretvoriti se u fero (Fe^{2+}) stanje koje može biti vrlo reaktivno i toksično.

U ovom istraživanju uočena je statistički značajna razlika u koncentraciji željeza u serumu po postnatalnoj dobi i tjelesnoj težini u skupinama N-Z i N-ABO. Najveću koncentraciju željeza imala je novorođenčad starosti tri dana kao i novorođenčad s tjelesnom težinom $> 3,5$ kg, što se može pripisati fiziološkom raspadu eritrocita i ukupnom volumenu krvi. Sukladno rezultatima Caliper studije (157) koja predlaže referentni interval željeza u serumu po dobi i spolu, medijan koncentracije izmjeren kod naših ispitanika unutar je predloženoga referentnog intervala. Koncentracija željeza u serumu u ovom istraživanju statistički se značajno razlikovala između skupina N-Z i N-DBB, kao i između skupina N-DBB i N-ABO. Medijan koncentracije željeza u serumu najmanji je bio kod skupine Z-DBB, što je moguće pripisati utjecaju upalnog stanja. Naime, upravo je skupina Z-DBB imala najveće koncentracije CRP-a, što potvrđuje dosadašnje spoznaje da upalni odgovor i sinteza proteina akutnog odgovora dovode do promjene koncentracije i statusa željeza (167). Koncentracija željeza statistički se (iako relativno slabo) razlikovala u N-ABO skupini po Apgar ocjeni ($P = 0,048$), iako u istraživanju Mondala i sur. nije dokazana statistički značajnu povezanost koncentracije željeza u serumu i Apgar ocjene u prvim minutama života (168).

Kako se uNGAL pokazao odličnim pokazateljem ABO-a kod odrasle populacije, neinvazivnost uzimanja uzorka te dostupnost određivanja u neonatalnom razdoblju mogli bi doprinijeti razumijevanju bubrežne funkcije i prepoznavanju ABO-a i kod novorođenčadi. Temeljem sadašnjih spoznaja vrlo se mali broj istraživanja u literaturi odnosi na određivanje koncentracije uNGAL-a u zdrave novorođenčadi te stoga referentni intervali za novorođenčad dosad nisu jasno postavljeni. Nadalje, glavnina istraživanja koja se odnose na populaciju novorođenčadi

uključuje zapravo prerano rođenu novorođenčad jer je kod takve novorođenčadi i veći rizik od razvoja ABO-a, sepse i drugih patoloških stanja.

Do sada je provedeno tek nekoliko istraživanja gdje se mjerila koncentracija uNGAL-a kod zdrave novorođenčadi stare nekoliko dana. Objavljeni radovi koji su određivali koncentraciju uNGAL-a uključivali su uglavnom male skupine ispitanika i djecu različite dobi. Jedno od tih istraživanja jest istraživanje Chen i sur. u kojem je mjerena koncentracija uNGAL-a kod 38 terminski zdrave rođene novorođenčadi u trećem danu života. Medijan koncentracije uNGAL-a iznosio je 88,1 ng/mL (169). Sarafidis i sur., istražujući skupinu od 22 terminski zdrave novorođenčadi, dobili su medijan koncentracije uNGAL-a u prvom danu života 6,8 ng/ml, a u trećem danu medijan koncentracije uNGAL-a iznosio je 7,1 ng/mL (170). U istraživanju koje su proveli Abdelhady i sur. sudjelovalo je 20 zdrave novorođenčadi kao kontrolna skupina, medijan koncentracije uNGAL-a iznosio je 9 ng/ml (171). Jedino do sada provedeno istraživanje na većem broju ispitanika bilo je istraživanje Kamianowske i sur. U njihovo ispitivanje bilo je uključeno 88 terminski zdrave novorođenčadi, a medijan koncentracije uNGAL-a iznosio je 16,74 ng/mL. Njihovo istraživanje je dokazalo da je koncentracija uNGAL-a znatno veća kod novorođenčadi ženskog spola gdje je medijan koncentracije iznosio 24,16 ng/mL (13,30 ng/mL za novorođenčad muškog spola), uz $p < 0,01$ (172). Bitno je naglasiti da je u svim navedenim istraživanjima koncentracija mjerena ELISA metodama različitih proizvođača. Istraživanje koje je uključivalo 30 zdravih odraslih osoba pokazalo je da su koncentracije uNGAL-a dobivene CMIA (Abbott) metodom znatno veće od onih dobivenih ELISA metodom (R&D Systems) (173). Stoga je bitno napomenuti da su koncentracije u ovom istraživanju mjerene standardiziranom i potpuno automatiziranom CMIA metodom, za razliku od većine prije navedenih istraživanja koja su se koristila ELISA metodama različitih proizvođača (169 – 172).

U istraživanju u kojem je sudjelovalo 25 novorođenčadi medijan koncentracije uNGAL-a iznosio je 30,3 ng/mL (174), a u ovom je istraživanju taj medijan iznosio je 22,9 ng/mL. Bitno je naglasiti da su koncentracije u oba istraživanja mjerene CMIA metodom. U ranijim istraživanjima, u kojima je ispitivana povezanost uNGAL-a s manjom tjelesnom težinom i gestacijskom dobi novorođenčadi, dobiveni su oprečni rezultati. Kod dva istraživanja uočena je povezanost uNGAL-a i tjelesne težine (175,176), dok su rezultati ovog istraživanja u suglasnosti s rezultatima Elmasa i sur., odnosno nisu utvrđenje razlike u koncentracijama uNGAL-a u odnosu na porođajnu težinu (177). Istraživanje Seaidi i sur. utvrdilo je povezanost postnatalne dobi s koncentracijom uNGAL-a (178). S druge strane, rezultati ovog istraživanja slažu sa istraživanjem Lavery i sur. koje nije utvrdilo razlike u koncentraciji uNGAL-a s

obzirom na postnatalnu dob (176). Također, iz rezultata ovog istraživanja u skupini koju je činila zdrava novorođenčad nije uočena značajna razlika u koncentraciji uNGAL-a između djece s Apgar ocjenom 10 i Apgar ocjenom 9, kao ni znatne razlike u koncentraciji uNGAL-a s obzirom na spol, postnatalnu dob i težinu novorođenčadi.

Vrijedeći laboratorijski kriteriji za otkrivanje ABO-a imaju velike nedostatke jer je kreatinin kasni biljeg zbog konstantne brzine stvaranja u mišićnom tkivu, a interpretacija u prvim danima života izrazito je otežana jer je pod utjecajem bubrežne funkcije majke. Stoga su potrebni novi biljezi koji nisu pod utjecajem bubrežne funkcije majke i koji uspješno prepoznaju ABO neposredno po porodu. Unutar ovog istraživanja dobiveni su rezultati koji pokazuju da skupina N-ABO ima povećanu koncentraciju uNGAL-a za razliku od N-Z, tako da je medijan koncentracije u skupini N-ABO iznosio 222,70 ng/mL. Također nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji uNGAL-a kod novorođenčadi s ABO-om po spolu, postnatalnoj dobi i težini. Iako nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji uNGAL-a po Apgar ocjeni, uočeno je da je veće koncentracije uNGAL-a imala novorođenčad s manjom Apgar ocjenom. Essey i sur. uočili su u svom istraživanju da nije bilo statistički značajne razlike prema postnatalnoj dobi, ali da su najveće koncentracije zabilježene kod novorođenčadi s ABO-om starosti jedan dan (179). Iako ni u ovom istraživanju nije bilo statistički značajne razlike prema postnatalnoj dobi, najveće koncentracije uNGAL-a zabilježene su kod novorođenčadi s ABO-om starosti dva dana. U literaturi je opisano samo nekoliko istraživanja koja su uključivala terminsku novorođenčad s ABO-om koja su dokazala povećanu koncentraciju uNGAL-a kao i u ovom istraživanju. U istraživanju koje su proveli Wang i sur. novorođenčad s ABO-om imala je statistički znatno veće koncentracije uNGAL-a od kontrolne skupine te je srednja vrijednost koncentracije uNGAL-a kod novorođenčadi s ABO-om iznosila 12,03 $\mu\text{g/L}$ (180). U istraživanju Timovska i sur. srednja vrijednost koncentracije uNGAL-a iznosila je 373,8 ng/mL (181), a Oncel i sur. dobili su srednju vrijednost koncentracije uNGAL-a 99 ng/mL (182) kod novorođenčadi s ABO-om. Medijan koncentracije uNGAL-a kod pacijenata s ABO-om u istraživanju Esseja i sur. iznosio je 391 ng/mL (179). Tanigasalam i sur. zaključili su u svom istraživanju da je uNGAL koristan biljeg za ranu dijagnozu ABO-a kod asfiksичne novorođenčadi s ABO-om. Mjerenjem uNGAL-a utvrdili su da je medijan koncentracije kod pacijenta s ABO-om 165 ng/mL (142).

Rezultati metaanalize Bellos i sur. upućuju na to da je koncentracija uNGAL-a povećana u novorođenčadi s perinatalnom asfiksijom i komplikacijama povezanim s ABO-om te može poslužiti kao dijagnostički i prognostički biljeg. Longitudinalnim mjerenjem uNGAL-a

omogućilo bi se definiranje optimalnog vremena uzorkovanja i procjena korisnosti u smislu biljega oporavka nakon oštećenja bubrega (183).

Koncentracija uNGAL-a u skupini N-DBB statistički se značajno razlikovala od skupine N-Z i N-ABO. Medijan koncentracije bio je veći od medijana koncentracije zdrave novorođenčadi, a s druge strane znatno manji od skupine s ABO. Statistički značajna razlika uočena je u koncentraciji uNGAL-a po Apgar ocjeni gdje je novorođenčad s Apgar ocjenom većom od 7 imala manje koncentracije uNGAL-a, a statistički značajna razlika nije uočena u koncentraciji uNGAL-a po spolu, postnatalnoj dobi i težini. Kako su upravo N-DBB skupinu činili pacijenti s hidronefrozom ili urinskom infekcijom, ovo je istraživanje potvrdilo rezultate prethodnih istraživanja kod kojih je uočena povećana koncentracija uNGAL-a (184, 185). U istraživanju Madsen i sur. koncentracija uNGAL-a bila je povećana kod pacijenata s hidronefrozom u usporedbi s kontrolnom skupinom ($p < 0,05$) (186). S druge strane, Krzemien i sur. nisu dobili statistički značajnu razliku između koncentracije uNGAL-a kod kontrolne skupine i afebrilnih pacijenata s urinskom infekcijom, dok je statistički značajna razlika uočena kod febrilnih pacijenata s urinskom infekcijom (187).

U dosad objavljenj literaturi najveći broj istraživanja usmjeren je prema određivanju i ispitivanju značenja koncentracije hepcidina u održavanju homeostaze željeza. Heparidin se uglavnom ekspresira u jetri, iako je njegova ekspresija također otkrivena u makrofagima, beta-stanicama gušterače, bubrezima, adipocitima i plućima. Inducira kovalentnu modifikaciju feroportina, što dovodi do njegove internalizacije i lizosomske razgradnje te se tako sprječava izlazak željeza iz stanice (74, 188, 189). Ekspresija hepcidina se povećava pri povećanim koncentracijama željeza, pri infekciji i upali, a supresija sinteze hepcidina vidljiva je kod nedostatka željeza, hipoksiji, anemijama i pojačanoj eritropoezi (190 – 195). U patološkim stanjima, povezanim s poremećajem metabolizma željeza, mjerenje koncentracije hepcidina (serum, urin) kao središnjeg regulatora homeostaze željeza otvara nove dijagnostičke, ali i terapijske mogućnosti u kojima bi hepcidin mogao poslužiti kao biljeg za praćenje i prognozu bolesti. U skladu s istraživanjima Sanada i sur. hepcidin u urinu može se koristiti kao dijagnostički i prognostički biljeg za anemiju s nedostatkom željeza (196) te je njegova velika prednost kao dijagnostičkog biljega u neinvazivnoj prirodi uzorka kao i u malim dnevnim varijacijama koncentracije (197). S druge strane, ekspresija hepcidina kod novorođenčadi u prvim danima nakon poroda nije u potpunosti jasna. Još uvijek je nerazjašnjeno jesu li koncentracije hepcidina u krvi pupkovine isključivo fetalnog podrijetla jer posteljica također proizvodi hepcidin (198), a mogućnost prolaska hepcidina kroz posteljicu još nije u potpunosti

razjašnjena. Mali broj dosadašnjih istraživanja proveden je u uzorcima urina terminske novorođenčadi, a iz literaturnih podataka vidljivo je da su hepcidin u serumu i urinu značajno povezani te da je korelacija vidljiva i kod prerano rođene novorođenčadi kao i kod odraslih (63, 199, 200).

U ovom istraživanju koncentracija hepcidina u skupini N-Z iznosila je 26,12 ng/mL te je zabilježena statistički značajna razlika po težini ($P = 0,038$). Iako to statistički nema dovoljnu značajnost ($P = 0,065$), u ovom istraživanju medijan koncentracije novorođenčadi starosti dva i tri dana je veći od medijana koncentracije hepcidina u urinu novorođenčadi stare jedan dan, što bi se zapravo moglo pripisati povećanju koncentracije željeza u cirkulaciji kao rezultatu raspadanja eritrocita u prvim danima života. Prentice i sur. u svom su istraživanju utvrdili koncentraciju hepcidina u urinu od 45 ng/mL u novorođenčadi starosti 24 – 48 sati te 87,1 ng/mL u novorođenčadi starosti 72 – 96 sati (201). Također, literaturni podatci upućuju da je srednja koncentracija hepcidina u uzorku umbilikalne krvi veća u terminski rođene novorođenčadi (29,7 ng/mL) nego u prerano rođene novorođenčadi (8,4 ng/mL) (202). Kulik i sur. u svom su istraživanju utvrdili da je medijan koncentracija hepcidina u serumu treći dan od rođenja u zdrave novorođenčadi iznosio 66,79 ng/mL (203). Koncentracije zdrave novorođenčadi bile su se u rasponu od 26,8 do 67,7 ng/mL u istraživanja Wu i sur. (204). U istraživanju Uijterschou i sur. koncentracija hepcidina iznosila je 69,6 ng/mL (205). Kao i u ovom istraživanju, Santos i sur. nisu utvrdili statistički značajnu razliku u koncentraciji hepcidina po spolu u uzorku umbilikalne krvi (206). U ovom je istraživanju uočeno da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji hepcidina po težini ($P = 0,038$) te da novorođenčad težine manje od 2,99 kg ima i najmanju koncentraciju hepcidina. Ustanovljeno je u dosadašnjim istraživanjima da postoji povezanost između težine i koncentracije hepcidina te da na koncentraciju hepcidina utječe porođajna težina i sama eritropoetska aktivnosti (207) te da je smanjena koncentracija hepcidina u serumu povezana s manjom porođajnom težinom i dužinom terminske novorođenčadi kao posljedicom konzumiranja cigareta majki tijekom trudnoće (208).

Kako je funkcija hepcidina povezana s bioraspoloživosti željeza, dokazano je da tijekom ishemije dolazi do katabolizma hem-proteina, što rezultira povećanjem labilnih ferio (Fe^{2+}) iona (209-211). Fe^{2+} katalizira stvaranje hidroksilnog radikala ($\cdot OH$) interakcijom sa superoksidnim anionom (O^{2-}) i vodikovim peroksidom (H_2O_2), koji oštećuje biomolekule/tkivo, a koncentracija oba reaktivna spoja se povećava tijekom ishemijsko-reperfuzijske ozljede (212). Doprinos željeza oštećenju tkiva vidljiv je ne samo u ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi bubrega (15, 16), nego i u drugim modelima ABO-a (162, 213, 214). Dosadašnja istraživanja

pokazuju da hepcidin u urinu može biti rani poslijeoperacijski biljeg ABO nakon ugradnje kardiopulmonalne prenosnice. Iako su istraživanja utvrdila pozitivnu korelaciju između povećane koncentracije hepcidina u urinu i zaštite od ABO-a, njegova izravna uloga još je nepoznata (140, 215). Jednako tako, na mišjim modelima nakon ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja bubrega uočena je povećana ekspresija hepcidina te time i regulacija feroportina, što zapravo potencijalno upozorava na renoprotektivnu sposobnost hepcidina preko njegove interakcije sa željezom (162). S druge strane, Peters i sur. istraživali su učinak hepcidina u serumu kod pacijenata s kroničnom bubrežnom bolešću te su uočili da je koncentracija hepcidina neovisana o GFR-u bolesnika s kroničnom bubrežnom bolešću (216).

U ovom je istraživanju utvrđena statistički značajna razlika u koncentraciji hepcidina u urinu skupini s ABO-om naspram N-Z skupine. Tako je medijan koncentracije hepcidina u urinu u skupini s ABO-om iznosio 82,60 ng/mL te je utvrđena statistički značajna razlika u koncentraciji hepcidina po spolu, Apgar ocjeni i postnatalnoj dobi. Kako je posljedica sepse i ABO, u istraživanju Cizmeci i sur. srednja vrijednost koncentracije hepcidina u serumu iznosila je 68,1 ng/mL te nije utvrđena nikakva statistički značajna povezanost koncentracije hepcidina s gestacijskom dobi i težinom novorođenčadi (217). Slične rezultate pokazalo je još jedno istraživanje u kojoj je srednja vrijednost koncentracije hepcidina u urinu iznosila 422 ng/mL, a u serumu 288 ng/mL (197). Rezultati ovog istraživanja govore u prilog teoriji da se koncentracija hepcidina u urinu povećava zbog lokalne sinteze hepcidina u distalnim tubulima bubrega, iz čega proizlazi da je porast koncentracije hepcidina renoprotektivni odgovor na oštećenje bubrega gdje zapravo dolazi do unutarstanične sekvestracije željeza te ograničavanja apoptoze stanice regulacijom oksidacijskog stresa i nastanka slobodnih radikala (162, 215, 218). Na sve to upozorava statistički značajna razlika koncentracije hepcidina u urinu po Apgar ocjeni u skupini N-ABO. Zapravo, vidljiva je veća koncentracija hepcidina kod novorođenčadi s manjom Apgar ocjenom, a s druge strane dobro je poznato da je manja Apgar ocjena povezana s većim bubrežnim oštećenjem. Također je iz rezultata ovog istraživanja vidljiva statistički značajno veća koncentracija hepcidina u urinu kod novorođenčadi muškog spola u skupini N-ABO, dok je u istraživanju Uijteschou i sur. utvrđeno suprotno, tj. oni su u svom istraživanju utvrdili statistički znatno manje koncentracije kod novorođenčadi muškog spola nego kod novorođenčadi ženskog spola u prvom tjednu života. Ova rodna razlika u njihovu istraživanju postajala je sve manja s porastom starosti i više nije bila bitna u dobi od mjesec ipo odnosno četiri mjeseca (205). U ovom istraživanju prema dobivenim podacima zabilježena je statistički značajna razlika u koncentraciji hepcidina u urinu po postnatalnoj dobi. Uočeno je da najveću koncentraciju hepcidina u urinu ima novorođenčad starosti jedan dan. Upravo je u

istraživanjima koja su uključivala odrasle pacijente s ABO-om porast urinskog hepcidina zabilježen u prva 24 sata (95,96). Bitno je naglasiti da su pacijenti s ABO-om imali manji porast koncentracije urinskog hepcidina za razliku od pacijenata koji nisu razvili ABO. Također, mogući mehanizmi koji doprinose manjem porastu koncentracije hepcidina u pacijenata s ABO-om uključuju utjecaj hipoksije/šoka, anemije, od kojih je svaka povezana s manjim porastom koncentracije hepcidina u urinu. S druge strane, rezultati istraživanja na mišjem modelu polažu velike nade u primjenu egzogenog hepcidina kod prevencije ABO-a. U svom protokolu istraživači su primjenom egzogenog hepcidina kod miševa utvrdili manji opsega bubrežnog oštećenja. Hecpidinom inducirana obnova homeostaze željeza bila je popraćena znatnim smanjenjem ozljede tubula, apoptoze, bubrežnoga oksidacijskog stresa kao i infiltracijom upalnih stanica. Zapravo, njihovi podatci upućuju da sustavno isporučeni i lokalno proizvedeni hepcidin štiti od ABO-a te bi terapijskom primjenom hepcidina liječnici u budućnosti možda mogli spriječiti ili barem smanjiti stupanj ABO-a (162, 219).

Kako su N-DBB skupinu činili pacijenti s hidronefrozom ili urinskom infekcijom, nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji hepcidina u urinu u odnosu na N-Z skupinu. U ovoj skupini uočena je statistički značajna razlika u koncentraciji hepcidina između novorođenčadi muškoga i ženskoga spola ($P = 0,024$), što bi pretpostavljeno zapravo bila posljedica ili izravan utjecaj povećane koncentracije CRP-a i upalnog stanja koje je bilo izraženije kod novorođenčadi muškog spola. Sukladno navedenom, u istraživanju Yan i sur. koncentracija hepcidina u plazmi pokazala je značajnu pozitivnu korelaciju s koncentracijom CRP-a i duljinom boravka u bolnici (220).

Za kvantifikaciju hepcidina dostupne su različite laboratorijske metode, uključujući masenu spektrometriju (MS) i ELISA metodu (195, 221, 222). Zbog navedenog postoje značajne razlike u koncentracijama hepcidina između istraživanja te je potrebno uložiti dodatne napore i standardizirati metode radi lakšeg praćenja i tumačenja kliničkog značenja hepcidina.

Iako se koncentracija cistatin C u serum već dulje vrijeme koristi u kliničkoj primjeni, jako je malo spoznaja o cistatinu C u novorođenačkoj populaciji u prvim danima života. U ovom istraživanju utvrđeno je da nema statistički značajne razlike u koncentraciji cistatinu C u serumu u odnosu na spol, postnatalnu dob, porođajnu težinu i Apgar ocjenu u skupini N-Z. U skladu s navedenim, rezultati ovog istraživanja daju prednost cistatinu C u serumu u odnosu na kreatinin u serumu u smislu prvog biljega izbora za procjenu bubrežne funkcije novorođenčadi u kliničkoj praksi.

Nekoliko je istraživanja pratilo koncentraciju cistatina C u serumu kod zdrave novorođenčadi tijekom prvih dana nakon rođenja. Jedno od tih istraživanja bilo je od Bokenkamp i sur. čiji su

podaci pokazali da je medijan koncentracija cistatina C u serumu iznosio 2,16 mg/L tijekom prva tri postnatalna dana (223). Ovi rezultati pokazuju nešto veće koncentracije od onih dobivenih u ovom istraživanju (medijan: 1,99 mg/L). U istraživanju koju su proveli Masise-Wobo i sur. gdje je medijan koncentracije cistatina C u serumu prvog dana nakon rođenja bio 1,8 mg/L, trećeg dana 1,6 mg/L (224). Olayinka i sur. proveli su istraživanje te dobili vrijednosti koncentracije cistatina C u serumu $1,0 \pm 0,11$ mg/L (225). U drugom istraživanju, medijaln koncentracije cistatina C u serumu iznosio je 1,36 mg/L (226). U skupini terminski rođene zdrave novorođenčadi uključene u istraživanje Kandasamyja i sur. srednja koncentracija cistatina C u serumu bila je $1,7 \pm 0,3$ mg/L (227). Spomenuta istraživanja pokazuju nešto veće ili manje rezultate od ovog istraživanja, a razlozi za razlike u koncentraciji cistatina C među istraživanjima bez sumnje su u najvećem dijelu posljedica razlika u korištenim metodama, odnosno u različitim proizvođačima testova. To je u skladu s prethodnim istraživanjem Yate i sur. koji su pokazali razlike u koncentraciji cistatina C u serumu pri korištenju različitih metoda (228). Čak je i istraživanje Tonga i sur. utvrdilo nešto manji medijan koncentracije cistatina C, iako su koncentracije mjerene istom metodom kao i u ovom istraživanju (imunoturbidimetrija, Abbott) u prva tri dana nakon rođenja (229). Razlike u koncentraciji cistatina C nadalje mogu biti prouzročene i rasnim/etničkim razlikama u ispitivanim populacijama. Ovo istraživanje nije pronašlo statistički značajne razlike u koncentraciji cistatina C između novorođenčadi ženskoga i muškog spola, što je u skladu s prethodnim istraživanjima. Štoviše, podaci u ovom istraživanju nisu pokazali statističke značajne razlike u koncentraciji cistatina C kod novorođenčadi različite težine i gestacijske dobi, što je također prikazano u istraživanju Madise-Wobo i sur. (224). Iz prethodnih istraživanja također je vidljivo da težina prijevremeno rođene novorođenčadi kao i gestacijska dob nisu utjecali na koncentraciju cistatina C u serumu, što je svakako izrazita prednost cistatina C naspram kreatinina u serumu u ovoj vulnerabilnoj skupini (229 – 232). Rezultati slični ovom istraživanju također su dobiveni u istraživanju koju su proveli Lee i sur. Njihovi rezultati nisu pokazali statističke značajne razlike u koncentraciji cistatina C tijekom prva tri postnatalna dana, razlike su bile vidljive tek u postnatalnoj dobi od 5 do 20 dana (233). Iz svega ovoga proizlazi da je cistatin C u serumu dobar pokazatelj bubrežne funkcije jer ne ovisi o spolu, dobi, mišićnoj masi kao ni o majčina bubrežnoj funkciji za razliku od kreatinina u serumu.

U ovom istraživanju raspon koncentracije (2,5 i 97,5 percentile) cistatina C bio je nešto širi od intervala utvrđenog u Caliper istraživanju. Treba, međutim, napomenuti da se referentni interval Caliper istraživanja odnosi na dojenčad do jednog mjeseca starosti.

Koncentracija cistatina C u serumu u ovom se istraživanju nije statistički značajno razlikovala između N-Z i N-DBB. U istraživanja Karakuş i sur. također nije otkrivena značajna razlika između pacijenata s hidronefrozom i kontrolne skupina s obzirom na koncentracije cistatina C u serumu (234). Jednako tako, nije uočena statistički značajna razlika u koncentraciji cistatina C u prvih sedam dana nakon rođenja kod djece s prirođenom opstrukcijom urogenitalnog sustava. Zapravo koncentracije cistatina C statistički su se značajno razlikovale tek kod novorođenčadi starosti jedan mjesec ($P = 0,001$) (185). Kod terminski rođene djece s neonatalnom sepsom koncentracija cistatina C u serumu statistički se značajno razlikovala nakon primjene amikacina ($P < 0,001$) (235).

Nekoliko istraživanja potvrdilo je da cistatin C u serumu može dijagnosticirati ABO ranije od kreatinina u serumu (236, 237), ali kasnije od uNGAL-a (238, 239) te da se uz pomoć koncentracije cistatina C može otkriti ABO jedan do dva dana ranije od kreatinina (236, 237). Medijan koncentracije cistatina C u ovom istraživanju kod novorođenčadi s ABO-om iznosio je 2,77 mg/L te nije uočena statistički značajna razlika u koncentraciji po spolu, postnatalnoj dobi, porođajnoj težini i Apgar ocjeni. U ovom istraživanju zabilježene su nešto veće koncentracije cistatina C za razliku od istraživanja dostupnih u literaturi. Tako je srednja vrijednost koncentracije cistatina C u serumu kod novorođenčadi s ABO-om u istraživanju Zhang i sur. iznosila 1,96 mg/L u prva 24 sata od rođenja (240), a u istraživanju Bagla i sur. srednja vrijednost kod novorođenčadi s ABO-om iznosi 2,18 mg/L (241). Rezultati longitudinalnoga kohortnog istraživanja koncentracije cistatina C u skupini novorođenčadi rođenih prijevremeno i praćenih serijskim mjerenjima do prve godine pokazali su da cistatin C u serumu ne ovisi o tjelesnoj težini ni spolu te da pokazuje trend snižavanja koncentracija (242).

Istraživanja provedena tijekom proteklih desetljeća dala su znatan doprinos širenju znanstvenih spoznaja o točnom i preciznom mjerenju te procjeni GFR-a u novorođenčadi i djece (127,132,243). Zbog brojnih poteškoća povezanih s pravilnim prikupljanjem urina i višestrukog uzorkovanja krvi u djece upotreba jednadžbi za eGFR-a više je nego korisna. Nekoliko je jednadžbi eGFR-a koje rabe različite koncentracije endogenih biljega u serumu (kreatinin, cistatin C i ureja) i antropometrijske mjere (dužina/visina tijela i težina) razvijeno je tijekom posljednjih desetljeća. Prije svega, bilo je potrebno izbjeći krajnje nepraktičnu i opterećujuću primjena egzogenih biljega i prikupljanje urina kod pedijatrijskih pacijenata. U tom je smislu eGFR korištenjem endogenih biljega postao koristan alat u kliničkoj praksi.

Poznato je da terminski zdrava novorođenčad pri samom rođenju imaju relativno smanjenu glomerularnu filtraciju, tek oko 20 mL/min/1,73 m², a do velikog porasta glomerularne filtracije dolazi tijekom prva dva tjedna nakon rođenja (128, 244, 245). Vrijednosti eGFR-a izračunate u ovom istraživanju utvrđene su uz pomoć triju jednadžbi. Medijan vrijednosti eGFR-a izračunat uz pomoć Schwartzove jednadžbe kod zdrave novorođenčadi iznosio je 26 mL/min/1,73 m², eGFR izračunat cistatin C jednadžbom iznosio je 37 mL/min/1,73 m², a CKID jednadžbom 28 mL/min/1,73 m². U skupini N-Z utvrđena je statistički značajna razlika u eGFR vrijednosti dobivene Schwartzovom jednadžbom po Apgar ocjeni, gdje je novorođenčad s Apgar ocjenom 9 imala nešto manje vrijednosti eGFR, ali te vrijednosti nisu odstupale od vrijednosti zdrave terminske novorođenčadi. Vrijednosti eGFR dobivene u ovom istraživanju u skupini N-Z nešto su manje od vrijednosti zabilježenih u drugim istraživanjima. Iz rezultata je vidljivo da su najveće vrijednosti eGFR zabilježene korištenjem cistatin C jednadžbe, što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima koja upućuju na veliku prednost korištenja cistatin C u procjeni eGFR (246). Tako su Treiber i sur., koristeći se u svom istraživanju Schwartzovom jednadžbom, dobili vrijednosni eGFR prvi dan po porodu 30,25 ± 6,37 ml/min/1,73 m², a vrijednosti eGFR izračunate CKiD-2012 jednadžbom iznosile su 52,76 ± 6,67. U svom su istraživanju pokazali jasnu prednost korištenja cistatina C kao primarnog biljega funkcije bubrega u novorođenčadi, kao i prednost cistatin C jednadžbe za procijenu GFR-a (247).

S druge strane, Abitbol i sur. proveli su istraživanje u kojem su rabili inulin, cistatin C i kreatinin kao biljege GFR-a i eGFR-a. Vrijednost GFR-a uz pomoć inulina iznosila je 57,5 mL/min/1,73 m², GFR procijenjen uz pomoć CKID-2012 jednadžbe iznosio je 46,8 mL/min/1,73 m², GFR procijenjen Schwartzovom jednadžbom iznosio je 34,1 mL/min/1,73 m, a 53,3 mL/min/1,73 m² uz pomoć cistatin C jednadžbe. Autori su izvijestili da su formule za eGFR temeljene samo na serumskom kreatininu podcijenile GFR, dok su jednadžbe s cistatinom C ili pak kombinirane jednadžbe bile podudarnije s klirensom inulina koji se smatra zlatnim standardom određivanja GFR-a (248).

ABO se obično definira kao smanjenje brzine GFR-a što se uvriježeno prati preko porasta koncentracije kreatinina u serumu. Međutim, ova definicija podcjenjuje prevalenciju s obzirom na to da tijekom ranog ABO-a vrijednosti GFR-a kao i koncentracija kreatinina mogu ostati nepromijenjene. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da prema korištenim jednadžbama za eGFR novorođenčad s ABO-om ima statistički značajno manje vrijednost eGFR-a od N-Z skupine. Tako je medijan vrijednosti eGFR-a izračunat uz pomoć Schwartzove jednadžbe kod N-ABO iznosio 17 mL/min/1,73 m², cistatin C jednadžbom iznosio je 29 mL/min/1,73 m², a CKID jednadžbom 21 mL/min/1,73 m². Vrijednosti eGFR-a izračunate Schwartzovom i CKID

jednadžbom kod novorođenčadi muškog spola statistički su značajno veće, što zapravo proizlazi iz činjenice da je koncentracija kreatinina potrebna za izračun bila manja kod novorođenčadi muškog spola. Iz rezultata je vidljivo da eGFR vrijednosti dobivene cistatin C i CKID jednadžbom razlikuju po postnatalnoj dobi. Novorođenčad starosti jedan dan ima najmanje vrijednosti eGFR-a, što je zapravo posljedica izmjerene koncentracije cistatina C u serumu koja je najveća kod novorođenčadi s ABO-om starosti jedan dan. Ovi rezultati pokazuju da jednadžbe za procijenu GFR-a bazirane na koncentraciji cistatina C u serumu su puno bolji izbor već u prvom danu života. Također iz rezultata dostupnih istraživanja vidljivo je da su vrijednosti eGFR-a manje kod novorođenčadi s ABO-om. Primjerice, u istraživanjima koja su proveli Hidayati i sur., medijan eGFR vrijednosti kod novorođenčadi s ABO-om, dobiven korištenjem Schwartzove jednadžbe, iznosio je 14 mL/min/1,73 m², a vrijednosti temeljene na cistatin C jednadžbi iznosile su 37 mL/min/1,73 m² (249). Pan i sur. u svom su istraživanju, uz pomoć Schwartzove jednadžbe, kod asfiksичne novorođenčadi u prva 24 sata po rođenju zabilježili vrijednosti eGFR-a od 16,79 mL/min/1,73 m² (250).

U nekim je istraživanjima zabilježeno da djeca s urinskom infekcijom imaju statistički značajno manje vrijednosti eGFR-a (251). Iz rezultata ovog istraživanja vidljivo je da su vrijednosti eGFR-a nešto manje u skupini N-DBB naspram vrijednosti N-Z skupine, ali nije zabilježena statistički značajna razlika, a s druge strane vrijednosti eGFR-a statistički su značajno veće u skupini N-DBB nego u skupini N-ABO. Također u skupini N-DBB nije uočena statistički značajna razlika u vrijednostima eGFR-a po spolu, postnatalnoj dobi, težini i Apgar ocjeni ni za jednu jednadžbu korištenu u ovom istraživanju. Toffollo i sur. zabilježili su tijekom praćenja pacijenata s urinskom infekcijom da je samo kod oko 4 % ispitanika došlo do smanjenja eGFR-a (252), a Kostic i sur. uočili su da vrijednosti eGFR-a izračunate uz pomoć cistatin C jednadžbe bile 12 do 15 mL/min/1,73 m² manje kod pacijenata s hidronefrozom (185).

Kako je funkcija bubrega u novorođenčadi dinamičan proces, a kreatinin iz majčine krvi prisutan je i u cirkulaciji novorođenčeta, Filler i sur. predložili su da se korištenjem Schwartzove formule GFR može procijeniti tek nakon 72 sata od rođenja novorođenčeta dok se jednadžba temeljena na koncentraciji cistatina C u serumu može koristiti odmah nakon rođenja (253). Kod novorođenčeta ili malog djeteta s promijenjenom ukupnom mišićnom masom (spina bifida, mišićna distrofija i dr.), eGFR također treba procjenjivati isključivo uz pomoć cistatina C. Dodatno, s metodološke je strane poznato da na Jaffeovu metodu za mjerenje koncentracije kreatinina u serumu utječe povećana koncentracija bilirubina te bi i zbog toga prednost trebalo dati cistatinu C i procjeni GFR-a temeljenoj na cistatinu C (254).

Za procjenu GFR-a u novorođenčadi cistatin C je puno prikladniji endogeni biljeg od kreatinina s obzirom na minimalni prijenos kroz posteljicu, relativno konstantnu brzinu stvaranja i neovisnost o upalnim stanjima, mišićnoj masi, spolu, sastavu tijela i dobi. Zbog svega navedenog, cistatin C lakše otkriva promjene GFR-a u usporedbi s kreatininom (255). Navedeno je vidljivo i u rezultatima ovog istraživanja gdje je korištenjem cistatina C u jednadžbi zabilježena najveća statistički značajna razlika u vrijednosti eGFR-a između skupine N-Z i N-ABO ($P < 0,001$). Međutim, relativno visoka cijena u odnosu na cijenu mjerenja koncentracije kreatinina, kao i nedostatak standardizirane mjerne metode stoje na putu raširenije kliničke primjene.

Jedan od ciljeva ovog rada odnosio se na korelacijsku analizu i ispitivanje povezanosti izmjerenih biljega. Poznato je da koncentracije uNGAL-a pokazuju visok stupanj korelacije s trajanjem, kao i sa stupnjem bubrežnog oštećenja, dužinom boravka u bolnici i stopom smrtnosti (41). Dosadašnja istraživanja pokazala su da su koncentracije NGAL-a u serumu i urinu bile u pozitivnoj korelaciji s koncentracijom kreatinina u serumu (256) te da je vidljiva korelacija između koncentracije kreatinina i hepcidina kod ABO-a (257). Cilj dosad objavljenih istraživanja kod novorođenačke populacije odnosio se na otkrivanje dijagnostičkih karakteristika NGAL-a i hepcidina u serumu te njihove povezanosti s rutinskim parametrima u kliničkoj upotrebi. Broj istraživanja o uNGAL-u i hepcidinu u urinu jako je mali ili su provedena na ograničenom broju prijevremeno rođene djece. U ovom istraživanju u svim je skupinama uočena slaba povezanost uNGAL-a i hepcidina u urinu. Uspoređujući njihove koeficijente korelacije, iz rezultata je vidljivo da skupina N-ABO ima nešto veći koeficijent korelacije od drugih dviju skupina. Činjenica je da i hepcidin i NGAL imaju antibakterijsko djelovanje. Uključeni su u metabolizam željeza kao komponente vezane za željezo ili induciraju sekvestraciju željeza kako bi se ograničilo preuzimanje željeza od patogenih organizama ili pak onemogućila samoinducirana stanična apoptoza (26, 55, 62, 70). Jednako je tako vidljiva pojačana ekspresija hepcidina i NGAL-a u plazmi i urinu rano nakon ABO-a, što upozorava na moguću zaštitu bubrega mehanizmom sekvestracije željeza (258 – 260). Sve ove činjenice otvaraju mogućnost daljnjih ispitivanja povezanosti ovih dvaju biljega i njihove međuovisnosti te patofiziološkog djelovanja.

U rezultatima ovog istraživanja nije nađena povezanost uNGAL-a kao ni hepcidina u urinu s biljezima koji su u dijagnostičkoj upotrebi (kreatinin, ureja i cistatin C) u skupini N-Z kao ni u skupini s N-ABO. Jedino je uočena vrlo slaba povezanost između koncentracije hepcidina u urinu i kreatinina u serumu te slaba povezanost koncentracije hepcidina i cistatina C u skupini

N-DBB. Potrebno je istaknuti da je kod nekih dosadašnjih istraživanja povezanost između biljega bubrežne funkcije koji su u široj dijagnostičkoj upotrebi (prije svega kreatinina) nađena tek nakon trećeg dana od početnog ABO-a (256, 261). Ovo je istraživanje uključivalo novorođenčad starosti do tri dana, što govori u prilog činjenici da je kreatinin kasni i relativno nepouzdana biljeg bubrežne funkcije u prvim danima života.

Također nije uočena povezanost između uNGAL-a i vrijednosti eGFR-a. Jednadžbe za procjenu GFR-a su bazirane na koncentraciji kreatinina, ureje i cistatina C kod kojih isto tako nije bila uočena povezanost s uNGAL-om. Slaba povezanost bila je vidljiva kod Schwartzove jednadžbe i hepcidina u urinu u skupini N-ABO. Sukladno navedenom, kod istraživanja u odrasloj populaciji vidljivo je da postoje oprečni rezultati kod korelacijske analize eGFR-a i hepcidina, pri čemu su neka istraživanja pokazala povezanost, a u drugim je istraživanjima nije bilo (216, 262, 263). Jednako tako, polemika se vodi o tome je li riječ o negativnoj ili pozitivnoj povezanosti te da je zapravo povezanost vidljiva samo kod vrlo smanjene brzine glomerularne filtracije gdje je jako oštećena bubrežna funkcija. (264).

Kako bismo potvrdili ili opovrgnuli povezanost biljega od interesa, za odgovor na ovo pitanje bilo bi potrebno istraživanje s većim brojem ispitanika iz koje bi se jasnije vidjelo jesu li dobivene slabe korelacije samo posljedica malog broja ispitanika ili realan prikaz povezanosti.

Prepoznavanje učinkovitih, specifičnih i neinvazivnih biljega može omogućiti pravodoban pristup dijagnostici i liječenju, a time i bolje kliničke ishode. U sklopu ovog istraživanja odabrana su dva prethodno korištena biokemijska parametra (hepcidin u urinu i uNGAL) za koje je neprijeporno dokazana uloga u patogenezi i prepoznavanju ABO-a kod odrasle populacije. Određivanje biokemijskih biljega u urinu neinvazivan je pristup u diferencijalnoj dijagnostici različitih bolesti te time svakako doprinosi učinkovitosti zdravstvene skrbi i sigurnosti bolesnika. Kako je jedan od ciljeva ovog istraživanja bila procjena dijagnostičke točnosti ispitivanih parametara u ranom prepoznavanju prisutnosti ABO-a i drugih bubrežnih bolesti u novorođenačkoj populaciji, poslužili smo se ROC analizom.

Dobiveni rezultati pokazuju vrlo dobre diskriminacijske karakteristike ispitivanih biokemijskih biljega, što upućuje na potencijalno znatnu dijagnostičku točnost. U procjeni dijagnostičke točnosti za novorođenčad u skupini N-ABO, u ovom se istraživanju uNGAL pokazao najboljim izborom uz vrlo uvjerljive rezultate temeljene na ROC analizi. Dobivena je visoka vrijednost područja ispod krivulje koja je pri graničnoj vrijednosti 67,3 ng/mL iznosila 0,987, uz osjetljivost 97 % i specifičnost od 93,6 %. S druge strane, AUC vrijednost za hepcidin u urinu iznosila je 0,855, gdje granična vrijednost od 52,1 ng/mL ostvaruje jako dobru osjetljivost od

81 %, ali znatno slabiju dijagnostičku specifičnost (70 %), što u konačnici može rezultirati znatno većim postotkom lažno pozitivnih nalaza za razliku od uNGAL-a. Rezultati dobiveni za uNGAL u istraživanju Abdelhadyja i sur. kod novorođenčadi s ABO-om koja su pri porodu doživjela asfiksiju pokazuju slično visoku dijagnostičku točnost te je vrijednost AUC iznosila 0,93 (149). Rezultati dobiveni u istraživanju Songa i sur. pokazuju također vrlo dobru dijagnostičku točnost: u skupini s ABO-om vrijednost AUC-a za uNGAL kod asfiksične novorođenčadi starosti 48 sati iznosila je 0,892, a korištena granična vrijednost za otkrivanje bubrežnog oštećenja bila je 48,5 ng/mL (265). Kod meta analize u koju su bila uključena djeca s ABO-om nakon operacijskog zahvata vrijednost površine ispod ROC krivulje šest sati nakon operacije iznosila je 0,97 uz korištenje granične vrijednosti od 50 mg/dL (266). Kod procjene dijagnostičke točnosti hepcidina u urinu, AUC vrijednost iznosila je 0,878 u istraživanju koje su proveli Sherbiny i sur. u prvim danim života (197), a kod Alberta i sur. kod odraslih pacijenata s ABO-om zabilježen je AUC od 0,81 (267).

Iz rezultata ovog istraživanja vidljivo je da se korištena granična vrijednost hepcidina nalazi oko gornje granice vrijednosti utvrđenoga referentnog intervala temeljenom na 2,5 – 97,5 percentili izmjerenih koncentracija. S obzirom na to da je granična vrijednost relativno mala, moguć je znatan broj lažno pozitivnih rezultata što upozorava na donekle slabu dijagnostičku specifičnost ovog biljega kod ABO-a u usporedbi s uNGAL-om. Rezultati ovog istraživanja svakako daju prednost uNGAL-u kao primarnom biljegu rane dijagnostike ABO-a. Mogućnost brzoga, jednostavnog, standardiziranog i automatiziranog mjerenja uNGAL-a također doprinosi realnom uključanju ovog biljega u svakodnevnu kliničku praksu.

U procjeni dijagnostičke točnosti za novorođenčad u heterogenoj skupini drugih bubrežnih bolesti (N-DBB), hepcidin se pokazao neučinkovitim za razlikovanje zdrave novorođenčadi od novorođenčadi s drugim bubrežnim bolestima (AUC = 0,484). AUC vrijednost za uNGAL iznosila je 0,717 pri graničnoj vrijednosti od 29,65 ng/mL koja se međutim nalazi unutar referentnog intervala uNGAL-a. Navedeno znači da će gotovo u trećine zdrave novorođenčadi (bez bubrežne bolesti) pogrešno biti postavljena sumnja na prisutnost bubrežnog oboljenja. Ovakvom rezultatu ponajviše doprinosi heterogenost skupine s obzirom na dijagnozu uz izmjeren relativno mali porast ispitivanog biljega, za razliku od skupine novorođenčadi s ABO-om. Iz dostupnih literaturnih podataka vidljivi su oprečni rezultati istraživanja provedenih na sličnoj populaciji bolesnika. Primjerice, AUC vrijednosti u novorođenčadi s hidronefrozom bile su oko 0,6 – 0,8, dok je kod urinskih infekcija ustanovljena nešto veća dijagnostička osjetljivost

kod duže febrilne djece s urinarnom infekcijom za razliku od kontrolne skupinom bez urinarne infekcije (AUC = 0,86) (187,268,269).

Iz rezultata ovog istraživanja proizlazi da uNGAL pokazuje visoku dijagnostičku točnost kod novorođenčadi s ABO-om, dok nema potencijalnu dijagnostičku primjenu u novorođenčadi s drugim bolestima bubrega i/ili urogenitalnog sustava.

Rezultati dostupnih istraživanja vrlo su različiti i to u smislu iskazane dijagnostičke točnosti biokemijskih biljega s pomoću ROC analize, vremenskih točaka uzorkovanja urina kod novorođenčadi itd. Tako neujednačeni rezultati mogu biti uvjetovani različitošću ustroja istraživanja te nestandardiziranim i stoga neusporedivim analitičkim postupcima, prije svega u smislu primjene različitih imunokemijskih metoda. Za primjenu u kliničkoj praksi u nekim provedenim istraživanjima prije svega nedostaju primjerene referentne vrijednosti. No, bez obzira na navedene nedostatke i heterogenost rezultata, sva istraživanja govore u prilog korištenju uNGAL-a te donekle i hepcidina u urinu u smislu neinvazivnih biokemijskih biljega ABO-a.

U literaturi, prije svega zbog etičkih razloga te poteškoća u prikupljanju uzoraka postoji relativno mali broj istraživanja koja uključuju procjenu dijagnostičke točnosti novih biokemijskih biljega u novorođenčadi. Međutim, upravo u ovoj izrazito vulnerabilnoj skupini ključna je pravodobna rana dijagnoza. Bez obzira na to je li rizik od bubrežnih bolesti kod novorođenčadi povezan s osnovnim stanjem, perinatalnom asfiksijom, infekcijama ili nefrotoksičnom terapijom, klinička slika nije uvijek jasna te je odnos rizika terapijske intervencije naspram dobiti za pacijenta velik klinički izazov. Bubrežne bolesti i oštećenja povećali su dijagnostički izazov u neonatalnom razdoblju, a prije svega to je akutno bubrežno oštećenje čije nepravodobno prepoznavanje označava izrazit rizik i mogućnost razvoja ozbiljnih posljedica. Stoga je potrebno što prije standardizirati mjerenja i dostupne metode za potencijalno vrijedne dijagnostičke biljege. U tom smislu, jednako je važno uspostaviti odgovarajuće referentne intervale sukladne dobi, spolu i etničkim skupinama. Rano dijagnosticiranje bubrežnih bolesti novorođenčadi, u prvom redu akutnoga bubrežnog oštećenja moglo bi se znatno poboljšati upotrebom urinskih biljega s obzirom na to da se radi o neinvazivnom i lako dostupnom biološkom uzorku čiji sastav najbolje odražava stanje bubrega i mokraćnog sustava. Rano otkrivanje porasta koncentracije urinskih biljega izvan granica referentnih vrijednosti, u prvom redu uNGAL-a, kliničaru daje vrijednu informaciju o mogućem razvoju ABO-a, usmjerava kliničku skrb ka intenzivnom praćenju bubrežne funkcije, postavljanju rane dijagnoze, ranijem liječenju i boljem ishodu za bolesnika. S obzirom na obećavajuće rezultate, ali i relativno mali broj novorođenčadi uključene u ovo istraživanje,

potrebno je provesti dodatna višecentarska istraživanja koja bi potvrdila značenje novijih laboratorijskih biljega u urinu (prije svega uNGAL-a) u ranoj dijagnostici ABO-a u novorođenčadi.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja, rezultati ovog istraživanja ukazuju na slijedeće zaključke:

1. Utvrđen je 95-postotni interval koncentracije uNGAL-a i hepcidina u urinu u skupini N-Z postnatalne starosti do tri dana. Interval za uNGAL iznosi 5,3-47,5 ng/mL, a hepcidin u urinu 12,3- 57,6 ng/mL.
2. Koncentracije uNGAL-a i hepcidina u urinu ne ovise o gestacijskom tjednu, postnatalnoj dobi, Apgar ocjeni i porođajnoj težini.
3. N-ABO skupina ima značajno povećane koncentracije uNGAL-a i hepcidina u urinu u odnosu na N-Z skupinu.
4. Koncentracija testiranih biljega u urinu NGAL-a i hepcidina, značajno je povećana u prvome postnatalnom danu u skupini N-ABO, dok su koncentracije kreatinina najveće treći dan.
5. Koncentracije uNGAL-a kod skupine N-DBB su značajno povećane u odnosu na N-Z skupinu, dok kod hepcidina u urinu nije opaženo znatno povećanje koncentracije.
6. Utvrđena je slaba pozivna povezanost između biljega uNGAL-a i hepcidina u urinu.
7. Zabilježene su povećane koncentracije kreatinina i cistatina C u serumu u skupini N-ABO u odnosu na N-Z i N-DBB skupinu.
8. Novorođenčad u skupini N-ABO imala je znatno manje vrijednosti eGFR-a u odnosu na N-Z skupinu primjenom triju prediktivnih jednadžbi.
9. Korištenjem cistatin C jednadžbe i CKID jednadžbe utvrđena je značajna razlika u vrijednostima eGFR-a između skupine N-ABO i N-DBB.

10. Dijagnostička točnost testiranih biljega u novorođenčadi s ABO-om, u prvom redu uNGAL-a, potvrđena je visokom AUC vrijednosti od 0,987, dok je AUC vrijednost za hepcidin iznosila 0,855.

11. Znatno povećanje koncentracije neinvazivnih biljega u urinu NGAL-a i hepcidina već u prvih 24 h može doprinijeti pravodobnom prepoznavanju ABO-a.

7. LITERATURA

1. Grbeša Đ. Mokraćni sustav. U: Osnove histologije. Bradamante Ž, Kostović-Knežević Lj, ur. Zagreb, Školska knjiga, 2005;383-403.
2. Mardešić D i suradnici. Novorođenče. U: Pedijatrija. Mardešić D ur. Školska knjiga, Zagreb, 2003;95-203.
3. Wang J, Tripathy N, Chung EJ. Targeting and therapeutic peptide-based strategies for polycystic kidney disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 2020;161-162:176-89.
4. Sampio FJB. Renal anatomy: endourologic considerations. *Urologic Clinics* 2000; 27.4: 585-607.
5. Kujundžić M i suradnici. Klinička potofiziologija za studente Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu, 2003;1-57.
6. Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija, 12. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada, 2012;12:303-7, 34-323.
7. Bitsori M. The development of renal function. *Research Signpost* 2012; 37/661(2),9-20.
8. Cataldi L, Zaffanello M, Gnarra M, Fanos V. Neonatal Nephrology Study Group, Italian Society of Neonatology. Urinary tract infection in the newborn and the infant: state of the art. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2010;23 Suppl 3:90-3.
9. Ostermann M, Joannidis M. Acute kidney injury 2016: diagnosis and diagnostic workup. *Crit Care.* 2016;20(1):299.
10. Sladoje-Martinović B, Orlić L, Župan Ž. Biomarkeri ranog otkrivanja akutnog bubrežnog zatajenja, *Med fluminensis* 2010;46 (4): p. 458-62.
11. Askenazi DJ, Ambalavanan N, Goldstein SL. Acute kidney injury in critically ill newborns: what do we know? What do we need to learn? *Pediatr Nephrol* 2009; 24:265–74.
12. Čvorišćec D, Čepelak I, ur. Štrausova medicinska biokemija. 3. izd. Zagreb: Medicinska naklada, 2009. str. 203-4.
13. Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija. 3. izd. Zagreb: Medicinska naklada, 2009. str. 492-4.
14. Fassett RG, Venuthurupalli SK, Gobe GC, Coombes JS, Cooper MA, Hoy WE. Biomarkers in chronic kidney disease: a review. *Kidney Int* 2011;80(8):806-21.
15. Beker BM, Corleto MG, Fieiras C, Musso CG. Novel acute kidney injury biomarkers: their characteristics, utility and concerns. *Int Urol Nephrol* 2018;50(4):705-13.
16. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P. Acute Dialysis Quality Initiative workgroup. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care* 2004;8(4):R204-12.

17. Akcan-Arikan A, Zappitelli M, Loftis LL, Washburn KK, Jefferson LS, Goldstein SL. Modified RIFLE criteria in critically ill children with acute kidney injury. *Kidney Int* 2007;71(10):1028-35.
18. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, et al. Acute Kidney Injury Network. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* 2007;11(2):R31.
19. KDIGO AKI Work Group: KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury. *Kidney Int Suppl* 2. 2012;120.4: c179-84
20. Stapleton FB, Jones DP, Green RS. Acute renal failure in neonates: incidence, etiology and outcome. *Pediatr Nephrol* 1987;1(3):314-20.
21. Essajee F, Were F, Admani B. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin in asphyxiated neonates: a prospective cohort study. *Pediatr nephrol* 2015;30:1189-96.
22. Smertka M, Wroblewska J, Suchojad A, Majcherczyk M, Jadamus-Niebroj D, Owsianka-Podlesny T, et al. Serum and urinary NGAL in septic newborns. *Biomed Res Int* 2014;2014:717318.
23. Roszkowska-Blaim M, Kisiel A. Role of biomarkers in early diagnosis of acute kidney injury in neonates. *Postepy Nauk Medycznych* 2013;26 (2):138-43.
24. Koralkar R, Ambala N, Anan V, Levitan EB, McGwin G, Goldstein S, et al. Acute kidney injury reduces survival in very low birth weight infants. *Pediatr Res* 2011;69(4):354-8.
25. Devarajan P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Curr Opin Pediatr* 2011;23,194-200.
26. Yim HE. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin and Kidney Diseases, *Child Kidney Dis* 2015;19:79-88.
27. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell* 2002;10(5):1033-43.
28. Mishra J, Mori K, Ma Q, Kelly C, Yang Y, Mitsnefes M, et al. Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc nephrol* 2004;15:3073-82.
29. Monisha J, Padmavathi G, Bordoloi D, Roy NK, Kunnumakkara AB. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL): A Promising Biomarker for Cancer Diagnosis and A Potential Target for Cancer Therapeutics. *J Cell Sci Molecul Biol* 2014;1(2):106.
30. Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY, Kalandadze A, Cohen DJ, Devarajan P, et al. Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol* 2007;18(2):407-13.

31. Filiopoulos V, Biblaki D, Vlassopoulos D. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a promising biomarker of contrast-induced nephropathy after computed tomography. *Ren Fail* 2014;36(6):979–86.
32. Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: new path for an old shuttle. *Cancer Ther* 2007;5(B):463-70.
33. Axelsson L, Bergenfeldt M, Ohlsson K. Studies of the release and turnover of a human neutrophil lipocalin. *Scand J Clin Lab Invest* 1995;55(7):577-88.
34. Peres LA, Cunha Júnior AD, Schäfer AJ, Silva AL, Gaspar AD, Scarpari DF, et al. Biomarkers of acute kidney injury. *J Bras Nefrol* 2013;35(3):229-36.
35. Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a promising biomarker for human acute kidney injury. *Biomark Med* 2010;4(2):265–80
36. Mårtensson J, Xu S, Bell M, Martling CR, Venge P. Immunoassays distinguishing between HNL/NGAL released in urine from kidney epithelial cells and neutrophils. *Clin Chim Acta* 2012;413(19-20):1661-7.
37. Nickolas TL, Schmidt-Ott KM, Canetta P, Forster C, Singer E, Sise M, et al. Diagnostic and prognostic stratification in the emergency department using urinary biomarkers of nephron damage: a multicenter prospective cohort study. *J Am Coll Cardiol* 2012;17;59(3):246-55.
38. Nickolas TL, O'Rourke MJ, Yang J, Sise ME, Canetta PA, Barasch N, et al. Sensitivity and specificity of a single emergency department measurement of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin for diagnosing acute kidney injury. *Ann Intern Med* 2008;148:810–9.
39. Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): A new marker of kidney disease, *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 2008;241: 89–94
40. Wang Y, Zeng TT. Clinical significance of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in colorectal cancer: a meta-analysis. *Genet Mol Res* 2014;13(3):7102-12.
41. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* 2005;365:1231
42. Herbert C, Patel M, Nugent A, Dimas VV, Guleserian KJ, Quigley R, et al. Serum Cystatin C as an Early Marker of Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin-positive Acute Kidney Injury Resulting from Cardiopulmonary Bypass in Infants with Congenital Heart Disease. *Congenit Heart Dis* 2015;10(4):E180-8.
43. Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV, Biomarkers of Acute Kidney Injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008;48:463–93.

44. Singer E, Elger A, Elitok S, Kettritz R, Nickolas TL, Barasch J, Luft FC, Schmidt-Ott KM. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin distinguishes pre-renal from intrinsic renal failure and predicts outcomes. *Kidney Int* 2011;80(4):405-14.
45. Hewitson TD, Holt SG, Smith ER. Progression of Tubulointerstitial Fibrosis and the Chronic Kidney Disease Phenotype - Role of Risk Factors and Epigenetics. *Front Pharmacol*. 2017;8:520.
46. Eddy AA, Neilson EG. Chronic kidney disease progression. *J Am Soc Nephrol* 2006;17(11):2964-6.
47. Yim H. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and kidney diseases. *Childhood Kidney Diseases* 2015;19.2:79-88.
48. Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 2015;72:4-15.
49. Haase–Fielitz A, Haase M, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of acute kidney injury: a critical evaluation of current status. *Ann Clin Biochem* 2014;51(803):335-51.
50. Sanjeevani S, Pruthi S, Kalra S, Goel A, Kalra OP. Role of neutrophil gelatinase-associated lipocalin for early detection of acute kidney injury. *Int J Crit Illn Inj Sci* 2014;4(3):223-8.
51. Nickolas TL, Forster CS, Sise ME, Barasch N, Solá-Del Valle D, Viltard M, et al. NGAL (Lcn2) monomer is associated with tubulointerstitial damage in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2012;82(6):718-22.
52. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001;276(11):7806-10.
53. Krause A, Neitz S, Mägert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, et al. LEAP1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett* 2000;480:147-50.
54. Politou M, Papanikolaou G. Heparin: A key iron regulator involved in the pathogenesis of anaemia of chronic disease. *Haema* 2004;7:165-74
55. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide heparin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 2001;276(11):7811-9.
56. Camaschella C, Silvestri L. New and old players in the heparin pathway. *Haematologica* 2008;93(10):1441-4.
57. Swinkels DW, Wetzels JFM. Heparin: a new tool in the management of anaemia in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:2450-3 .

58. Oğuz A, Uzunlulu M, Hekim N. Hepcidin is not a marker of chronic inflammation in atherosclerosis. *Anadolu Kardiyol Derg* 2006;6:239-42.
59. Arruda SF, Siqueira EM, de Valência FF. Vitamin A deficiency increases hepcidin expression and oxidative stress in rat. *Nutrition*. 2009;25(4):472-8.
60. Jordan JB, Poppe L, Haniu M, Arvedson T, Syed R, Li V, et al. Hepcidin revisited, disulfide connectivity, dynamics, and structure. *J Biol Chem* 2009;284(36):24155-67.
61. Peslova G, Petrak J, Kuzelova K, Hrdy I, Halada P, Kuchel PW, et al. Hepcidin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to alpha-2-macroglobulin in blood. *Blood*. 2009;113(24):6225-36.
62. Huang ML, Austin CJD, Sari MA, Suryo Rahmanto Y, Ponka P, Vyoral D, et al. Hepcidin bound to α 2-macroglobulin reduces ferroportin-1 expression and enhances its activity at reducing serum iron levels. *J Biol Chem* 2013;288(35):25450-65.
63. Ganz T, Olbina G, Girelli D, Nemeth E, Westerman M. Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood* 2008;112:4292–7.
64. Swinkels DW, Girelli D, Laarakkers C, Kroot J, Campostrini N, Kemna EH, et al. Advances in quantitative hepcidin measurements by time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One* 2008;3(7):e2706S
65. Sumboonnanonda A, Malasit P, Tanphaichitr VS, Ong-ajyooth S, Sunthornchart S, Pattanakitsakul S, et al. Renal tubular function in beta-thalassemia. *Pediatr Nephrol* 1998;12(4):280-3.
66. Wan L, Bellomo R, Di GD, Ronco C. The pathogenesis of septic acute renal failure. *Curr Opin Crit Care* 2003;9:496 –502.
67. Kulaksiz H, Theilig F, Bachmann S, Gehrke SG, Rost D, Janetzko A, et al. The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: expression and cellular localization in the mammalian kidney. *J Endocrinol* 2005;184(2):361-70.
68. Preza GC, Pinon R, Ganz T, Nemeth E. Cellular catabolism of the iron-regulatory peptide hormone hepcidin. *PLoS One* 2013;8(3):e58934.
69. Dewan P, Dixit A, Gomber S, Kotru M, Banerjee BD, Tyagi V, et al. Serum and Urinary Hepcidin for Diagnosing Iron-deficiency Anemia in Under-5 Children. *J Pediatr Hematol Oncol* 2019;41(4):e216-20.
70. Kwapisz J, Slomka A, Zekanowska E. Hepcidin and Its Role in Iron Homeostasis. *EJIFCC* 2009;20(2):124-8.
71. Sangkhae V, Nemeth E. Regulation of the Iron Homeostatic Hormone Hepcidin. *Adv Nutr* 2017;8(1):126-36.

72. Ross AC. Impact of chronic and acute inflammation on extra- and intracellular iron homeostasis. *Am J Clin Nutr* 2017;106(Suppl 6):1581S-87S.
73. Xu Y, Alfaro-Magallanes VM, Babitt JL. Physiological and pathophysiological mechanisms of hepcidin regulation: clinical implications for iron disorders. *Br J Haematol* 2021;193(5):882-93.
74. De Domenico I, Ward DM, Langelier C, Vaughn MB, Nemeth E, Sundquist WI, et al. The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. *Mol Biol Cell* 2007;18(7):2569-78.
75. Ginzburg YZ. Hepcidin-ferroportin axis in health and disease. *Vitam Horm* 2019;110:17-45.
76. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, et al. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 2004;113(9):1271-6.
77. Farnaud S, Patel A, Evans RW. Modelling of a metal-containing hepcidin. *Biometals* 2006;19:527-33.
78. Babitt JL, Lin HY. Molecular mechanisms of hepcidin regulation: implications for the anemia of CKD. *Am J Kidney Dis* 2010; 55:726-41.
79. Du X, She E, Gelbart T, Truksa J, Lee P, Xia Y, et al. The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency. *Science* 2008;320(5879):1088-92.
80. Finberg KE, Whittlesey RL, Fleming MD, Andrews NC. Down-regulation of Bmp/Smad signaling by Tmprss6 is required for maintenance of systemic iron homeostasis. *Blood* 2010;115(18):3817-26.
81. Nicolas G, Viatte L, Bennoun M, Beaumont C, Kahn A, Vaulont S. Hepcidin, a new iron regulatory peptide. *Blood Cells Mol Dis* 2002;29(3):327-35.
82. Nemeth E, Ganz T. The role of hepcidin in iron metabolism. *Acta Haematol* 2009;122(2-3):78-86.
83. Coffey R, Ganz T. Erythroferrone: An Erythroid Regulator of Hepcidin and Iron Metabolism. *Hemasphere* 2018;2(2):e35.
84. Rodriguez R, Jung CL, Gabayan V, Deng JC, Ganz T, Nemeth E, et al. Hepcidin induction by pathogens and pathogen-derived molecules is strongly dependent on interleukin-6. *Infect Immun* 2014;82(2):745-52.
85. Dallalio G, Law E, Means JRT. Hepcidin inhibits in vitro erythroid colony formation at reduced erythropoietin concentrations. *Blood* 2006; 107:2702-4.

86. Stancu S, Bârsan L, Stanciu A, Mircescu G. Can the response to iron therapy be predicted in anemic nondialysis patients with chronic kidney disease? *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5(3):409-16.
87. Mercadal L, Metzger M, Haymann JP, Thervet E, Boffa JJ, Flamant M, et al. NephroTest Study Group. The relation of hepcidin to iron disorders, inflammation and hemoglobin in chronic kidney disease. *PLoS One* 2014;9(6):e99781.
88. Sasu BJ, Cooke KS, Arvedson TL, Plewa C, Ellison AR, Sheng J, et al. Antihepcidin antibody treatment modulates iron metabolism and is effective in a mouse model of inflammation-induced anemia. *Blood* 2010;115(17):3616-24.
89. Agarwal AK. Iron metabolism and management: focus on chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* (2011). 2021;11(1):46-58.
90. Gafter-Gvili A, Schechter A, Rozen-Zvi B. Iron Deficiency Anemia in Chronic Kidney Disease. *Acta Haematol* 2019;142:44-50.
91. Tsuchiya K, Nitta K. Hepcidin is a potential regulator of iron status in chronic kidney disease. *Ther Apher Dial* 2013;17(1):1-8.
92. an Swelm RP, Wetzels JF, Verweij VG, Laarakkers CM, Pertijs JC, van der Wijst J, et al. Renal Handling of Circulating and Renal-Synthesized Hepcidin and Its Protective Effects against Hemoglobin-Mediated Kidney Injury. *J Am Soc Nephrol* 2016;27(9):2720-32.
93. Peters HP, Laarakkers CM, Pickkers P, Masereeuw R, Boerman OC, Eek A, et al. Tubular reabsorption and local production of urine hepcidin-25. *BMC Nephrol* 2013;14:70.
94. Deger, E. B., Arslan, E., Deger, M. D., Kaya, O. Biomarkers of acute kidney injury and their role in clinical patient management. *Biomedical Reviews* 2020;31:11-29.
95. Haase-Fielitz A, Mertens PR, Plass M, Kuppe H, Hetzer R, Westerman M, et al. Urine hepcidin has additive value in ruling out cardiopulmonary bypass-associated acute kidney injury: an observational cohort study. *Crit Care* 2011;15:R186.
96. Choi N, Whitlock R, Klassen J, Zappitelli M, Arora RC, Rigatto C, et al. Early intraoperative iron-binding proteins are associated with acute kidney injury after cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2019;157:287-97.e2.
97. Kemna E, Tjalsma H, Laarakkers C, Nemeth E, Willems H, Swinkels D. Novel urine hepcidin assay by mass spectrometry. *Blood* 2005;106:3268 –70.
98. Kemna EH, Tjalsma H, Podust VN, Swinkels DW. Mass spectrometry-based hepcidin measurements in serum and urine: analytical aspects and clinical implications. *Clin Chem* 2007;53:620 –8.
99. Konz T, Montes-Bayón M, Vaulont S. Hepcidin quantification: methods and utility in diagnosis. *Metallomics* 2014;6(9):1583-90.

100. Mussap M, Plebani M. Biochemistry and Clinical Role of Human Cystatin C. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2004;41:467-550.
101. Piķuła M, Smużyńska M, Krzystyniak A, Zieliński M, Langa P, Deptuła M, et al. Cystatin C peptidomimetic derivative with antimicrobial properties as a potential compound against wound infections. *Bioorg Med Chem* 2017;25(4):1431-9.
102. Allegaert K, Mekahli D, Van den Anker J. Cystatin C in newborns: a promising renal biomarker in search for standardization and validation. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2015;28(1):1833-8.
103. Olafsson I. The human cystatin C gene promoter: functional analysis and identification of heterogeneous mRNA. *Scand J Clin Lab Invest* 1995;55:597-607.
104. Prądzińska M, Behrendt I, Astorga-Wells J, Manoilov A, Zubarev RA, Kołodziejczyk AS, et al. Application of amide hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry for epitope mapping in human cystatin C. *Amino Acids* 2016;48(12):2809-20.
105. Lodish HF. Transport of secretory and membrane glycoproteins from rough endoplasmic reticulum to the Golgi. A rate-limiting step in protein maturation and secretion. *J Biol Chem* 1988;263:2107-10.
106. Bjarnadottir M, Nilsson C, Lindstrom V, Westman A, Davidsson P, Thormodsson F, et al. The cerebral hemorrhage-producing cystatin C variant (L68Q) in extracellular fluids. *Amyloid* 2001;8:1-10.
107. Argyri I, Xanthos T, Varsami M, Aroni F, Papalois A, Dontas I, et al. The role of novel biomarkers in early diagnosis and prognosis of acute kidney injury in newborns. *Am J Perinatol* 2013;30(5):347-52.
108. Filler G, Bökenkamp A, Hofmann W, Le Bricon T, Martínez-Brú C, Grubb A. Cystatin C as a marker of GFR--history, indications, and future research. *Clin Biochem* 2005;38(1):1-8.
109. Benoit SW, Ciccia EA, Devarajan P. Cystatin C as a biomarker of chronic kidney disease: latest developments. *Expert Rev Mol Diagn* 2020;20(10):1019-26.
110. Novo AC, Sadeck Ldos S, Okay TS, Leone CR. Longitudinal study of Cystatin C in healthy term newborns. *Clinics* 2011;66(2):217-20.
111. Donadio C. Serum and urinary markers of early impairment of GFR in chronic kidney disease patients: diagnostic accuracy of urinary β -trace protein. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010;299(6):F1407-23.
112. Helmersson-Karlqvist J, Lipcsey M, Ärnlov J, Bell M, Ravn B, Dardashti A, et al. Cystatin C predicts long term mortality better than creatinine in a nationwide study of intensive care patients. *Sci Rep* 2021;11(1):5882.

113. Poulik MD, Perry DJ, Vokac E, Sekine T. Post-gamma globulin. II. Radioimmunoassay determination of levels of post-gamma globulin and beta 2-microglobulin. *Clin Chim Acta* 1983;128: 249–60.
114. Kyhse-Andersen J, Schmidt C, Nordin G, Andersson B, Nilsson-Ehle P, Lindström V, et al. Serum cystatin C, determined by a rapid, automated particle-enhanced turbidimetric method, is a better marker than serum creatinine for glomerular filtration rate. *Clin Chem* 1994;40(10):1921-6.
115. Finney H, Newman DJ, Gruber W, Merle P, Price CP. Initial evaluation of cystatin C measurement by particle-enhanced immunonephelometry on the Behring nephelometer systems (BNA, BN II). *Clin Chem*. 1997 Jun;43(6 Pt 1):1016-22.
116. Tanaka M, Matsuo K, Enomoto M, Mizuno K. A sol particle homogeneous immunoassay for measuring serum cystatin C. *Clin Biochem* 2004;37(1):27-35.
117. Tschuppert Y, Buclin T, Rothuizen LE, Decosterd LA, Galleyrand J, Gaud C, et al. Effect of dronedarone on renal function in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 2007;64(6):785-91.
118. Waikar SS, Betensky RA, Emerson SC, Bonventre JV. Imperfect gold standards for kidney injury biomarker evaluation. *J Am Soc Nephrol* 2012;23(1):13-21.
119. Chu X, Bleasby K, Chan GH, Nunes I, Evers R. The Complexities of Interpreting Reversible Elevated Serum Creatinine Levels in Drug Development: Does a Correlation with Inhibition of Renal Transporters Exist? *Drug Metab Dispos* 2016;44(9):1498-509.
120. Levey AS, Inker LA, Coresh J. GFR estimation: from physiology to public health. *Am J Kidney Dis* 2014;63(5):820-34.
121. Kastl JT. Renal function in the fetus and neonate - the creatinine enigma. *Semin Fetal Neonatal Med* 2017;22(2):83-9.
122. Wuyts B, Bernard D, Van den Noortgate N, Van den Walle J, Van Vlem B, De Smet R, et al. Reevaluation of formulas for predicting creatinine in adults and children, using compensated creatinine methods. *Clin Chem* 2003;49(6 Pt 1):1011-4.
123. Marakala V, Avinash SS., Shivashankara AR, Malathi M, Kumar A. Serum creatinine assay: enzymatic vs kinetic Jaffe's method. *J Evol Med Dent Sci* 2012;1(4), 328-34.
124. McCance RA, Robinson JR. Evaluation of renal clearances. *Proc R Soc Med*. 1949 Jul;42(7):475-80.
125. Said S, Hernandez GT. The link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *J Nephropathol* 2014;3(3):99-104.
126. Effersoe P. Relationship between endogenous 24-hour creatinine clearance and serum creatinine concentration in patients with chronic renal disease. *Acta Med Scand* 1957; 156:429-34.

127. Vrkić N. Procjena brzine glomerularne filtracije i mjerenje proteinurije i albuminurije. *Medix*, br. 74. 2008: 9-15.
128. Schwartz GJ, Work DF. Measurement and estimation of GFR in children and adolescents. *J Am Soc Nephrol* 2009; 4(11):1832-43.
129. Schwartz GJ, Muñoz A, Schneider MF, Mak RH, Kaskel F, Warady BA, et al. New equations to estimate GFR in children with CKD. *J Am Soc Nephrol* 2009;20(3):629-37.
130. Staples A, LeBlond R, Watkins S, Wong C, Brandt J. Validation of the revised Schwartz estimating equation in a predominantly non-CKD population. *Pediatr Nephrol* 2010;25(11):2321-6.
131. Bacchetta J, Cochat P, Rognant N, Ranchin B, Hadj-Aissa A, Dubourg L. Which creatinine and cystatin C equations can be reliably used in children? *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6(3):552-60.
132. Filler G, Lepage N. Should the Schwartz formula for estimation of GFR be replaced by cystatin C formula? *Pediatr Nephrol* 2003;18(10):981-5.
133. Schwartz GJ, Schneider MF, Maier PS, Moxey-Mims M, Dharnidharka VR, Warady BA, et al. Improved equations estimating GFR in children with chronic kidney disease using an immunonephelometric determination of cystatin C. *Kidney Int* 2012 Aug;82(4):445-53.
134. Grubb A, Blirup-Jensen S, Lindstrom V, Schmidt C, Althaus H, Zegers I. First certified reference material for cystatin C in human serum ERM-DA471/IFCC. *Clin Chem Lab Med* 2010;48(11):1619-21.
135. Askenazi DJ, Feig DI, Graham NM, Hui-Stickle S, Goldstein SL. 3-5 year longitudinal follow-up of pediatric patients after acute renal failure. *Kidney Int* 2006;69(1):184-9.
136. Beddhu S, Samore MH, Roberts MS, Stoddard GJ, Pappas LM, Cheung AK. Creatinine production, nutrition, and glomerular filtration rate estimation. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:1000-5.
137. Ross EA, Wilkinson A, Hawkins RA, Danovitch GM. The plasma creatinine concentration is not an accurate reflection of the glomerular filtration rate in stable renal transplant patients receiving cyclosporine. *Am J Kidney Dis* 1987;10:113-7.
138. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999;130:461-70.
139. Wheeler DS, Devarajan P, Ma Q, Harmon K, Monaco M, Cvijanovich N, et al. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of acute kidney injury in critically ill children with septic shock. *Crit Care Med* 2008 Apr;36(4):1297-303.

140. Prowle JR, Ostland V, Calzavacca P, Licari E, Ligabo EV, Echeverri JE, et al. Greater increase in urinary hepcidin predicts protection from acute kidney injury after cardiopulmonary bypass. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:595-602.
141. Cowland JB, Borregaard N. Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. *Genomics* 1997;45(1):17-23.
142. Tanigasalam V, Bhat BV, Adhisivam B, Sridhar MG, Harichandrakumar KT. Predicting Severity of Acute Kidney Injury in Term Neonates with Perinatal Asphyxia Using Urinary Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin. *Indian J Pediatr* 2016;83(12-13):1374-8.
143. Mårtensson J, Glassford NJ, Jones S, Eastwood GM, Young H, Peck L, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin to hepcidin ratio as a biomarker of acute kidney injury in intensive care unit patients. *Minerva Anestesiol.* 2015;81(11):1192-200.
144. Colton T. *Statistics in Medicine.* Little Brown and Company, New York, NY, 1974
145. McGuire W. Perinatal asphyxia. *BMJ Clin Evid* 2007;2007:0320.
146. Sweetman DU. Neonatal acute kidney injury - Severity and recovery prediction and the role of serum and urinary biomarkers. *Early Hum Dev* 2017;105:57-61.
147. Durkan AM, Alexander RT. Acute kidney injury post neonatal asphyxia. *J Pediatr* 2011;158(2 Suppl):e29-33.
148. Fiala M, Baumert M, Surmiak P, Walencka Z, Sadowska P. Umbilical markers of perinatal hypoxia. *Ginekol Pol* 2016;87(3):200-4.
149. Abdelhady S, Gawad ERA, Haie OMA, Mansour AI .Usefulness of serum and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in detecting acute kidney injury in asphyxiated neonates. *Int J Med Health Sci* 2016;5(4):230–6.
150. Bohn MK, Higgins V, Adeli K. CALIPER paediatric reference intervals for the urea creatinine ratio in healthy children & adolescents. *Clin Biochem* 2020;76:31-4.
151. Treiber M, Gorenjak M, Pecovnik Balon B. Serum cystatin-C as a marker of acute kidney injury in the newborn after perinatal hypoxia/asphyxia. *Ther Apher Dial* 2014;18(1):57-67.
152. Sarafidis K, Tsepkentzi E, Agakidou E, Diamanti E, Taparkou A, Soubasi V, et al. Serum and urine acute kidney injury biomarkers in asphyxiated neonates. *Pediatr Nephrol* 2012;27(9):1575-82.
153. Hadzimuratovic E, Skrablin S, Hadzimuratovic A, Dinarevic SM. Postasphyxial renal injury in newborns as a prognostic factor of neurological outcome. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2014;27(4):407-10.

154. Momtaz HE, Sabzehei MK, Rasuli B, Torabian S. The main etiologies of acute kidney injury in the newborns hospitalized in the neonatal intensive care unit. *J Clin Neonatol* 2014;3:99-102.
155. Saha D, Mollah MAH, Afroz S, Banerjee M, Saha CS. Renal Functional Status of Asphyxiated Babies & its Correlation with Apgar Score. *J of Bangladesh College of Physic and Surgeons* 2017;35(3), 128-32.
156. Karlo J, Bhat BV, Koner BC, Adhisivam B. Evaluation of renal function in term babies with perinatal asphyxia. *Indian J Pediatr* 2014;81(3):243-7.
157. Abou El Hassan M, Stoianov A, Araújo PA, Sadeghieh T, Chan MK, Chen Y, et al. CLSI-based transference of CALIPER pediatric reference intervals to Beckman Coulter AU biochemical assays. *Clin Biochem* 2015;48(16-17):1151-9.
158. ELSayed AS, Omar HR, Abd Elhalim WA, Eltokhy A M . Prediction of Acute Kidney Injury in Term Newborn Following Perinatal Asphyxia. *Benha J of Applied Sci* 2021; 5(Issue 3 part (1)):13-8.
159. Jalali SZ, Enteshari M, Saadat F. Reciprocal assessment of urinary beta-2-microglobulin and BUN levels in renal dysfunction of neonates with birth asphyxia. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2022;35(25):6624-30.
160. Biyikli NK, Alpay H, Ozek E, Akman I, Bilgen H. Neonatal urinary tract infections: analysis of the patients and recurrences. *Pediatr Int* 2004;46(1):21-5.
161. Haase-Fielitz A, Mertens PR, Plass M, Kuppe H, Hetzer R, Westerman M, et al. Urine hepcidin has additive value in ruling out cardiopulmonary bypass-associated acute kidney injury: an observational cohort study. *Crit Care* 2011;15(4):R186.
162. Scindia Y, Dey P, Thirunagari A, Liping H, Rosin DL, Floris M, et al. Hepcidin mitigates renal ischemia-reperfusion injury by modulating systemic iron homeostasis. *J Am Soc Nephrol* 2015;26:2800–14.
163. Paller MS, Hedlund BE. Extracellular iron chelators protect kidney cells from hypoxia/reoxygenation. *Free Radic Biol Med*. 1994;17(6):597-603.
164. Kovtunovych G, Eckhaus MA, Ghosh MC, Ollivierre-Wilson H, Rouault TA. Dysfunction of the heme recycling system in heme oxygenase 1-deficient mice: effects on macrophage viability and tissue iron distribution. *Blood* 2010;116(26):6054-62.
165. Martines AM, Masereeuw R, Tjalsma H, Hoenderop JG, Wetzels JF, Swinkels DW. Iron metabolism in the pathogenesis of iron-induced kidney injury. *Nat Rev Nephrol*. 2013;9(7):385-98.
166. Nath KA. Heme oxygenase-1: a provenance for cytoprotective pathways in the kidney and other tissues. *Kidney Int* 2006;70(3):432-43.

167. Raiten DJ, Sakr Ashour FA, Ross AC, Meydani SN, Dawson HD, Stephensen CB, et al. INSPIRE Consultative Group. Inflammation and Nutritional Science for Programs/Policies and Interpretation of Research Evidence (INSPIRE). *J Nutr* 2015;145(5):1039S-108S.
168. Mondal M, Sinha SK, Sengupta M, Bose D, Saha S, Chaudhuri U. Study of Complete Haemogram and Iron Profile From Cord Blood of Newborn with Respect to Primigravida, Multigravida and Apgar Score. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2018;34(2):310-13.
169. Chen CN, Chou CH, Jeng SF, Tsai IJ, Chen PC, Chen CY, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels in neonates. *Pediatr Neonatol*. 2016;57:207–12.
170. Sarafidis K, Tsepkentzi E, Agakidou E, Diamanti E, Taparkou A, Soubasi V, et al. Serum and urine acute kidney injury biomarkers in asphyxiated neonates. *Pediatr Nephrol*. 2012;27:1575–82.
171. Abdelhady S, Abdel Gawad ER, Abdel Haie OM, Mansour AI. Usefulness of serum and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in detecting acute kidney injury in asphyxiated neonates. *Int J Med Health Sci* 2016;5:230-6.
172. Kamianowska M, Wasilewska A, Szczepanski M, Kulikowska E, Bebko B, Koput A. Health term-born girls had higher levels of urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin than boys during the first postnatal days. *Acta Paediatr* 2016;105:1105-8.
173. Krzeminska E, Wyczalkowska-Tomasik A, Korytowska N, Paczek L. Comparison of Two Methods for Determination of NGAL Levels in Urine: ELISA and CMIA. *J Clin Lab Anal* 2016;30(6):956-60.
174. Cangemi G, Storti S, Cantinotti M, Fortunato A, Emdin M, Bruschettoni M, et al. Reference values for urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in pediatric age measured with a fully automated chemiluminescent platform. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:1101–5.
175. Suchojad A, Tarko A, Smertka M, Majcherczyk M, Brzozowska A, Wroblewska J, et al. Factors limiting usefulness of serum and urinary NGAL as a marker of acute kidney injury in preterm newborns. *Ren Fail* 2015;37:439-45.
176. Lavery AP, Meinen-Derr JK, Anderson E, Ma Q, Bennett MR, Devarajan P, et al. Urinary NGAL in premature infants. *Pediatr Res* 2008;64:423–8.
177. Elmas AT, Tabel Y, Ipek S. Determination of reference values for urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in premature infants. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2014;27(2):187-91.
178. Saeidi B, Koralkar R, Griffin RL, Halloran B, Ambalavanan N, Askenazi DJ. Impact of gestational age, sex and postnatal age on urine biomarkers in premature neonates. *Pediatr Nephrol* 2015;30:2037-44.

179. Essajee F, Were F, Admani B. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin in asphyxiated neonates: a prospective cohort study. *Pediatr Nephrol* 2015;30(7):1189-96.
180. Wang Z, Jin L, Shen T, Zhan S. The Value of Urine NAG, NGAL Combined with Serum Cys-C in Early Diagnosis of Neonatal Hyperbilirubinemia-related Acute Kidney Injury *Signa Vitae* 2020;16(2).
181. Naunova-Timovska S, Cekovska S, Sahpazova E, Tasić V. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as an early biomarker of acute kidney injury in newborns. *Acta Clin Croat* 2020;59(1):55-62.
182. Oncel MY, Canpolat FE, Arayici S, Alyamac Dizdar E, Uras N, Oguz SS. Urinary markers of acute kidney injury in newborns with perinatal asphyxia (.). *Ren Fail.* 2016;38(6):882-8.
183. Bellos I, Fitrou G, Daskalakis G, Perrea DN, Pergialiotis V. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as predictor of acute kidney injury in neonates with perinatal asphyxia: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Pediatr* 2018;177(10):1425-34.
184. Valdimarsson S, Jodal U, Barregård L, Hansson S. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin and other biomarkers in infants with urinary tract infection and in febrile controls. *Pediatr Nephrol* 2017;32(11):2079-87.
185. Kostic D, Dos Santos Beozzo GPN, do Couto SB, Kato AHT, Lima L, Palmeira P, et al. First-year profile of biomarkers for early detection of renal injury in infants with congenital urinary tract obstruction. *Pediatr Nephrol.* 2019;34(6):1117-28.
186. Madsen MG, Nørregaard R, Palmfeldt J, Olsen LH, Frøkiær J, Jørgensen TM. Urinary NGAL, cystatin C, β 2-microglobulin, and osteopontin significance in hydronephrotic children. *Pediatr Nephrol* 2012;27(11):2099-106.
187. Krzemień G, Pańczyk-Tomaszewska M, Adamczuk D, Kotuła I, Demkow U, Szmigielska A. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin: A Biomarker for Early Diagnosis of Urinary Tract Infections in Infants. *Adv Exp Med Biol* 2018;1047:71-80.
188. Abboud S, Haile DJ. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem* 2000;275(26):19906-12.
189. Moulouel B, Houamel D, Delaby C, Tchernitchko D, Vaulont S, Letteron P, et al. Heparin regulates intrarenal iron handling at the distal nephron. *Kidney Int* 2013;84(4):756-66.
190. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.* 2004;306(5704):2090-3.
191. Nemeth E. Targeting the hepcidin-ferroportin axis in the diagnosis and treatment of anemias. *Adv Hematol.* 2010;2010:750643.

192. De Domenico I, Ward DM, Kaplan J. Hepcidin regulation: ironing out the details. *J Clin Invest*. 2007;117(7):1755-8.
193. Izawa T, Murakami H, Wijesundera KK, Golbar HM, Kuwamura M, Yamate J. Inflammatory regulation of iron metabolism during thioacetamide-induced acute liver injury in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2014;66(2-3):155-62.
194. Maisetta G, Vitali A, Scorciapino MA, Rinaldi AC, Petruzzelli R, Brancatisano FL, et al. pH-dependent disruption of *Escherichia coli* ATCC 25922 and model membranes by the human antimicrobial peptides hepcidin 20 and 25. *FEBS J* 2013;280(12):2842-54
195. Kroot JJ, Tjalsma H, Fleming RE, Swinkels DW. Hepcidin in human iron disorders: diagnostic implications. *Clin Chem* 2011;57(12):1650-69.
196. Sanad M, Gharib AF. Urinary hepcidin level as an early predictor of iron deficiency in children: A case control study. *Ital J Pediatr* 2011;37(1):1-8.
197. Sherbiny HS, Mostafa HAF, Sherief LM, Kamal NM, El-Shal AS, Abdel-El Halm MM, et al. Validity of serum and urinary hepcidin as biomarkers for late-onset sepsis in premature infants. *Ther Adv Chronic Dis*. 2022;13:20406223221122527.
198. Rao R, Georgieff MK. Iron in fetal and neonatal nutrition. *Semin Fetal Neonatal Med* 2007;12:54-63.
199. Müller KF, Lorenz L, Poets CF, Westerman M, Franz AR. Hepcidin concentrations in serum and urine correlate with iron homeostasis in preterm infants. *J Pediatr* 2012;160(6):949-53.e2.
200. German KR, Comstock BA, Parikh P, Whittington D, Mayock DE, Heagerty PJ, et al. Do Extremely Low Gestational Age Neonates Regulate Iron Absorption via Hepcidin? *J Pediatr* 2022;241:62-7.e1.
201. Prentice S, Jallow AT, Sinjanka E, Jallow MW, Sise EA, Kessler NJ, et al. Hepcidin mediates hypoferremia and reduces the growth potential of bacteria in the immediate post-natal period in human neonates. *Sci Rep* 2019;9(1):16596.
202. Cross JH, Prentice AM, Cerami C. Hepcidin, Serum Iron, and Transferrin Saturation in Full-Term and Premature Infants during the First Month of Life: A State-of-the-Art Review of Existing Evidence in Humans. *Curr Dev Nutr* 2020;4(8):nzaa104.
203. Kulik-Rechberger B, Kościeszka A, Szponar E, Domsud J. Hepcidin and iron status in pregnant women and full-term newborns in first days of life. *Ginekol Pol* 2016;87(4):288-92.
204. Wu TW, Tabangin M, Kusano R, Ma Y, Ridsdale R, Akinbi H. The utility of serum hepcidin as a biomarker for late-onset neonatal sepsis. *J Pediatr* 2013;162(1):67-71.
205. Uijtershout L, Domellöf M, Berglund SK, Abbink M, Vos P, Rövekamp L, et al. Serum hepcidin in infants born after 32 to 37 wk of gestational age. *Pediatr Res* 2016;79(4):608-13.

206. Santosa Q, Soemantri AG, Hadisaputro S, Soejoenoes A. Iron Status of Newborns and Umbilical Cord Blood Heparin Levels in Gender Differences. *J Kedokteran Brawijaya* 2020;31(1):58-65.
207. Ichinomiya K, Maruyama K, Inoue T, Koizumi A, Inoue F, Fukuda K, et al. Perinatal Factors Affecting Serum Heparin Levels in Low-Birth-Weight Infants. *Neonatology* 2017;112(2):180-6.
208. Chełchowska M, Ambroszkiewicz J, Gajewska J, Jabłońska-Głąb E, Maciejewski TM, Ołtarzewski M. Heparin and Iron Metabolism in Pregnancy: Correlation with Smoking and Birth Weight and Length. *Biol Trace Elem Res* 2016;173(1):14-20.
209. Aroun A, Zhong JL, Tyrrell RM, Pourzand C. Iron, oxidative stress and the example of solar ultraviolet A radiation. *Photochem Photobiol Sci* 2012;11(1):118-34.
210. Baliga R, Zhang Z, Baliga M, Ueda N, Shah SV. Role of cytochrome P-450 as a source of catalytic iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Kidney Int* 1998;54(5):1562-9.
211. Zhang W, Wang M, Xie HY, Zhou L, Meng XQ, Shi J, et al. Role of reactive oxygen species in mediating hepatic ischemia-reperfusion injury and its therapeutic applications in liver transplantation. *Transplant Proc* 2007;39:1332–7.
212. Himmelfarb J, McMonagle E, Freedman S, Klenzak J, McMenamin E, LeP, et al. The PICARD Group. Oxidative stress is increased in critically ill patients with acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2004;15(9):2449-56.
213. Baliga R, Zhang Z, Baliga M, Ueda N, Shah SV. In vitro and in vivo evidence suggesting a role for iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Kidney Int* 1998; 53: 394–401.
214. Zager RA. Combined mannitol and deferoxamine therapy for myohemoglobinuric renal injury and oxidant tubular stress. Mechanistic and therapeutic implications. *J Clin Invest* 1992;90(3):711-9.
215. Ho J, Reslerova M, Gali B, Gao A, Bestland J, Rush DN, et al. Urinary heparin-25 and risk of acute kidney injury following cardiopulmonary bypass. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6:2340-6.
216. P eters HP, Laarakkers CM, Swinkels DW, Wetzels JF. Serum heparin-25 levels in patients with chronic kidney disease are independent of glomerular filtration rate. *Nephrol Dial Transplant* 2010;25(3):848-53.
217. Cizmeci MN, Kara S, Kanburoglu MK, Simavli S, Duvan CI, Tatli MM. Detection of cord blood heparin levels as a biomarker for early-onset neonatal sepsis. *Med Hypotheses* 2014;82(3):310-2.
218. Vermeulen Windsant IC, Snoeijs MG, Hanssen SJ, Altintas S, Heijmans JH, Koepfel TA, et al. Hemolysis is associated with acute kidney injury during major aortic surgery. *Kidney Int* 2010;77(10):913-20.

219. van Swelm RP, Wetzels JF, Verweij VG, Laarakkers CM, Pertijs JC, van der Wijst J, et al. Renal Handling of Circulating and Renal-Synthesized Hepcidin and Its Protective Effects against Hemoglobin-Mediated Kidney Injury. *J Am Soc Nephrol* 2016;27(9):2720-32.
220. Yan JH, Cai XY, Huang YH. The clinical value of plasma hepcidin levels in predicting bacterial infections in febrile children. *Pediatr Neonatol* 2019;60(4):377-81.
221. Van der Vorm LN, Hendriks JCM, Laarakkers CM, Klaver S, Armitage AE, Bamberg A, et al. Toward Worldwide Hepcidin Assay Harmonization: Identification of a Commutable Secondary Reference Material. *Clin Chem* 2016;62:993–1001.
222. Diepeveen LE, Laarakkers CMM, Martos G, Pawlak ME, Uğuz FF, Verberne KESA, et al. Provisional standardization of hepcidin assays: creating a traceability chain with a primary reference material, candidate reference method and a commutable secondary reference material. *Clin Chem Lab Med* 2019;57(6):864-72.
223. Bökenkamp A, Domanetzki M, Zinck R, Schumann G, Brodehl J. Reference values for cystatin C serum concentrations in children. *Pediatr Nephrol* 1998;12(2):125-9.
224. Madise-Wobo AD, Gbelee OH, Solarin A, Animasahun BA, Njokanma OF. Serum cystatin C levels in Healthy Nigerian neonates: Is there a need for normative values in Nigerian babies? *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2017;28(6):1247-55.
225. Olayinka RI, Ayodele OS, Timothy OA, Olugbenga AM, Mohammed BA, Sikiru AB. Determination of glomerular filtration rate using cystatin C in healthy Nigerian newborns. *Alex J Med* 2019;55: 89-94.
226. Wilhelm-Bals A, Combescure C, Chehade H, Daali Y, Parvex P. Variables of interest to predict glomerular filtration rate in preterm newborns in the first days of life. *Pediatr Nephrol* 2020;35(4):703-12.
227. Kandasamy Y, Rudd D, Smith R. The relationship between body weight, cystatin C and serum creatinine in neonates. *J Neonatal Perinatal Med* 2017;10:419-23.
228. Yata N, Uemura O, Honda M, Matsuyama T, Ishikura K, Hataya H, et al. Reference ranges for serum cystatin C measurements in Japanese children by using 4 automated assays. *Clin Exp Nephrol* 2013;17(6):872-6.
229. Tong C, Liu Y, Wu Y, Li Q, Wu Y, Wang L, et al. Gestational and Age-Specific Cystatin C Reference Intervals for Newborns. *Am J Perinatol* 2022;39(15):1654-8.
230. Demirel G, Celik IH, Canpolat FE, Erdeve O, Biyikli Z, Dilmen U. Reference values of serum cystatin C in very low-birthweight premature infants. *Acta Paediatr* 2013;102(1):e4-7.
231. Elmas AT, Tabel Y, Elmas ON. Reference intervals of serum cystatin C for determining cystatin C-based glomerular filtration rates in preterm neonates. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2013; 26: 1474-8

232. Dorum S, Silfeler I, Dorum BA, Silfeler DB, Canbak Y, Say A. Reference values of serum cystatin-C for full-term and preterm neonates in Istanbul. *Indian J Pediatr* 2012;79(8):1037-42.
233. Lee JH, Hahn WH, Ahn J, Chang JY, Bae CW. Serum cystatin C during 30 postnatal days is dependent on the postconceptional age in neonates. *Pediatr Nephrol* 2013;28(7):1073-8.
234. Karakus S, Oktar T, Kucukgergin C, Kalelioglu I, Seckin S, Atar A, et al. Urinary IP-10, MCP-1, NGAL, Cystatin-C, and KIM-1 Levels in Prenatally Diagnosed Unilateral Hydronephrosis: The Search for an Ideal Biomarker. *Urology* 2016;87:185-92.
235. Pratiwi P, Artana IW, Yantie NP, Santoso H, Putra IG, Nilawati GA, et al. Cystatin C level and amikacin use in neonatal sepsis *Paediatr Indones* 2020;60:1-5
236. Herget-Rosenthal S, Marggraf G, Husing J, Goring F, Pietruck F, Janssen O, et al. Early detection of acute renal failure by serum cystatin c. *Kidney Int* 2004;66:1115-22.
237. Asilioglu N, Acikgoz Y, Paksu MS, Gunaydin M, Ozkaya O: Is serum cystatin C a better marker than serum creatinine for monitoring renal function in pediatric intensive care unit? *J Trop Pediatr* 2012;58:429-34.
238. Ling W, Zhaohui N, Ben H, Leyi G, Jianping Liu, Huili D, et al. Urinary IL-18 and NGAL as early predictive biomarkers in contrast-induced nephropathy after coronary angiography. *Nephron Clin Pract* 2008;108(3):c176-81.
239. Al-Beladi FI. Cystatin C is an early marker of contrast-induced nephropathy in patients with sepsis in the intensive care unit. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2015;26(4):718-24.
240. Zhang Y, Zhang B, Wang D, Shi W, Zheng A. Evaluation of Novel Biomarkers for Early Diagnosis of Acute Kidney Injury in Asphyxiated Full-Term Newborns: A Case-Control Study. *Med Princ Pract* 2020;29(3):285-91.
241. Bagla J, Kumari S, Gupta R, Khan I. Cystatin C as a biomarker of acute kidney injury in sick neonates. *Asian J of Pediatr Nephrol* 2020;3(1),10-3.
242. Nakashima T, Inoue H, Fujiyoshi J, Matsumoto N. Longitudinal analysis of serum cystatin C for estimating the glomerular filtration rate in preterm infants. *Pediatr Nephrol* 2016 Jun;31(6):983-9.
243. Brion LP, Fleischman AR, McCarton C, Schwartz GJ. A simple estimate of glomerular filtration rate in low birth weight infants during the first year of life: noninvasive assessment of body composition and growth. *J Pediatr* 1986;109(4):698-707
244. Hunley TE, Kon V, Ichikawa J. Glomerular circulation and function. In: Avner ED, Harmon WE, Niaudet P, Yoshikawa N, editors. *Pediatric nephrology*. 6th ed. Philadelphia: Springer, 2009:31-64.

245. Vogt BA, Dell KM. The kidney and urinary tract. In: Martin R, Fanaroff A, Walsh M, editors. Fanaroff and Martin's neonatal perinatal medicine. 9th ed. Elsevier; 2008:1681-704.
246. Muhari-Stark E, Burckart GJ. Glomerular Filtration Rate Estimation Formulas for Pediatric and Neonatal Use. *J Pediatr Pharmacol Ther* 2018;23(6):424-31.
247. Treiber M, Pečovnik Balon B, Gorenjak M. A new serum cystatin C formula for estimating glomerular filtration rate in newborns. *Pediatr Nephrol* 2015;30(8):1297-305.
248. Abitbol CL, Seeherunvong W, Galarza MG, Katsoufis C, Francoeur D, Defreitas M, et al. Neonatal kidney size and function in preterm infants: what is a true estimate of glomerular filtration rate? *J Pediatr*. 2014;164(5):1026-31.e2.
249. Hidayati EL, Utami MD, Rohsiswatmo R, Tridjaja B. Cystatin C compared to serum creatinine as a marker of acute kidney injury in critically ill neonates. *Pediatr Nephrol* 2021;36(1):181-6.
250. Pan JJ, Sun ZY, Zhou XY, Hu YH, Cheng R, Chen XQ, et al. Is neutrophil gelatinase-associated lipocalin a good diagnostic marker for renal injury in asphyxiated preterm infants? *J Res Med Sci* 2018;23:90.
251. Kwak BO, Chung S, Kim KS. Microalbuminuria in children with urinary tract infection. *Korean J Pediatr* 2010;53(9):840-4.
252. Toffolo A, Ammenti A, Montini G. Long-term clinical consequences of urinary tract infections during childhood: a review. *Acta Paediatr* 2012;101:1018-31.
253. Filler G, Bhayana V, Schott C, Díaz-González de Ferris ME. How should we assess renal function in neonates and infants? *Acta Paediatr* 2021;110(3):773-80.
254. Filler G, Lee M. Educational review: measurement of GFR in special populations. *Pediatr Nephrol* 2017;33(11):2037-46.
255. Dworkin LD. Serum cystatin C as a marker of glomerular filtration rate. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001;10(5):551-3.
256. Aljumah AA, Tamim H, Saeed M, Tamimi W, Alfawaz H, Al Qurashi S, et al. The Role of Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in Predicting Acute Kidney Dysfunction in Patients With Liver Cirrhosis. *J Clin Med Res* 2018;10(5):419-28.
257. Schaalán MF, Mohamed WA. Determinants of hepcidin levels in sepsis-associated acute kidney injury: Impact on pAKT/PTEN pathways? *J Immunotoxicol* 2016;13(5):751-7.
258. Cho SY, Hur M. Hepcidin and Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Biomarker for Acute Kidney Injury Linked Iron Metabolism. *Ann Lab Med* 2020;40(2):97-8.
259. Qiu ZL, Yan BQ, Zhao R, Xu DW, Shen K, Deng XQ, et al. Combination of hepcidin with neutrophil gelatinase-associated lipocalin for prediction of the development of sepsis-induced acute kidney injury. *Clin Chim Acta* 2021;523:38-44.

260. Scindia PhD Y, Leeds Md J, Swaminathan Md S. Iron Homeostasis in Healthy Kidney and its Role in Acute Kidney Injury. *Semin Nephrol* 2019;39(1):76-84.
261. Troutt JS, Butterfield AM, Konrad RJ. Heparin-25 concentrations are markedly increased in patients with chronic kidney disease and are inversely correlated with estimated glomerular filtration rates. *J Clin Lab Anal* 2013;27(6):504-10.
262. Ashby DR, Gale DP, Busbridge M, Murphy KG, Duncan ND, Cairns TD, et al.. Plasma hepcidin levels are elevated but responsive to erythropoietin therapy in renal disease. *Kidney Int* 2009;75(9):976-81.
263. Tomosugi N, Kawabata H, Wakatabe R, Higuchi M, Yamaya H, Umehara H, et al. Detection of serum hepcidin in renal failure and inflammation by using ProteinChip System. *Blood* 2006;108(4):1381-7.
264. Chen MX, Kuehne N, Mattman A, Liu J, Van der Gugten G, Wright B. Clinical interpretation of serum hepcidin-25 in inflammation and renal dysfunction. *J Mass Spectrom Adv Clin Lab* 2022;24:43-9.
265. Song Y, Sun S, Yu Y, Li G, Song J, Zhang H, et al. Diagnostic value of neutrophil gelatinase-associated lipocalin for renal injury in asphyxiated preterm infants. *Exp Ther Med* 2017;13(4):1245-8.
266. Izadi A, Yousefifard M, Nakhjavan-Shahraki B, Baikpour M, Mirzay Razaz J, Hosseini M. Diagnostic value of Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) in detection of pediatric acute kidney injury; a systematic review and meta-analysis. *Inter J of Pediatr* 2016;4(11), 3875-95.
267. Albert C, Haase M, Albert A, Kropf S, Bellomo R, Westphal S, et al. Urinary Biomarkers may Complement the Cleveland Score for Prediction of Adverse Kidney Events After Cardiac Surgery: A Pilot Study. *Ann Lab Med* 2020;40(2):131-41.
268. Noyan A, Parmaksiz G, Dursun H, Ezer SS, Anarat R, Cengiz N. Urinary NGAL, KIM-1 and L-FABP concentrations in antenatal hydronephrosis. *J Pediatr Urol* 2015;11(5):249.e1-6.
269. Moon JH, Yoo KH, Yim HE. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a marker of urinary tract infection among febrile children. *Clin Exp Pediatr* 2021;64(7):347-54.

8. POPIS KRATICA

ABO	akutno bubrežno oštećenje
AKIN	kriteriji za definiciju i klasifikaciju akutnog bubrežnog oštećenja
apoNGAL	lipokalin udružen s neutrofilnom gelatinazom bez vezanih siderofora i željeza
AUC	površina ispod krivulje
BMP	koštani morfogogenetski protein
BMP/HJV/SMAD	koštani morfogogenetski protein/hemojuvelin/ SMAD signali put
BUN	ureja
CAKUT	prirodne anomalije bubrega i urinskog trakta
CMIA	kemiluminiscentna imunokemijska metoda
CRP	C-reaktivni protein
CYS	cistein
ECM	izvanstanični matriks
eGFR	procjena glomerularne filtracije
EIA	enzimska imunometoda
ELISA	enzimska imunokemijska metoda
ER	endoplazmatski retikulum
ERFE	eritroferon
ERSD	krajnji stadij bubrežne bolesti
ESA	stimulirajućih agenasa eritropoeze
FNP	feroportin
GFR	glomerularna filtracija
GLDH	glutamat-dehidrogenaza
HFE	homeostatski regulatora željeza
HJV	hemojuvelin
IL	interleukin
IL-18	interleukin 18
IL-6	interleukin 6
IL-8	interleukin 8

KBB	kronična bubrežna bolest
KDIGO	smjernice inicijative za kvalitetu ishoda bolesti bubrega
KIM-1	molekula bubrežnog oštećenja 1
LC/MS	sustav tekućinske kromatografije i spektrometrije masa
LCN2	lipokalin 2
LEAP-1	hepcidin
L-FABP	jetreni protein koji veže masne kiseline
MMP-9	matriksna metaloproteinaza-9
MS	masena spektrometrija
N-ABO	novorođenčad s akutnim bubrežnim oštećenjem
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NAG	N-acetil-beta-D-glukozaminidaza
N-DBB	novorođenčad s drugim bubrežnim oštećenjima i bolestima
NFκB	jezgreni čimbenik kappa B
NGAL	lipokalin udružen s neutrofilnom gelatinazom
NMR	spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije
NSAID	nesteroidni antiupalni lijekovi
N-Z	terminski zdrava novorođenčad
PENIA	nefelometrijska imunometoda
PETIA	turbidimetrijska imunokemijska metoda s potpomognutim česticama
POCT	brzi test koji se izvodi uz pacijenta
r	Spermanov koeficijent korelacije
RES	retikuloendotelni sustav
RIA	radioimunoanaliza
RIFLE	kriterij rizika, ozljeda, zatajivanja, gubitaka bubrežne funkcije i završnog stadija bubrežne bolesti
ROC	krivulja operativnih karakteristika
RRT	renalna nadomjesna terapija
Scys	cistatin C u serumu;

SELDI-TOF	matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija
SRID	enzimski pojačana pojedinačna radijalna imunodifuzija
TIMP-1	tkivni inhibitor matriksnih metaloproteinaza
TMPRSS6	transmembranska serinska proteaza 6
TRF 2	transferin receptor 2
VEGF	vaskularni endotelni faktor rasta

9. ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

Vinka Mikulić, rođena je 18. kolovoza 1984. godine u Mostaru. Osnovnu školu August Šenoa pohađala je u Širokom Brijegu kao i Opću gimnaziju fra. Didak Buntić. Potom je upisala Prirodoslovno matematički fakultet, Sveučilišta u Zagrebu te diplomirala 2010. godine stekavši zvanje diplomirani inženjer kemije. Od 2010. godine do danas radi u Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Sveučilišne kliničke bolnice Mostar te kao asistent sudjeluje u izvođenju nastave iz kolegija Medicinska kemija i biokemija, Medicinski fakultet, Sveučilišta u Mostaru. Također, od 2014. godine kao asistent sudjeluje u izvođenju nastave iz kolegija Biokemija I i Klinička biokemija, Farmaceutski fakultet, Sveučilišta u Mostaru. Aktivno je sudjelovala na više domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova. Autor je i koautor 6 znanstvenih članaka objavljenih u časopisima indeksiranim u Current Contents i Web of Science Core Collection te koautor Priručnika za vježbe iz medicinske kemije i biokemije za studente medicine

**Znanstveni radovi u časopisima indeksiranim
u Current Contents (CC) i Web of Science Core Collection**

1. Mikulić V, Rogić D, Mikulić I, Ljubić K, Ćuk A, Tomić V, et al. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin concentration in healthy newborns during the first three postnatal days. *Biochem Med* 2020;30:030706
2. Mikulic V, Rogic D, Mikulic I, Jerkovic Raguz M, Brzica J, Pandza Topic M, et al. Cystatin C Concentration During the First Three Postnatal Days in Healthy Term Newborns. *Z Geburtshilfe Neonatol* 2022;226(3):193-6.
3. Raguz MJ, Šoljić K, Prce Ž, Mikulić V, Barišić T, Grgić S. Is it Good to be Born as a Late Preterm Infant. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2020;49(10), 230.
4. Mihalj M, Karlović Z, Vladić-Spaić D, Matić B, Mikulić I, Mikulić V, Golubović V. Effects of midazolam co-induction to general anesthesia: A randomized clinical trial. *Medicine (Baltimore)*. 2022;101(45):e31400.
5. Franjić, D., Karlović, H., Rajič, B., Azinović, I., Komšić, M., Mikulić, V., ... & Arapović, J. . The cytomegalovirus seroprevalence among children in Mostar, Bosnia and Herzegovina: A hospital cross-sectional study. *Clinl Epidemiol and Global Health* 2020;1302-5.
6. Šušak B, Mikulić V, Lazarević A, Mikulić I, Arapovic J. Sustained seroprevalence of SARS-CoV-2 antibodies one year after infection: one of the first COVID-19 cluster cases in Bosnia and Herzegovina. *Bosn J Basic Med Sci* 2022;22(1):147-52.

10. PRILOG

Cystatin C Concentration During the First Three Postnatal Days in Healthy Term Newborns

Authors

Vinka Mikulic^{1,2} , Dunja Rogic^{3,4}, Ivanka Mikulic^{2,5}, Marjana Jerkovic Raguz^{6,7} , Jerko Brzica^{7,8}, Maja Pandza Topic⁹, Kristina Ljubić^{1,2}, Vajdana Tomic^{10,11}

Affiliations

- 1 Department of Laboratory Diagnostics, University Clinical Hospital Mostar, Mostar, Bosnia and Herzegovina
- 2 Clinical Biochemistry, University of Mostar, School of Medicine, Mostar, Bosnia and Herzegovina
- 3 Department of Laboratory Diagnostics, University Hospital Center Zagreb, Zagreb, Croatia
- 4 Department of Medical Biochemistry and Hematology, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Zagreb, Croatia
- 5 Department of Laboratory Medicine, University Clinical Hospital Mostar, Mostar, Bosnia and Herzegovina
- 6 Department of Neonatology and Intensive Care Unit, Sveucilisna Klinicka Bolnica Mostar, Mostar, Bosnia and Herzegovina
- 7 Department of Pediatrics, University of Mostar, School of Medicine, Mostra, Bosnia and Herzegovina
- 8 Department of Neonatology and Intensive Care Unit, University Clinical Hospital Mostar, Mostar, Bosnia and Herzegovina
- 9 Department of Psychology, University of Mostar Faculty of Philosophy, Mostar, Bosnia and Herzegovina
- 10 Department of Obstetrics and Gynaecology, University Clinical Hospital Mostar, Mostar, Bosnia and Herzegovina
- 11 Department of Gynaecology, University of Mostar School of Medicine, Mostar, Bosnia and Herzegovina

Key words

Cystatin C, Newborn, Kidney, Reference values

received 21.09.2021

accepted after revision 10.12.2021

Bibliography

Z Geburtsh Neonatol 2022; 226: 1–4

DOI 10.1055/a-1727-6309

ISSN 0948-2393

© 2022, Thieme. All rights reserved.

Georg Thieme Verlag KG, Rüdigerstraße 14,
70469 Stuttgart, Germany

Correspondence

Dr. Vinka Mikulic
University Clinical Hospital Mostar
Department of Laboratory Diagnostics
Kralja Tvrtka b.b, Mostar, 88000
Bosnia and Herzegovina
barac.vinka@gmail.com

ABSTRACT

Objective Cystatin C (Cys-C) concentration has not been examined sufficiently among healthy newborn population, particularly in terms of reference values. This study aimed to establish gender-, postnatal age- and birth weight-specific Cys-C concentration for healthy term newborns. Its objective was also to examine if there were any differences between our measured concentration and the reference interval established by the CALIPER study.

Methods Serum samples from a total of 90 healthy term newborns were used to determine Cys-C concentration. Cys-C was measured within first three days of birth using particle-enhanced turbidimetric immunoassay (PETIA) on the Architect plus ci8200 analyzer.

Results Median concentration of the Cys-C was 2.05 mg/L. There were no statistically significant differences in Cys-C concentration regarding gender ($p = 0.779$), birth weight ($p = 0.505$), postnatal age ($p = 0.512$) or Apgar score ($p = 0.799$). The value of the 2.5th and 97.5th percentile for Cys-C concentrations for girls was 0.93–3.15 mg/L and for boys it was 1.5–3.36 mg/L.

Conclusion Cys-C concentration in healthy term newborns does not depend on gender, birth weight, postnatal age, or Apgar score. Our measured concentration range of Cys-C in healthy newborns turned out to be slightly wider than the interval determined in the CALIPER study.

Introduction

Cystatin C (Cys-C), a non-glycosylated low-weight molecular protein (13 kDa; 120 amino acid peptide chain), is a cysteine proteinase inhibitor which plays an important role in the intracellular catabolism of proteins. The synthesis of human Cys-C is regulated by the CST3 gene, which is located on chromosome 20p11.2 and is known as the housekeeping gene [1]. Cys-C is completely filtered by the glomerulus and catabolized in the proximal tubules and therefore has been identified as an excellent potential marker of kidney function. However, mainly due to logistic and/or financial reasons, serum creatinine is still a more commonly used biomarker within this clinical setting.

Contrary to creatinine, Cys-C does not cross the placenta and is not affected by gender, body muscle mass, age, inflammation, or neonatal conditions such as jaundice [2, 3]. Results of past studies have shown that it is a more accurate indicator of kidney function impairment compared to creatinine and that it detects kidney changes earlier [4, 5]. However, in spite of obvious advantages, Cys-C studies in newborns and infants are rather limited [6, 7]. To ensure effective results interpretation, a number of studies worldwide were performed to determine the reference values of Cys-C in newborns and children, among which the best known is the Canadian Laboratory Initiative on Pediatric Reference Intervals (CALIPER) study [8]. For better application in clinical practice and correct interpretation in different pathological conditions, it is necessary to have a recommended method and a well-defined concentration for healthy newborns. Specifically in pediatrics, physical development, nutrition, growth, organ maturity, hormone and immune responses as well as diseases during specific age segments should be taken into account when determining reference values for healthy newborns. As opposed to creatinine, Cys-C does not cross the placenta. Therefore, serum values are expected to be constant within the first postnatal days, which presents a huge advantage compared to creatinine. Thus, the aim of the study was to determine the serum concentration of Cys-C in healthy term newborns within the first three days of life as well as to establish if there was a difference in Cys-C serum concentrations in relation to gender, postnatal age, birth weight, and Apgar score. Another aim was to examine whether the CALIPER study results could be applied to newborns in Bosnia and Herzegovina. The hypothesis was that Cys-C concentration does not depend on gender, postnatal age, and birth weight.

Materials and methods

Subjects

This study was conducted at the Medical Biochemistry Laboratory, University Hospital Mostar, Bosnia and Herzegovina, with the approval of the Ethics Committee of the University Clinical Hospital Mostar (Ethics Committee approval number 2272/12 at UCHM) in adherence to the Declaration of Helsinki. Signed written informed consent was obtained from all parents of newborns. The present study was prospective and included 90 healthy newborns born from April to October 2019. The newborns included in the study were delivered from full-term pregnancies, and inclusion criteria after clinical examination were as follows: gestational age at birth ≥ 37 weeks, Apgar score ≥ 8 in the first minute after birth, CRP level < 5 mg/L, nor-

mal physical and kidney ultrasound examination [9–11]. If routine clinical examination after birth showed the presence of infection, cardiac disease, congenital anomalies, or chromosomal disorder, the newborns were excluded from the study.

Methods

In the present study, we used leftover patient sera after performing routine laboratory tests (mainly bilirubin) required by a neonatologist after post-delivery examination. 1.1 mL of venous blood was collected in micro sample tubes with gel (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) with 23 G micro needles (Sarstedt) within 72 hours after birth. The collected samples were centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes and stored at -80 °C until analysis. CRP concentration, which was the inclusion/exclusion criterion for the study, was measured using a CRP latex reagent kit (Beckman Coulter, Ireland) on the Beckman Coulter Chemistry Analyzer AU680. The Architect Cystatin C reagent kit (1P93–30; Sentinel CH, Milan, Italy) was used to measure Cys-C on the Architect plus ci8200 analyzer (Abbott, Chicago, USA). The Architect Cystatin C assay is a particle-enhanced turbidimetric immunoassay (PETIA). Latex particles coated with anti-human cystatin C antibodies agglutinate when mixed with a sample containing human Cys-C. The change in absorbance due to agglutination of the reaction mixture is proportional to the quantity of human cystatin C in the sample. The assay was calibrated according to the manufacturer's instructions (Architect Cystatin C Calibrator 1P93–10, Sentinel CH) and checked daily by using commercial controls (Architect Cystatin C Controls 1P93–20, Sentinel CH). According to manufacturer's data based on Laboratory Standards Institute (CLSI) protocol NCCLA EP5-A, intra assay CV was ≤ 5 %.

Statistical analysis

By applying the formula for single mean estimation and using results from a sample study conducted on three-day-old neonates in Slovenia performed by Treiber et al. as a population variance, it was possible to calculate the sample size [12]. With the 5 % degree of precision of the mean and the confidence coefficient set at 95 %, the necessary sample size was 67. Since these calculations were based only on the results available for the 3rd post-natal day, we rounded the sample size to 90 neonates to ensure higher precision in parameter estimation for all the analyzed post-natal days. Data analysis was performed using SPSS version 20 software (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Owing to skewed distributions (tested via the Shapiro-Wilk test), non-parametric tests were used for further analyses. Descriptive statistics for measurement data were shown as median and interquartile range (from first (Q1) to third quartile (Q3)), except for gestational age and Apgar score, which are presented as median and minimum–maximum. To estimate the differences between two or more groups, the Mann-Whitney or Fisher's exact test and the Kruskal-Wallis test were used. P values < 0.05 were considered statistically significant. For the purposes of comparison, reference intervals for cystatin C on Abbott Architect were taken from the CALIPER base [8].

Results

The study involved 37 healthy term newborn girls and 53 healthy term newborn boys, both with a median gestational age 40 weeks.

► **Table 1** shows the general demographic characteristics (birth weight, birth length, and Apgar score) of the study group. The parameters in the table show no statistically significant difference between genders. According to the obtained data, median serum Cys-C concentration in the study group was 2.05 mg/L. Median Cys-C concentration did not differ between newborn boys and girls ($p = 0.779$). The interval from the 2.5th to the 97.5th percentile regarding Cys-C concentration of newborn girls was 0.93–3.15 mg/L, whereas for boys it was 1.5–3.36 mg/L. The influence of postnatal age and birth weight on Cys-C concentration was tested by comparison of different postnatal age subgroups and by comparison of different weight subgroups. Statistically significant differences in Cys-C concentrations were not observed between different postnatal age subgroups ($p = 0.512$) and between different birth weight subgroups ($p = 0.505$). Since eleven newborns did not have an Apgar score of 10 in the first minute after birth, the difference in Cys-C according to Apgar was also tested. These results did not show a statistically significant difference between them, $p = 0.799$ (► **Table 2**).

Discussion

Currently there is not enough data about serum Cys-C concentration in healthy newborns during the early postnatal period. The present study aimed to gather information on the concentration of Cys-C in healthy term newborns during the first three days of life. The results of our study showed that there was no significant difference in Cys-C concentration in relation to gender, postnatal age, birth weight, and Apgar score, which supports the initial hypothesis; also, these findings support a role of Cys-C as a robust marker for early detection of kidney dysfunction in this population.

There have been several studies that measured Cys-C in healthy term newborns during the first days after birth. One of these studies was by Bokenkamp et al., whose data showed that the median concentration of Cys-C was 2.16 mg/L during first three postnatal days [13]. These results show slightly higher concentration values than obtained in the present study. In the study performed by Masisse-Wobo et al., the measured Cys-C median concentration on the first day after birth was 1.8 mg/L [14] and 1.6 mg/L on third day. Olayinka et al. carried out a research obtaining Cys-C concentration values of 1.0 mg/L [15]. In another study, i. e., a study by Wilhelm-Bels A. et al., the median concentration was 1.36 mg/L [16]. In the group of healthy term newborns included in a study by Kandasamy et al., the median concentration of Cys-C was 1.7 mg/L [17]. The above-mentioned studies show slightly higher or lower results than the present study and the reasons behind these reported differences in Cys-C may come from differences in the assay methods and manufacturers. This is in agreement with a previous study by Yata et al. that showed differences in Cys-C concentration when using different assay methods [18]. Even a study by Tong et al. showed somewhat lower median concentrations of Cys-C although they were measured by the same method on Abbott Architect in the first three days of birth [19]. Reported differences in Cys-C concentration may therefore be caused by racial/ethnic differences in study populations. The present study did not find any statistical differences in Cys-C concentration between boys and

girls, which is in agreement with previous research. Moreover, data in the present study demonstrated no statistical differences in Cys-C concentration with different healthy term newborns' weight and gestational age, which was also shown in the study by Kandasamy et al. and by Masisse-Wobo et al. From the previous studies it is also evident that premature newborns weight and gestational age did not have an impact on Cys-C concentration; it represents another advantage of Cystatin C compared to creatinine in such a vulnerable population [20–23]. Results similar to the present study were also obtained in a study conducted by Lee et al. These results did not show statistically significant differences in Cys-C concentration during the first three postnatal days; such differences were shown only at a postnatal age of 4–20 days [24]. Since it was carried out on healthy newborns, the present study – as expected – showed no significant difference in concentration of Cys-C in newborns with an Apgar score of 10 compared to newborns with an Apgar score of 9.

► **Table 1** Demographic characteristics of healthy newborns.

General characteristic	Total (N = 90)	Males (N = 53)	Females (N = 37)	p
Gestational age (weeks)	40 (39–41)	40 (39–41)	40 (39–41.75)	0.521*
Birth weight (g)	3450 (3180–3800)	3500 (3200–3800)	3450 (3110–3770)	0.764*
Birth length (cm)	55 (53–56)	55 (53–56)	55 (53–56)	0.854*
APGAR	10 (9–10)	10 (9–10)	10 (9–10)	1.000‡

Data for birth weight and birth length are presented as the median and interquartile range; data for gestational age and Apgar data are presented as median and minimum-maximum. * Mann-Whitney U test; ‡Fisher's exact test; $P < 0.05$ was considered statistically significant

► **Table 2** Cystatin C concentration of healthy newborns.

Parameters	Cystatin C (mg/L)		
	Median	Q1-Q3	p value
Total study group A (N = 90)	2.05	1.84–2.27	–
Gender			
Girls (N = 37)	2.04	1.81–2.26	0.779*
Boys (N = 53)	2.05	1.84–2.29	
Postnatal age			
1st day (N = 18)	1.95	1.84–2.25	0.512‡
2nd day (N = 61)	2.05	1.83–2.24	
3rd day (N = 11)	2.19	1.96–2.31	

N = number of newborns; *Mann-Whitney U test; ‡Kruskal-Wallis ANOVA; $P < 0.05$ was considered statistically significant

Considering the 2.5th and 97.5th percentiles with regard to results of 90 neonates, Cystatin C concentration range was slightly wider than the interval determined in the CALIPER study (1.49–2.85 mg/L). However, it should be noted that the CALIPER study interval does not only apply to infants between one and three days of postnatal age, but the samples were taken in the interval from birth to one month of age. A limitation of the present study was a relatively small number of healthy newborns and the fact that no additional serum biomarker was studied in order to compare its relative utility in relation to Cys-C. However, the creatinine values have many known limitations, among which the important one in this population is maternal creatinine present in neonatal blood during the early postnatal days. In the literature, mostly for ethical reasons, there is a relatively small number of studies that involve obtaining data on a healthy newborn population. Yet, it is necessary to determine the ranges of concentration values in healthy newborns and standardize measurements and methods. Access to a larger sample is vital for establishing appropriate reference intervals in order to obtain more information based on age, gender, and ethnic group. Thus, future studies might be needed to include a higher number of healthy newborns to help establish definitive reference intervals of the Cys-C concentration and in this manner contribute to its use in the early detection of kidney dysfunction in newborns, which will eventually lead to a lower number of misdiagnoses.

Conclusion

This study generated serum concentration of Cys-C for healthy term newborns within the first three days of birth and demonstrated that there was no significant difference in Cys-C concentration in relation to gender, postnatal age, birth weight, and Apgar score. Concentration range has turned out to be slightly wider than the interval determined in the CALIPER study. Serum Cys-C has properties that make it a more reliable biomarker for early diagnosis and treatment.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- [1] Olafsson I. The human cystatin C gene promoter: functional analysis and identification of heterogeneous mRNA. *Scand J Clin Lab Invest* 1995; 55: 597–607
- [2] Otukesh H, Hoseini R, Rahimzadeh N et al. Glomerular function in neonates. *Iran J Kidney Dis* 2012; 6: 166–172
- [3] den Bakker E, Gemke RJB, Bökenkamp A. Endogenous markers for kidney function in children: a review. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2018; 55: 163–183
- [4] Dharnidharka VR, Kwon C, Stevens G. Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 2002; 40: 221–226

- [5] Roos JF, Doust J, Tett SE et al. Diagnostic accuracy of cystatin C compared to serum creatinine for the estimation of renal dysfunction in adults and children – a meta-analysis. *Clin Biochem* 2007; 40: 383–391
- [6] Nakhjavan-Shahraki B, Yousefifard M, Ataei N et al. Accuracy of cystatin C in prediction of acute kidney injury in children; serum or urine levels: which one works better? A systematic review and meta-analysis. *BMC Nephrol* 2017; 18: 120–■
- [7] Muhari-Stark E, Burckart GJ. Glomerular filtration rate estimation formulas for pediatric and neonatal use. *J Pediatr Pharmacol Ther* 2018; 23: 424–431
- [8] Adeli K, Higgins V, Trajcevski K et al. The Canadian laboratory initiative on pediatric reference intervals: A CALIPER white paper. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2017; 54: 358–413
- [9] Spong CY. Defining term pregnancy: recommendations from the Defining Term Pregnancy Workgroup. *JAMA* 2013; 309: 2445–2446
- [10] Pregnancy, childbirth, postpartum and newborn care: a guide for essential practice – 3rd ed. World Health Organization 2015;
- [11] Adeli K, Higgins V, Trajcevski K et al. The Canadian laboratory initiative on pediatric reference intervals: A CALIPER white paper. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2017; 54: 358–413
- [12] Treiber M, Gorenjak M, Pecovnik Balon B. Serum cystatin-C as a marker of acute kidney injury in the newborn after perinatal hypoxia/asphyxia. *Ther Apher Dial* 2014; 18: 57–67
- [13] Bökenkamp A, Domanetzki M, Zinck R et al. Reference values for cystatin C serum concentrations in children. *Pediatr Nephrol* 1998; 12: 125–129
- [14] Madise-Wobo AD, Gbelee OH, Solarin A et al. Serum cystatin C levels in healthy Nigerian neonates: Is there a need for normative values in Nigerian babies? *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2017; 28: 1247–1255
- [15] Olayinka RI, Ayodele OS, Timothy OA et al. Determination of glomerular filtration rate using cystatin C in healthy Nigerian newborns. *Alex J Med* 2019; 55: 89–94
- [16] Wilhelm-Bals A, Combesure C, Chehade H et al. Variables of interest to predict glomerular filtration rate in preterm newborns in the first days of life. *Pediatr Nephrol* 2020; 35: 703–712
- [17] Kandasamy Y, Rudd D, Smith R. The relationship between body weight, cystatin C and serum creatinine in neonates. *J Neonatal Perinatal Med* 2017; 10: 419–423
- [18] Yata N, Uemura O, Honda M et al. Reference ranges for serum cystatin C measurements in Japanese children by using 4 automated assays. *Clin Exp Nephrol* 2013; 17: 872–876
- [19] Tong C, Liu Y, Wu Y et al. Gestational and age-specific cystatin C reference intervals for newborns. *Am J Perinatol* 2021. doi:10.1055/s-0041-1724000
- [20] Demirel G, Celik IH, Canpolat FE et al. Reference values of serum cystatin C in very low-birthweight premature infants. *Acta Paediatr* 2013; 102: e4–e7
- [21] Elmas AT, Tabel Y, Elmas ON. Reference intervals of serum cystatin C for determining cystatin C-based glomerular filtration rates in preterm neonates. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2013; 26: 1474–1478
- [22] Dorum S, Silfeler I, Dorum BA et al. Reference values of serum cystatin-C for full-term and preterm neonates in Istanbul. *Indian J Pediatr* 2012; 79: 1037–1042
- [23] Demirel G, Celik IH, Canpolat FE et al. Reference values of serum cystatin C in very low-birthweight premature infants. *Acta Paediatr* 2013; 102: e4–e7
- [24] Lee JH, Hahn WH, Ahn J et al. Serum cystatin C during 30 postnatal days is dependent on the postconceptional age in neonates. *Pediatr Nephrol* 2013; 28: 1073–1078

■ Note from Copy Editor: References 8 and 11 are the same, please check and correct, thank you! ■

■ Proof copy for correction only. All forms of publication, duplication or distribution prohibited under copyright law. ■

Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin concentration in healthy newborns during the first three postnatal days

Vinka Mikulić^{*1}, Dunja Rogić², Ivanka Mikulić¹, Kristina Ljubić¹, Ana Ćuk¹, Vajdana Tomić³, Helena Radić Mišković⁴

¹Department of Laboratory Diagnostics, University Clinical Hospital Mostar, Mostar, Bosnia and Herzegovina

²Department of Laboratory Diagnostics, University Hospital Center Zagreb, Zagreb, Croatia

³Department of Obstetrics and Gynaecology, University Clinical Hospital Mostar, Mostar, Bosnia and Herzegovina

⁴Department of Neonatology, University Clinical Hospital Mostar, Mostar, Bosnia and Herzegovina

*Corresponding author: barac.vinka@gmail.com

Abstract

Introduction: Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (uNGAL) is a biochemical marker significant for early prediction of acute kidney injury in adults. However, it has not been examined sufficiently among the infant population, particularly newborns in terms of reference values. The aim of our study was to determine the concentration of uNGAL in healthy term newborns and to determine if there was a difference in uNGAL concentration according to gender, postnatal age and birth weight.

Materials and methods: Our study involved 81 healthy term newborns birth (≥ 37 weeks, Apgar score ≥ 8 in the first minute after birth, CRP < 5 mg/L). Urine NGAL was measured using chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) within 72 hours after birth, on Architect plus ci8200 analyser (Abbott, Chicago, USA). Data were analysed using Statistica software.

Results: The median concentration of uNGAL in the whole study group of healthy term newborns was 27.1 ng/mL (16.5-56.0 ng/mL) (newborn girls, 27.1 ng/mL (15.8-47.9 ng/mL); newborn boys, 27.9 ng/mL (16.5-61.0 ng/mL), $P = 0.941$). Median uNGAL concentration according to postnatal age expressed in days was 28.2 ng/mL (11.7-57.2 ng/mL) 1st day, 28.9 ng/mL (16.5-64.2 ng/mL) 2nd day and 23.9 ng/mL (20.2-46.6) 3rd day, $P = 0.863$. Regarding birth weight for newborns < 3500 g, median concentration was 25.0 ng/mL (16.5-45.4 ng/mL) and for weight ≥ 3500 g 30.6 ng/mL (16.5-64.2 ng/mL), $P = 0.455$.

Conclusions: There were no significant difference in uNGAL concentration in relation to gender, postnatal age and birth weight.

Keywords: neutrophil gelatinase-associated lipocalin; urine; healthy term newborns

Submitted: February 21, 2020

Accepted: July 21, 2020

Introduction

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), also known as lipocalin-2, LCN2, siderocalin, 24p3, is a 25 kDa molecular weight protein. It belongs to the lipocalin superfamily, which consists of proteins that transport small hydrophobic molecules such as lipids, steroid hormones and retinoids (1). This biochemical marker appears to be significant in early detection of acute kidney injury, but currently it has not been sufficiently examined in the paediatric population, particularly in newborns

population. Although NGAL can be secreted by different types of cells, some research data indicate its high diagnostic sensitivity and specificity in acute kidney injury. Numerous studies emphasise its predictive, diagnostic and prognostic benefits in acute kidney injury (2-8). To date, research on urine NGAL in newborn population has included certain conditions and illnesses such as asphyxia and sepsis, which might cause acute kidney injury. In most research, reference groups consisted

of a small number of healthy newborns (9-12). There is not enough data about NGAL concentration in healthy infants, including both serum and urine NGAL, which challenges the probability of correct interpretation in different pathological conditions. Thus, the aim of the study was to determine the concentration of urine NGAL (uNGAL) in healthy term newborns, as well as to determine if there was a difference between urine NGAL concentration in relation to gender, postnatal age and birth weight. The hypothesis was that uNGAL concentration does not depend on gender, postnatal age and birth weight.

Materials and methods

Subjects

The present study was prospective and included 81 healthy newborn (newborns girls, N = 31 and newborn boys, N = 50) born at University Hospital Mostar, Bosnia and Herzegovina, from April to October 2019. The study was approved by the Ethics Committee of the University Clinical Hospital Mostar (Ethical approving number 2272/12 at UCHM) in adherence to the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all parents after explaining the purpose of the study. The newborns included in the study were delivered from full-term pregnancies and inclusion criteria after clinical examination were as follows: gestational age at birth ≥ 37 weeks, Apgar score ≥ 8 in the first minute after birth, C-reactive protein (CRP) < 5 mg/L, normal physical and ultrasound examination (12-14). If routine clinical examination after birth showed the presence of infection, cardiac disease, congenital anomalies and chromosomal disorder, the newborns were excluded from the study.

Methods

The present study used the leftover serum samples that had previously been analysed in routine laboratory tests (mainly bilirubin) required by a neonatologist after the post-delivery examination. The leftover serum was used to determine CRP concentration, which was the including criteria for

the study. Venous blood samples were collected in Micro sample tubes with gel (Sarstedt, Nümbrecht, Germany; volume 1.1 mL) with Micro needles 23 G (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). CRP concentration was determined using a CRP Latex reagent kit (Beckman Coulter, Co. Clare, Ireland) on Beckman Coulter Chemistry Analyser AU680 (Beckman Coulter, Brea, USA), controlled two times a day (ITA Control Serum Level 1, REF. ODC0014; ITA Control Serum Level 2, REF.ODC0015; ITA Control Serum Level 3, REF.ODC0016). Urine samples (3 – 5 mL) were obtained within 72 hours after birth in paediatric urine sterile collector for newborns with a birth weight over 2000 g (B. Braun Medical, Saint-Cloud, France) and centrifuged at 400 RCF over five minutes and stored at $- 80$ °C until analysis. Urine NGAL concentration was quantitatively determined using original manufacturer Architect Urine NGAL reagent kit (REF.1P37, LOT.89159UI00, Abbott, Sligo, Ireland) on Architect plus ci8200 analyser (Abbott, Chicago, USA). The Architect Urine NGAL assay is a two-step immunoassay for the quantitative detection of NGAL in human urine using chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) technology. The Architect urine NGAL assay utilizes a non-competitive, sandwich format with chemiluminescent signal detection. The assay includes a microparticle reagent prepared by covalently attaching an anti-NGAL antibody to paramagnetic particles and a conjugate reagent prepared by labelling a second anti-NGAL antibody with acridinium. Following the immunochemistry steps, the solid phase is washed again and the acridinium label is triggered with peroxide and base to generate the signal (15). The assay was calibrated according to the manufacturer's instructions (Architect Urine NGAL Calibrators, Abbott, Ireland REF.1P37-01, LOT.86303UI00, 0.0 ng/mL, 10.0 ng/mL, 100.0 ng/mL, 500.0 ng/mL, 1000.0 ng/mL, 1500.0 ng/mL) and checked by using commercial controls (Architect Urine NGAL Controls, Abbott, Ireland, REF.1P37-10, LOT.90414UI00, Low Control 20.0 ng/mL, Medium Control 200.0 ng/mL, High Control 1200.0 ng/mL). According to Architect Urine NGAL manufacturer's study, which was based on Laboratory Standards Institute (CLSI) EP15-A2 guidance, CV was $\leq 6.7\%$.

TABLE 1. General characteristics of healthy newborns

Characteristic	F (N = 31)	M (N = 50)	P value*
Gestation age (weeks)	39.4 (37.0-41.1)	39.6 (37.0-41.4)	0.872
Birth weight (g)	3350 (2950-3600)	3525 (3250-3800)	0.056
Birth length (cm)	54 (53-56)	55 (53-56)	0.134
Apgar score (1 min)	10 (10-10)	10 (10-10)	0.741

Data are presented as the median and interquartile range, except for gestation age that is presented as median and minimum – maximum. *Mann-Whitney U-test. F – newborn girls. M – newborn boys. P < 0.05 was considered statistically significant.

Statistical analysis

Data analysis was performed using Statistica 12.0. software (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Non-parametric tests were used because the obtained data were not normally distributed (Shapiro Wilk test). Measurement data were indicated as median and interquartile range (from first (Q1) to the third quartile (Q3)), except for gestation age that is presented as median and minimum – maximum. To compare two groups, Mann-Whitney U-test was used. Kruskal-Wallis test was used to compare more groups. P values < 0.05 were considered statistically significant.

Results

The study comprised 81 healthy term neonates, newborn girls (subgroup F) and newborn boys (subgroup M). The respective median gestational ages were 39 (37-41) weeks in females, and 40 (37-41) weeks in males. Median values with an interquartile range along with general characteristics of healthy newborns (birth weight, birth length and Apgar score) differentiated by gender are shown in Table 1. No parameter was shown to be statistically significantly different between genders, although we observed an almost significant difference regarding birth weight (P = 0.056). Median uNGAL concentration in the whole study group was 27.1 ng/mL (16.5-56.0 ng/mL). The values did not differ between genders (P = 0.941), in relation to postnatal age (P = 0.863) nor in relation to birth weight (P = 0.455) (Table 2).

TABLE 2. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (uNGAL) concentration of healthy newborns

Parameter	uNGAL (ng/mL)	P
Total group (N = 81)	27.1 (16.5-56.0)	/
Gender		
F (N = 31)	27.1 (15.8-47.9)	0.941*
M (N = 50)	27.9 (16.5-61.0)	
Postnatal age		
1st day (N = 20)	28.2 (11.7-57.2)	0.863 [†]
2nd day (N = 51)	28.9 (16.5-64.2)	
3rd day (N = 10)	23.9 (20.2-46.6)	
Birth weight		
< 3500 g (N = 41)	25.0 (16.5-45.4)	0.455*
≥ 3500 g (N = 40)	30.6 (16.5-64.2)	

Data are presented as the median and interquartile range. *Mann-Whitney U-test. [†]Kruskal-Wallis test. P<0.05 was considered statistically significant.

Discussion

The study demonstrated that there was no significant difference in uNGAL concentration in relation to gender, postnatal age and birth weight, which supports the hypothesis mentioned beforehand. There have been several studies that included uNGAL concentration measurement in a healthy newborn population. One of these studies, done by Chen *et al.*, included measurement of uNGAL in 38 term newborns when they were three days old. The median concentration of uNGAL was 88.1 ng/

mL (16). The uNGAL values were higher than in our study. Another study by Sarafidis *et al.* was carried out on 22 term infants on their first and third day of life. Median urine NGAL concentration on the first day of a newborn's life was 6.8 ng/mL, while this concentration was 7.1 ng/mL on the third day (17). Abdelhady *et al.* carried out a research on a control group of 20 newborns and results showed the median uNGAL concentration of 9 ng/mL (18). The only research carried out on a higher number of subjects was conducted by Kamianowska *et al.* (19). This research included 88 term-neonates with median uNGAL concentration of 16.74 ng/mL. In contrast to our study, their study proved that uNGAL concentration is significantly higher in female newborns. The median concentration of uNGAL was 24.16 ng/mL for female neonates and 13.30 ng/mL for male neonates, $P < 0.01$. The uNGAL values in these studies were lower than those obtained by us (17-19). The reasons for the reported differences may result from different measurement methods, different manufacture reagents and antibodies. Study by Krzeminska *et al.* on 30 healthy adults demonstrated that uNGAL concentration obtained by CMIA (Abbott) method was significantly higher than ELISA (R&D Systems) (20). It is highly important to note that the concentrations in the present study were measured using a fully standardized and automated CMIA method, as opposed to most above-mentioned studies using ELISA method from different manufacturers (16-19). Similar results to the present study were published by Cangemi *et al.* on 25 newborns and the median concentration of uNGAL was 30.3 ng/mL (CMIA method, Abbott). Also in their study, there wasn't a significant difference regarding uNGAL value associated with gender (21). Early research, which examined a possible correlation between uNGAL, birth weight and postnatal age had obtained conflicting results. Two separate studies, done by Suchojad *et al.* and Lavery *et al.*, showed a negative correlation between uNGAL and birth weight (22,23). On the contrary, our results are in concordance with Elmas *et al.* that showed no differences in uNGAL concentrations in regard to birth weight (24). The study Seaidi *et al.* showed

that postnatal age is associated with uNGAL concentration (25). On the other hand, our results agree with Lavery *et al.* study that showed no differences in uNGAL concentration regarding postnatal age (23). There is a relatively small number of studies that deal with uNGAL concentration measurement in healthy children, especially in newborns within the first days of life. Moreover, other published papers addressing uNGAL concentration measurement include small groups of subjects or children of different ages. Based on the literature review, the present study is the first one that used automated CMIA method for measurement of urine NGAL concentration over 80 healthy term neonates. The big advantage of CMIA method is the shorter time of measurement of uNGAL (in our case about 35 minutes) which is highly important for routine clinical use, and is less demanding in technical manner. Our findings pointed towards a usable reference range limits for uNGAL among the newborn population. However, similar to all previous studies, our study had the same potential limitation - we did not use uNGAL/creatinine ratio. Our rationale was that at this early stage of life creatinine excretion is not constant and therefore cannot be used to improve the variability of the results due to urine concentration. In conclusion, since it was carried out in healthy newborns, as expected, the present study showed no significant difference in concentration of uNGAL in relation to gender, postnatal age and birth weight of newborns. Future studies should include a higher number of neonates utilizing the same standardized method in order to precisely determine NGAL reference interval for neonate population and thus contribute to the possibility of early acute kidney injury recognition in the first days of life.

Acknowledgments

The authors wish to thank all neonatal nurses and laboratory technicians for their assistance in collecting samples.

Potential conflict of interest

None declared.

References

1. Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:2534–43. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000088027.54400.C6>
2. Mori K, Nakao K. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. *Kidney International*. 2007;71:967–70. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002165>
3. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet*. 2005;365:1231–8. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)74811-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)74811-X)
4. Wagener G, Jan M, Kim M, Mori K, Barasch JM, Sladen RN, Lee TH. Association between increases in urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute renal dysfunction after adult cardiac surgery. *Anesthesiology*. 2006;105:485–91. <https://doi.org/10.1097/0000542-200609000-00011>
5. Nickolas TL, O'Rourke MJ, Yang J, Sise ME, Canetta PA, Barasch N, et al. Sensitivity and specificity of a single emergency department measurement of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin for diagnosing acute kidney injury. *Ann Intern Med*. 2008;148:810–9. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-148-11-200806030-00003>
6. Bennett M, Dent C, Ma Q, Dastrala S, Grenier F, Workman F, et al. Urine NGAL predicts severity of acute kidney injury after cardiac surgery: a prospective study. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3:665–73. <https://doi.org/10.2215/CJN.04010907>
7. Wheeler DS, Devarajan P, Ma Q, Harmon K, Monaco M, Cvijanovich N, Wong HR. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of acute kidney injury in critically ill children with septic shock. *Crit Care Med*. 2008;36:1297–303. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318169245a>
8. Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Haase-Fielitz A. NGAL Meta analysis Investigator Group. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis*. 2009;54:1012–24. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2009.07.020>
9. Smertka M, Wroblewska J, Suchojad A, Majcherczyk M, Jadamus-Niebroj D, Owsianka-Podlesny T, et al. Serum and urinary NGAL in septic newborns. *BioMed Res Int*. 2014;2014:717318. <https://doi.org/10.1155/2014/717318>
10. Raggal NE, Khafagy SM, Mahmoud NH, Beltagy SE. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of acute kidney injury in asphyxiated neonates. *Indian Pediatr*. 2013;50:459–62. <https://doi.org/10.1007/s13312-013-0153-6>
11. El-Farghali OG, El-Raggal NM, Mahmoud NH, Zaina GA. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a predictor of acute kidney injury in critically ill neonates. *Pak J Biol Sci*. 2012;15:231–7. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2012.231.237>
12. Spong CY. Defining “term” pregnancy: recommendations from the Defining “Term” Pregnancy Workgroup. *JAMA*. 2013;309:2445–6. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.6235>
13. Pregnancy, childbirth, postpartum and newborn care: a guide for essential practice – 3rd ed. World Health Organization 2015.
14. Adeli K, Higgins V, Trajcevski K, White-Al Habeeb N. The Canadian laboratory initiative on pediatric reference intervals: a CALIPER white paper. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2017;54:358–413. <https://doi.org/10.1080/10408363.2017.1379945>
15. Grenier FC, Ali S, Syed H, Workman R, Martens F, Liao M, et al. Evaluation of the ARCHITECT urine NGAL assay: assay performance, specimen handling requirements and biological variability. *Clin Biochem*. 2010;43:615–20. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2009.12.008>
16. Chen CN, Chou CH, Jeng SF, Tsai IJ, Chen PC, Chen CY, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels in neonates. *Pediatr Neonatol*. 2016;57:207–12. <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2015.09.003>
17. Sarafidis K, Tsepkentzi E, Agakidou E, Diamanti E, Taparkou A, Soubasi V, et al. Serum and urine acute kidney injury biomarkers in asphyxiated neonates. *Pediatr Nephrol*. 2012;27:1575–82. <https://doi.org/10.1007/s00467-012-2162-4>
18. Abdelhady S, Abdel Gawad ER, Abdel Haie OM, Mansour AI. Usefulness of serum and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in detecting acute kidney injury in asphyxiated neonates. *Int J Med Health Sci*. 2016;5:230–6.
19. Kamianowska M, Wasilewska A, Szczepanski M, Kulikowska E, Bebko B, Koput A. Health term-born girls had higher levels of urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin than boys during the first postnatal days. *Acta Paediatr*. 2016;105:1105–8. <https://doi.org/10.1111/apa.13508>
20. Krzeminska E, Wyczalkowska-Tomasik A, Korytowska N, Paczek L. Comparison of Two Methods for Determination of NGAL Levels in Urine: ELISA and CMIA. *J Clin Lab Anal*. 2016;30:956–60. <https://doi.org/10.1002/jcla.21962>
21. Cangemi G, Storti S, Cantinotti M, Fortunato A, Emdin M, Bruschetti M, et al. Reference values for urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in pediatric age measured with a fully automated chemiluminescent platform. *Clin Chem Lab Med*. 2013;51:1101–5. <https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0540>
22. Suchojad A, Tarko A., Smertka M, Majcherczyk M, Brzozowska A, Wroblewska J, Maruniak-Chudek I. Factors limiting usefulness of serum and urinary NGAL as a marker of acute kidney injury in preterm newborns. *Renal Failure*. 2015;37:439–45. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2014.996109>
23. Lavery AP, Meinen-Derr JK, Anderson E, Ma Q, Bennett MR, Devarajan P, et al. Urinary NGAL in premature infants. *Pediatr Res*. 2008;64:423–8. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e318181b3b2>
24. Elmas AT, Tabel Y, Ipek S. Determination of reference values for urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in premature infants. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2014;27:187–91. <https://doi.org/10.3109/14767058.2013.806900>
25. Saeidi B, Koralkar R, Griffin RL, Halloran B, Ambalavanan N, Askenazi DJ. Impact of gestational age, sex and postnatal age on urine biomarkers in premature neonates. *Pediatric Nephrol*. 2015;30:2037–44. <https://doi.org/10.1007/s00467-015-3129-z>

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

DIJAGNOSTIČKA VRIJEDNOST NGAL I HEPCIDINA U RANOM OTKRIVANJU BUBREŽNOG OŠTEĆENJA U NOVOROĐENČADI

VINKA MIKULIĆ

Nedostatak specifičnoga ranog biokemijskog biljega velik je problem u dijagnostici i liječenju bubrežnih oštećenja, u prvom redu akutnoga bubrežnog oštećenja (ABO) novorođenčadi. Laboratorijska dijagnostika bubrežnih oštećenja još uvijek se dobrim dijelom oslanja na promjene koncentracije kreatinina u serumu. Međutim, kreatinin kao biljeg oštećenja bubrega ima brojne nedostatke, od kojih je najveći nedovoljna dijagnostička osjetljivost. Posljedica je toga kasna dijagnoza, a samim time i ograničena rana terapijska intervencija. Stoga se kontinuirano istražuju rani biokemijski biljezi koji bi bili od pomoći u ranom otkrivanju i prevenciji bubrežnih oštećenja.

U ovom istraživanju izmjerene su koncentracije urinskih biljega hepcidina i lipokalina povezanog s neutrofilnom gelatinazom (NGAL, engl. *neutrophil gelatinase associated lipocalin*) te su uspoređene s biljezima općeg statusa bubrežne funkcije koji su trenutačno u upotrebi (kreatinin, cistatin C, eGFR). Radi što boljeg razumijevanja dijagnostičke točnosti izabranih biljega bubrežne funkcije ispitanici su bili podijeljeni u tri skupine: terminski zdrava novorođenčad (N-Z, N = 120), novorođenčad s akutnim bubrežnim oštećenjem (N-ABO, N = 20) te skupina s drugim bubrežnim oštećenjima i bolestima (N-DBB, N = 23). U svrhu ovog istraživanja koristila se isključivo ostatna količina seruma preostala nakon provedenih rutinskih laboratorijskih pretraga, a uzorci urina uzeti su unutar 72 sata nakon rođenja.

Rezultati ovog istraživanja utvrdili su veće koncentracije urinskih biljega NGAL-a i hepcidina u novorođenčadi s ABO u odnosu na zdravu novorođenčad. Koncentracije NGAL-a u pacijenata s drugim bubrežnim bolestima statistički su značajno veće u odnosu na zdravu novorođenčad, dok kod hepcidina nije opažen bitan porast koncentracije. Novorođenčad s ABO imala je statistički manje vrijednosti eGFR-a u odnosu na zdravu novorođenčad primjenom svih triju prediktivnih jednadžbi. Korištenjem cistatin C jednadžbe i CKID jednadžbe utvrđena je statistički značajna razlika u vrijednostima eGFR-a između skupine s N-ABO i N-DBB. U procjeni dijagnostičke točnosti za novorođenčad u skupini N-ABO, u ovom se istraživanju NGAL pokazao najboljim izborom uz vrlo uvjerljive rezultate temeljene na ROC analizi. Dobivena je visoka vrijednost područja ispod krivulje koja je pri graničnoj vrijednosti 67,3 ng/mL iznosila 0,987, uz osjetljivost 97 % i specifičnost od 93,6 %. S druge strane, AUC vrijednost za hepcidin iznosila je 0,855, gdje granična vrijednost od 52,1 ng/mL ostvaruje jako dobru osjetljivost od 81 %, ali znatno slabiju dijagnostičku specifičnost 70 %. Na temelju rezultata ovog istraživanja u novorođenčadi s ABO rani porast koncentracije urinskih biljega te mogućnost brzoga, jednostavnog, standardiziranog i automatiziranog mjerenja, u prvom redu NGAL-a, može doprinijeti realnom uključenju ovoga neinvazivnog biljega u svakodnevnu kliničku praksu.

Rad je pohranjen u Centralnoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži: 132 stranice, 12 slika, 23 tablice i 269 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: lipokalin povezan s neutrofilnom gelatinazom (NGAL), hepcidin, cistatin C, procjena glomerularne filtracije (eGFR), bubrežno oštećenje

Mentori: prof. dr. sc. Dunja Rogić
izv. prof. dr. sc. Ivanka Mikulić

Povjerenstvo:

Rad je prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Doctoral thesis

DIAGNOSTIC MEANING OF NGAL AND HEPCIDIN IN EARLY DETECTION OF RENAL DAMAGE IN NEWBORNS

VINKA MIKULIĆ

The lack of specific early biochemical markers is a major problem in the diagnosis and treatment of kidney damage, especially acute kidney injury (AKI) in neonates. Laboratory diagnostics of kidney damage still largely rely on changes in serum creatinine concentration. However, creatinine as a marker of kidney damage has numerous drawbacks, the biggest of which is inadequate diagnostic sensitivity. As a result, there is delayed diagnosis and hence limited early therapeutic intervention. Therefore, early biochemical markers that could aid in early detection and prevention of kidney damage are continuously being researched.

In this study, the concentrations of urinary biomarkers hepcidin and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) were measured and compared with commonly used markers of general kidney function (creatinine, cystatin C, eGFR). To better understand the diagnostic accuracy of the selected kidney function markers, participants were divided into three groups: term healthy neonates (N-H, N = 120), neonates with acute kidney injury (N-AKI, N = 20), and a group with other kidney injuries and diseases (N-OKD, N = 23). Only the remaining serum samples after routine laboratory tests were used for this study, and urine samples were collected within 72 hours after birth.

The results of this study showed higher concentrations of urinary biomarkers NGAL and hepcidin in neonates with AKI compared to healthy neonates. NGAL concentrations in patients with other kidney diseases were significantly higher compared to healthy neonates, while no significant increase in hepcidin concentration was observed. Neonates with AKI had statistically lower eGFR values compared to healthy neonates using all three predictive equations. Using the cystatin C equation and CKID equation, a statistically significant difference in eGFR values was found between the N-AKI and N-OKD groups. In the assessment of diagnostic accuracy for newborns in the N-AKI group, this study showed that urinary NGAL was the best choice with very convincing results based on ROC analysis. The obtained high area under the curve value was 0,987 at a cutoff value of 67,3 ng/mL, with a sensitivity of 97% and specificity of 93,6%. On the other hand, the AUC value for hepcidin was 0,855, with a cutoff value of 52,1 ng/mL achieving good sensitivity of 81%, but significantly lower diagnostic specificity of 70%. Based on the results of this study, the early rise in urinary biomarker concentrations in newborns with AKI and the possibility of fast, simple, standardized, and automated measurement, primarily of NGAL, can contribute to the real inclusion of this non-invasive biomarker in everyday clinical practice.

Thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 132 pages, 12 figures, 23 tables and 269 references. Original is in Croatian language.

Keywords: neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), hepcidin, cystatin C, estimated glomerular filtration rate (eGFR), renal damage

Supervisors: Professor Dunja Rogić, Ph.D.
Associate Professor Ivanka Mikulić, Ph.D.

Reviewers:

Accepted:.