

Tip 2 DM'de Düşük Molekül Ağırlıklı Serum Proteinleri ve Kreatinin Klirensi İle İlişkisi

Low Molecular Weight Proteins and Their Relation with Creatinine Clearance in Type 2 DM

Asuman Orçun* Nazan Tunçbilek* İnci Küçükercan*
Gülcan Baloğlu* Mehmet Sargın**

Kartal Dr. Lütfi Kırdar Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul
*Biyokimya Bölümü, **Endokrinoloji/Diyabet Bölümü

ÖZET

Amaç: Glomerüler filtrasyon hızının (GFR) tahmininde, serum Sistatin C (sSC), β -2 Mikroglobulin (s β Mg) ve Retinol Bağlayıcı Protein (sRBP) gibi düşük molekül ağırlıklı proteinlerin kullanımı önerilmektedir. Bu çalışmada tip 2 diyabetik hastalarda, bu proteinlerin serum düzeylerini tayin etmek ve kreatinin klirensi ile ilişkilerini değerlendirdik.

Gereç ve Yöntem: Yaş ortalaması 57.7±10.6 yıl olan, 62 kadın (%53) 54 erkek (%47), 116 tip 2 diyabetik hasta ile yaş ve cins eşli, yaş ortalaması 55.8±8.6 yıl olan, 17 kadın (%55) 14 erkek (%45), 31 sağlıklı kontrol olgusu çalışmaya dahil edildi. Olguların serum sSC, s β Mg, sRBP ile serum kreatinin (sKre) ve idrar kreatinin düzeyleri çalışıldı.

Bulgular: Kontrol grubunda sSC, s β Mg, sRBP ve sKre düzeyleri sırasıyla (Ort±SD) 0.84±0.16mg/L, 1.74±0.28 mg/L, 0.038±0.012 g/L, 0.77±0.12 mg/dL olarak bulundu. Diyabetik grupta sSC, s β Mg, sRBP ve sKre düzeyleri sırasıyla 1.15 ±0.42 mg/L (p<0.001), 2.07±0.98 mg/L (p=0.003), 0.044±0.013 g/L (p=0.015), 0.89±0.34 mg/dL (p=0.003) idi. Diyabetik grup (94.9±37.3, ort±SD, mL/dak/1.73 m²) ile kontrol grubu (106.5±27.1, ort±SD, mL/dak/1.73 m²) arasında kreatinin klirensleri (KKli) istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermedi (p=0.11). Diyabetik grup KKli'lerine göre 1. grup klirens>80, n=71; 2. grup 79>klirens>50, n=31; 3. grup klirens<49 mL/dak/1.73 m², n=14 olarak altgruplandı. Bu 3 grubun sSC (p=0.002), s β Mg (p<0.001) ve sKre (p<0.001) düzeyleri arasında anlamlı farklılık bulundu, sRBP için fark bulunmadı (p=0.643). Yalnız 1. ve 2. grup arasında sSC anlamlı farklılık gösterdi (post-hoc p=0.036).

Sonuç: Çalışmamızda sSC, s β Mg ve sRBP düzeyleri diyabetiklerde kontrol grubuna göre belirgin artış gösterdi. sSC ve s β Mg serum düzeyleri hastaların GFR'leri azaldıkça göreceli olarak arttı, yalnızca 1. grup (klirensi normal) ve 2. grup (klirensi hafif azalmış) diyabetiklerde sSC anlamlı farklılık gösterdi.

Anahtar Sözcükler: Sistatin C, β -2 Mikroglobulin, Retinol Bağlayıcı Protein, Tip 2 Diyabet

ABSTRACT

Objective: Low molecular weight proteins serum Cystatin C (sSC), β -2 Microglobulin (s β Mg), Retinol Binding Protein (sRBP) have been proposed for estimation of Glomerular Filtration Rate (GFR). This study is designed to see how these proteins change with alterations of GFR in type2 diabetic patients

Methods: 116 type 2 diabetic patients, 62 females (%53) and 54 males (%47), with a mean age of 57.7 ± 10.6 years, age and gender matched 31 healthy controls, 17 females (%55) and 14 males (%45), mean age 55.8 ± 8.6 years were included in the study. sSC, s β Mg, sRBP, serum creatinine (sCre) and urine creatinine levels were determined.

Results: sSC, s β Mg, sRBP and sCre levels were found as 0.84 ± 0.16 mg/L, 1.74 ± 0.28 mg/L 0.038 ± 0.012 g/L, 0.77 ± 0.12 mg/dL respectively. Diabetic groups' values for these proteins were 1.15 ± 0.42 mg/L for sSC ($p < 0.001$), 2.07 ± 0.98 mg/L for s β Mg ($p = 0.003$), 0.044 ± 0.013 g/L for sRBP ($p = 0.015$) and 0.89 ± 0.34 mg/dL for sCre ($p = 0.003$) and were significantly higher. Creatinine clearances (CCr) of controls (106.5 ± 27.1 , mean \pm SD, mL/min/1.73 m²) and diabetics (94.9 ± 37.3 , mean \pm SD, mL/min/1.73 m²) did not show statistically significant difference ($p = 0.11$). When diabetic group was subdivided according to their CCr's (1. group CCr > 80, n=71; 2. group $79 > \text{CCr} > 50$, n=31; and 3. group CCr < 49 mL/min/1.73 m², n=14) we found significant differences in mean concentrations of sSC ($p = 0.002$), s β Mg ($p < 0.001$), and sCre ($p < 0.001$), but not in sRBP ($p = 0.643$). Only sSC differed significantly between Groups 1 and 2 (post-hoc $p = 0.036$).

Conclusion: sSC, s β Mg ve sRBP were markedly increased in diabetics. Serum levels of sSC and s β Mg increased gradually, as GFRs declined. Only sSC levels showed significant difference between diabetics with normal and slightly reduced clearances.

Key Words: Cystatin C, β -2 Microglobulin, Retinol Binding Protein, Type 2 Diabetes

GİRİŞ

GFR renal fonksiyonun yararlı bir göstergesidir, ancak tayini zordur. İnulin klirensi GFR için halen altın standarttır ancak pahalı ve uygulaması güç bir tekniktir (1,2). Klinik uygulamada GFR tahmininde en yaygın kullanılan yöntem serum ve idrar kreatinini ile hesaplanan kreatinin klirensidir. Kreatinin düzeyi kişinin kas kitle miktarı ile değişir, aynı zamanda tubuler ve gastrointestinal sekresyona uğrar ve ölçüm yöntemleri ile ilgili analitik sorunlar ile ilaç interferansları da tanımlanmıştır (3). Diyabetik nefropati son dönem böbrek hastalığının en sık nedenidir. Potansiyel nefropatik diyabetiklerin böbrek fonksiyonlarının takibi hayati önem taşır. Renal yetmezlikte azalmış filtrasyon, yetersiz tubuler geri emilim ve azalmış renal katabolizma nedeniyle, düşük molekül ağırlıklı (MA < 50 000) proteinlerin serum konsantrasyonları artabilir ve bu artış renal hasarın derecesi ile ilgili bilgi verebilir (4,5). Bu çalışmada tip 2 diyabetik hastalarda düşük molekül ağırlıklı proteinlerin serum konsan-

trasyonlarını tayin ettik ve bu proteinlerin hastaların kreatinin klirensleri ile ilişkisini değerlendirdik.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kurulum: WHO kriterlerine göre diyabet tanısı almış ve hastanemiz Endokrinoloji/Diyabet Ünitesi tarafından takip edilmekte olan hastalardan, Haziran-Temmuz 2004 döneminde poliklinik vizitlerine gelenler çalışmaya dahil edildiler. Üriner sistem enfeksiyonu, akut hastalık ve kalp yetmezliği bulunan olgular çalışmaya alınmadı. Her hastaya rutin biyokimyasal analiz, ultrasonografi, idrar kültürü ve mikroskopik idrar analizi uygulanarak kriterlere uymayanlar dışlandı. Kontrol grubu hastane sağlık kurulundan sağlıklı raporu almış bireylerden oluşturuldu. Çalışmanın tamamı Helsinki Deklarasyonuna uygun olarak düzenlendi.

Hastalar: Çalışmaya yaş ortalaması 57.7 ± 10.6 (35-80) yıl olan, 62 kadın (%53) 54 erkek (%47), 116 tip 2 diyabetik hasta ile yaş ve

cins eşli, yaş ortalaması 55.8 ± 8.6 (39-77) yıl olan, 17 kadın (%55) 14 erkek (%45), 31 sağlıklı kontrol olgusu dahil edildi. Diyabetiklerin Vücut Kitle İndeksleri (VKİ=kg olarak ağırlık / m olarak boy) 32.3 ± 5.6 kg/m², kontrol grubunun VKİ'leri 26.2 ± 4.3 kg/m² idi. Diyabetik grup ortalama hastalık süresi 7.4 ± 8.2 (1-25) yıl idi. Uygulanan tedavi modelleri insülin ve/veya oral antidiyabetik ve/veya diet idi. Hastalar KKli'lerine göre 3 alt gruba ayrıldı; 1. grupta KKli>80 mL/dak/1.73 m² olan 71 hasta ayrıldı ve normal klirensli olarak adlandırıldı. 2. grupta $79 > \text{KKli} > 50$ mL/dak/1.73 m² olan 31 hasta ayrıldı ve hafif azalmış klirensli olarak adlandırıldı. 3. grupta KKli<49 mL/dak/1.73 m² olan 14 hasta ayrıldı ve azalmış klirensli olarak adlandırıldı.

Metodlar: sSC, sβMg ve sRBP Dade Behring Latex partikül nefelometrik immunoassay prensibiyle, Dade Behring BN II nefelometresinde çalışıldı. Bu kitlerde saflaştırılmış insan proteinleri sSC ve sRBP'ye karşı oluşturulmuş tavşan antikoları ile sβMg'ye karşı oluşturulmuş sıçan antikoları kullanılmıştır. Bu 3 protein yönteminin gün-içi ve günler-arası değişim katsayıları (CV) Tablo 1'de verildi. Serum ve idrar kreatininleri Roche Diagnostics'in (Indianapolis, ABD) enzimatik sarkozin oksidaz yöntemiyle aynı üreticiye ait Modüler Sistem otoanalizörde çalışıldı.

Venöz kan örnekleri Beckton Dickinson'ın katıksız vakumlu tüplerine alındı ve 1500 g.

Tablo 1. sSC (mg/L), sβMg (mg/L), sRBP (g/L)'nin 2 farklı konsantrasyonda serum havuzundan çalışılan gün-içi (n=20) ve günler-arası (n=10) değişimleri.

	Gün-içi Değişim			Günler-Arası Değişim		
	Ortalama	SD	CV%	Ortalama	SD	CV%
sSC	0.882	0.016	1.8	0.886	0.051	5.7
	1.265	0.046	3.6	1.248	0.037	3.9
sβMg	1.656	0.029	1.7	1.67	0.088	5.2
	2.44	0.046	1.8	2.442	0.101	4.1
sRBP	0.044	0.0017	3.8	0.040	0.0023	5.7
	0.0681	0.0014	2.0	0.071	0.0025	3.5

de 10 dakika santrifüj edildi. Serumlar analiz gününe kadar -20 °C'de saklandı. 24 saatlik idrar örnekleri laboratuvara getirildikleri gün bekletilmeden çalışıldı. Kreatinin klirensleri (KKli) şu formülle hesaplanıp 1.73 m^2 vücut yüzey alanına göre düzeltildi.

$$\text{KKli (mL/dak/1.73 m}^2) = (\text{idrar hacmi/dak}) \times (\text{idrar kreatinini} / \text{serum kreatinini})$$

İstatistiksel analizler: SPSS paket programının Windows 10.0 versiyonu kullanıldı. Hasta subgrupları Kruskal Wallis nonparametrik ANOVA ile, post hoc karşılaştırmalar Dunnett ve Scheffe analizleri ile hesaplandı. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ düzeyi kullanıldı.

BULGULAR

Kontrol ve diyabetik grupların sonuçları Tablo 2'de görülmektedir. Normal klirensli 71, hafif azalmış klirensli 31 ve azalmış klirensli 14 diyabetik hastanın KKli'leri sırasıyla 115.3 ± 25.2 , 66.6 ± 7.7 ve 33.7 ± 12.36 mL/dak/1.73 m² (ortalama±SD) olarak bulundu. Hastaların KKli'leri azaldıkça, sSC ($p=0.002$), sβMg ($p<0.001$) ve sKre ($p<0.001$) düzeylerinin arttığı, ancak sRBP düzeylerinde 3 grup arasında farklılık olmadığı gözlemlendi ($p=0.643$). Tablo 3'te normal, hafif azalmış ve azalmış klirensli diyabetiklerin sSC, sβMg, sRBP and sKre ortalama±SD değerleri ile istatistiksel değerlendirmesi görülmektedir.

Tablo 2. 31 kontrol olgusu ve 116 diyabetik hastanın ortalama, SD (standart deviasyon), değerleri ile bunların istatistiksel karşılaştırması.

	Kontrol (n=31)		Diyabetik (n=116)		P
	Ortalama	SD	Ortalama	SD	
Yaş (yıl)	55.8	8.6	57.7	10.6	0.394
VKİ (kg/m ²)	26.2	4.3	32.3	5.6	0.024
sKre (mg/dL)	0.77	0.12	0.89	0.34	0.003
sSC (mg/L)	0.84	0.16	1.15	0.42	<0.001
sβMg (mg/L)	1.74	0.28	2.07	0.98	0.003
sRBP (g/L)	0.038	0.012	0.044	0.013	0.015
KKli (mL/min/1.73 m ²)	106.5	27.1	94.9	37.3	0.111

Tablo 3. Normal (n=71), hafif azalmış (n=31) ve azalmış klirensli (n=14) olarak sınıflanan diyabetik hastaların sSC, sβMg, sRBP ve sKre için ortalama, SD değerleri ve bu 3 grup değerlerinin birbirinden farkının istatistiksel önemi(ANOVA p) ile normal ve hafif azalmış klirensli grupların (G1XG2) posthoc karşılaştırması sonucu bulunan önem derecesi (posthoc p).

	G	Ortalama	SD	P (ANOVA)	Post-hoc p (G1 X G2)
sSC (mg/L)	1	1.07	0.34	0.002	0.036
	2	1.29	0.44		
	3	1.49	0.57		
sβMg (mg/L)	1	1.85	0.75	<0.001	0.061
	2	2.32	0.76		
	3	3.09	1.54		
sRBP (g/L)	1	0.044	0.012	0.643	0.971
	2	0.044	0.014		
	3	0.047	0.014		
sKre (mg/dL)	1	0.80	0.22	<0.001	0.097
	2	0.98	0.31		
	3	1.13	0.59		
KKli (mL/dak. 1.73 m ²)	1	115.3	25.20		
	2	66.6	7.70		
	3	33.7	12.36		

Not: GRUP (G) 1 (n=71): KKli ≥80 mL/dak/1.73m² olan diyabetikler.

GRUP (G) 2 (n=31): 79>KKli ≥50 mL/dak. 1.73 m² olan diyabetikler.

GRUP (G) 3 (n=14): KKli<49 mL/dak.1.73 m² olan diyabetikler

TARTIŞMA

Çelişen bir kaç çalışmaya rağmen (6-8), düşük molekül ağırlıklı proteinler, özellikle sSC, pek çok çalışmada farklı etyolojiye bağlı renal hastalıklarda GFR'nin güvenilir belirteçleri olarak tanımlanmış ve glomeruler disfonksiyon göstergesi olarak serum kreatinine üstünlük sağladıkları söylenmiştir (9-13). Vikas ve ark. 2002'de yaptıkları meta analizde sSC'nin sKre'e hem korelasyon katsayısı ve hem de Receiver Operator Characteristics (ROC) analizinde Area Under Curve (AUC) karşılaştırmasında üstünlüğünü gösterdiler (14). Potansiyel nefropatik diyabetiklerin takibinde de GFR önem taşır ancak diyabetiklerde GFR değişimi özellik gösterir; öncelikle bir hiperfiltrasyon dönemini takiben

hipofiltrasyon gelişir. Bu nedenle diyabetik GFR değerleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında değişiklik göstermeyebilir (9,15). Bizim kontrol grubunun KKli ortalaması 106.5 iken diyabetik grubunki 94.9 mL/dak/1.73 m² idi ve aradaki fark anlamlı değildi (p=0.11). Kontrol grubumuzun (ortalama -1 SD) değeri olan 80 mL/dak/1.73 m²'yi cut-off olarak aldık ve alt grup oluşturduk. Diyabetiklerde az sayıda çalışma yapılmış ve düşük molekül ağırlıklı proteinlerinde artışlar gösterilmiştir. Mussapet ve ark. 52 tip 2 diyabetik hasta ile çalıştılar ve hastaları GFR'lerine göre 80 mL/dak/1.73 m²'yi cut-off alarak 2 gruba ayırdılar ve bu grupların sSC ve sKre medyanlarını karşılaştırdılar. Çalışmalarında sSC'nin sKre'e göre daha fazla artış gösterdiğini gözlediler. Bu çalışmada azalmış GFR'li diyabetiklerin oldukça geniş bir krom-etilen diamintetra asetik asit klirens aralığı vardı (16-80 mL/dak/1.73 m²) ve bu grupta sSC değerleri normal GFR'li diyabetiklere göre belirgin artmış bulundu (15). Ancak GFR'si azalmış diyabetikler de kendi aralarında göreceli olarak düşük GFR'li alt gruplara ayrılabilirler durum ne olurdu? Biz çalışmamızda azalmış klirensli hasta grubunu da , kontrol grubu ortalamamızın -1SD ve -2SD değerlerini cut-off kullanarak, hafif azalmış ve azalmış klirensli olarak adlandırdığımız 2 düzey oluşturduk. Özellikle hafif azalmış klirensli (50-79 mL/dak/1.73 m²) grup değerlerin irdelemeye çalıştık. 3 grup birlikte karşılaştırıldığında, parametrelerin hepsinde azalan klirens değerleri ile anlamlı artışlar bulunmasına rağmen, post-hoc karşılaştırmalarda yalnız sSC normal ve hafif azalmış klirensli diyabetik grupta anlamlı değişiklik gösterdi. Randers ve ark. değişik tanımlar almış 46 böbrek hastasında sSC çalıştılar ve hastaları teknetyum-dietilen triamino penta asetik asit klirenslerine göre 3 alt gruba ayırdılar (16). sSC'lerin gitgide azalan GFR düzeyleriyle paralel artış gösterdiğini gözlediler. Bu çalışmada alt grupların ikili karşılaştırması yapılmamıştır. Aynı çalışmada 250 kan donöründe referans aralık çalışması yapılmış ve 0.51-1.02 mg/L'lik bir non-parametrik aralık tanımlan-

mıştır (medyan 0.79; min-max 0.33-1.07). Bu düzey bizim kontrol grup sSC referans aralığıyla (0.81±0.16 mg/L; ort±SD) örtüşmektedir. Bizim verilerimiz normal dağılım gösterdiğinden parametrik olarak ifade ettik. Yine aynı çalışmada sSC'nin, sKre'e tanısız üstünlük sağlamasına rağmen ölçülen ve hesaplanan Kkli'ten daha etkin bir belirteç olmadığı sonucuna varılmıştır. Bir başka çalışmada Chantrel ve ark. (8) altın standart olan inulin klirensini kullandılar ve sSC'nin ne sKre ne de Kkli'ne, renal yetmezlik takibinde avantaj sağlamadığını söylediler. Kkli için literatürde çelişen görüşler mevcuttur ancak 24 saatlik idrar toplama işlemi dikkatli yapılırsa Kkli'nin GFR'yi iyi tanımladığı söylenmektedir. Biz çalışmamızda bir altın standart yerine Kkli kullanmakla yetindik çünkü amacımız GFR tahmininden çok hastaları böbrek fonksiyonlarına göre sınıflamaktır.

Sonuç olarak, iyi tanımlanmış cut-off'larla, düşük molekül ağırlıklı proteinler özellikle sSC- diabetik nefropatinin takibinde, GFR'nin henüz azaldığı erken dönemlerde, kullanılabilir görünmektedir.

KAYNAKLAR

1. Lavender S, Hilton PJ, Jones NF. The measurement of glomerular filtration rate in renal disease. *Lancet* 1969; 2(7632): 1216-9.
2. Renkin EM, Robinson RR. Glomerular filtration. *N Engl J Med* 1974; 290(14): 785-9.
3. Perrone RD, Madias NE, Levey AS. Serum creatinine as an index of renal function: New insights into old concepts. *Clin Chem* 1992; 38(10): 1933-53.
4. Tencer J, Frick IM, Oqvist B, Alm P, Rippe B. Size selectivity of the glomerular barrier to high molecular weight proteins. The upper size limitations of the shunt pathways. *Kidney Int* 1998; 53(3): 709-15.
5. Guasch A, Deen WM, Myers BD. Charge selectivity of the glomerular filtration barrier in healthy and nephrotic humans. *J Clin Invest* 1993; 92(5): 2274-82.
6. Donadio C, Lucchesi A, Ardini M, Giordani R. Cystatin C, beta 2-microglobulin and retinol binding protein as indicators of glomerular filtration rate: Comparison with plasma creatinine. *J Pharm Biomed Anal* 2001; 24(5-6): 835-42.
7. Oddoze C, Morange S, Portugal H, Berland Y, Dussol B. Cystatin C is not more sensitive than creatinine for detecting early renal impairment in patients with diabetes. *Am J Kidney Dis* 2001; 38(2): 310-6.
8. Chantrel F, Agin A, Offner M, Koehl C, Moulin B, Hannedouche T. Comparison of Cystatin C versus creatinine for detection of mild renal failure. *Clin Nephrol* 2000; 54(5): 374-81.
9. Harmoinen AP, Kouri TT, Wirta OR, Lehtimäki TJ, Rantalaiho V, Turjanmaa VM. Evaluation of plasma Cystatin C as a marker of glomerular filtration rate with type 2 diabetes. *Clin Nephrol* 1999; 52(6): 363-70.
10. Plebani M, Dall'Amico R, Musap M, Montini G, Ruzzante N, Marsilio R, et al. Is serum Cystatin C a sensitive marker of glomerular filtration rate (GFR)? A preliminary study on renal transplant patients. *Ren Fail* 1998; 20(2): 303-9.
11. Priem F, Althaus H, Jung K, Sinha P. Beta trace protein is not better than cystatin C as an indicator of reduced glomerular filtration rate. *Clin Chem* 2001; 47(12): 2181.
12. Trollfors B, Norrby R. Estimation of glomerular filtration rate by serum creatinine and serum beta 2-microglobulin. *Nephron* 1981; 28(4): 196-9.
13. Ayatse JO, Kwan JT. Relative sensitivity of serum and urinary retinol binding protein and alpha-1 microglobulin in the assessment of renal function. *Ann Clin Biochem* 1991; 28: 514-6.
14. Dhamidharka 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(2): 221-6.
15. Mussap M, Vestra MD, Fioretto P, Saller A, Varagnolo M, Nosadini R, et al. Cystatin C is a more sensitive marker than creatinine for the estimation of GFR in type 2 diabetic patients. *Kidney Int* 2002; 61(4): 1453-61.
16. Randers E, Erlandsen EJ, Pedersen OL, Hasling C, Danielsen H et al. Serum cystatin C as an endogenous parameter of the renal function in patients with normal to moderately impaired kidney function. *Clin Nephrol* 2000; 54(3): 203-9.

Yazışma adresi:

Dr. Asuman Orçun
Orhangazi Mah. Mimoza Sok. No: 7/5
Dragos, Kartal, İstanbul
Tel: 0.216 441 39 00/ 1160
GSM: 532 457 55 50
E-posta: asumanorcun@mynet.com
Tele/Faks: 0.216 459 86 45