Značaj izražaja dendrina, čimbenika rasta vezivnog tkiva (CTGF) i c-Myb kao ranih pokazatelja kronične bubrežne bolesti u primarnim glomerulopatijama : kohortna studija

Mizdrak, Maja

Doctoral thesis / Disertacija

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:104947

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

Maja Mizdrak

Značaj izražaja dendrina, čimbenika rasta vezivnog tkiva (CTGF) i c-Myb kao ranih pokazatelja kronične bubrežne bolesti u primarnim glomerulopatijama - kohortna studija

Doktorski rad

Akademska godina: 2019./2020.

Mentor:

Prof. prim. dr. sc. Merica Glavina Durdov, dr. med.

U Splitu, svibanj 2020.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

Maja Mizdrak

Značaj izražaja dendrina, čimbenika rasta vezivnog tkiva (CTGF) i c-Myb kao ranih pokazatelja kronične bubrežne bolesti u primarnim glomerulopatijama - kohortna studija

Doktorski rad

Akademska godina: 2019./2020.

Mentor:

Prof. prim. dr. sc. Merica Glavina Durdov, dr. med.

U Splitu, svibanj 2020.

Rad je izrađen na Zavodu za patologiju, citologiju i sudsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Split i na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Split.

Mentor rada: prof. prim. dr.sc. Merica Glavina Durdov, dr. med., spec. patologije

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Merici Glavina Durdov na nesebičnoj pomoći, edukaciji, usmjeravanju, savjetima i svom vremenu koje je odvojila za mene.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Katarini Vukojević i prof. dr. sc. Nataliji Filipović na savjetima, odvojenom vremenu i pomoći kod izvođenja istraživanja.

Zahvaljujem se svojoj obitelji na podršci, motiviranju i pomoći.

SADRŽAJ

1.	**UVOD……**	4
1.1.	Kronična bubrežna bolest	4
1.1.1.	Procjena bubrežne funkcije	5
1.1.2.	Patogeneza kronične bubrežne bolesti.....	6
1.1.2.1.	Epitelijalno - mezenhimalna pretvorba.....	7
1.1.2.2.	Fibroza bubrega.....	8
1.1.2.3.	Podociti.....	10
1.2.	Klasifikacija glomerularnih bolesti.....	11
1.2.1	IgA nefropatija.....	12
1.2.1.1.	Imunoglobulin A.....	14
1.2.1.2.	Patogeneza IgA nefropatije.....	17
1.2.1.2.1.	Prvi udarac - povećana koncentracija oskudno O-galaktoziliranih IgA1…..	17
1.2.1.2.2.	Drugi udarac - proizvodnja protutijela specifičnih za O-glikan…….	20
1.2.1.2.3.	Treći udarac - stvaranje imunokompleksa……..	21
1.2.1.2.4.	Četvrti udarac - deponiranje imunokompleksa u mezangij.....	21
1.2.1.3.	Liječenje IgA nefropatije.....	23
1.2.1.4.	Prognoza IgA nefropatije.....	24
1.2.2.	Henoch-Schönlein purpura.....	24
1.2.2.1.	Patogeneza Henoch-Schönlein purpure.....	26
1.2.2.2.	Liječenje i prognoza Henoch-Schönlein purpura.....	28
1.2.3.	Bolest minimalnih promjena.....	28
1.2.3.1.	Patogeneza bolesti minimalnih promjena.....	30
1.2.3.2.	Liječenje bolesti minimalnih promjena.....	32
1.2.3.3.	Prognoza bolesti minimalnih promjena.....	32
1.2.4.	Fokalna segmentalna glomeruloskleroza.....	33

1.2.4.1. Klasifikacija fokalne segmentalne glomeruloskleroze..... 34
1.2.4.2. Patogeneza fokalne segmentalne glomeruloskleroze..... 35
1.2.4.2.1. Primarna FSGS..... 36
1.2.4.2.2. Adaptivna FSGS..... 37
1.2.4.2.3. Genetska FSGS..... 38
1.2.4.2.4. FSGS uzrokovana virusom..... 39
1.2.4.2.5. FSGS uzrokovana lijekovima..... 39
1.2.4.2.6. APOL1 FSGS..... 40
1.2.4.3. Liječenje i prognoza fokalne segmentalne glomeruloskleroze..... 40
1.2.4.4. FSGS i BMP – krajevi spektra iste bolesti?..... 41
1.3. Novi prognostički biljezi..... 41
1.3.1. Dendrin..... 42
1.3.1.1. Značaj nuklearnog dendrina..... 43
1.3.1.2. Regulacija izražaja dendrina..... 44
1.3.2. Čimbenik rasta vezivnog tkiva..... 45
1.3.2.1. Izražaj i uloga CTGF..... 46
1.3.2.2. Izražaj CTGF u bolestima bubrega..... 49
1.3.2.3. Mogućnost anti-CTGF terapije..... 50
1.3.3. c-Myb..... 51
1.3.3.1. Izražaj i uloga c-Myb..... 52
1.3.3.2. Regulacija izražaja c-Myb..... 53
1.3.3.3. Mogućnosti anti-c-Myb terapije..... 54
2. CILJ RADA I HIPOTEZE……... 55
3. ISPITANICI I POSTUPCI……... 56
3.1. Ispitanici..... 56
3.2. Materijali..... 56
3.3. Metode..... 56

3.4. Postupci 58
3.5. Analiza..... 58
3.5.1. Analiza izražaja dendrina..... 58
3.5.2. Analiza izražaja CTGF i c-Myb..... 61
3.6. Statistička raščlamba..... 62
3.7. Etička načela..... 63
4. REZULTATI…… 64
4.1. Rezultati izražaja dendrina..... 69
4.2. Rezultati izražaja CTGF i c-Myb..... 77
5. RASPRAVA……... 83
6. ZAKLJUČAK…… 89
7. LITERATURA…….. 90
8. SAŽETAK…….. 112
9. SUMMARY…… 113
10. ŽIVOTOPIS……..... 114

Popis oznaka i kratica

ACEI	inhibitori angiotenzin konventirajućeg enzima
ADCC	protutijelima posredovana stanična citotoksičnost
AEC	*anti-endothelial cell antibodies*
α-SMA	α- glatkomišićni aktin
apoA1b	*angiopoetin-like-4*
APRIL	*a proliferation-inducing ligand*
BAFF	*B-cell activating factor*
β2GPI	β2-glikoprotein I
BMP	bolest minimalnih promjena
BMP	*bone morphogenetic proteins*
cfDNA	*cell free DNA*
C	polumjeseci (engl. *crescents*)
C1GalTl	*core*-1 beta 1,3-galaktoziltransferaza
CDC	citotoksičnost posredovana komplementom
CD2AP	*CD-associated protein*
COX2	ciklooksigenaza 2
CTGF	čimbenik rasta vezivnog tkiva (engl. *connective tissue growth factor*)
DAMP	*danger associated molecular pattern*
dIgA	dimerni IgA
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
E	endokapilarna hipercelularnost
EGF	*epidermal growth factor*
eGFR	*estimated glomerular filtration rate*
EMT	epitelijalno - mezenhimalna pretvorba
EndMT	endotelijalno - mezenhimalna pretvorba
Fab	*fragment antigen-binding*
FGF	*fibroblast growth factor*
FSGS	fokalna segmentalna glomeruloskleroza

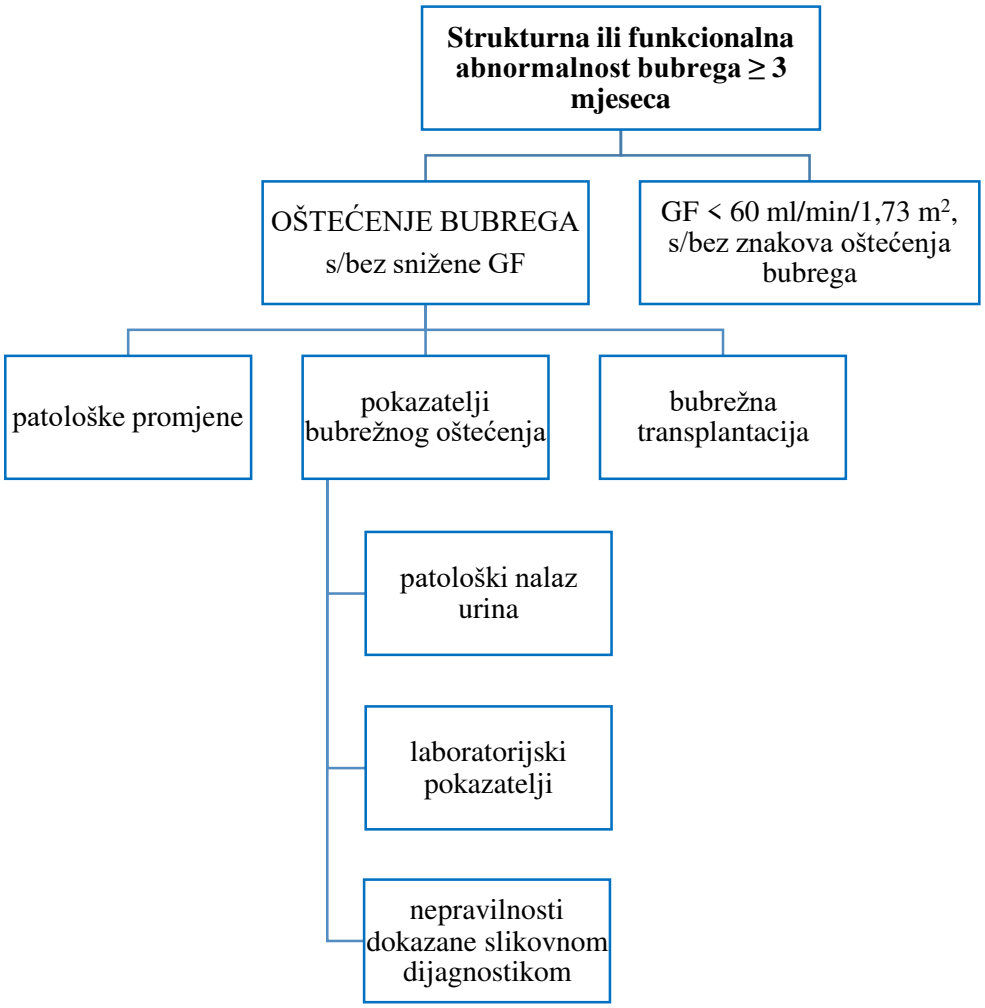
FSP1	protein-1 specifičan za fibroblast
GalNAc	N-acetilgalaktozamin
GalNAcT2	N-acetilgalaktozaminil transferaza
GB	glomerularne bolesti
GBM	glomerularna bazalna membrana
gd-IgA1	galaktoza oskudni - IgA1
Gadd45a	DNA-*damage-inducible 45 alpha*
GF	glomerularna filtracija
HGF	*hepatocyte growth factor*
HIV	*human immunodeficiency virus*
HLA	*human leukocyte antigen*
HSP	Henoch-Schönlein purpura
HSPN	Henoch-Schönlein purpura nefritis
IFN	interferon
IFTA	intersticijska fibroza i tubularna atrofija
IgAN	Imunoglobulin A nefropatija
ILK	*integrin-linked kinase*
ISKDC	*International Study of Kidney Disease in Children*
KBB	kronična bubrežna bolest
KBC	Klinički bolnički centar
KBZ	kronično bubrežno zatajenje
KDIGO	*Kidney Disease Improving Global Outcomes*
KIM 1	*kidney injury molecule-1*
KK1	klirens kreatinina u vrijene biopsije
KK2	klirens kreatinina na kraju praćenja
M	mezangijska hipercelularnost
MAGI-2	*membrane-associated guanylate kinase inverted 2*
MAPK	p38 mitogen aktivirana protein kinaza
MBL	manoza vezujući lektin (engl. *manosa binding lectin*)

MET	mezenhimalno - epitelijalna pretvorba
mIgA	monomerni ili serumski imunoglobulin A
MMP	*matrix metalloproteinase*
NGAL	*neutrophil gelatinase-associated lipocalin*
NETs	*neutrophil extracellular traps*
NS	nefrotski sindrom
ODN	*antisense oligonucleotide*
PAMP	*pathogen-associated molecular patterns*
PCR	omjer proteina i kreatinina (engl. *protein creatinine ratio*)
PDGF	*platelet-derived growth factor*
PDSS1	*decaprenyl diphosphate synthase subunit 1*
RAAS	renin angiotenzin aldosteronski sustav
RES	retikuloendotelni sustav
RNK	ribonukleinska kiselina
ROS	reaktivni kisikovi radikali
S	segmentalna glomeruloskleroza
Sk1	serumski kreatinin u vrijeme biopsije
Sk2	serumski kreatinin na kraju praćenja
ST2,3	α2,3 sijaliltransferaza
suPAR	*plasma soluble urokinase-type plasminogen activator receptor*
T	tubularna atrofija/ intersticijska fibroza
TG	transglutaminaza
TGF-β	*transforming growth factor β*
TNF	*tumor necrosis factor*
TLR	*Toll like receptor*
VASP	*vasodilator-stimulated phosphoprotein*
Wtip	*Wt-1 interacting protein*
YAP	*yes-associated protein*
ZO-1	*zonula occludens*

1. UVOD

1.1. Kronična bubrežna bolest

Kronična bubrežna bolest (KBB) je globalni javnozdravstveni problem, prepoznat kao „skrivena epidemija“ od koje boluje preko 850 milijuna ljudi u svijetu, odnosno 10% - 13% populacije u razvijenim zemljama i 200 tisuća ljudi u Republici Hrvatskoj (1,2). Prosječno 2,3 – 7,1 milijuna bolesnika prerano umire zbog nedostupnosti dijalize i transplantacije te je KBB šesta na popisu najbrže rastućih uzroka smrti. Prema KDIGO klasifikaciji (engl. *Kidney Disease Improving Global Outcomes*), KBB se definira kao oštećenje bubrega i/ili pad glomerularne filtracije (GF) ispod 60 mL/min/1,73 m^2 u trajanju duljem od tri mjeseca (3) (Slika 1).



Slika 1. Algoritam za definiciju kronične bubrežne bolesti (KDIGO klasifikacija, 2012. godina).

KBB se prema razini glomerularne filtracije dijeli u pet stadija, od kojih najviši zahtijeva nadomještanje bubrežne funkcije dijalizom ili transplantacijom. Bubreg vrši i nadzire brojne funkcije: izlučivanje produkata metabolizma, održavanje ravnoteže vode, elektrolita i acido-bazne ravnoteže i sintezu hormona. Zbog toga zatajenje bubrega nosi niz zdravstvenih komplikacija kao što su: elektrolitski disbalans, dislipidemija, malnutricija, anemija, poremećaj mineralno - koštanog metabolizma, poremećaj spavanja, slabljenje kognitivnih funkcija, hiperhidracija, oksidativni stres i povećani rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti. U bolesnika sa sniženom GF povišen je rizik od kongestivnog srčanog zatajenja, atrijske fibrilacije, moždanog udara, koronarne bolesti srca i periferne arterijske bolesti (4). U višim stadijima KBB multiplicira se rizik od kardiovaskularnih bolesti pa je u najvišem stadiju KBB 30 puta veći nego u odgovarajućih zdravih kontrola (5). Osim tradicionalnih čimbenika rizika, u patogenezi nastanka kardiovaskularnih bolesti dodatni utjecaj imaju anemija, oksidativni stres, upala, malnutricija, poremećaji u metabolizmu kalcija i fosfora, hiperhomocistinemija i poremećaji lipida (6). Stoga je opće preživljenje bolesnika na dijalizi kraće nego preživljenje onkoloških bolesnika od nekih vrsta karcinoma (npr. dojke, prostate i debelog crijeva) (7). Osim toga, KBB predstavlja značajno financijsko opterećenje za svaki zdravstveni sustav, primjerice godišnji trošak u Sjedinjenim Američkim Državama je 48-60 milijardi dolara (8).

Najčešći uzroci nastanka kroničnog bubrežnog zatajenja (KBZ) su dijabetička nefropatija i nefroangioskleroza uzrokovana arterijskom hipertenzijom, a na trećem mjestu su bolesti glomerula. Glomerulopatije obuhvaćaju široki spektar kliničko-patoloških sindroma karakteriziranih promjenama glomerularne građe i funkcije i uzrok su razvoja terminalnog stadija KBZ u 90% slučajeva (8,9). Kod sumnje na glomerularnu bolest, perkutana iglena biopsija bubrega je zlatni standard u dijagnostičkom algoritmu (10). Iz bioptičkog uzorka postavlja se patološka dijagnoza uz procjenu aktivnosti i kroniciteta bolesti, što je važno za individualizirani terapijski pristup i prognozu bolesti.

1.1.1. Procjena bubrežne funkcije

Praktično se bubrežna funkcija procjenjuje po vrijednostima serumskog kreatinina (sK), klirensa kreatinina (KK) i albuminurije/proteinurije. Razina sK je relativno neprecizan pokazatelj jer ovisi o dobi, spolu, prehrambenim navikama, mišićnoj masi i tubularnoj sekreciji kreatinina (11). S druge strane, albuminurija prethodi padu GF, a u tubulointersticijskim bolestima može biti odsutna (12). Stoga rani stadij KBB može ostati

neprepoznat, a KBB bez simptoma ili s nespecifičnim simptomima biti otkrivena tek u poodmaklom stadiju. Važno je istaknuti da liječenje KBB u ranom stadiju može oporaviti bubrežnu funkciju, ili bar usporiti progresiju bolesti. U bioptatu je tubularna atrofija superiorniji prediktor opadanja glomerularne filtracije nego glomerularne patološke promjene (13). U novije vrijeme istražuju se neinvazivne metode procjene ranih pokazatelja bubrežnog oštećenja. Prema Watsonu, uz KK i proteinuriju, urinarni panel biljega za rano otkivanje KBB detektira cfDNA (*cell free DNA*), metiliranu cfDNA, klusterin i CXCL10 (1). Foster je utvrdio da su β-*trace* protein i β2-mikroglobulin neovisni predskazatelji najvišeg stadija KBB i općeg mortaliteta (14). U djece su, uz albuminuriju, mogući rani predskazatelji KBB monocitni kemoreaktantni protein 1, interleukin-18 i retinol-vežući protein te tubularni biljezi KIM-1 (engl. *kidney injury molecule*-1), NGAL (engl. *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*), cistatin C i α-1-mikroglobulin, ali prije njihove primjene u kliničkoj praksi nužna je laboratorijska validacija (12).

1.1.2. Patogneza kronične bubrežne bolesti

U višim stadijima KBB, u bioptatu nalazi se dosta globalno ožiljno promijenjenih glomerula, infiltracija intersticija upalnim stanicama, intersticijska fibroza i tubularna atrofija (kratica IFTA) (15). U glomerulopatijama glomeruloskleroza može biti povezana s gubitkom podocita s ili bez upalne i proliferativne komponente, dok je progresivna intersticijska fibroza uvijek praćena sterilnom upalom (16). Neovisno o tome je li glomerularna bolest posljedica imunološkog ili metaboličkog oštećenja, hipoperfuzije, infekcije ili genetske nepravilnosti, postoji spektar promjena u glomerulu i posljedično cijelom nefronu. U glomerulima može biti smanjena produkcija čimbenika rasta i promijenjena interakcija stanica s matriksom, mezangijski matriks proširen, glomerularna bazalna membrana (GBM) smanjenog negativnog naboja ili neadekvatno građena, mezangijske stanice hiperplastične, podociti reverzibilno prilagođeni ili podložni apoptozi, promijenjena propusnost i selektivnost filtracijske barijere te reduciran protok krvi (16). S obzirom na „nizvodni“ položaj kanalića i intersticija u odnosu na glomerule, zbog promjena u protoku krvi i količine/kvalitete ultrafiltrata dolazi do sekundarnog oštećenja tubulointersticija (16). Prvo su oštećeni proksimalni kanalići, u njima je pojačana endocitoza filtriranih albumina i eventualno većih proteina - profibrotičkih i proupalnih citokina, komponenti komplementa, imunoglobulina, feritina i lipida (16,17). Na molekularnoj razini u epitelu kanalića promijenjeno je stvaranje citokina i čimbenika rasta uz

stres endoplazmatskog retikula, nakupljanje reaktivnih kisikovih radikala, nakupljanje DAMP molekula (engl. *danger associated molecular pattern*) s aktivacijom *Toll like receptora* (TLR), što kronično može voditi u tubularnu atrofiju i epitelijalno-mezenhimalnu pretvorbu (EMT) (16). Tubularna atrofija je karakterizirana gubitkom četkaste prevlake i apikalnih mitohondrija u epitelu proksimalnih kanalića, simplifikacijom cilindričnog u kubični epitel koji ima piknotične jezgre i smanjenu transportnu funkciju te dilatacijom lumena kanalića koji mogu sadržavati proteinske čepove (13). Bazalna membrana kanalića je zadebljana i nabrana, peritubularni intersticij infiltriran upalnim stanicama, a tubularni epitel propada apoptozom te s vremenom kanalići budu nadomješteni fibroziranim intersticijem. Patološki mehanizmi tubularne atrofije su: apoptoza ili starenje tubularnih epitelnih stanica, prorjeđenje peritubularnih kapilara i posljedična ishemija, atubularni glomeruli/aglomerularni tubuli, oksidativni stres, epitelijalno-mezenhimalna pretvorba, intersticijska upala, lipotoksičnost i inaktivacija Na/K pumpe (13). U intersticiju je povišena razina proupalnih i profibrotičkih citokina, brojniji su fibrociti i fibroblasti, aktivirani rezidentni monociti i dendritičke stanice, što sve vodi u intersticijsku fibrozu (16). Normalno su glomerularna i peritubularna mikrovaskulatura raspoređene u sekvencu koja omogućava finu ravnotežu između GF i tubularne reapsorpcije. U nekim glomerulopatijama je smanjen protok krvi kroz glomerul i posljedično smanjena opskrba peritubularne kapilarne mreže koja o njemu ovisi, jer ne postoji kolateralna poslijeglomerularna cirkulacija. Posljedica je tubularna hipoksija i ishemija zbog apoptoze endotela i prorjeđenja kapilarne peritubularne mreže, što doprinosi nastanku intersticijske fibroze (16).

1.1.2.1. Epitelijalno-mezenhimalna pretvorba

Epitelijalno-mezenhimalna pretvorba (engl. *epithelial-mesenchymal transition*) je složeni proces u kojem polarizirane epitelne stanice, koje normalno tijesno prijanjanju jedna uz drugu i u doticaju su s bazalnom membranom, u patološkim okolnostima podliježu promjenama i stječu mezenhimalna fenotipska obilježja (18). Karakteristike vretenastih mezenhimalnih stanica su povećani migratorni kapacitet, invazivnost, manja osjetljivost na apoptozu i veća proizvodnja komponenti izvanstaničnog matriksa (18). EMT ima četiri stadija: gubitak epitelnih adhezija, *de novo* izražaj α-glatkomišićnog aktina (α-SMA) i aktinska reorganizacija, disrupcija bazalne membrane, povećana stanična migracija i invazivnost. Analogni proces u endotelnim stanicama zove se endotelijalno-mezenhimalna

pretvorba (EndMT), a obrnuti proces mezenhimalno-epitelijalna pretvorba (MET). Opisana su tri tipa EMT. Prvi tip je povezan s implantacijom, embriogenezom i organogenezom i nema za posljedicu fibrozu ni invazivne migratorne fenotipove (18). Drugi tip se nalazi u cijeljenju rana, regeneraciji i fibrozi, uglavnom nakon ozljede tkiva (18,19). Treći tip se vidi u novotvorinama i povezan je sa sposobnošću metastaziranja i invazije tumorskih stanica (18). Ključnu ulogu u održavanju integriteta epitela kanalića imaju E-kaderin i ZO-1 (engl. *zonula occludens-1*), a tubularna bazalna membrana sprječava interakciju epitelnih stanica i miofibroblasta (20). Bez E-kaderina, desmoplakina, okludina i koneksina, stanica izgubi apikalno - bazalni polaritet i započne EMT (18,19, 21-23). Zamjena citokeratina vimentinom u citoskeletu rezultira promjenom stanice iz kuboidnog u vretenasti oblik (19). Umjesto apikalno-bazalnog, stanica dobiva prednje-stražnji polaritet, stvara adhezije s matriksom umjesto sa susjednim epitelnim stanicama i pojačano izražava mezenhimalne biljege: FSP1 (protein-1 specifičan za fibroblast), α-SMA, kolagen I, vimentin i N-kaderin (19,24). Brojni transkripcijski čimbenici poput SNAI1/Snail 1, SNAI2/Snail 2 (Slug), ZEB1, ZEB2, TCF3, KLF8, Twist, Goosecoid, TCF4 (E2.2), SIX1, FOXC2 mogu izravno ili neizravno potisnuti izražaj E-kaderina (25,26). Slug uzrokuje disrupciju desmosoma i gubitak međustaničnih adhezija (27,28). Snail i Slug imaju središnju ulogu u EMT jer njihov pojačani izražaj u epitelnim stanicama uzrokuje fenotipske promjene, pojačani motilitet i invazivnost (29). EMT može biti potaknuta djelovanjem TGF-β (*transforming growth factor β1*), FGF (*fibroblast growth factor*), EGF (*epidermal growth factor*), HGF (*hepatocyte growth factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*), FGF-2, MMP-2 (*matrix metalloproteinase*), MMP-3, MMP-9, Wnt/beta-katenin, Notch, hiperglikemije i hipoksije (18,30).

1.1.2.2. Fibroza bubrega

Fibroza bubrega, krajnji ishod progresivne KBB, karakterizirana je intersticijskim odlaganjem izvanstaničnog matriksa i ožiljkavanjem (31,32). Nastanak fibroze posredovan je upalnim stanicama i fibroblastima (18). Miofibroblast koji izražava α-SMA je osnovni tip stanice koja stvara matriks (33). Prema eksperimentalnim istraživanjima, u procesu nastanka fibroze u bubregu 12% fibroblasta je podrijetlom iz koštane srži, 30% iz tubularnih epitelnih stanica nastalih EMT, 35% nastalih EndMT, a ostatak iz rezidentnih fibroblasta ili drugih mezenhimalnih stanica (pericita, fibrocita ili perivaskularnih glatkomišićnih stanica) (18). U reakciji na ozljedu, tubularne epitelne stanice mogu podleći EMT, čime je onemogućen

oporavak i regeneracija epitela, zaustavljen stanični ciklus i potaknuta aktivacija intersticijskih fibroblasta (33). Istraživanja su pokazala da u nastanku bubrežne fibroze tubularne epitelne stanice podliježu samo parcijalnoj EMT jer izražavaju biljege epitelnih i mezenhimalnih stanica i ostaju povezane s bazalnom membranom (33). Međutim, parcijalna EMT je dovoljna za gubitak tubularne funkcije, zaustavljanje staničnog ciklusa u G2 fazi i otpuštanje profibrogenih citokina (33). Nastanku fibroze pridonosi defektni stanični metabolizam masnih kiselina i disfunkcija mitohondrija u tubularnom epitelu. Do toga dolazi zbog smanjenog izražaja ključnih enzima - regulatora oksidacije masnih kiselina koje su bitan izvor energije u epitelu proksimalnih kanalića (34). Inhibicija oksidacije masnih kiselina *in vitro* uzrokuje iscrpljivanje ATP-a, staničnu smrt, dediferencijaciju i unutarstanično nakupljanje lipida (34). U tom procesu sudjeluje TGF-β1 koji inhibira izražaj karnitin palmitoiltransferaze 1, enzima ključnog za oksidaciju masnih kiselina i smanjenje metabolizama masnih kiselina (33). TGF-β je najpotentniji profibrotički čimbenik, potiče izražaj čimbenika rasta, citokina i kemokina koji induciraju i održavaju EMT (20,35). Osim toga, TGF-β posreduje stanično signaliziranje i interakcije između različitih signalnih puteva, što dovodi do promjena u staničnoj diferencijaciji (36).

Fibroza bubrega nastaje postupno kroz nekoliko faza. U reakciji na stresni podražaj kao što su hiperglikemija, proteinurija, hipoksija, autoimuna reakcija i perzistentna infekcija, tubularne epitelne stanice proizvode citokine i kemokine koji privlače monocite, makrofage i limfocite T (32). Mononuklearna infiltracija aktivira proupalne i profibrotične čimbenike i taj mikrookoliš potiče fenotipsku prilagodbu tubularnog epitela, odnosno podržava EMT kako bi stanice izbjegle apoptozu (32). Osim tubularnog epitela, EMT mogu proći endotelne stanice i podociti (32). U nadzoru EMT su važni signalni putovi TGFβ/Smad, *integrin-linked kinase* (ILK) i Wnt/β-katenin (32). TGFβ se veže na tip 2 TGFβ transmembranskog receptora i s tip 1 receptorom čini kompleks koji uzrokuje fosforilaciju i aktivaciju Smad 2 i Smad 3. Fosforilizirane Smad potom se spajaju sa Smad 4 i translociraju u jezgru gdje nadziru transkripciju gena CTGF, ILK, Snail, α-SMA, Wnt, kolagen IA2 (32). TGFβ signalni put neovisan o Smad također ima ulogu u EMT, a uključuje RhoA, p38 mitogen aktiviranu protein kinazu (MAPK) i fosfatidil-inozitol-3-kinazu/Akt (32). U ILK signaliziranju stanična serin/treonin protein kinaza ulazi u interakciju s citoplazmatskom domenom β-integrina i posreduje integrinsko signaliziranje u različitim tipovima stanica. Wnt/β-katenin signalni put uključuje Wnt obitelj sekretornih čimbenika rasta i β-katenin, protein važan za održavanje

međustaničnih adhezija i transkripciju gena koji induciraju Snail i suprimiraju izražaj nefrina (32).

1.1.2.3. Podociti

Podociti su visoko specijalizirane stabilne epitelne stanice koje oblikuju visceralni list Bowmanove čahure, a nastaju mezenhimalno-epitelijalnom transdiferencijacijom u metanefrosu (32). Zajedno s fenestriranim endotelnim stanicama glomerularnih kapilara i glomerularnom bazalnom membranom tvore filtracijsku barijeru koja omogućava ultrafiltraciju, a sprječava gubitak proteina. Podociti imaju središnju ulogu u održavanju glomerularne funkcije, patogenezi glomerularnih bolesti i progresiji KBB (37). U reakciji na oštećenje, podociti pokazuju različite adaptivne promjene koje ovise o intenzitetu, vrsti i trajanju ozljede (32). Početni odgovor može biti gubitak nožica i hipertrofija kojom nastoje kompenzirati gubitak funkcije. Ako je ozljeda progresivna, podociti podliježu EMT kako bi izbjegli apoptozu. Tada smanjeno izražavaju epitelne biljege P-kaderin, ZO-1 i nefrin, a pojačano dezmin, MMP-9, fibronektin, kolagen I i transkripcijski represor Snail te od epitelnih postaju stanice s mezehimalnim obilježjima (38). Produžena ili teža ozljeda dovest će do odljepljivanja podocita od GBM, apoptoze i podocitopenije (32). Razlika između EMT podocita i tubularnog epitela je u tome što podocit nakon pretvorbe postane pokretan i odvaja se od GBM, a tubularna epitelna stanica preko tubularne bazalne membrane invadira u intersticij i sintetizira komponente matriksa (32). Gubitak podocita i posljedična podocitopenija vode u glomerulosklerozu.

1.2. Klasifikacija glomerularnih bolesti

Glomerularne bolesti (GB) su heterogena skupina bolesti koje se u etiopatogenetskoj klasifikaciji dijele na primarne, sekundarne i nasljedne (tablica 1).

Tablica 1. Klasifikacija glomerularnih bolesti (39)

Primarne glomerularne bolesti
Bolest minimalnih promjena
Fokalna segmentalna glomeruloskleroza
Membranska nefropatija
Akutni postinfekcijski glomerulonefritis
Membranoproliferativni glomerulonefritis
IgA nefropatija
Bolest gustih membrana
C3 glomerulopatija
Glomerulopatije zbog sistemskih bolesti
Lupus nefritis (sistemski eritematozni lupus)
Dijabetička nefropatija
Amiloidoza
Glomerulopatija zbog multiplog mijeloma
Goodpasture sindrom
Mikroskopski poliangitis
Granulomatoza s poliangitisom
Henoch-Schönlein purpura
Glomerulonefritis povezan s bakterijskim endokarditisom
Trombotička mikroangiopatija
Nasljedne bolesti
Sindrom Alport
Fabrijeva bolest
Mutacije proteina podocitne pukotinaste membrane

Jedna se glomerularna bolest može očitovati različitim kliničkim sindromima i imati različit tijek, a vrijedi i obrnuto - više se različitih glomerularnih bolesti može prezentirati istim sindromom (9). Klinički sindromi su nefrotski sindrom (NS), akutni nefritički sindrom, akutno/brzoprogresivno bubrežno zatajenje, hematurija, asimptomatska proteinurija i KBZ (9). Kompleksna patogeneza glomerularnih bolesti još uvijek nije u potpunosti razjašnjena (40). Složena je zbog više razloga: a) različiti stresori mogu inicirati ozljedu, b) osjetljivost na ozljedu se razlikuje, moguće zbog genetske predispozicije, c) na upalnu reakciju utječu

interakcije između molekula (komponenti komplementa, protutijela, kemokina, citokina i čimbenika rasta), leukocita i intrinzičnih bubrežnih stanica i d) bubrežne bolesti su često kronične i progresivne (40). Poznati uzroci su imunološki, hemodinamski, metabolički, infektivni, toksični i nasljedni, a ponekad uzrok ostaje nepoznat (9). Sve sastavnice glomerula doprinose održanju njegove normalne funkcije, ali u oštećenju aktivno reagiraju i, zajedno s posrednicima upale i leukocitima, utječu na glomerularnu disregulaciju i nastanak GB (41). Početne patološke promjene ovise o mjestu ozljede u glomerulu. Na primjer, mezangijske stanice su preko fenestra endotela izravno izložene krvi pa će taloženje cirkulirajućih imunih kompleksa (npr. u IgA nefropatiji) rezultirati hiperplazijom mezagijskih stanica i proširenjem matriksa (40). Bolesti povezane s oštećenjem podocita i GBM karakterizirane su gubitkom nožica podocita, što rezultira poremećajem filtracijske barijere i proteinurijom (40). Odlaganja cirkulirajućih imunih kompleksa ili *in situ* stvaranje kompleksa autoprotutijela i intrinzičnog antigena izaziva reakciju komplementa i/ili upalnih stanica s endokapilarnom hipercelularnošću, mogućom rupturom GBM i nastankom polumjeseca u urinarnom prostoru. U hemolitičko-uremičkom sindromu ozljeda endotela i aktiviranja koagulacije izaziva stvaranje tromba u lumenu glomerularnih kapilara i proširenje subendotelnog prostora (40).

Opisane patološke promjene nalaze se u biopsijama bubrega standardno analiziranim imunoflorescentnom, svjetlosnom i elektronsko mikroskopskom metodom.

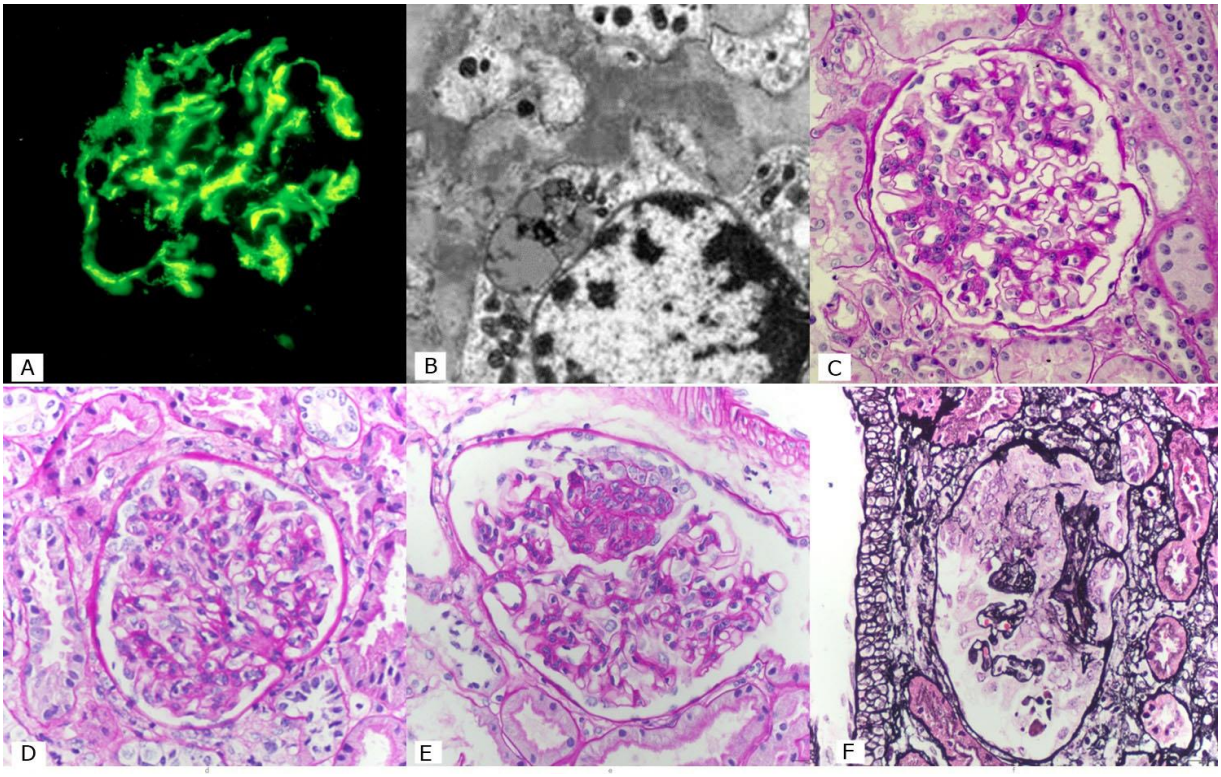
U ovom istraživanju analizirani su ispitanici s IgA nefropatijom (IgAN), Henoch-Schönlein purpurom (HSP), bolesti minimalnih promjena (BMP) i fokalnom segmentalnom glomerulosklerozom (FSGS) pa će te bolesti biti detaljno opisane.

1.2.1. IgA nefropatija

IgAN-u su prvi opisali Berger i Hinglais 1968. godine (42). To je najčešća primarna glomerulopatija, karakterizirana odlaganjem IgA imunih depozita u mezangiju. Godišnja incidencija je 2,5 oboljela na 100 tisuća stanovnika, ali podaci nisu pouzdani jer se biopsija bubrega ne izvodi uvijek kod sumnje na IgAN (43). Bolest je najučestalija u istočnoj Aziji, Europi i Africi (44). Primarna IgAN je ograničena na bubreg. Međutim, mezangijski depoziti IgA mogu se naći sekundarno u bolestima jetre i probavnog trakta, sistemnim infekcijama, plućnim bolestima i autoimunim bolestima (45). Ne postoji specifično histološko obilježje koje bi razlikovalo primarnu od sekundarne IgAN pa je točnu prevalenciju teško utvrditi, jer

se ponekad ne radi o sekundarnoj već koincidentnoj novootkrivenoj primarnoj IgAN (46). U sekundarnoj IgAN se mogu pronaći histološka obilježja koja nisu tipična za primarni oblik bolesti (bojanje za kapa lake lance istog ili jačeg intenziteta nego za lambda lake lance i prisutnost subepitelnih grba na elektronskoj mikroskopiji) (46).

Nalaz svjetlosne mikroskopije u primarnoj IgAN-i je varijabilan; od hiperplazije mezangijskih stanica, endokapilarne proliferacije do glomerulonefritisa s polumjesecima ili globalne glomeruloskleroze s visokim postotkom IFTA (47). Na imunofluorescentnoj mikroskopiji nalaze se zrnati (para)mezangijski depoziti predominantno IgA, C3 i rjeđe i slabije IgG ili IgM, a na elektronskoj mikroskopiji vide se elektronski gusti mezangijski depoziti (Slika 2). IgAN je kroničnog tijeka, a u patološkom nalazu aktivnost i kronicitet bolesti izražavaju se MEST-C zbrojem po Oksfordskoj klasifikaciji (48) (Tablica 2).



Slika 2. IgA nefropatija: A) zrnati jako izraženi depoziti IgA u mezangiju (IgA/FITC, 400 x, B) elektronski gusti depoziti u mezangiju (4000 x), C) mezangijska hipercelularnost, D) endokapilarna proliferacija, E) segmentalna skleroza i F) celularni polumjesec u Bowmanovom prostoru (PAS, Jones 400 x).

Tablica 2. Oksfordska klasifikacija IgA nefropatije po MEST-C zbroju

HISTOLOŠKA VARIJABLA	DEFINICIJA	ZBROJ
Mezangijska hipercelularnost	> 4 mezangijske stanice u bilo kojoj mezangijskoj regiji glomerula	M0: prisutna u <50% glomerula M1: prisutna u >50% glomerula
Endokapilarna hipercelularnost	Hipercelularnost s posljedično povećanim brojem stanica u glomerularnom kapilarnom lumenu	E0: odsutna E1: prisutna barem u jednom glomerulu
Segmentalna glomeruloskleroza	Adhezija ili skleroza (obliteracija kapilarnog lumena matriksom) u dijelu, ali ne u cijelom glomerularnom klupku	S0: odsutna S1: prisutna u barem jednom glomerulu
Tubularna atrofija/ intersticijska fibroza	Procijenjeni postotak kore koji pokazuje znakove tubularne atrofije i intersticijske fibroze, koja god je veća	T0:0-25% kore T1: 26-50% kore T2: >50% kore
Celularni ili fibrocelularni polumjeseci	Postotak glomerula s celularnim ili fibrocelularnim polumjesecima	C0: odsutni C1: 0-25% glomerula C2: ≥ 25% glomerula

IgAN se može klinički manifestirati u širokom rasponu od mikrohematurije s ili bez asimptomatske proteinurije, preko makrohematurije, nefrotskog ili nefritičkog sindroma do brzoprogresivnog zatajenja bubrega.

1.2.1.1. Imunoglobulin A

Imunoglobulin A (IgA) je najzastupljeniji imunoglobulin u organizmu. Lokaliziran je prvenstveno u sluznicama koje štiti od invazije mikroorganizama, a luče ga lokalne plazma stanice. IgA koji cirkulira krvlju izlučuju plazma stanice u koštanoj srži. Po rođenju ga nema te mu razina postupno raste tijekom prve godine života, a u serumu odrasle osobe iznosi 61 do 356 mg/dL (49). Povišena razina IgA u serumu može se naći u IgA nefropatiji, imunoglobulin A vaskulitisu, sindromu stečene imunodeficijencije, alkoholnoj cirozi, uznapredovalom hepatitisu, IgA mijelomu, reumatoidnom artritisu i sistemskom eritematoznom lupusu (50).

Molekula IgA građena je od dva teška i dva laka lanca. Teški lanac ima varijabilnu i tri konstantne regije, a laki lanac varijabilnu i konstantnu regiju. Između dvije konstantne regije teškog lanca je zglobna regija koja je glikozirana. Monomerna molekula IgA ima dvije Fab

regije *(engl. fragment antigen-binding*) kojima veže antigene. IgA monomer ima podrazrede IgA1 i IgA2, različite po tome što IgA2 ima kraću zglobnu regiju. IgA1 predominira u krvi, suzama, slini, sekretima iz gornjeg dišnog sustava i tankom crijevu, IgA2 u debelom crijevu, a u vagini su oba monomera jednako zastupljena (45). U ljudskom organizmu IgA ima monomernu, polimernu (uglavnom dimernu) i sekretornu izoformu (45) (Slika 3). Monomerni ili serumski IgA (mIgA) nalazi se u krvi, polimerni IgA (pIgA) je u krvi u niskoj koncentraciji, a sekretorni ili mukozni IgA (sIgA) nalazi se u sluznicama i sekretima (45).



Slika 3. Izoforme imunoglobulina A (45).

U krvi mIgA preko Fab regije veže antigen, a preko Fc domene može se vezati na specifični Fc-alfa receptor (Fc-alfa-RI ili CD89) na stanicama mijeloidne loze (neutrofili, eozinofili, monociti, makrofagi, dendritičke i Kupfferove stanice) (45). Na taj način dolazi do fagocitoze i čišćenja cirkulirajućih IgA imunih kompleksa pomoću fagocitnog sustava (51-53).

U lamini propriji svih sluznica lokalne plazma stanice luče IgA kao dimernu molekulu (dIgA) koju potom polimerni Ig receptor (pIgR), smješten na bazolateralnoj strani epitela, transportira kroz stanicu i otpušta u lumen (54). Pri tom sekretorna komponenta receptora ostane vezana s IgA pa nastane sekretorni IgA (sIgA) (54). Na površini sluznica dišnog, crijevnog i genitourinarnog trakta sIgA štiti sluznicu od prodora bakterija jer ih aglutinira, ometa njihovu pokretljivost i neutralizira bakterijske proizvode (54-56). Ako antigeni uđu u laminu propriju, dIgA ih opsonizira te se prenesu natrag u lumen istim putem kao slobodni dIgA; tako se sluznica oslobađa od antigena (54).

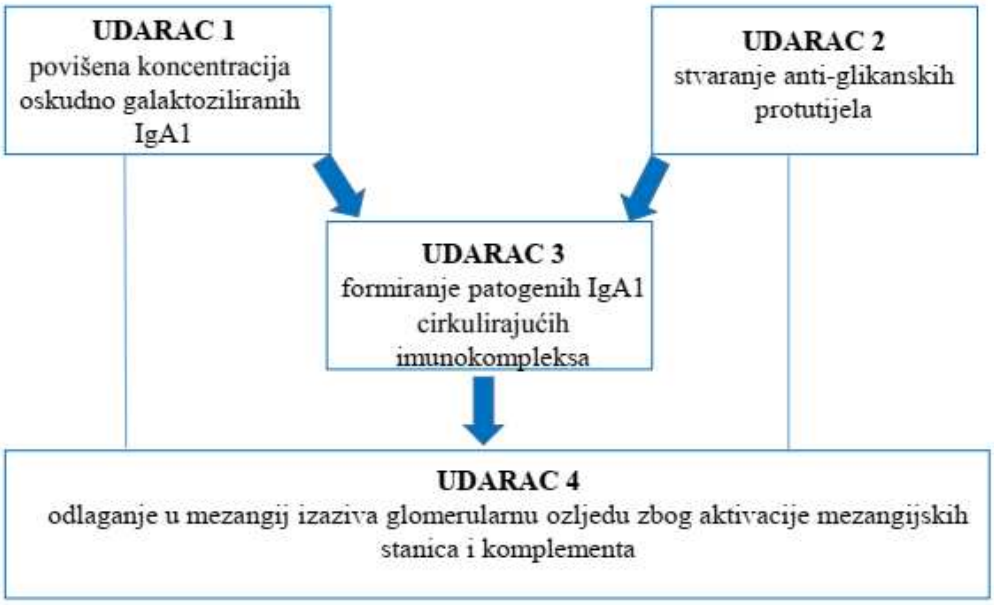
Preko 90% serumskog IgA (mIgA1, pIgA1, pIgA2) se katabolizira u jetri, slezeni i bubrezima, a biološki poluvijek je 3 do 5 dana (57). Hepatociti izražavaju

asijaloglikoproteinski receptor (ASGPR) kojim prepoznaju i vežu glikane iz zglobne regije IgA1 (58). Drugi mehanizam klirensa IgA je putem retikuloendotelnog sustava (RES), prvenstveno Kupfferovih stanica koje preko svog receptora CD89 prepoznaju Fc domenu mIgA, pIgA i IgA u imunokompleksima (59,60). Vezanje mIgA s CD89 receptorom ima protuupalni učinak, a vezanje IgA iz imunokompleksa s CD89 receptorom inducira proupalni odgovor (45). Takva bifunkcionalna uloga CD89 receptora posredovana je adaptorom FcRγ (45). CD89 je regulator između protu- i proupalnih odgovora na IgA (54). Abnormalno ili prekomjerno nakupljanje IgA-imunokompleksa može izazvati pojačanu aktivaciju neutrofila i posljedično oštećenje tkiva (54).

Molekula CD89 ima dvije solubilne izoforme, od kojih se manja nalazi u serumu i zdravih i bolesnika s IgAN, a veća izoforma samo u serumu bolesnika s IgAN. U bolesnika s IgA nefropatijom je povećana razina cirkulirajućih IgA1-IgG imunokompleksa, a snižena razina IgA-sCD89 kompleksa, što upućuje da su CD89 koji sadrže imunokomplekse selektivno zarobljeni u mezangiju i pogoršavaju glomerularnu ozljedu (60).

1.2.1.2. Patogeneza IgA nefropatije

Prema prihvaćenoj hipotezi, IgAN je posljedica nekoliko patogenih udaraca: a) povećana je razina gd-IgA1, b) na njih se stvaraju protuglikanska protutijela IgG ili IgA1 razreda, c) nastaju cirkulirajući imunokompleksi, d) odlažu se u mezangij te potiču aktivaciju, proliferaciju i apoptozu mezangijskih stanica (61) (Slika 4). Aktivirane mezangijske stanice luče proupalne, proliferativne i profibrogene čimbenike čiji učinak vodi do progresije IgAN (61).

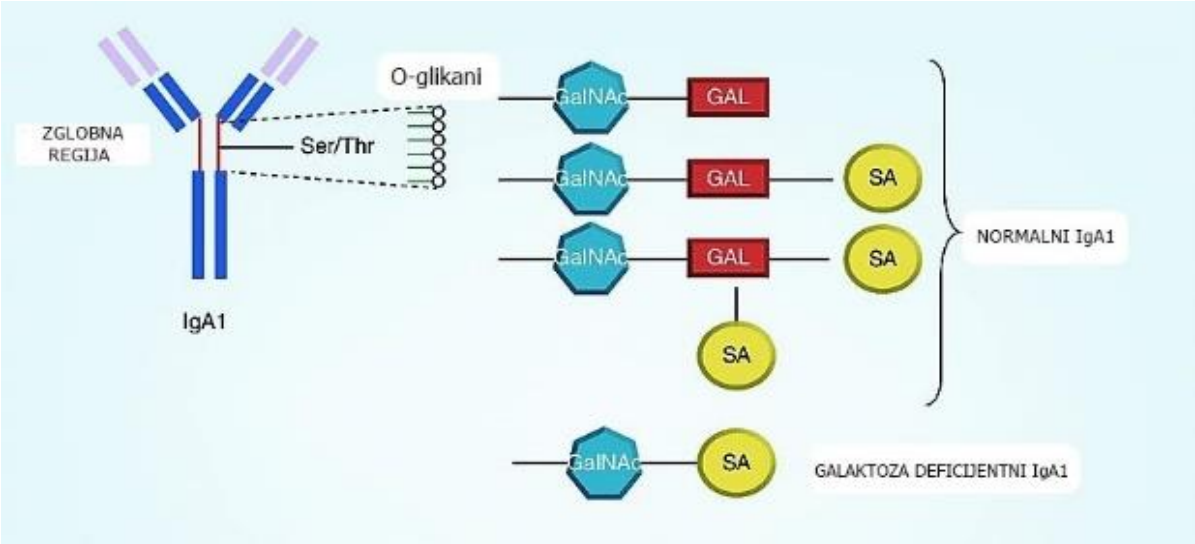


Slika 4. Patogeneza IgA nefropatije prema teoriji višestrukih udaraca (62).

1.2.1.2.1. Prvi udarac - povećana koncentracija gd-IgA1

Većina cirkulirajućih IgA1 je monomerna, jako O-galaktozilirana i sintetiziraju ih plazma stanice koštane srži. Prvi udarac u patogenezi IgAN je povećana koncentracija gd-IgA1 glikoforme u serumu i imunim depozitima u mezangiju (63,64). Samo IgA1 podrazred se nalazi u mezangijskim depozitima (65). Između CH1 i CH2 konstantne domene α teškog lanca IgA je zglobna regija od 18 aminokiselina gdje se na aminokiselinske ostatke serina ili treonina mogu vezati lanci O-glikana (61). Devet je mogućih veznih mjesta u svakom lancu, a tri do šest su zauzeti. Proces glikozilacije započinje dodavanjem N-acetilgalaktozamina (GalNAc) preko kisikovog atoma na serinski ili treoninski ostatak, djelovanjem enzima N-

acetilgalaktozaminil transferaze (GalNAcT2). O-glikanski lanac može se proširiti dodavanjem galaktoze na GalNAc i stvaranjem disaharida djelovanjem enzima C1GalTl *(core*-1 beta 1,3-galaktoziltransferaze). Sijalinska kiselina može se vezati na galaktozni dio pomoću enzima α2,3 sijaltransferaze (ST2,3) ili se spojiti na GalNAc u α2,6 spoju, djelovanjem enzima α2,6 sijaltransferaze (ST2,6). Sijalizacija GalNAc sprječava daljnje dodavanje galaktoze (64) (Slika 5).

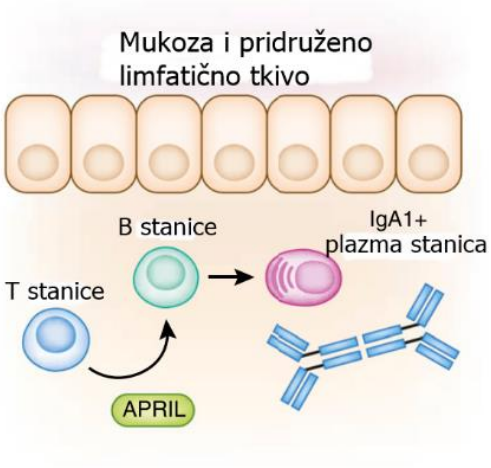


Slika 5. Razlike u građi normalnog i oskudno galaktoziliranog imunoglobulina A (63). GalNAc: N-acetilgalaktozamin; SA-sijalinska kiselina, GAL-galaktoza; Ser-Thr- serin treonin.

Pojam „galaktoza deficijentni IgA1“ nije posve točan jer većina O-glikoformi sadrži galaktozne ostatke, ali su tijekom posttranslacijske modifikacije oskudno O-glikozilirani (64). Prema Yeo i suradnicima, gd-IgA1 je normalno prisutan na površini sluznice, a prisutnost u serumu nastaje zbog neke suptilne greške u mukoznom imunološkom sustavu (64). Naime, B stanice podliježu aktivaciji i programiranju u lokalnom imunološkom miljeu sluznice, ali je moguće da se „prokrijumčare“ u koštanu srž i oslobađaju gd-IgA1 izravno u sistemni krvotok (64). U serumu gd-IgA1 ima veću sklonost agregiranju, a na N-acetilgalaktozamin u zglobnoj regiji se stvaraju specifična protutijela razreda IgA ili IgG (66-69). U sluznicama je smanjen broj plazma stanica koje luče sIgA, dok je povećan u koštanoj srži (70,71). Prema tome, gd-IgA1 je normalni O-glikozilirani oblik IgA1 na površini sluznice, a njegova povećana prisutnost u serumu i mezangiju u IgAN odražava disregulaciju imunološkog sustava sluznice. Osim „krijumčarenja“ mukoznih B stanica i plazma stanica u koštanu srž, postoji

poremećaj mukoznog imunološkog odgovora na antigen i nekontrolirani sistemni odgovor (64). Iako je mukozno-renalna osovina već dugo poznata, nije još jasno koje promjene u mukoznom imunološkom sustavu prethode povećanju razine gd-IgA1 u serumu bolesnika. U kliničkoj praksi se zna da nakon infekcije gornjih dišnih puteva bolesnici s IgAN obično dobiju hematuriju („sinfaringitis hematurija“) i u serumu imaju povećanu koncentraciju cirkulirajućih IgA imunokompleksa (72). IgAN je povezana s bolestima u kojima je imunološki sustav sluznice oštećen, npr. u celijakiji i upalnoj bolesti crijeva. Dokazi o disreguliranom mukoznom imunološkom odgovoru na antigen temelje se na ispitivanju interakcije mikrobioma s mukoznim imunološkim sustavom u bolesnika s IgAN. Posebnu pozornost privukao je sastojak glutena, glijadin. Miševi koji su nakon okota bili podvrgnuti dijeti bez glutena i potom izloženi dijeti bogatoj glutenom, imali su u serumu anti-glijadinska IgA protutijela, a u mezangiju depozite IgA (73). Nedavno je razvijen model transgeničnog miša koji izražava humani IgA1 i CD89 i spontano obolijeva od IgAN. Međutim, ako se takvi miševi u tri generacije hrane dijetom bez glutena, značajno se smanje mezangijski depoziti IgA i glomerularna upala (74).

Molekularna regulacija mukoznog imunološkog odgovora je vrlo složena. Prirođeni imunološki odgovor izazvan je vezivanjem antigena na TLR i čimbenik aktivacije B stanica (BAFF od engl. *B-cell activating factor*) te ligand APRIL (engl. *a proliferation-inducing ligand*) koji potiče proliferaciju (66). B stanice izražavaju TLR-4, TLR-9 i TLR-10 koji su uključeni u patogenezu IgAN (66,75). Stimulacija TLR pokreće kaskadu signala koja rezultira sintezom interferona (IFN), proupalnih i efektorskih citokina koji usmjeravaju stečeni imunološki odgovor (64). Citokin BAFF je potentni aktivator B stanica iz obitelji TNF liganda. BAFF utječe na sazrijevanje i preživljavanje B stanica, a razina mu je povišena u infekcijama i autoimunim bolestima gdje korelira s koncentracijom autoprotutijela (64). U miševa koji pojačano izražavaju BAFF, povišena je razina pIgA i pojačano odlaganje IgA u mezangiju. APRIL je član superobitelji liganda čimbenika tumorske nekroze, a dijeli zajedničke receptore s BAFF i tako utječe na sazrijevanje i preživljavanje B stanica, kao i sazrijevanje plazma stanica koje luče IgA (64,76). Povećana razina APRIL povezana je s povišenom razinom gd-IgA1 (77). U tonzilama bolesnika s IgAN razine TLR9 i APRIL su povišene, a stimulacija TLR9 inducira izražaj APRIL u tonzilarnim B stanicama (77,78). Izgleda da je programiranje B-stanica u sluznici preko TLR, BAFF i APRIL ključno u razvoju IgAN (64) (Slika 6).



Slika 6. Mukozni imunološki odgovor u patogenezi IgA nefropatije (79).

Nove imunomodulacijske strategije liječenja mogle bi biti crijevna terapija budesonidom, blisibimodom (antagonist BAFF-a), ataciceptom (fuzijskim proteinom koji blokira BAFF i APRIL) i hidroksiklorokinom (inhibitorom TLR9). Pokazalo se da sistemna B stanična deplecija rituksimabom nije učinkovita (80-83). Zanimljivo je da u bolesnika s IgAN nije promijenjena O-galaktozilacija serumskog IgD, što znači da gd-IgA1 nije posljedica urođenog generaliziranog oštećenja enzima galaktozilacije u svim B stanicama (84). U nastanku gd-IgA1 ulogu imaju genetski i epigenetski čimbenici jer je prema studijama obiteljskih kohorti velika mogućnost nasljeđivanja gd-IgA1, do 80% (85). Pokazalo se da razina ukupnog IgA u serumu ima nisku nasljednost te da O-galaktozilacija IgA1 nije ovisna o serumskoj koncentraciji IgA (64). U kliničkoj praksi je zabilježeno da u bolesnika s IgAN može doći do povrata bolesti u presatku, a obrnuto, da u bubregu s IgAN koji je nehotice transplantiran primatelju bez IgAN depoziti IgA budu spontano uklonjeni (86-88). Navedena opažanja ukazuju da je incijalni okidač u patogenezi IgAN vjerojatno izvan bubrega (64).

1.2.1.2.2. Drugi udarac – proizvodnja protutijela specifičnih za O-glikan

Iako je u patogenezi IgAN ključna prisutnost gd-IgA1, to nije dovoljno za razvoj kliničke bolesti. Na O-glikan se stvaraju specifična protutijela IgG ili IgA1 razreda, a nastali se cirkulirajući imunokompleksi prolaskom kroz bubreg, deponiraju u mezangiju i tako započinje glomerularno oštećenje. Serumska razina protutijela za O-glikan povezana je s aktivnošću i progresijom bubrežne bolesti (89,90). Ta protutijela razreda IgG u varijabilnom

području teškog lanca sadrže specifičnu sekvencu aminokiselina Y1CS3 koja se po S3 razlikuje od sekvence Y1CA3 na istom mjestu u zdravih kontrola (64). Smatra se da je ostatak S3 kritičan za vezanje na gd-IgA1. Ta zamjena nije nađena u embrionalnoj DNK te je rezultat somatske mutacije, možda pod utjecajem specifičnih antigena iz okoline (68,91). Promjene u O-galaktozilaciji IgA1-zglobne regije rezultiraju konformacijskom promjenom molekule i izlaganjem novih epitopa u zglobnoj regiji. Novi epitopi potiču stvaranje specifičnih protutijela na O-glikan i/ili mogu biti pogrešno prepoznati kao glikoproteini bakterijske ili virusne stijenke (molekularna mimikrija) (64). U genomskim studijama bolesnika s IgAN dokazana je uloga HLA lokusa na kromosomu 6p, što upućuje na ulogu disreguliranog stečenog imunološkog odgovora u preferencijalnom predstavljanju gd-IgA1 kao autoantigena (72).

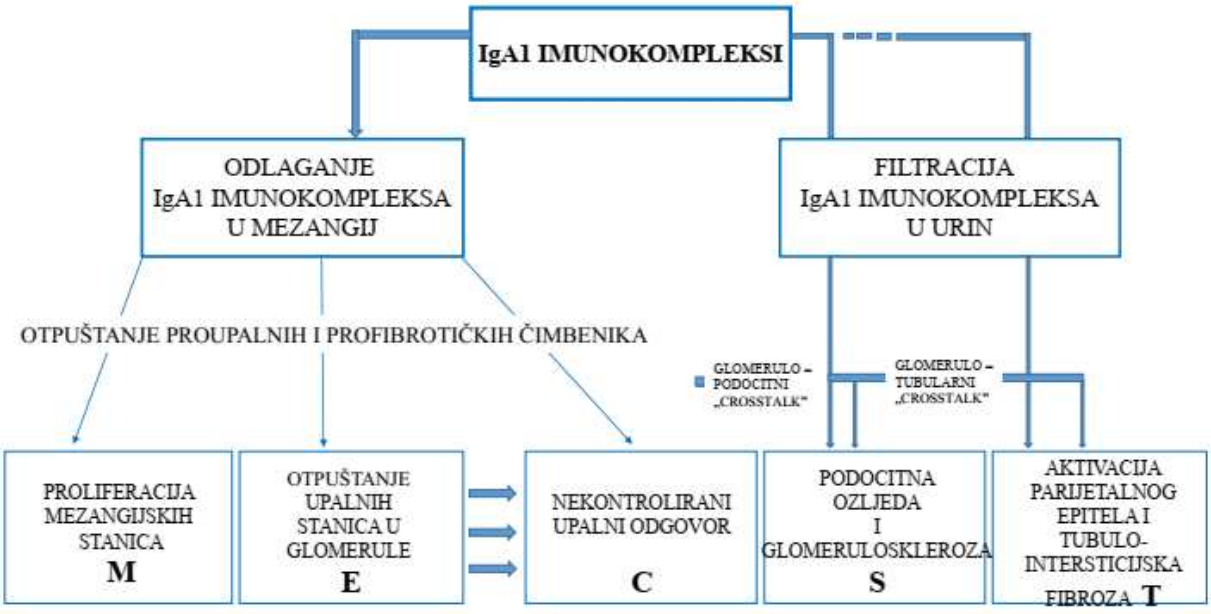
1.2.1.2.3. Treći udarac – stvaranje imunokompleksa

Povećana razina gd-IgA1 i proizvodnja protutijela specifičnih za O-glikan rezultiraju stvaranjem imunokompleksa koji se odlažu u mezangij u obliku depozita i izazivaju glomerularno oštećenje. Mezangijalno odlaganje IgA relativno je čest subklinički nalaz u općoj populaciji, posebno u Azijata (64). Ne zna se jesu li takvi depoziti IgA biokemijski različiti i imunološki inertni, ili postoje čimbenici u bubrezima koji sprječavaju glomerularno oštećenje. Mehanizmi odgovorni za izazivanje glomerularnog oštećenja u IgAN su različiti od mehanizma odgovornog za deponiranje u mezangij (92-94). Kiryluk i suradnici su pokazali da djeca s IgAN ili HSP često imaju roditelja sa sličnim serumskim IgA1 O-glikoformnim profilom, ali bez bolesti bubrega, što ukazuje da je za očitovanja glomerularne bolesti potreban drugi udarac (95). Prekomjerno stvaranje imunih kompleksa u IgAN nastaje zbog abnormalne interakcije cirkulirajućeg IgA1 i solubilnog CD89 (64).

1.2.1.2.4. Četvrti udarac – deponiranje imunokompleksa u mezangij

Deponiranje imunih kompleksa je posljedica njihova „zarobljavanja“ u mezangiju i povećanog afiniteta gd-IgA1 za fibronektin i kolagen tipa IV u izvanstaničnom matriksu (96,97). IgG iz imunokompleksa također može vezati Fcγ receptore na mezangijskim stanicama (98). Mezangijske stanice aktiviraju se nakon vezanja gd-IgA1-CD89 kompleksa

na transferinski receptor CD71, čime se stimulira izražaj CD71 na mezangijskim stanicama (99). To podržava glomerularno oštećenje povezano s alternativnim putem aktivacije komplementa (properdin i faktor H), lektinskim putem (manoza vezujući lektin i s njima povezane serinske proteaze 1 i 2 te C4d) i odlaganjem C3 (100). U reakciji na depozite IgA, mezangij luči IL-6, TNF alfa i TGF koji potiču proliferaciju mezangijskih stanica i upalnu infiltraciju. U spektru histoloških promjena najčešće se vide hipercelularnost mezangija i proširenje matriksa do segmentalne skleroze, rjeđe endokapilarna proliferacija i ponekad nekroza GBM s rupturom, stvaranjem polumjeseca, kolapsom klupka i ožiljkavanjem glomerula (64). Citokini djeluju parakrino uzrokujući oštećenje podocita, tzv. glomerulo-podocitni „*šum u komunikaciji*“ (engl. *crosstalking*). Zbog povećane propusnosti filtracijske barijere, citokini i IgA imunokompleksi dospijevaju u ultrafiltrat i aktiviraju epitelne stanice proksimalnog kanalića, što vodi u oštećenje tubulointersticija (tzv. glomerulo-tubularni *šum*) (64). Glomerulo-podocitna i glomerulo-tubularna komunikacija su nužne kako u razvoju nefrona, tako i održavanju funkcije filtracijske barijere (101). Stoga ometanje intraglomerularnog signaliziranja potiče nastanak GB. Povezanost oštećenja s patološkim nalazom, odnosno MEST-C zbrojem u IgAN pokazuje Slika 7.



Slika 7. Shema oštećenja nefrona u IgA nefropatiji (64).

1.2.1.3. Liječenje IgA nefropatije

Nema specifične terapije za liječenje IgA nefropatije (69). Usporavanje napredovanja bolesti zasniva se na općim mjerama - kontroli krvnog tlaka blokatorima renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava (RAAS) i ograničenju unosa soli (69). Preporuča se niskoproteinska dijeta s 0,8 g/kg TT/dan, prestanak pušenja i liječenje sastavnica metaboličkog sindroma (102). Prema nekim autorima korisno je uvođenje malih doza blokatora aldosterona, npr. spironolaktona u dozi 25 mg/dan. Nije jasan protuupalni učinak ribljeg ulja koje sadrži omega-3 polinezasićene masne kiseline (69). Tonzilektomija se ne preporuča u KDIGO smjernicama, ali je japanske smjernice savjetuju u ranoj fazi bolesti, neovisno o anamnezi tonzilitisa (103).

S obzirom na heterogenost IgAN i oprječnu učinkovitost pojedinih vrsta terapije, neki autori smatraju da IgAN nije jedna bolest, već skupina bolesti sa zajedničkom patološkom prezentacijom mezangijskog depozita IgA (104). Sistemna kortikosteroidna terapija preporuča se u bolesnika s proteinurijom iznad 1 g/dan i glomerularnom filtracijom iznad 50 ml/min/1.73 m^2 (KDIGO) ili 60 ml/min/1.73 m^2 (Japanske smjernice) (103). Međutim, rasprava o dobrobiti imunosupresivne terapije nije završena. Prema VALIGA studiji, bolesnici liječeni RAAS inhibitorima i kortikosteroidima imali su bolji ishod liječenja (smanjenje proteinurije i usporavanje pogoršanja bubrežne funkcije) od bolesnika liječenih samo RAAS inhibitorima (102,105). Taj je učinak bio bolji u slučaju M1, S1, T1 zbroja Oksfordske klasifikacije, početnog KK ispod 50 ml/min i proteinurije iznad 1 g/dan (102,106,107). U studiji STOP-IgAN bolesnici su, nakon 6 mjeseci intenzivnog potpornog liječenja, randomizirani na način da su jedni primali imunosupresivnu terapiju (kortikosteroidi i ciklofosfamid, potom azatioprin), a drugi nastavili potporno liječenje (108). Nakon tri godine praćenja, skupina koja je primala imunosupresivnu terapiju imala je bolju redukciju proteinurije, ali mali povoljan učinak na progresiju bolesti (109,110). Primjena kortikosteroida je bila povezana s većom stopom kliničke remisije, ali više nuspojava kao što su poremećaj metabolizma glukoze, debljanje i infekcije. Studija TESTING usporedila je učinkovitost metilprednizolona (0,8 mg/kg/dan; maksimalno 48 mg/dan) s placebom i pokazala da relativno visoka doza kortikosteroida ima potencijalnu korist u smanjenju proteinurije i progresiji bolesti. Studija je prekinuta zbog značajno povećanog broja štetnih događaja, tj. po život opasnih infekcija (111). U nedavno objavljenom sustavnom pregledu o učinkovitosti imunosupresivne terapije u IgAN, analizirano je 58 studija s ukupnim brojem od 3933 ispitanika (112). Zaljučeno je: a) da je liječenje kortikosteroidima 2 do 6 mjeseci

učinkovitije od placeba u smanjenju rizika od opadanja GF, dvostrukog povišenja sK i progresije do terminalnog stadija KBB; b) zajednička primjena kortikosteroida s RAAS inhibitorima je učinkovitija nego svakog lijeka pojedinačno; c) u ispitanika s proteinurijom iznad 1 g/dan liječenje kortikosteroidima je povezano sa smanjenjem proteinurije i smanjenim rizikom od progresije u završni stadij KBB; d) rijetki su dokazi nuspojava poput infekcija, malignoma ili smrti; e) drugi imunosupresivni lijekovi ne poboljšavaju klinički ishod u bolesnika s IgAN.

U fazi kliničkih ispitivanja su atacicept (fuzijski protein koji može blokirati učinak BAFF i APRIL), blisibimod (selektivni antagonist BAFF), TRF budezonid (za lokalnu primjenu u distalnom ileumu, glavnom izvoru mukoznih limfocita B), bortezomib (semiselektivni plazma stanični inhibitor proteasoma) dosad primjenjivan u liječenju mijeloma, ACTHr ili adrenokortikotropni hormon (ACTH) koji djeluje putem melanokortinskog receptora 1 i u SAD je odobren za liječenje idiopatskog NS i NS uzrokovanog lupus nefritisom, Avacopan (blokator receptora C5a komponentne komplementa), LNP023 (inhibitor faktora B, odnosno alternativnog puta aktivacije komplementa) i OMS721, inhibitor MASP-2 - ključne komponente aktivacije lektinskog puta komplementa (64).

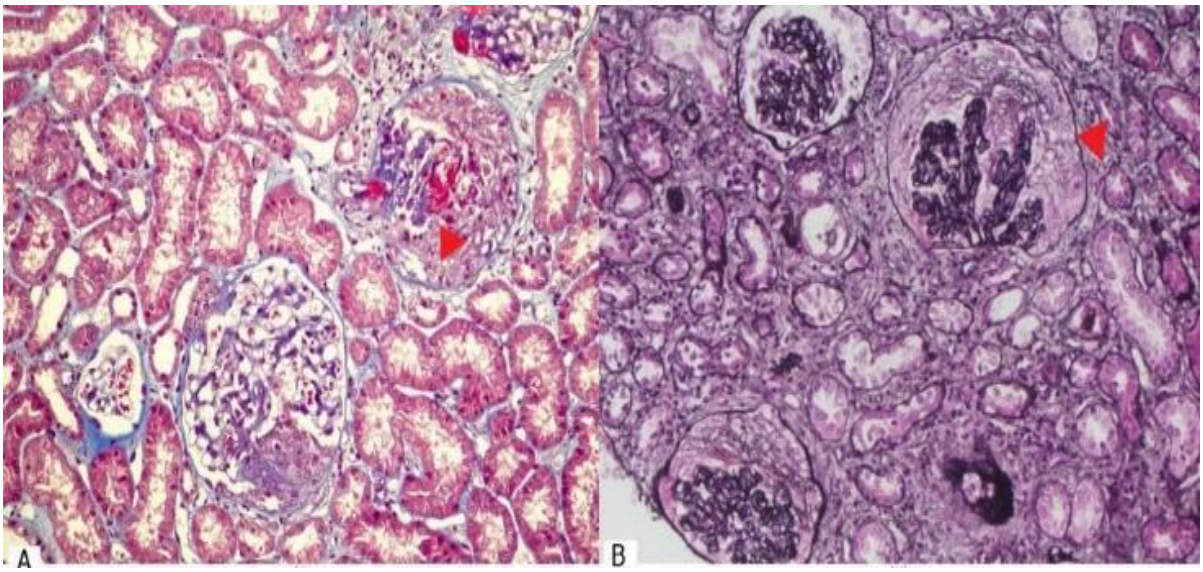
1.2.1.4. Prognoza IgA nefropatije

U trećine bolesnika bolest kroz godine progredira do završnog stadija KBB (113). Loši prognostički pokazatelji su proteinurija nefrotskog ranga, arterijska hipertenzija, snižena glomerularna filtracija i histološki zbroj M1, S1, T1 i T2 (45,0113,114). Loš prognostički pokazatelj je povišena razina cirkulirajućeg gd-IgA1 i imunog kompleksa sa specifičnim protutijelom IgG ili IgA1 razreda (115).

1.2.2. Henoch-Schönlein purpura

Henoch-Schönlein purpura (HSP) je prema novoj nomenklaturi imunoglobulin A vaskulitis. Kliničku sliku opisao je 1801. godine Heberden u petogodišnjeg dječaka s bolovima u trbuhu, hematokezijom, artralgijom, hematurijom i purpurom; mnogo kasnije Henoch i Schönlein sagledali su tu kliničku sliku kao sindrom (116). Čak 90% slučajeva javlja se u dječjoj dobi (117). Najčešći je oblik sistemskog vaskulitisa u djece, s incidencijom

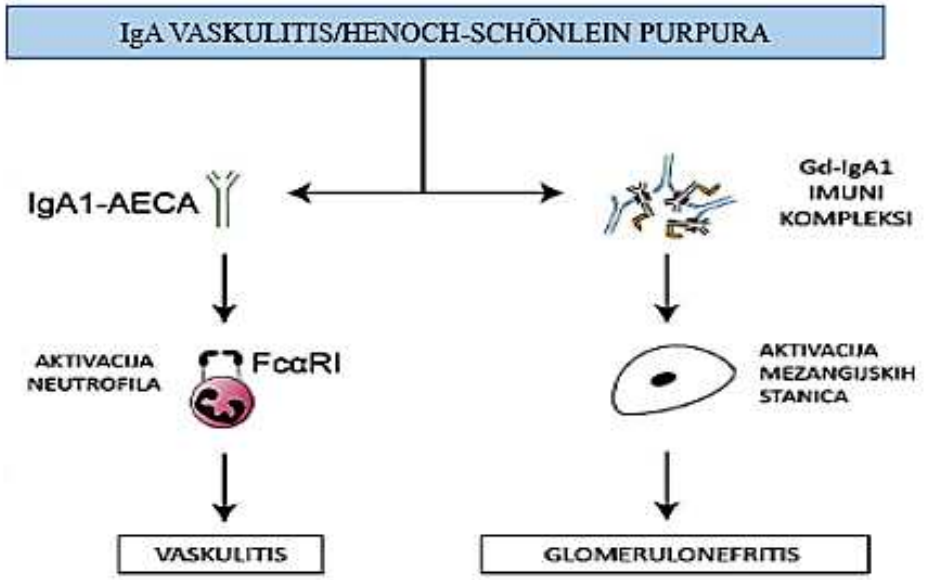
3 - 26,7 na 100 tisuća djece, dok je učestalost u odrasloj populaciji 0,8 - 1,8 na 100 tisuća stanovnika (118). Za razliku od drugih vrsta sistemskog vaskulitisa, HSP je u većini slučajeva samoograničavajuća bolest. Sindrom sačinjavaju palpabilna purpura (bez trombocitopenije i koagulopatije), artritis ili artralgija, bol u trbuhu i nefritis u polovice bolesnika (116). HSP je imunoposredovani vaskulitis povezan s taloženjem IgA u stijenku malih krvnih žila. Etiološki su važni imunološki, genetski i okolišni čimbenici (119). Bolest je učestalija tijekom hladnih mjeseci, češća je u sjevero-istočnoj Aziji, u muške djece i bolesnika s Helicobacter pylori infekcijom (120). Karakterističan nalaz je leukocitoklastični vaskulitis s imunokompleksima. U biopsiji kožnih lezija vidi se u papilarnom dermisu upala stijenke postkapilarnih venula (47). U infiltratu su neutrofili i monociti, a na imunofluorescenci depoziti IgA, C3, C5-C9 i fibrina, rjeđe IgG i IgM (121,122). Osim u krvnim žilama kože, depoziti se nalaze u mezangiju i stijenci glomerularnih kapilara (47). Prema klasifikaciji ISKDC (*International Study of Kidney Disease in Children*) HSP u djece podjeljena je u šest stupnjeva: 1 - minimalne promjene, 2 – mezangijska proliferacija, 3 - proliferacija ili skleroza s manje od 50% polumjeseca a) fokalno ili b) difuzno, 4 - mezangijska proliferacija ili skleroza s 50-75% polumjeseca a) fokalno ili b) difuzno, 5 - mezangijska proliferacija ili skleroza s više od 75% polumjeseca (a) fokalno ili b) difuzno, 6 - nalik na membranoproliferativni glomerulonefritis (123) (Slika 8).



Slika 8. HSP nefritis: a) fibrinoidna nekroza glomerularnih kapilara s rupturom GBM i b) brojnim celularnim polumjesecima (HE i Jones, 400 x)

1.2.2.1. Patogeneza Henoch-Schönlein purpure

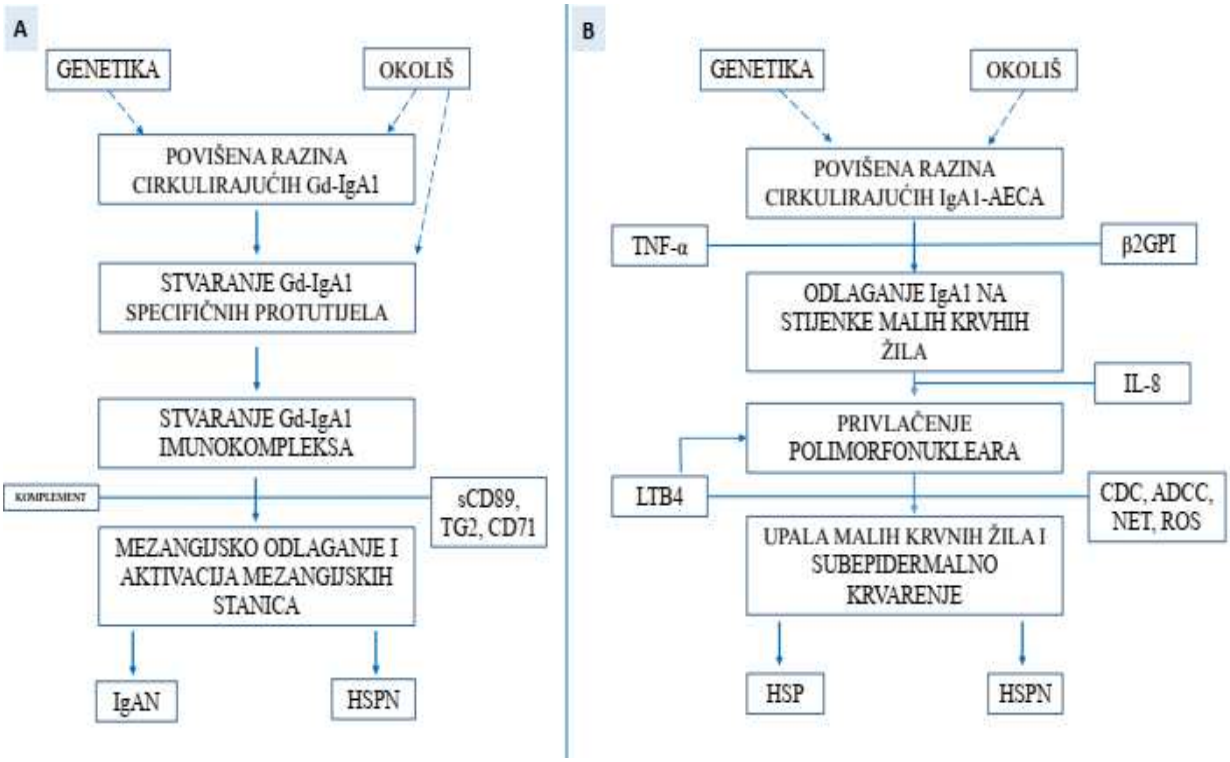
Iako je bolest opisana pred 200 godina, patogeneza još uvijek nije u potpunosti razjašnjena (116). HSP je karakterizirana odlaganjem IgA1 imunih depozita i komplementa u krvne žile i glomerule te infiltracijom neutrofila (120). Prema Heineke i suradnicima prisutni su gd-IgA1 imunokompleksi i, još važnije, IgA1 protutijela na endotelne stanice (120). Iako su gd-IgA1 imunokompleksi uključeni u patogenezu glomerulonefritisa u IgAN i HSP, nije poznato imaju li ulogu u patogenezi sistemnog vaskulitisa (120) (Slika 9).



Slika 9. Patogeneza Henoch-Schönlein purpure (120). AECA:anti-endothelial cell antibodies, FcαRIFc receptor za IgA.

AECA (*anti-endothelial cell antibodies*) su heterogena skupina IgA1 autoprotutijela koja se vežu na slabo opisane antigene na humanim endotelnim stanicama (120). IgA iz seruma bolesnika s HSP mogu se *in vitro* vezati na humani endotel što potvrđuje postojanje IgA-AECA (124). Smatra se da IgA1 autoprotutijela vežu za sada nepoznati (auto)antigen (120). Neki mikroorganizmi imaju antigene strukture koje nalikuju stijenci krvnih žila i infekcija tim mikroroganizmima može potaknuti stvaranje protutijela koja križno reagiraju s humanim

endotelom (125). Kandidat antigen je β2GPI (β2-glikoprotein I), serumska molekula koja se veže na fosfolipide na površini endotelnih stanica (126). Adherencijom β2GPI na endotelnu stijenku otkrivaju se inače skriveni antigeni (127). IgA receptor FcαRI na neutrofilima ima ključnu ulogu u patogenezi Henoch-Schönlein purpure (120). IgA-AECA potiču sintezu citokina poput IL-8, što za posljedicu ima stvaranje upalnog okruženja, kemotaksiju neutrofila i vaskularno krvarenje (120,128,129). Prema teoriji višestrukih udaraca Heineke i suradnika, u patogenezi sistemnih simptoma u HSP i HSPN bitni su a) povećana serumska koncentracija IgA1-AECA, b) protutijela se vežu na β2GPI na endotelu malih krvnih žila c) vezanje na endotel potiče sintezu IL-8 koji je kemoatraktant za neutrofile, d) interakcijom IgA1 i FcαRI neutrofili se aktiviraju, otpuštaju leukotrijen B4 kojim privlače i aktiviraju druge neutrofile. Aktivirani neutrofili otpuštaju TNF-α, što potiče daljnju aktivaciju endotela koji izlaže inače skrivene antigene (120) (Slika 10).



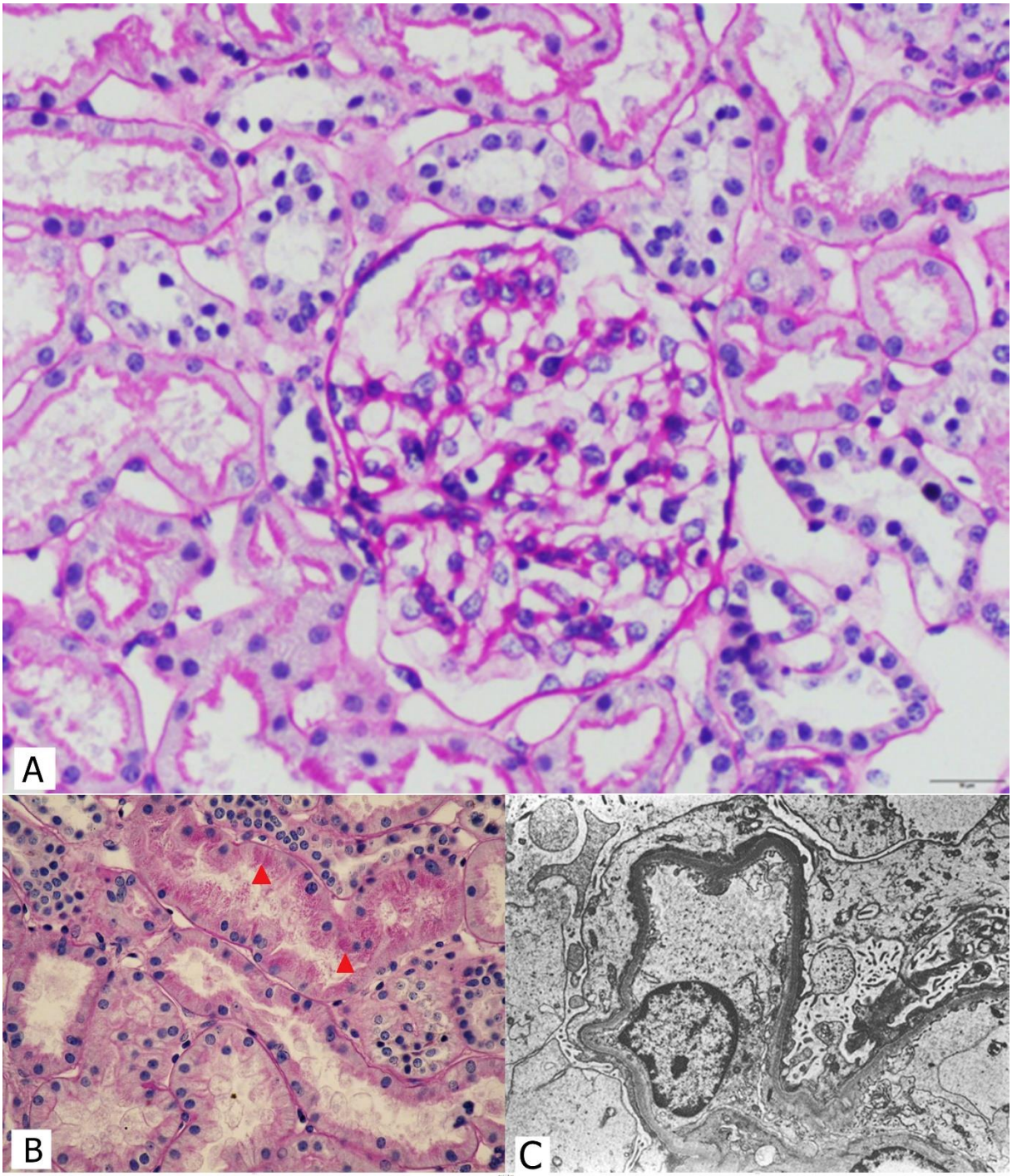
Slika 10. Predloženi model višestrukih udaraca u patogenezi glomerulonefritisa (A) i vaskulitisa u HSP i HSPN (B) (120). ADCC: protutijelima posredovana stanična citotoksičnost, AECA: anti-endotelna protutijela, β2GPI: β2-glikoprotein I, CDC: citotoksičnost posredovana komplementom, Gd-IgA: Galaktoza oskudni (deficijentni)imunoglobulin A1, NETs: *neutrophil extracellular traps*, ROS: reaktivni kisikovi radikali, TG- transglutaminaza, LTB4 leukotrijen B4, HSPN Henoch Schonleein purpura nefritis

1.2.2.2. Liječenje i prognoza HSP

Većina bolesnika s HSP liječi se simptomatski; ako je zahvaćen probavni sustav, treba izbjegavati nesteroidne antireumatike. Blaga do umjerena proteinurija zahtjeva primjenu ACE inhibitora. Primjena kortikosteroida, npr. prednizona 1-2 mg/kg/dan, maksimalne doze 60-80 mg/dan preporuča se radi skraćenja trajanja bolova u trbuhu, ali učinak nije dokazan za druge manifestacije bolesti (130). Za bolesnike koji ne toleriraju *per os* terapiju daje se ekvivalentna doza parenteralnog metilprednizolona u dozi 0,8-1,6 mg/kg/dan do maksimalne doze 64 mg/dan. U 11% bolesnika bolest napreduje do najvišeg stadija KBB (119). Nepovoljni prognostički pokazatelji povezani s progresijom bolesti su proteinurija iznad 1 ili 1,5 g/dan i snižena glomerularna filtracija, a u bioptičkom nalazu fibrinoidna nekroza s polumjesecima, visoki udio intersticijske fibroze i glomeruloskleroze (119).

1.2.3. Bolest minimalnih promjena

Bolest minimalnih promjena je jedan od najčešćih uzroka idiopatskog nefrotskog sindroma s udjelom 10% - 15% u odraslih i 70% - 90% u djece starije od godinu dana (131). Incidencija u djece je 2-7 novooboljelih na 100 tisuća djece i veća je u Aziji (131). U djece dvaput češće obolijeva muški spol, a u kasnijoj životnoj dobi oba spola podjednako (132,133). BMP se prezentira masivnom proteinurijom i edemima koji dobro odgovaraju na peroralnu terapiju prednizonom u standardnoj dozi. U djece se bolest liječi *ex juvantibus* bez biopsije bubrega jer je obično osjetljiva na steroide (131). Mikroskopski se na svjetlosnoj mikroskopiji nalaze samo hipertrofični podociti bazofilne citoplazme i u epitelu kanalića apsorptivne kapljice; na imunoflorescenci nema imunih depozita, a na elektronskoj mikroskopiji nalazi se difuzni gubitak nožica podocita (Slika 11).



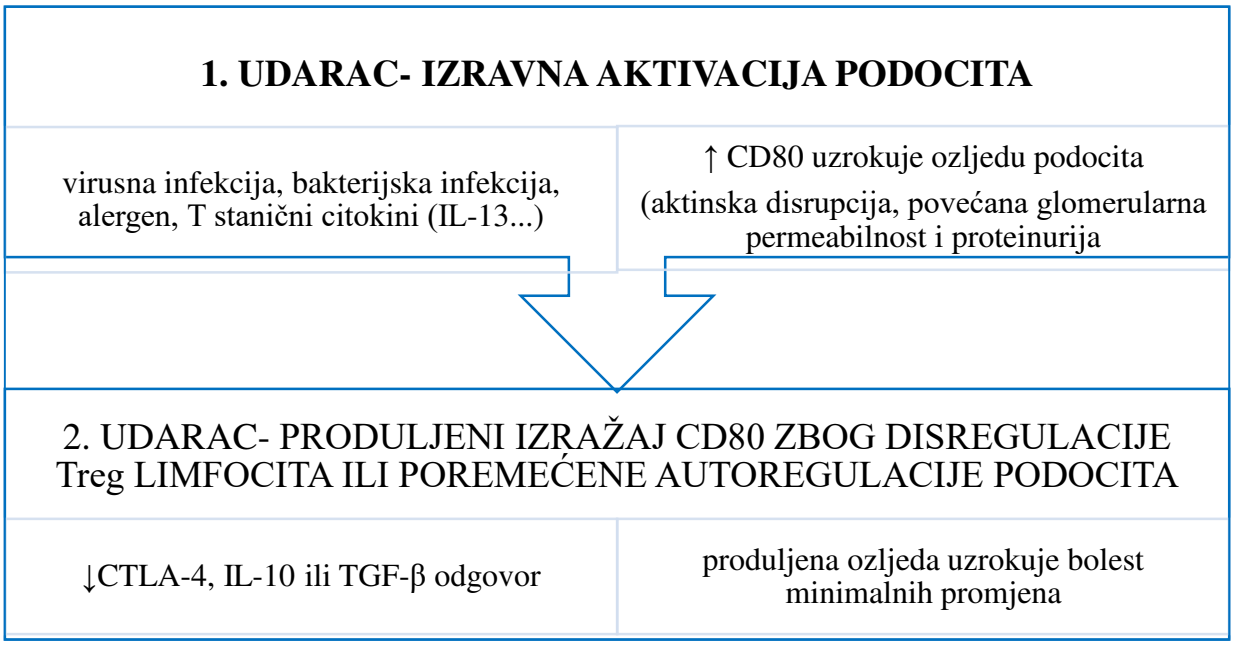
Slika 11. Bolest minimalnih promjena: A) uredan izgled glomerula uz blago naznačenu hipertrofiju podocita (PAS, 400 x), B) resorpcija proteina u proksimalnim kanalićima i C) potpuni gubitak nožica podocita (4000 x).

Blaga žarišna proširenost mezangija s 3-4 stanice po segmentu, ili difuzna mezangijska hipercelularnost s više od 4 mezangijske stanice po segmentu u ≥ 80% glomerula predstavljaju varijante BMP (134). Za razliku od klasične BMP, varijante se mogu

prezentirati hematurijom i hipertenzijom (134). Ako se u imunofluorescenci nađe mezangijski depozit IgA, a histološki nalaz i nedostatak podocitnih nožica odgovaraju BMP, dijagnosticira se IgA nefropatija s BMP (131,135,136). Fokalno segmentalno bojanje na IgM i C3 upućuje na FSGS čak i kad se ne nađe sklerotičnih lezija tj. „ne može se isključiti FSGS“. (131). U kliničkoj prezentaciji bolesti minimalnih promjena dominiraju edemi donjih udova, edemi genitalno ili periorbitalno, koji put uz ascites, pleuralni/perikardijalni izljev, trombozu renalnih vena i snižen arterijski tlak (137). Infekcije poput sepse, upale pluća i peritonitisa mogu prethoditi bubrežnoj bolesti. Laboratorijskom dijagnostikom dokaže se na urinskoj traci proteinurija 3+/4+ (≥ 300 mg/dl) i u 20% bolesnika mikrohematurija (137). Analizom 24-satnog urina dokaže se proteinurija nefrotskog ranga s > 40 mg/h/m^2 ili PCR (*protein creatinine ratio*) > 200 mg/mmol u djece i proteinurija > 3,5 g/d u odraslih (137,138). U biokemijskim nalazima snižena je vrijednost ukupnih proteina, albumina, ukupnog kalcija, nalazi se hiperlipidemija, povišena je α2-globulinska i snižena γ-globulinska frakcija. U imunoelektroforezi je značajno snižen IgG, diskretno IgA, IgM je povišen, a IgE povišen ili u referentnim vrijednostima. Povišena je vrijednost hemoglobina i hematokrita, fibrinogena, faktora zgrušavanja V i VIII, proteina C i broja trombocita (137).

1.2.3.1. Patogeneza bolesti minimalnih promjena

Dugo se smatralo da je patogeneza BMP povezana sa sistemnim poremećajem T limfocita i stanično posredovanom imunošću (139). Istraživanja Perieira i Sahali su pokazala da u aktivnoj fazi postoji neravnoteža subpopulacije CD8+ supresorskih limfocita T i prevalencija T pomoćničkih limfocita tipa 2 koji imaju citokinski profil: IL4, IL5, IL-8, IL9, IL10, IL13, IL-18 (139-143). Ni jedan citokin nije po sebi patogen, ali je povećana razina različitih citokina mogući patogenetski čimbenik (144). U nekim istraživanjima nađena je slabija funkcija regulatornih limfocita T (Treg) (145). Ti su limfociti zaduženi za održavanje imune homeostaze i toleranciju na vlastite antigene (146). Druge studije naglašavaju ulogu limfocita B, što podupire povezanost alergijske dijateze s početkom BMP i dobar učinak terapije rituksimabom, monoklonskim protutijelom protiv CD20 pozitivnih limfocita B (143). U relapsu BMP je u pomoćničkim T stanicama i B stanicama pojačano aktiviran NF kapa B (147). Moderni doprinos razumijevanju patogeneze BMP dao je Shimada. Prema njegovoj *hipotezi dva udarca* središnju ulogu ima membranski glikoprotein CD80 (B7-1), kostimulacijska molekula za aktivaciju limfocita T (148) (Slika 12).



Slika 12. Patogeneza bolesti minimalnih promjena prema teoriji dva udarca (148).

CD80 je izražen na dendritičkim stanicama, makrofagima i B limfocitima, a u glomerularnim bolestima na podocitima i tubularnom epitelu, gdje se normalno ne nalazi (143,149). Podociti i tubularni epitel mogu izraziti CD80 zbog vezanja bakterijskih lipopolisaharida na *Toll-like* receptor-4, djelovanja alergena ili T staničnog citokina IL-13 (143,148,149).

Prema Shimadi, u BMP je u prvom udarcu izražaj CD80 na podocitima povezan s promjenom njihova oblika i disrupcijom SMA, što uzrokuje povećanu permeabilnost filtracijske barijere i proteinuriju (148). U drugom udarcu zbog smanjene autoregulacije podocita i disregulacije Treg limfocita, CD80 ne može biti isključen i podržava patološko stanje podocita. U normalnim okolnostima, Treg stanice inhibiraju imunosni odgovor tako da otpuštaju solubilni citotoksični T limfocitni antigen 4 (CTLA-4), IL-10 i TGF- β koji se vežu na dendritične stanice i suprimiraju izražaj CD80, čime se blokira kostimulacijska aktivnost T limfocita. Prolaskom kroz filtracijsku barijeru, iste molekule blokiraju izražaj CD80 na podocitima (148).

U recentnoj literaturi navode se drugi potencijalni posrednici u patogenezi BMP. Hemopeksin je plazmastanični protein koji se veže na sijaloglikoproteine na podocitima, što dovodi do proteinurije i gubitka nožica (150,151). U nastanku BMP i FSGS spominju se protein nalik

angiopoetinu-4 i c-mip (152). U eksperimentalnim modelima povećani izražaj c-mip je povezan s masivnom proteinurijom bez stanične proliferacije jer c-mip utječe na podocitnu signalizaciju, deorganizaciju citoskeleta i gubitak nožica podocita (153).

1.2.3.2. Liječenje bolesti minimalnih promjena

U liječenju BMP primjenjuju se opće mjere kao što su restrikcije unosa tekućine i soli i terapija prednizonom ili prednizolonom (131,154). Nema jedinstvenog konsenzusa o optimalnoj dozi i duljini liječenja. U djece je najčešća shema prednizon 60 mg/m^2 na dan kroz 4 tjedna i 40 mg/m^2 tri dana u tjednu iduća 4 tjedna (155). Povišenje doze ili liječenje duže od 12 tjedana ne doprinose smanjenju relapsa (155,156). Kod rezistencije na steroidnu terapiju (izostanka remisije nakon 4-8 tjedana oralne terapije kortikosteroidima) ili učestalih relapsa, primjenjuju se levamizol, alkilirajući agensi (ciklofosfamid), kalcijneurinski inhibitori (ciklosporin A, takrolimus), antiproliferativni lijekovi (mikofenolat mofetil) i rituksimab (131,156). U liječenju odraslih bolesnika preporučena doza prednizona je 1 mg/kg na dan (maksimum 80 mg/d) ili 2 mg/kg svaki drugi dan (maksimum 120 mg/d) kroz 16 tjedana (minimum 4 tjedna ako se brzo postigne remisija) s postupnim smanjivanjem doze za 5-10 mg/tjedno nakon remisije, kroz 8 tjedana do ukupnog 24-tjednog liječenja (131). U 10%-20% slučajeva je NS otporan na steroidnu terapiju, odnosno za 16 tjedana ne postigne se terapijski odgovor (131). U tih bolesnika se na rebiopsiji može očekivati FSGS (131). Terapija se nastavlja kalcijneurinskim inhibitorima, ciklofosfamidom i takolimusom.

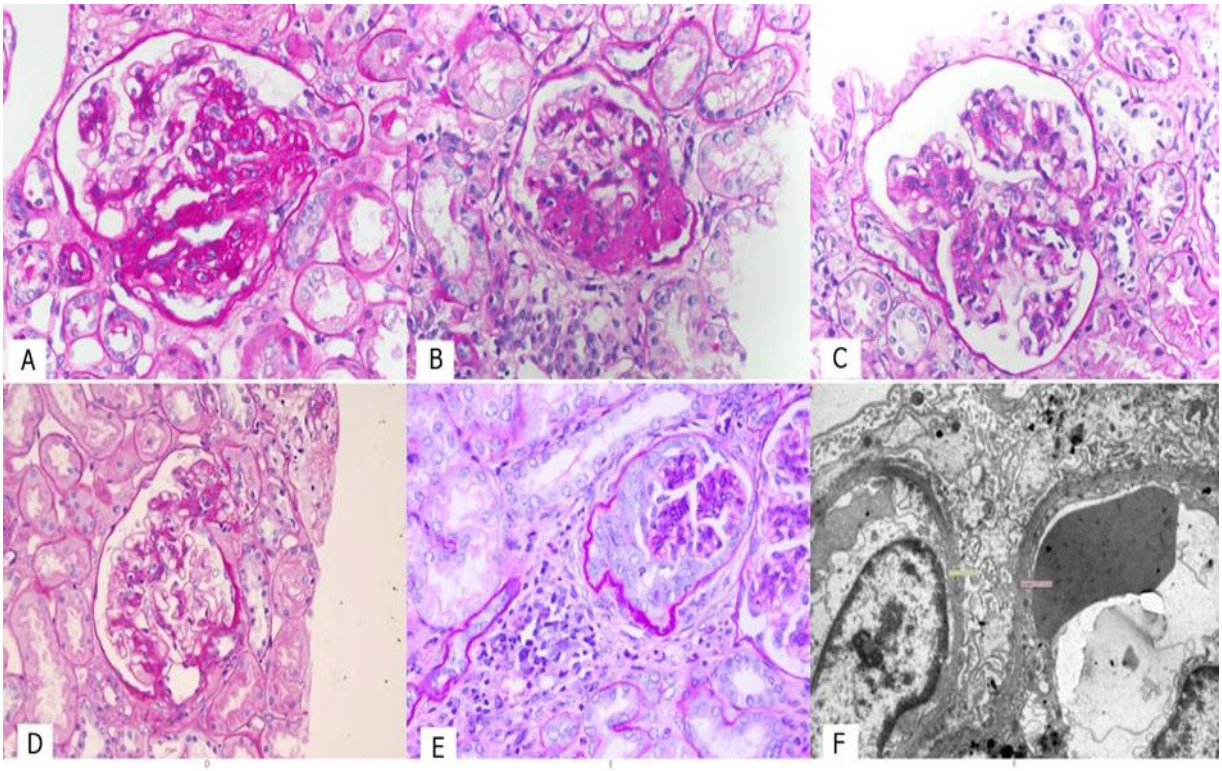
1.2.3.3. Prognoza bolesti minimalnih promjena

Djeca s BMP u većini slučajeva, 80-90%, odgovore na steroidnu terapiju. Od toga 60-80% djece dobije relaps, ali bolest gotovo nikad ne progredira do terminalnog stadija KBB (143). U prvoj epizodi bolesti, 50% djece postigne remisiju za 8 dana do 4 tjedna od početka liječenja steroidnom terapijom (131). U odraslih bolesnika medijan vremena u kojem se postigne remisija je duži, više od 2 mjeseca (131). BMP u djece i odraslih pokazuje visoku sklonost relapsu (131). Nakon prve epizode BMP i nastupa remisije, 30% djece neće dobiti relaps bolesti u narednih 18-24 mjeseca, 20%-30% djece imat će rijetke, a 40%–50% učestale

relapse bolesti (131). U odraslih su relapsi česti, u 56% - 76% slučajava, ali je progresija u KBB rijetka (131).

1.2.4. Fokalna segmentalna glomeruloskleroza

Prvi opis fokalne segmentalne glomeruloskleroze je dao Rich 1957. godine s napomenom da je jedna od najčešćih glomerularnih bolesti i s najvećom vjerojatnošću progresije u najviši stadij KBB (157). Devedesetih godina prošlog stoljeća je od deskriptivne dijagnoze, FSGS reklasificirana u dobro opisanu podocitopatiju čije je temeljno obilježje progresivno glomerularno ožiljkavanje (9,158). Karakterizirana je segmentalnom sklerozom pojedinih glomerula i difuznim skraćivanjem nožica podocita (9, 159). Na FSGS otpada 20% slučajeva NS u djece i 40% u odraslih (159). Incidencija bolesti je 0,2-1,8 na 100 tisuća stanovnika (160). Bolest je 1,5 puta češća u muškaraca te je češća u Afroamerikanaca nego bijelaca (161). Prezentira se najčešće kao NS, u djece u 75% do 90% slučajeva i u odraslih u 50% do 60% slučajeva (159). Na početku bolesti segmentalna glomeruloskleroza može se naći u malom broju glomerula, ali s vremenom broj pogođenih glomerula progredira, a u njima proces sklerozacije napreduje do globalne glomeruloskleroze (159). Svjetlosnom mikroskopijom nalazi se segmentalna i fokalna skleroza glomerula, obliteracija lumena kapilara, hijalinoza, pjenušave stanice i adhezija kapilarnog klupka s Bowmanovom čahurom (47) (Slika 13). Prvo su pogođeni jukstamedularni, a zatim glomeruli vanjske kore (162). U imunofluorescenci nalaze se zrnati i plošni segmentalni depoziti IgM i C3. Elektronsko mikroskopski nađe se gubitak nožica podocita, koji je u primarnoj FSGS karakteristično difuzan (47). S obzirom na raštrkanost oštećenih glomerula, za točnu dijagnozu potrebno je da bioptički uzorak sadržava dovoljan broj glomerula i jukstamedularnu koru. Primjerice, ako uzorak sadrži 20-30 glomerula, šansa za postavljenje ispravne dijagnoze je 80% (163).



Slika 13. Fokalna segmentalna glomeruloskleroza: A) klasična, B) perihilarna, C) celularna, D) vršna i E) kolapsna varijanta (PAS 400 x) i f) difuzni gubitak nožica podocita (4000 x).

1.2.4.1. Klasifikacija FSGS

Danas se FSGS smatra skupom kliničko-patoloških sindroma (159). Njena klasifikacija je složena i temelji se na patofiziološkim mehanizmima, kliničkoj i histološkoj prezentaciji i genetskim obilježjima. Glavne odrednice su morfološka i etiološka podjela. Prema Kolumbijskoj klasifikaciji razlikuje se pet patohistoloških varijanti FSGS: klasična (ožiljna, nespecificirana), perihilarna, vršna (engl. *tip*), celularna i kolapsna varijanta (164). U svim varijantama nalazi se obliteracija lumena kapilara (165). Ako se u bioptatu nalazi više varijanti, klinički tijek određuje teža najteža varijanta i to redom - kolapsna, vršna, celularna, perihilarna i klasična (47) (Tablica 3).

Tablica 3: Kolumbijska klasifikacija fokalne segmentalne glomeruloskleroze (159 i 166).

Varijanta FSGS	Uključujući kriteriji	Povezanost
Klasična	Barem jedan glomerul sa segmentalnom obliteracijom kapilarnog lumena. Može se naći segmentalna kolabirana stijenka kapilara bez prekrivajuće podocitne hiperplazije.	Primarna ili sekundarna (uključujući genetske oblike)
Perihilarna	Barem jedan glomerul s perihilarnom hijalinozom s/bez skleroze. > 50% glomerula sa segmentalnim lezijama mora imati perihilarnu sklerozu i/ili hijalinozu.	Adaptivna
Celularna	Barem jedan glomerul sa segmentalnom endokapilarnom hipercelularnošću koja okludira lumen s/ili bez pjenušavih stanica i karioreksom.	Uglavnom primarna, ali može biti sekundarna
Vršna	Barem jedna segmentalna celularna ili sklerozirajuća lezija na urinarnom polu. Adhezije ili konfluiranje podocita s parijetalim ili tubularnim stanicama u tubularnom lumenu.	Uglavnom primarna
Kolapsna	Barem jedan glomerul sa segmentalnim ili globalnim kolapsom i hipertrofija i hiperplazija podocita.	Primarna ili sekundarna

Prema etiološkoj klasifikaciji iz 2004. godine FSGS se dijeli na primarnu (idiopatsku) i sekundarnu (158). Klasifikacija iz 2011. godine navodi primarnu FSGS, a sekundarnu dijeli na adaptivnu, genetsku, virusom i lijekovima izazvanu FSGS (159). U novije vrijeme u osoba subsaharskog porijekla otkrivena je FSGS povezana s rizičnim alelom APOL1, nastalim kao genska modifikacija u obrani od infekcije Tripanosomom (165).

1.2.4.2. Patogeneza fokalne segmentalne glomeruloskleroze

Primarna FSGS se karakteristično javlja u adolescenata ili mlađih odraslih osoba, a manifestira masivnom proteinurijom, sniženim serumskim vrijednostima albumina i hiperlipidemijom (165). Klinička i eksperimentalna saznanja potvrđuju hipotezu da je cirkulirajući permeabilni čimbenik ključni posrednik u patogenezi, odnosno inicijator bubrežne ozljede u primarnoj i rekurentnoj FSGS (149). FSGS je podocitopatija. Prema predloženom patofiziološkom mehanizmu, značajne promjena u citoskeletu izazvane ozljedom podocita dovode do njihove apoptoze i gubitka u urinarni prostor (167). Ako je ozljeda bila ograničena, preostali podociti hipertofiraju kako bi prekrili ogoljenu površinu

GBM, a mezangij se proširi. Ako ozljeda mnogih podocita premaši kapacitet prilagodbe, na gubitak podocita i ogoljenu GBM reagira lokalni parijetalni epitel (167). Parijetalne epitelne stanice su progenitorne stanice te se mogu aktivirati i diferencirati u smjeru podocitne i tubularne linije (167). Ako je diferencijacija u podocite bila neučinkovita, stanice nemaju sva obilježja podocita i ne mogu se stvoriti interdigitacije. To potiče stvaranje hiperplastičnih lezija u Bowmanovom prostoru i ekspanziju matriksa, što vodi u glomerulosklerozu (167). Limfociti B vjerojatno imaju svoju ulogu u patogenezi FSGS, jer je zabilježen povoljan učinak plazmafereze i terapije lijekovima rituksimab i ofatumumab koji izazivaju depleciju CD20+ B limfocita (149). Osim toga, rituksimab se direkno veže na *sphingomyelin-phosphodiesterase-acid-like-3b* na podocitu čime stabilizira njegov aktinski citoskelet (149). Opisana je uspješna reinplantacija aloplantata bubrega od bolesnika s recidivirajućim primarnim FSGS na bolesnika čija primarna bolest bubrega nije bila FSGS. Transplantirani bubreg uklonjen je prvom bolesniku nakon 14 dana i transplatiran drugom bolesniku u kojem je funkcionirao dobro i bez proteinurije. Eelektronsko mikroskopskom analizom bioptata viđene su regenerirane nožice podocita, koje su bile uredne prije prve transplatacije presatka (168).

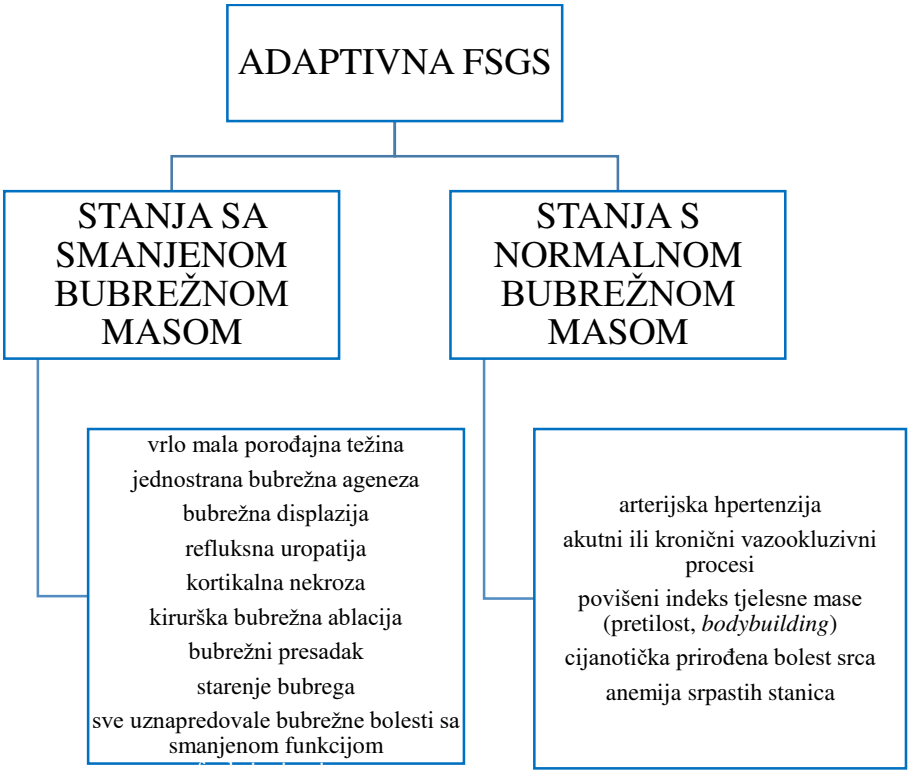
1.2.4.2.1. Primarna FSGS

Primarna FSGS je najbolje definirana onim što nije - ni jedan od drugih oblika FSGS (165). Pretpostavlja se da je uzrokovana cirkulirajućim čimbenikom, moguće citokinom. Predloženi su *cardiotrophin-like cytokine factor* 1 (član IL-6 obitelji koji preko JAK/STAT signalnog puta utječe na podocitni citoskelet), *angiopoetin-like*-4, apoA1b, *vasodilator-stimulated phosphoprotein* (VASP), protutijelo anti-CD40 i *plasma soluble urokinase-type plasminogen activator receptor* (suPAR) (149,165). Posljednji od njih, suPAR je najizgledniji biljeg FSGS, iako njegova uloga nije jasna. Reaktant akutne upale suPAR ima povišenu koncentraciju u raznim patološkim stanjima i nije specifičan za FSGS (165). Kao uPAR je izražen na membrani imunih stanica i endotela. Cijepanjem glikozilfosfatidilinozitola, uPAR se oslobodi s membrane i u serumu nalazi kao solubilna signalna molekula s više domena (suPAR) (165). Takav suPAR utječe na alteraciju podocitnog citoskeleta i djeluje na β3 integrin uzorkujući gubitak nožica podocita (149,165,169). Bolesnici s FSGS imaju značajno veće vrijednosti suPAR u plazmi od bolesnika s drugim vrstama glomerulonefritisa i zdravih kontrola (156,169). Više vrijednosti

su povezane s progresijom u završni stadij KBB, ali se čini da nemaju dijagnostički značaj (156,169). Rezultate suPar testa treba svakako interpretirati u kontekstu populacijske studije i odabira vrste testa, jer povišena vrijednost nije patognomonična za FSGS (156,169). Neki autori upozoravaju da povišene koncentracije suPAR nisu specifične za (rekurentnu) FSGS, već povezane s progresijom bubrežne bolesti neovisno o etiologiji i dijelom posljedica smanjenog gubitka mokraćom (149). Stoga je uloga suPAR u patognezi FSGS i dalje proturječna. U prilog tome da je cirkulirajući čimbenik uzrok bolesti govore vrlo brzi relaps FSGS u presatku (nekoliko sati do tjedana poslije transplatacije) i iskustvo da plazmafereza smanjuje proteinuriju i bubrežno oštećenje (149). Kako bilo, petogodišnje preživljenje bubrežnog presatka u bolesnika s primarnom FSGS je značajno lošije nego u ostalim glomerularnim bolestima (149).

1.2.4.2.2. Adaptivna FSGS

Adaptivna FSGS je posljedica strukturalno-funkcionalnog odgovora na glomerularnu hipertenziju uzrokovanu povišenim glomerularnim kapilarnim tlakom i povećanim protokom (159). Nastaje nakon razdoblja glomerularne hiperfiltracije na razini nefrona koja rezultira glomerulomegalijom, hipertrofijom podocita, stvaranjem sinehija i ekstracelularnog matriksa (170,171). Ta su stanja povezana sa smanjenom ili normalnom bubrežnom masom (Slika 14).



Slika 14. Čimbenici odgovorni za patogenezu adaptivne FSGS (159 i 165)

Značajno smanjenje bubrežne mase prati refleksna vazodilatacija aferentnih i eferentnih arteriola koja uzrokuje ubrzanje protoka u glomerularnim kapilarama (165). Smanjenje vaskularnog otpora je veće u aferentnoj nego eferentnoj arterioli, zbog čega raste glomerularni hidrostatski tlak i nastaje glomerularna hipertenzija. Sve to ubrzava glomerularnu filtraciju i povećava glomerularni volumen i površinu, stvarajući mehanički pritisak na podocite koji hipertrofiraju. U histološkoj slici nađe se glomerulomegalija s pretežno perihilarnim ožiljcima i samo djelomični gubitak nožica podocita (165).

1.2.4.2.3. Genetska FSGS

Genetska FSGS ima dva oblika. Prvi oblik je posljedica genetske predispozicije, a najpoznatiji su genski lokusi APOL1 i PDSS1 (*decaprenyl diphosphate synthase subunit 1*). Prisutnost APOL1 alela predstavlja rizik, ali većina ispitanika s dva rizična alela ipak neće razviti bubrežnu bolest (165). Drugi oblik genetske FSGS je posljedica mutacije jednog od 40-ak identificiranih gena, koja se nasljeđuje po Mendeljevim zakonima (za nuklerne gene) ili

putem mitohondrijske DNK i nosi visoku vjerojatnost razvoja bolesti (engl. *high penetrance*) (165). Neki od identificiranih gena su: COL4A3, NPHS (nefrin), ACTN4, INF2, WT 1 (*Denys–Drash, Frasier*), PLCE1, TTC21B, COL4A4, NPHS2 (podocin), INF2, NUP95, TRPC6, COL4A5, CD2AP, AHRGP24, NUP203, PTPRO (GLEPP1), AHRGDIA, XP05 (eksportin 5), MYO1E, NXF5 (*nuclear export factor 5*), PAX2, ITGB4 (bulozna epidermoliza), MYH9 (*Esptein, Fechtner*), INF2 (*Charcot–Marie–Tooth*), WT1 (*Denys–Drash, Frasier*), KANK4, SCARB2 (akcijski mioklonus), LAMB2 (Pearson), MT-TL1, MT-TL2 tRNA leucin (MELAS), LMX1B (*Nail-patella*), MT-TY, tRNA *tyrosine* (MELAS), COQ2, SMARCAL1 (*Schimke immune-osseous dysplasia*), COQ6,NXF5, PDSS2 (*Leigh*), EYA1 (*Branchio-oto-renal*), ADCK, WDR73, (*Galloway–Mowat*, bubreg-mali mozak sindrom), LMNA (parcijalna lipodistrofija).

1.2.4.2.4. FSGS uzrokovana virusom

FSGS može nastati izravnim djelovanjem virusa na podocit ili oslobađanjem citokina tijekom virusne infekcije koji ulaze u interakciju s podocitnim receptorima (165). Najpoznatiji primjer je kolapsna varijanta FSGS u kojoj su podociti i tubularni epitel inficirani HIV-1 virusom, posebno u osoba s dva APOL1 rizična alela (165). Opisane su FSGS povezane s citomegalovirusom, parvovirusom B19, Epstein-Barr virusom ili Simian virusom 40 (158). Paraziti *Plasmodium malariae*, *Schistosoma mansoni* i filiarijaza mogu također uzrokovati FSGS, stimulirajući mehanizame urođene imunosti s posljedičnim oštećenjem podocita (159,165).

1.2.4.2.5. FSGS uzrokovana lijekovima

Heroinska nefropatija je bila prvoopisana FSGS nastala djelovanjem aktivne tvari, heroina (159). Kolapsna varijanta FSGS je povezana s primjenom interferona. Podocit ima receptore za interferon alfa i interferon beta, a kao odgovor na interferon gama izražava HLA molekule drugog razreda, što upućuje na mogućnost izravnog štetnog učinka na podocit (159). Sve varijante FSGS mogu se naći kod terapije bisfosfonatima, litijem, sirolimusom, anaboličkim steroidima i antraciklinima (159). Toksični učinak kalcijneurinskih inhibitora manifestira se nastankom kolapsne FSGS i hijaline arterioloskleroze zbog akutne ishemije

izazvane jakom vazokonstrikcijom (159). Sirolimus (mTOR inhibitor) djeluje toksično tako da smanjuje izražaj nefrina u pukotinastoj membrani i izražaj proteina u citoskeletu (159). Točan farmakotoksični mehanizam za mnoge od navedenih lijekova još nije u potpunosti poznat (165).

1.2.4.2.6. APOL1 FSGS

APOL1-povezana FSGS je karakteristična za subsaharsko područje, dok u SAD takav oblik ima trećina bolesnika s s FSGS i svi su Afroamerikanaci (165). Apolipoprotein L1 (APOL-1) je protein plazme koji lizira parazita *Trypanosoma brucei brucei*, uzročnika bolesti spavanja. Mutacija alela predstavlja evolucijsku gensku prilagodbu za zaštitu od Tripanosoma i nasljeđuje se dominantno (165). Nasuprot tome, APOL1-povezana FSGS je recesivna jer su mutirane obje kopije gena. Oba mutirana alela značе povećanu vjerojatnost za razvoj bolesti jer je „genetska prodornost“ manja nego u drugim genetskim FSGS (165). Iznimka su HIV-pozitivni bolesnici u kojih je dovoljan jedan mutirani alel (165). APOL1-povezana FSGS može se manifestirati s NS kao primarna FSGS, kao recidiv FSGS u presatku ili kao adaptivna FSGS praćena minimalnim edemima (165). Međutim, bolesnici s APOL1-povezanom FSGS imaju veću vjerojatnost progresije u terminalni stadij KBB, a podatak o APOL1 mutaciji može imati utjecaj pri odabiru živih donora (159,165).

1.2.4.3. Liječenje i prognoza

Na donošenje odluke o liječenju utječu patohistološki nalaz, dob bolesnika i komorbiditeti. Prvi lijek izbora su kortikosteroidi, često u kombinaciji s ciklosporinom ili MMF, što se pokazalo superiornijim u očuvanje bubrežne funkcije nego monoterapija prednizonom (172). U adaptivnoj i genetski uzrokovanoj FSGS ne preporuča se kortikosteroidna terapija. FSGS povezanu s lijekom treba liječiti prekidom terapije, a FSGS povezanu s virusom antivirusnom terapijom. Od općih mjera primjenjuju se RAAS inhibitori, statini, lijekovi za snižavanje arterijskog tlaka i serumskih urata, soda bikarbona, redukcija pretilosti i prestanak pušenja. Učinak RAAS inhibitora potenciran je restrikcijom unosa soli i malom dozom tiazidskih diuretika. U djece s NS početna doza prednizona je 60 mg/m^2/dan kroz 4-6 tjedana (159). U odraslih bolesnika primjenjuje se prednizon 1 mg/kg TT/dan ili 2

mg/kg svako drugi dan kroz 16 tjedana, nakon čega se doza postupno snižava kroz 3 do 6 mjeseci (159). Ako bolesnik nema NS, nije potrebna terapija kortikosteroidima (159). Za bolesnike koji ne toleriraju kortikosteroide ili je FSGS rezistentna na kortikosteroide, lijek izbora su kalcijneurinski inhibitori, ciklosporin i takrolimus (165). Preporučena doza ciklosporina je 3-5 mg/kg/dan u više doza kroz 4-6 mjeseci. Veća vjerojatnost postizanja remisije je ako se terapija produži na 12 mjeseci (165). Kompletna remisija je PCR manje od 0,2 g/g, a djelomična remisija 50%-tno smanjenje od početne proteinurije i PCR manje od 2 g/g (165). Tipični su relapsi bolesti. Čimbenici povezani s lošim ishodom su crna rasa, velika proteinurija, pad KK, kolapsna varijanta i povećan udio IFTA (173).

1.2.4.4. FSGS i BMP – krajevi spektra iste bolesti?

BMP i FSGS se najčešće prezentiraju nefrotskim sindromom i zbog primarnih promjena u podocitu svrstane su u podocitopatije (174). Za postavljanje dijagnoze potrebno je uraditi biopsiju bubrega i dobiti uzorak s dovoljnim brojem glomerula i jukstamedularnih glomerula, što nije uvijek slučaj. Patološka dijagnoza je važna jer BMP ima odličnu stopu odgovora na kortikosteroide, a FSGS je uglavnom rezistentna, iako postoje suprotne iznimke (175, 176). Iako su po histološkim obilježjima i ishodu BMP i FSGS različite glomerulopatije, neki autori smatraju da predstavljaju krajeve spektra iste progresivne bolesti. Prema Massu, primarna FSGS i BMP nisu genetski uvjetovane, a bolesnici s BMP u urinu izlučuju CD80 koji se u visokoj koncentraciji može naći u urinu bolesnika s primarnom FSGS. Autor smatra da je primarna FSGS zapravo uznapredovali stadij u kojem je manja vjerojatnost odgovora na terapiju, a BMP rani stadij iste bolesti (176). U znanstvenom istraživanju treba utvrditi je li tako, ili se radi o dva različita entiteta, a u kliničkoj praksi svaki put imati na umu u slučaju slabog odgovora na terapiju BMP i odluke o rebiopsiji.

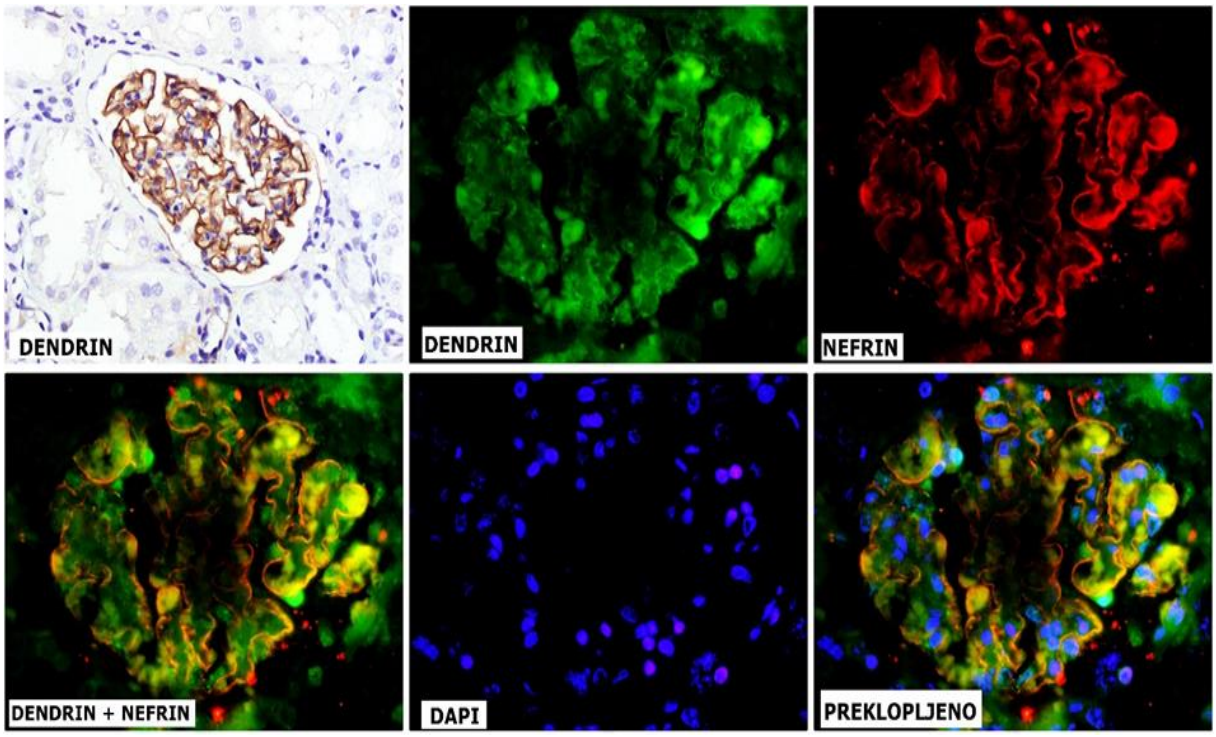
1.3. Novi prognostički biljezi

Bubrežna biopsija omogućava postavljanje patološke dijagnoze bolesti uz procjenu njene aktivnosti i kroniciteta koji su povezani s prognozom. U znanstveno istraživačkom radu na seriji uzoraka humanih bubrežnih biopsija moguća su retrospektivna istraživanja novih molekularnih biljega čiji bi izražaj mogao upozoriti na rano uključene mehanizme koji

dovode do KBB. U novije vrijeme kao potencijalni prognostički biljezi istražuju se dendrin, CTGF i c-Myb.

1.3.1. Dendrin

Dendrin je protein bogat prolinom otkriven u telencefaličkim dendritima eksperimentalnih štakora koji pate od nesanice; do sad njegova uloga nije u potpunosti razjašnjena (177). U čovjeka se dendrin, osim u mozgu, nalazi u bubrezima na bazalnoj strani podocita kao dio pukotinaste membrane (177,178). U reakciji na ozljedu podocita, dendrin s membrane translocira u jezgru i potiče apoptozu podocita pa se naziva „protein koji potiče smrt“ (engl. *death promoting protein*) (35). TGF-β1 je citokin koji regulira rast, diferencijaciju i apoptozu raznih stanica, uključujući podocite. Ako je u visokoj koncentraciji, potiče translokaciju dendrina u jezgru, a nuklearni dendrin amplificira TGF-β-om posredovanu apoptozu (35). U ontogenezi bubrega se dendrin prvi put može dokazati u stadiju kapilarne petlje i nikad nije izražen u jezgri (35). Prema eksperimentalnom modelu, translokacija s membrane u jezgru može se privremeno prezentirati kao istovremena dualna raspodjela dendrina na membrani i u jezgri (35). Dendrin se izravno veže na nefrin, važnu strukturnu komponentu pukotinaste membrane i za CD2AP (*CD-associated protein*), adaptornu molekulu koja regulira aktinski citoskelet (179). CD2AP i nefrin su u interakciji s p85 regulatornom podjedinicom fosfatidilinozitol 3 kinaze i stimuliraju antiapoptotski Akt signalni put, dok CD2AP potiskuje proapoptotski TGF-β signalni put i time reguliraju homeostazu podocita (177,179) (Slika 15).

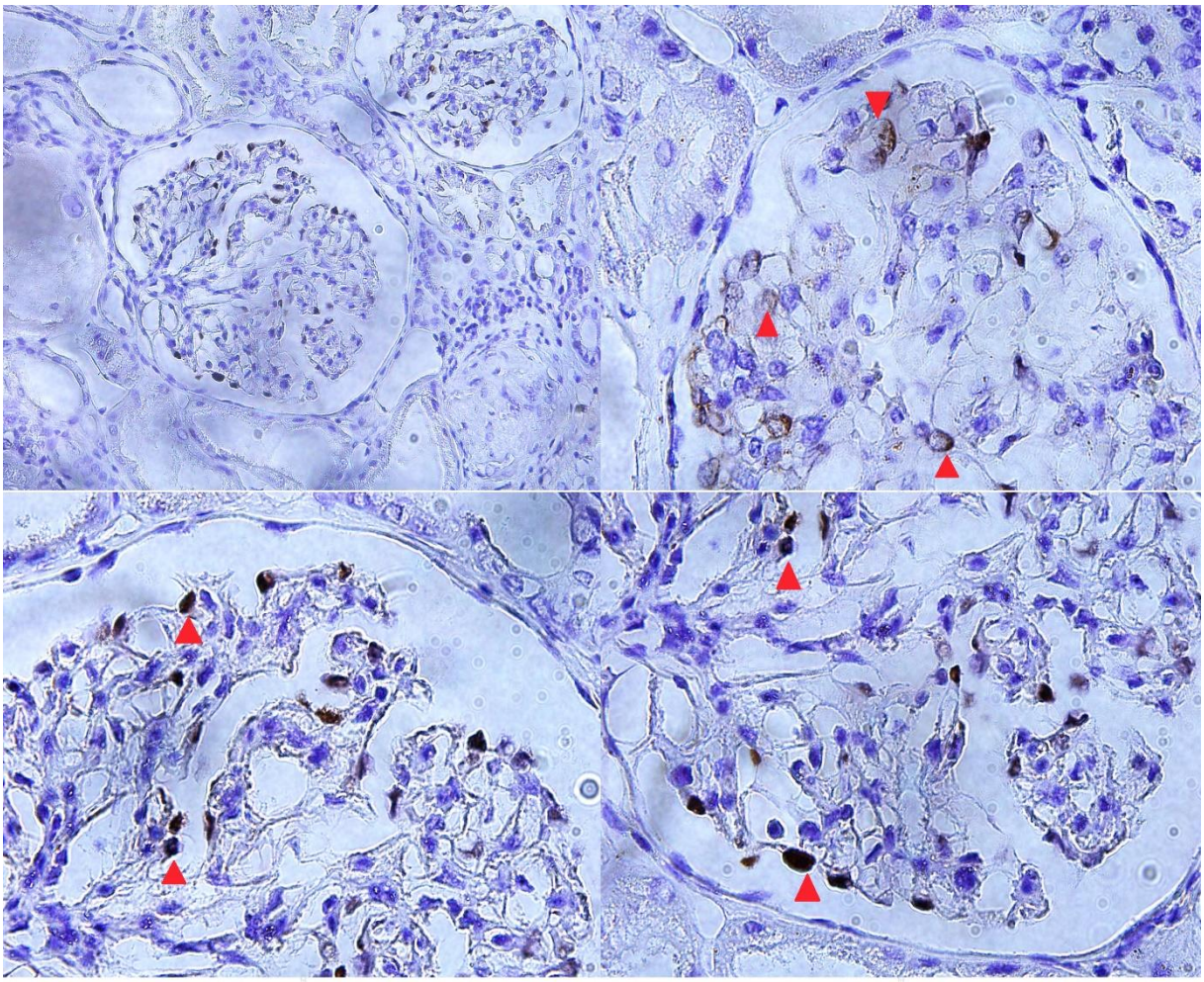


Slika 15. Membranski izražaj dendrina u normalnom glomerulu prikazan imunohistokemijskom (anti-Dendrin/HRP) i dvostrukom imunofluorescentnom metodom u koekspresiji s nefrinom (400 x).

1.3.1.1. Značaj nuklearnog dendrina

Nuklearni dendrin kao transkripcijski čimbenik potiče izražaj katepsina L koji vrši proteolizu CD2AP. U podocitnoj ozljedi to omogućava produljeni izražaj proteaza i povećava osjetljivost podocita na TGF-β1 i apoptozu (179). Osim toga, katepsin L cijepa regulatornu GTP-azu dinamin i sinaptopodin, adaptor povezan s aktinom. Posljedica je reorganizacija podocitnog mikrofilamentnog sustava što rezultira proteinurijom (178). Nuklearni dendrin uzrokuje proširenje mezangija jer potiče izražaj podocitnih čimbenika koji stimuliraju mezangijsko nakupljanje fibronektina (180) (Slika 16). Nuklearni dendrin potiče apoptozu podocita i gubitak kontakta s GBM, a posljedica je proteinurija i u kasnijim stadijima glomerulosklerozа (180). U eksperimentalnim istraživanjima miševi s inaktiviranim genom za dendrin su fertilni i imaju normalni životni vijek (178). Glomerulogeneza je uredna, a u odraslih miševa nema patoloških promjena u glomerulima niti značajne proteinurije. Kako dendrin nema homolognog proteina koji bi kompenzirao njegov manjak, može se zaključiti da nije presudan u funkciji filtracijske barijere (178). Štoviše, genska ablacija dendrina odgađa

nastanak završnog stadija KBB i pratećih komplikacija (180). U eksperimentalnim istraživanjima, u Cd2ap -/- miševa nastupa ozljeda podocita i proteinurija u 2.-3. tjednu života, a smrt u 8.-9. tjednu zbog bubrežnog zatajenja. Delecija gena za dendrin u tih miševa odgađa početak proteinurije, smanjuje proširenje mezangija i nastanak glomeruloskleroze te bubrežno zatajenje i smrt (180).



Slika 16. Translokacija dendrina u jezgru podocita (anti-Dendrin/HRP 1000 x).

1.3.1.2. Regulacija izražaja dendrina

U posljednje vrijeme otkrivaju se novi molekularni mehanizmi vezani za funkciju i regulaciju izražaja dendrina u bubrezima. MAGI-2 (*membrane-associated guanylate kinase inverted* 2) je komponenta pukotinaste membrane koja je ključna za održavanje funkcionalnosti filtracijske barijere i uključena u reguliranje funkcije dendrina (181). MAGI-2 *knockout* miševi imaju prekinutu pukotinastu membranu, morfološke abnormalnosti nožica

podocita i sklonost podocita apoptozi, što se klinički manifestira masivnom proteinurijom i opadanjem bubrežne funkcije (182). U fiziološkim uvjetima fosforilirani dendrin je lokaliziran na pukotinastoj membrani, a u odsustvu MAGI-2, defosforilirani dendrin se nakuplja u jezgri (182). Gubitak MAGI-2 rezultira nuklearnom translokacijom dendrina i nastankom FSGS (182). Čini se da CD2AP indirektno regulira interakciju MAGI-2 i dendrina (182).

Dendrin se veže na Wtip (engl. *Wt-1 interacting protein)*, citoplazmatsku komponentu pukotinaste membrane koja u ozljeđenom podocitu također translocira u jezgru, i na Gadd45a (DNA-*damage-inducible 45 alpha)*, protein ključan za regulaciju staničnog ciklusa, popravak DNK i genomsku stabilnost koji regulira dendrinom posredovane apoptotske signale (178). Vezivanje dendrina na Wtip i Gadd45a upućuje da dendrin ima sličnu ulogu regulatora transkripcije gena u jezgri podocita (178).

RhoA je GTPaza koja regulira arhitekturu citoskleta i njegova bazalna aktivnost je nužna za normalnu funkciju podocita (183). Aktivnost Rho je značajno snižena u eksperimentalnim modelima nefritisa. YAP onkogen je glavna nizvodna kaskada Hippo tumor-supresor signalnog puta za nadzor gena koji potiču staničnu proliferaciju i inhibiraju apoptozu i poznat je kao antiapoptotski protein u podocitu (184-186). U fiziološkim uvjetima defosforilirani YAP se nalazi u jezgri kao transkripcijski koaktivator, odnosno fiziološki endogeni inhibitor apoptoze posredovane dendrinom (183). Fosforilacija YAP potiče njegovu citoplazmatsku sekvestraciju i inaktivaciju (178). Manjak RhoA uzrokuje apoptozu podocita smanjenjem nuklearnog YAP i inhibicijom signala YAP/dendrin (183). U eksperimentalnim modelima, utišani izražaj dendrina značajno smanjuje apoptozu koja bi bila izazvana manjkom RhoA ili YAP (183). Ablacija dendrina može odgoditi početak i težinu podocitopenije i proteinurije (178).

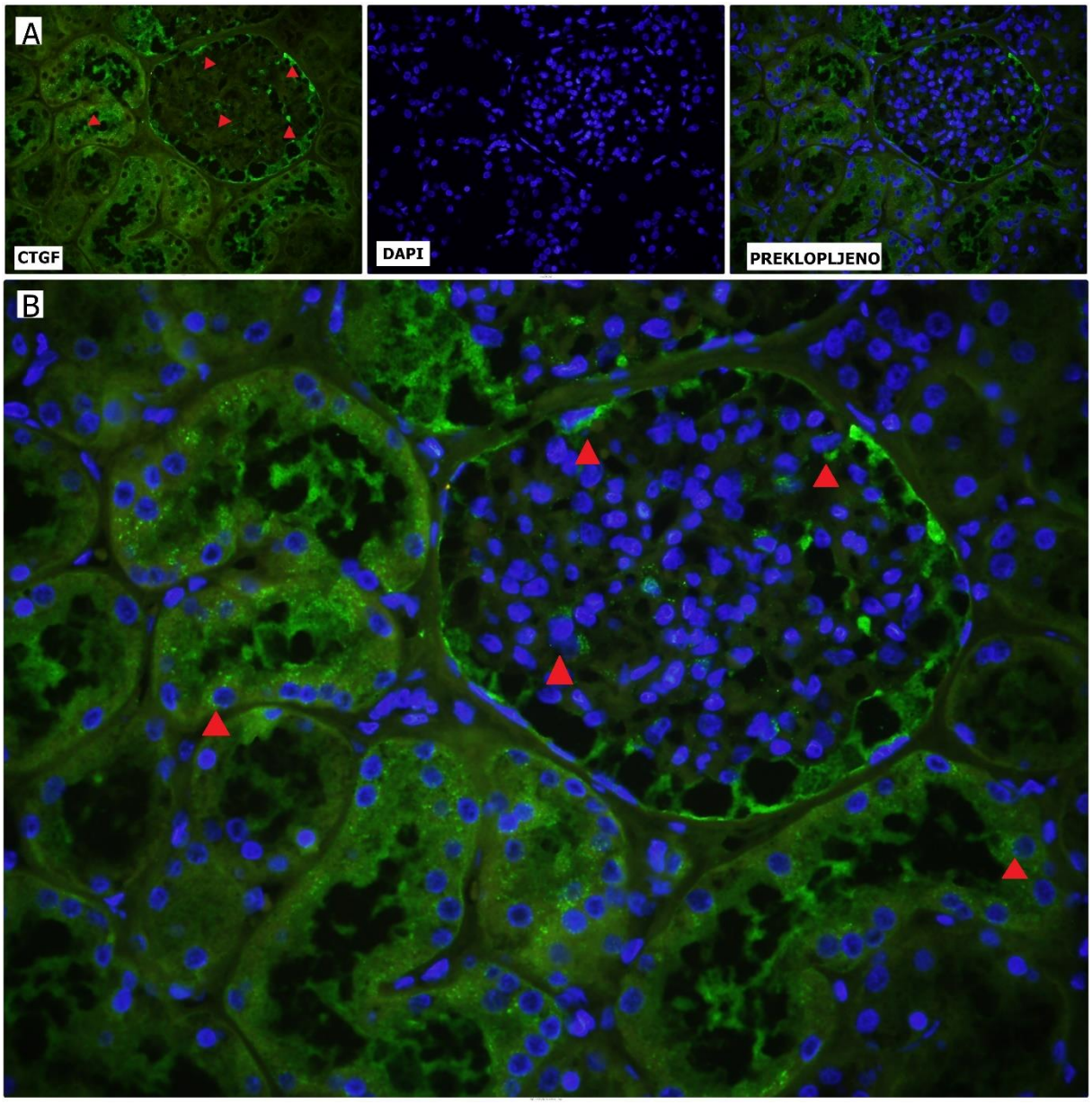
1.3.2. Čimbenik rasta vezivnog tkiva

Čimbenik rasta vezivnog tkiva (engl. *connective tissue growth factor)* CTGF ili CCN2 je matricelularni protein. Član je CCN obitelji strukturalno povezanih proteina koji dijele N-terminalni sekretorni signalni peptid i četiri konzervirane domene (domena proteina koji se veže za inzulinu sličan čimbenik rasta, domena von Willebrandova čimbenika, domena ponavljanog trombospondina tipa 1 i cistinski čvor) (187). CTGF je izoliran 1991. godine iz

kulture humanih endotelnih stanica iz umbilikalne vene (188,189). Sastavljen je od 349 aminokiselina i bogat je cisteinom (188). Humani *CTGF* je smješten na kromosomu 6 (6q23.1) (188). U ontogenezi bubrega, CTGF mRNA se prvi put nalazi u neposrednim pretečama podocita i parijetalnog epitela, u stadiju zareza i S stadiju (188). CTGF je ključni čimbenik u nastanku fibroze, ujedno važan za staničnu migraciju, preživljavanje, proliferaciju, angiogenezu, ciijeljenje rana, remodeliranje matriksa i upalu (188).

1.3.2.1 Izražaj i uloga CTGF

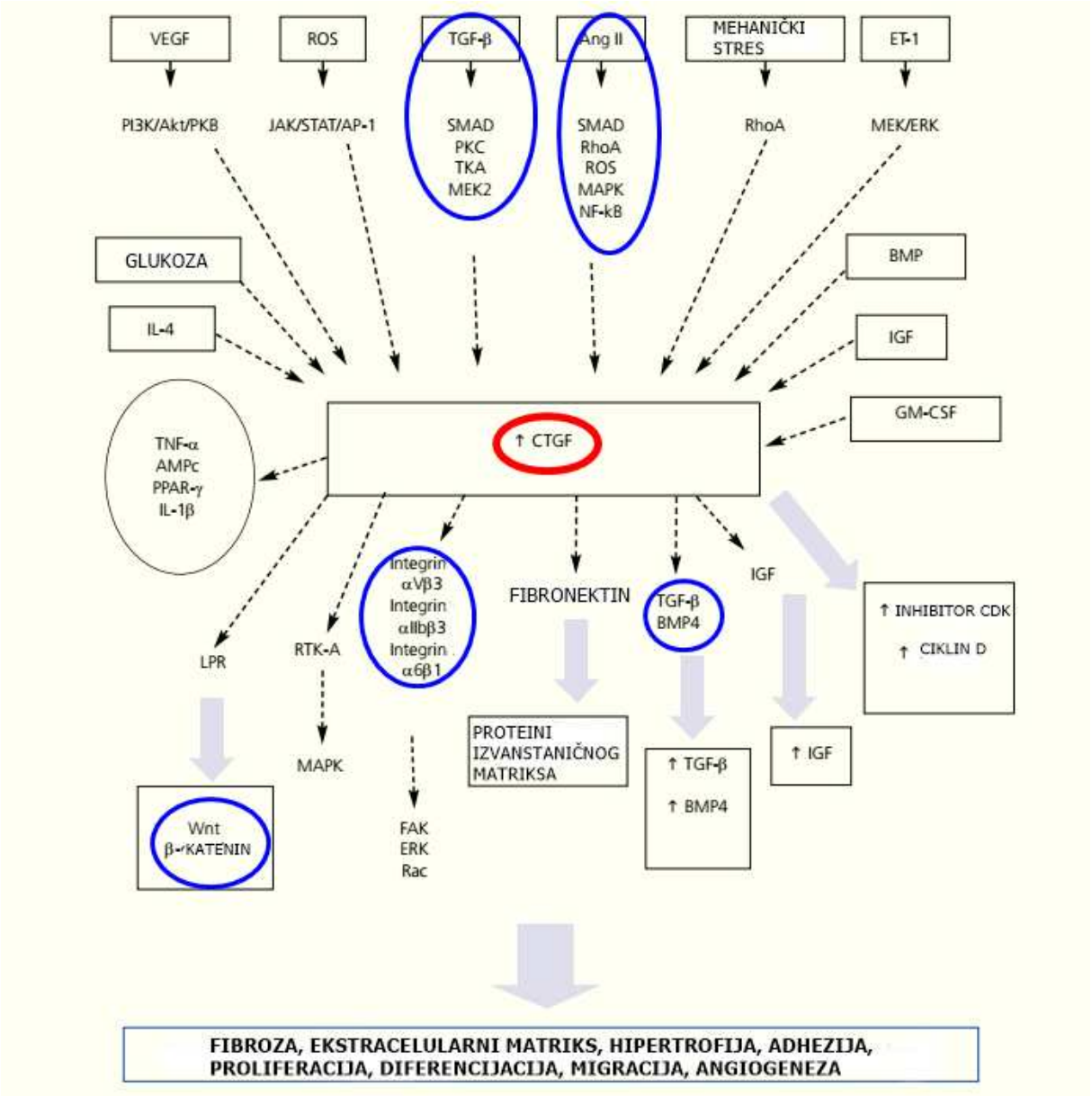
Jaki izražaj CTGF uočen je u ranom razvoju koštanog, krvožilnog i živčanog tkiva, a najviše u proliferirajućim hondrocitima, osteoblastima, miofibroblastima, endotelu i glatkomišićnim stanicama krvnih žila (190). CTGF sudjeluje u angiogenezi, razvoju pluća, formiranju bazalne membrane krvnih žila, postizanju normalne interakcije endotela i pericita u koži, stvaranju i remodeliranju izvanstaničnog matriksa, skeletogenezi i drugim važnim procesima (187,188,190). U bubregu CTGF izražavaju samo rezidentne bubrežne stanice (191). U razvojnoj fazi CTGF izražavaju predominantno podociti (187). U zrelom bubregu slabo ga izražavaju podociti, parijetalni epitel i intersticijski fibroblasti, po Hilhorstu samo epitel proksimalnih kanalića, po Ito-u epitel distalnih kanalića, a prema Sánchez-López uopće nema njegova izražaja u zrelom zdravom bubregu (187,189,191-193) (Slika 17).



Slika 17. Slab izražaj CTGF u glomerulima i kanalićima normalnog bubrega (A) i (B), anti-CTGF/FITC/DAPI 400 x

CTGF *knockout* miševi ugibaju neposredno nakon rođenja zbog zatajenja disanja uslijed malformacije pluća izazvane teškim malformacijama skeleta (187). Međutim, CTGF nije neophodan za normalni razvoj glomerula jer se u tih miševa nisu našle stukturne ni funkcionalne bubrežne abnormalnosti (187). U zdravih miševa nije jasno ima li CTGF ulogu u postnatalnom razvoju bubrežnog sustava, ali nakon 90% redukcije CTGF u starosnoj dobi od 10 dana nije bilo strukturnih promjena ni albuminurije (188).

Izražaj CTGF reguliraju angiotenzin II, TGF-β, hiperglikemija, hipoksija, VEGF, IL-4, GM-CSF, BMP (*bone morphogenetic proteins*) i stanični stres (189). Ključni transkripcijski koaktivatori izražaja CTGF su YAP (*yes-associated protein*)/TAZ (*transcriptional coactivator* s *PDZ-binding motif*)/TEAD (*transcriptional enhancer factor TEF-1*) i Ets1 (*ETS* protoonkogen) (194). Specifični receptor za CTGF nije poznat. CTGF se preko svojih strukturalnih domena veže na različite ligande i pozitivno ili negativno mijenja signalne puteve (188). Upravo zbog toga, CTGF ima ulogu integratora multiplih čimbenika rasta, integrina i signala porijekla ekstracelularnog matriksa (190) (Slika 18).



Slika 18. Prikaz složnosti signalih puteva putem kojih CTGF ostvaruje svoj učinak (189).

CTGF ostvaruje učinak ne samo direktnim vezivanjem za citokine i receptore, već različitim složenim mehanizmima: a) djeluje kao izvanstanični adaptorni protein koji vezanjem na citokine stimulira odgovor TGF-β ili njihovim odvajanjem u matriks, spriječava stanično signaliziranje preko VEGF, b) može se kompetitivno vezati na heparan sulfat proteoglikane, mijenjajući njihovu koncentraciju i utjecaj na signaliziranje, c) može blokirati ili stvoriti vezujuća mjesta u matriksu čime se mijenja stanično signaliziranje, adhezija i motilitet, d) može se vezati na stanične receptore i stimulirati prijenos staničnog signala, e) može biti unesen endocitozom u stanicu i djelovati kao unutarstanični adaptorni protein u citoplazmi i jezgri (195). CTGF može djelovati putem TGF-β i BMP, ali i obrnuto TGF-β potiče izražaj CTGF u različitim stanicama (190). S druge strane, CTGF i s njim povezani protein Cyr61 mogu imati učinak na genski izražaj suprotan učinku TGF-β (190).

U fiziološkim uvjetima CTGF sudjeluje u procesu stanične migracije, regulacije staničnog ciklusa, proliferacije, apoptoze, adhezije, mitogeneze, angiogeneze i regulira signalizaciju drugih čimbenika rasta i citokina. U patološkim uvjetima CTGF modulira tumorigenezu, aktivaciju i diferencijaciju miofibroblasta, odlaganje izvanstaničnog matriksa, remodeliranje i promjenu strukture organa, što konačno vodi u fibrozu (191). CTGF regulira izražaj proinflamatornih citokina i kemokina te inducira migraciju leukocita i aktivaciju NF-κB čimbenika (189).

1.3.2.2. Izražaj CTGF u bolestima bubrega

Izražaj CTGF je povišen u upalnim glomerularnim i tubulointerstucijskim bolestima, povezan sa staničnom proliferacijom i akumulacijom matriksa (196). U maloj seriji različitih glomerularnih bolesti (ekstrakapilarni GN, IgAN, FSGS i dijabetička nefropatija) uočen je povećani izražaj CTGF u ekstrakapilarnim, mezangioproliferativnim lezijama, kapsularnim adhezijama i regijama periglomerularne fibroze (191,192). Nasuprot tome, povišeni izražaj CTGF nije viđen u BMP, membranskoj glomerulopatiji i postinfekcijskom glomerulonefritisu koje cijele bez ožiljkavanja (191). Broj stanica koje izražavaju CTGF je povezan sa stupnjem tubulointersticijske fibroze, glomeruloskleroze i arterioloskleroze (191,197). U globalnoj glomerulosklerozi ne nalazi se izražaj CTGF (196). Prema Goldschmedingu, CTGF je ključni čimbenik bubrežne fibroze koji sudjeluje u intersticijskoj, ekstrakapilarnoj i mezangijskoj nakupljanju stanica i vanstaničnog matriksa te sklerozi (191).

U eksperimentalnim modelima izražaj CTGF mRNA je najviši sedmog dana nakon ozljede, a vraća se na normalnu razinu četrnaestog dana kad je cijeljenje tkiva završeno (198). U glomerulonefritisu izražaj CTGF korelira s eGFR, rezidualnom bubrežnom funkcijom i albuminurijom, odnosno smanjenje izražaja CTGF poboljšava proteinuriju i glomerularno oštećenje jer se smanji upalni odgovor i sinteza matriksa (192,194). Molekule koje suprimiraju prepisivanje CTGF mRNA su cAMP i NO (191). Induktori transkripcije CTGF mRNA su vjerojatno TGF-β i HGF, IL-1β i IL-4, a učinak TNF-α može biti dvojak (191,199). U kulturi fibroblasta s visokom kontaktnom inhibicijom (NIH3T3 stanice) nakon primjene deksametazona uočeno je da je izražaj TGF-β snižen, a CTGF povišen, što je važno s obzirom da su kortikosteroidi važni u liječenju glomerularnih bolesti (191,200). Taj učinak bi bilo uputno ispitati *in vivo*.

1.3.2.3. Mogućnost anti-CTGF terapije

Humano monoklonsko protutijelo FG-3019 potpuno inhibira biološku aktivnost CTGF i tako prevenira novu i regredira postojeću fibrozu (195). Učinkovitost terapije ispitivana je na animalnim modelima fibroze pluća, peritonealne fibroze, sistemne fibroze, ciroze jetre, ateroskleroze i smanjenja mikroalbuminurije u dijabetičkoj nefropatiji (188,195). Isto tako, dokazan je povoljan učinak imunoblokade CTGF na zaustavljanje tumorskog rasta u mišjim modelima melanoma i karcinoma gušterače i jajnika (194,195). Povišen izražaj CTGF uočen je u kolorektalnom karcinomu, karcinomu jetre, dojke (gdje je povezan s rezistencijom na kemoterapiju), jednjaka, jezika, kolangiokarcinomu, hondrosarkomu, gliomu, tumoru gušterače, karcinomu štitnjače, melanomu i neuroendokrinim tumorima (194). Dok izražaj CTGF povećava tumorski rast u ranom stadiju karcinoma debelog crijeva, čini se da ima zaštitnu ulogu protiv metastaziranja u kasnim stadijima bolesti (194).

Prema rezultatima recentnih kliničkih studija, učinak protutijela na CTGF je obećavajući. U PRAISE kliničkoj studiji provedenoj na više kontinenata, ispitan je terapijski učinak Pamrevlumab-a (FG-3019), rekombinantnog humanog monoklonskog protutijela na CTGF, u bolesnika s idiopatskom plućnom fibrozom (201). Jedna skupina bolesnika je primala intravenske infuzije Pamrevlumaba od 30 mg/kg svaka 3 tjedna kroz 48 tjedana, a druga skupina placebo. Terapijski učinak Pamrevlumaba je bio povoljan jer je značajno smanjio

pogoršanje plućne funkcije mjerene forsiranim vitalnim kapacitetom, a nije bilo značajnih nuspojava (201).

U nefrologiji je učinak FG-3019 istraživan u bolesnika sa šećernom bolesti tip 1 ili 2 i posljedičnom dijabetičkom nefropatijom manifestiranom mikroalbuminurijom. Ispitivana skupina je primala 3 ili 10 mg/kg FG-3019 intravenski svako 14 dana u 4 doze (202). S obzirom da se radilo o studiji faze 1, rezultati trebaju biti potvrđeni u prospektivnim randomiziranim, višestruko slijepim studijama i interpretirani s oprezom, no djeluju obećavajuće zbog značajne redukcije albuminurije bez značajnijih nuspojava (202).

Druga terapijska mogućnost su anti-*CTGF* oligonukleotidi (engl. *antisense oligonucleotide* - ODN) koji blokiranjem *CTGF* inhibiraju TGFβ-om posredovano stvaranje fibronektina tip 1 i kolagena u kulturi bubrežnih fibroblasta, koje *in vivo* pridonosi razvoju fibroze bubrega (203). U kliničkoj studiji je ispitivan učinak anti-*CTGF* oligonukleotida EXC 001 u usporedbi s placebom u žena sa simetričnim bilateralnim hipertrofičnim ožiljcima na dojkama, duljine minimalno 6 cm nakon prethodnog operativnog zahvata dojki neovisno o uzroku, a koje su podvrgnute kirurškoj reviziji ožiljaka (204). Lijek je ordiniran intradermalno u dozi od 5 mg/cm u 2., 5., 8. i 11. tjednu nakon operacije i došlo do značajnog smanjenja ožiljaka (204). Potrebna su daljnja istraživanja radi moguće terapijske primjene u različitim bolestima u svakodnevnoj praksi.

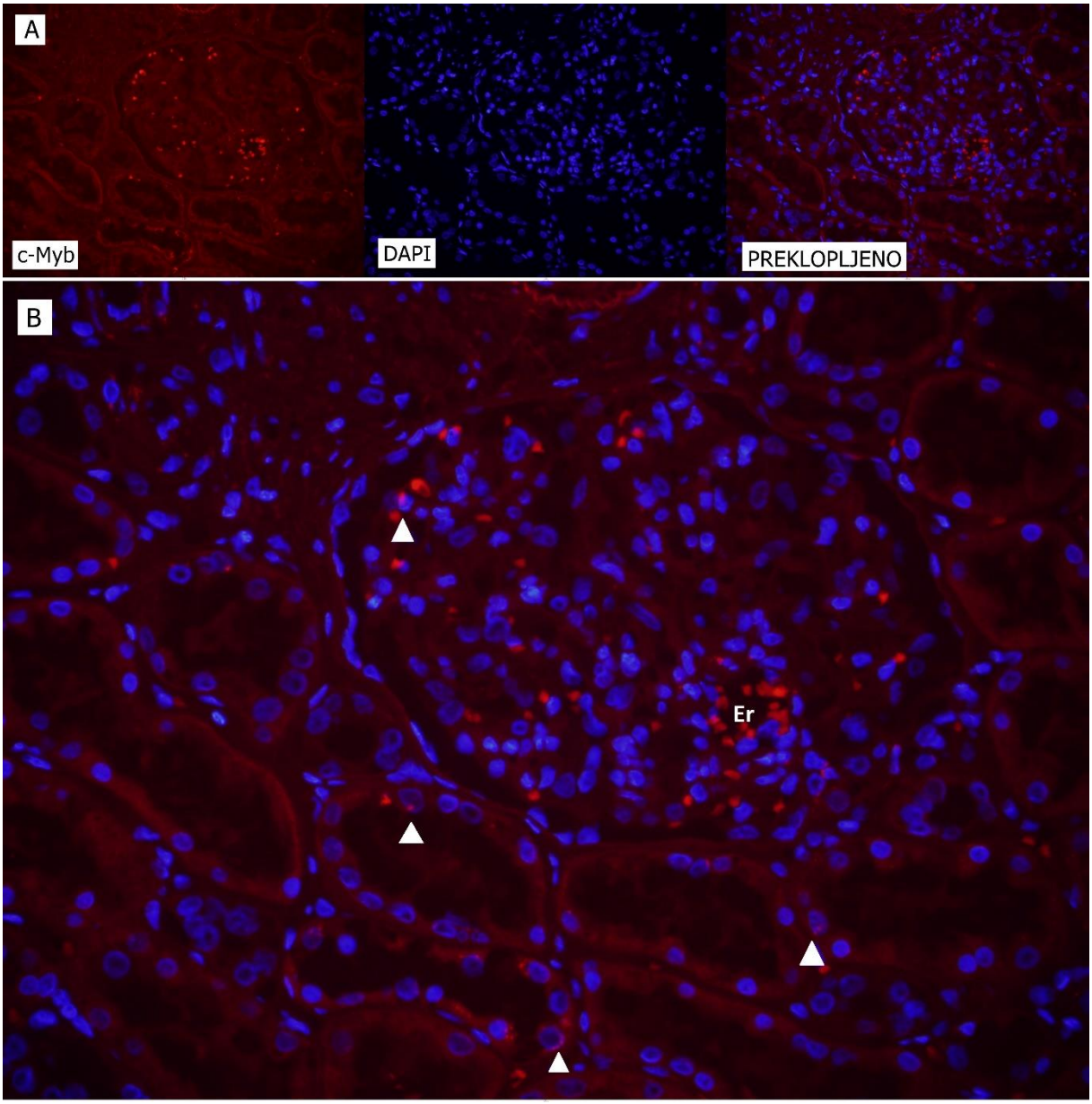
1.3.3. c-Myb

C-Myb je esencijalni transkripcijski čimbenik koji je prvi put identificiran kao virusni onkogen u ptičjoj leukemiji (*v-MYB*) (205). U ljudi je njegov stanični homolog protoonkogen *c-Myb* koji ima DNA vezujuću domenu, transaktivacijsku domenu i negativnu regulatornu domenu (205). A-Myb i B-Myb u ljudi također imaju DNA vezujuću domenu, a razlikuju se po tkivnoj distribuciji i ulozi koju obavljaju (206-208). Dudek i Reddy su otkrili dvije izoforme c-Myb u normalnim i tumorskim stanicama (209). Kasnije ih je otkriveno još, a najčešća izoforma c-Myb ima 72 kilodaltona i 650 aminokiselina (205). Najznačajnija uloga mu je regulacija stanične proliferacije i regulacija staničnog ciklusa u G1 i G2 fazi (208).

1.3.3.1. Izražaj i uloga c-Myb

C-Myb je izražen u nezrelim hematopoetskim matičnim stanicama i zadužen je za proliferaciju i diferencijaciju T i B limfocita i sazrijevanje eritrocita (205). C-Myb potiče razvoj pomagačkih T limfocita, a blokira razvoj citotoksičnih T limfocita (205). C-Myb nije specifičan samo za hematopoezu, već je uključen u razvoj neurona, diferencijaciju, razvoj i održavanje epitelnih stanica crijeva, mliječnih žlijezda, stanica glatkih mišića i bubrega (208) (Slika 19). Iako c-Myb nije potreban za inicijalnu hematopoezu u žumanjčanoj vreći, nužan je za fetalnu jetrenu hematopoezu pa delecija oba alela dovodi do smrti embrija u 14. danu gestacije zbog teških defekata u hematopoezi (208,210,211).

Izražaj c-Myb je tijekom razvoja i sazrijevanja stanica strogo kontroliran (205). Produženi izražaj c-Myb blokira staničnu diferencijaciju pa mu normalno izražaj opada kako stanica postaje diferencirana (208,212). Izražaj Myb proteina regulira Wnt signalni put (208). C-Myb ulazi u interakcije s velikim brojem drugih regulatora poput protein kinaza, regulatora staničnog ciklusa i transkripcijskih čimbenika, a istovremeno je subjekt posttranslacijskih modifikacija, uključujući serinsku i treoninsku fosforilaciju, lizinsku acetilaciju i ubikvitilaciju (208). U poremećenoj c-Myb regulaciji onkogen *c-Myb* potiče stanični rast i progresiju u solidnim zloćudnim tumorima dojke, debelog crijeva, gušterače, mozga i hematolimfatičnim tumorima (205). Ključna mutacija u onkogenezi je gubitak regulatorne C-terminalne domene (208). Normalni c-Myb protein nadzire gene koji su ključni za normalnu diferencijaciju stanica i razlikuju se od onih u onkogenoj varijanti (208). Obje varijante *c-Myb* gena imaju istu DNA vezujuću domenu i vežu se na ista mjesta na DNA; stoga je razlika posljedica različitih protein-protein interakcija koje nastaju (208). *c-Myb*-mutacija nastaje amplifikacijom, translokacijom uz nastanak hibridnog proteina i mutacijom TAL-1 promotora (205). Patološki izražen c-Myb aktivira druge gene poput ciklooksigenaze 2 (COX-2), Bcl-2, Bcl-X_L i c-Myc koji su važni za angiogenezu, proliferaciju i apoptozu te progresiju karcinoma (213). Važno je izravno djelovanje c-Myb na izražaj i aktivnost *c-Myc* čiji je protein uključen u patogenezu različitih tumora (208). Unatoč sličnom nazivu, ova dva gena su strukturalno različiti, iako oba posjeduju DNA vezujuću domenu, a dokazano je da c-Myb direktno nadzire izražaj, odnosno aktivnost c-Myc-a (208).



Slika 19. Slab Izražaj c-Myb u glomerulima i kanalićima normalnog zrelog bubrega (A) i (B) anti-c-Myb/FITC/DAPI 400 x, Er - eritrociti

1.3.3.2. Regulacija izražaja c-Myb

Slug (SNAI2, Snail2) je *zinc-finger* transkripcijski represor, član obitelji Snail čimbenika, važnih za epitelijalno-mezenhimalnu pretvorbu u patološkim i fiziološkim uvjetima (214). Snail je izražen tijekom formiranja mezoderma, gastrulacije i neuralnog grebena (214). U embrionalnom bubregu i nekim tipovima karcinoma (debelog crijeva, mijeloidnoj leukemiji, neuroblastomu) c-Myb regulira izražaj Slug-a (214). U embrionalnom bubregu i tumorskim stanicama, c-Myb inducira izražaj vimentina, fibronektina i N-kaderina,

što vodi stjecanju mezenhimalnih obilježja stanice kao preduvjetu za migraciju, rezistenciju na apopotozu i metastaziranje (214). Tijekom ontogeneze bubrega izražaj Snail1 i Snail2 je prisutan u mezodermu, a utišan neposredno prije epitelne diferencijacije (215). Snail geni su potisnuti za vrijeme diferencijacije bubrega i utišani epigenetskim mehanizmima u zrelom bubregu, kako bi se održao epitelni integritet i homeostaza (215,216). Povišeni izražaj Snail suprimira E-kaderin u epitelnim stanicama kanalića i inhibira nefrin i P-kaderin u podocitima (32). U zrelom bubregu, reaktivacija *Snail* i *Slug* je povezana s dva različita patološka procesa: a) s EMT tubularnog epitela koja inducira intersticijsku fibrozu i b) progresijom karcinoma bubrega (216). TGF-β je čimbenik EMT i potentni aktivator Snail/Slug (214). U karcinomu bubrega Snail suprimira izražaj E-kaderina i kaderina-16 tako da potiskuje aktivnost HNF-1β važnog za normalnu funkciju bubrega (216).

1.3.3.3. Mogućnosti anti-c-Myb terapije

S obzirom na ulogu c-Myb u fiziološkim i patološkim uvjetima, u liječenju tumora potrebno je ne samo inaktivirati mutirani c-Myb, nego i reaktivirati normalni c-Myb kako bi se potaknula diferencijacija (208). U novije vrijeme istražuje se učinak anti-Myb terapije oligodeoksinukleotidima rezistentnima na nukleazu (ODN) s ciljem kontrole genetskog izražaja (213). Glavna prepreka je postizanje stabilnosti tih spojeva *in vivo* (217). Takvim pristupom u liječenju leukemija nije bilo moguće ukloniti sve leukemijske stanice u bolesnika.

Danas se ispituju male molekule koje inhibiraju aktivnost c-Myb prekidom interakcije između c-Myb i njegovog koregulatora p300, čime se c-Myb destabilizira (217). Očekuju se klinička ispitivanja za male inhibitore celastrol i plumbagin, izolirane iz biljaka, koje imaju protu-tumorski učinak (217).

2. CILJ RADA I HIPOTEZE

Ciljevi istraživanja su:

1. Ispitati razliku između neupalnih (BMP i FSGS) i upalnih glomerulopatija (IgAN i HSP) te zdrave kontrole u apsolutnom broju dendrin-pozitivnih jezgara i s obzirom na uzorak izražaja dendrina u glomerulima.

2. Ispitati razliku između IgAN/HSP i zdrave kontrole u izražaju CTGF i c-Myb u glomerulima i bubrežnim kanalićima.

3. Ispitati je li izražaj dendrina, CTGF i c-Myb povezan s bubrežnom funkcijom u vrijeme biopsije i na završetku praćenja.

Hipoteza:

Imunohistokemijski promijenjen izražaj dendrina i povećani izražaj CTGF i c-Myb u bioptatu bubrega povezani su s lošijom bubrežnom funkcijom na kraju praćenja te ih možemo smatrati potencijalno lošim prognostičkim biljezima kronične bubrežne bolesti.

3. ISPITANICI I POSTUPCI

3.1. Ispitanici

U studiju je uključeno 48 ispitanika kojima je od 1996. do 2018. godine na temelju perkutane bubrežne biopsije postavljena dijagnoza glomerularne bolesti na Odjelu za patologiju Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC Split i nastavili su liječenje na Klinici za unutarnje bolesti, odnosno Klinici za dječje bolesti iste ustanove. U studiju su uključeni susljedno dijagnosticirani ispitanici s dijagnozom IgAN, HSP, BMP i primarne FSGS. Kriteriji uključenja bili su dostupnost originalnih histoloških preparata, cjelovita prethodna morfološka analiza s elektronskom mikroskopijom, dovoljno tkiva u parafinskom bloku za imunohistokemijsku analizu i dokumentirano kliničko praćenje do kraja studije. Kriteriji isključenja bili su nedovoljno matrijala u parafinskom bloku i nedostatak medicinske dokumentacije. Isključeni su slučajevi rebiopsije i biopsije presatka. U kontrolnoj skupini je bilo 12 ispitanika podvrgnutih nefrektomiji 2018. godine zbog svijetlostaničnog karcinoma bubrega, a analizirano je zdravo tkivo periferno od tumora. Ispitanici iz kontrolne skupine imali su urednu bubrežnu funkciju u trenutku nefrektomije uz odsustvo čimbenika rizika za razvoj KBB.

3.2. Materijali

Originalni histološki preparati i parafinski blokovi bubrežne biopsije 48 ispitanika i 12 kontrola prikupljeni su iz arhive Odjela za patologiju. Klinički podaci prikupljeni su iz povijesti bolesti Klinike za unutarnje bolesti i Klinike za dječje bolesti, a zadnji laboratorijski nalazi iz Kliničkog zavoda za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku KBC Split. Histološki preparati su ponovo pregledani i za svaki tip GN posebno klasificirani, IgAN po Oksfordskoj klasifikaciji, HSP po ISKDC klasifikaciji i FSGS po Kolumbijskoj klasifikaciji.

3.3. Metode

Na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Split urađeno je ručno dvostruko indirektno imunofluorescentno bojanje, a na Odjelu za patologiju KBC Split strojno indirektno imunohistokemijsko bojanje preparata. Upotrebljena su

specifična protutijela su dendrin, nefrin, CTGF i c-Myb. Iz parafinskog bloka bubrežnih biopsija izrezani su preparati debljine 5 mikrometara. Preparati za imunoflorescencu su deparafinirani u ksilolu (3x5 minuta), rehidrirani u gradijentu alkohola 2 x 100% 10 minuta, 96% 5 minuta, 70% 5 minuta do destilirane vode, kuhani u citratnom puferu (pH=7) u mikrovalnoj pećnici 12 minuta radi demaskiranja antigena i ohlađeni na sobnoj temperaturi 20 minuta. Isprani su radnom otopinom PBS-om (engl. *phosphate-buffered saline*). Radi blokiranja nespecifičnog bojenja apliciran je blokirajući serum, inkubiran 20 minuta i ocijeđen.

Urađeno je dvostruko imunofluorescentno bojenje na nefrin i dendrin kako bi se vizualizirala njihova koekspresija u podocitima. Na prethodno priređene preparate istodobno su aplicirani poliklonalno kozje protutijelo na nefrin (Santa Cruz, USA), razrjeđeno 1:300, i poliklonalno kunićje protutijelo na dendrin (AbCam, Cambridge, UK) razrjeđeno 1:200, i inkubirani u tamnoj i vlažnoj komori preko noći na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja u PBS istodobno su aplicirani poliklonalno magareće protutijelo za kozje IgG (Alexa fluor, 594 Life Technologies, USA), razrjeđeno 1:300, i poliklonalno magareće protutijelo na kunićje IgG (Alexa Flour 488 Life Technologies, USA), razrjeđeno 1:300, i inkubirani 60 minuta. Nakon ispiranja u PBS preparati su inkubirani s DAPI (4′,6-diamidino-2-fenilindol) 5 minuta za obojenje jezgara, isprani PBS te pokriveni medijem i pokrovnicom. Na Odjelu za patologiju KBC Split urađeno je indirektno imunohistokemijsko bojenje na aparatu Benchmark (Ventana, Medical System, USA) uporabom kunićjeg poliklonalnog protutijela na dendrin (Abcam, Cambridge, UK), razrjeđeno 1:200, i vizualizacijskog sustava Optiview Detection Kit (Ventana Medical Systems, Inc. USA).

Dvostruko imunoflorescentno bojenje na CTGF i c-Myc urađeno je ručnom metodom. Na prethodno priređene preparate istovremeno su aplicirani poliklonalno kozje protutijelo na CTGF (Santa Cruz Biotechnology, USA) razrjeđeno 1:100, i poliklonalno kunićje protutijelo na c-Myb (Santa Cruz, Biotechnology USA) razrjeđeno 1:300, i inkubirani u tamnoj vlažnoj komori preko noći na 4˚C. Nakon ispiranja u PBS istovremeno su aplicirani sekundarno magareće protutijelo na kozje IgG (Alexa fluor 594, Molecular Probes Life Technologies, Oregon, SAD) razrjeđeno 1: 400, i sekundarno magareće protutijelo na kunićje IgG (Alexa fluor 488, Molecular Probes Life Technologies, Oregon, SAD) razrjeđeno 1: 400. Nakon ispiranja, apliciran je DAPI za bojenje jezgara i inkubiran 4 minute. Nakon ispiranja u PBS, preparat je pokriven medijem i pokrovnicom.

3.4. Postupci

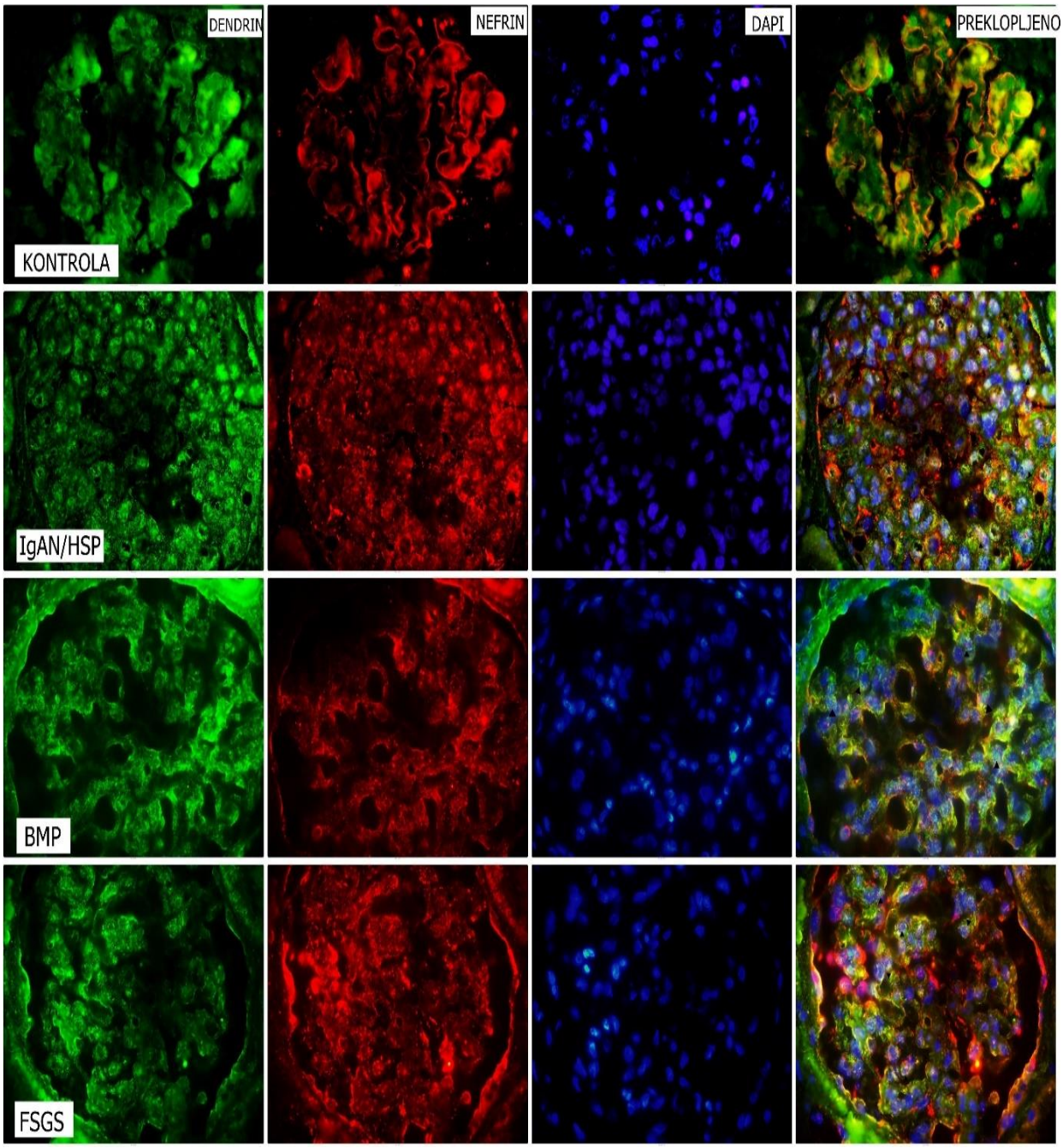
U studiji je provedeno retrospektivno-prospektivno kohortno istraživanje. Iz patološkog nalaza dobiveni su podaci o dobi i spolu ispitanika, datumu biopsije i dijagnozi. U originalnim histološkim preparatima svih ispitanika analiziran je broj globalno ožiljno promjenjenih glomerula, postotak tubularne atrofije i intersticijske fibroze. U slučajevima IgAN određen je MEST-C skor po Oksfordskoj klasifikaciji, u slučajevima HSP razred oštećenja po ISKDC klasifikaciji, a u slučajevima FSGS varijanta po Kolumbija klasifikaciji. Iz povijesti bolesti svih ispitanika prikupljeni su laboratorijski pokazatelji bubrežne funkcije u vrijeme biopsije: prisutnost hematurije (ne/da), vrijednosti arterijskog tlaka (mmHg), serumskog kreatinina (μmol/L), klirensa kreatinina (ml/min/1.73m^2) i proteinurije (mg/dU), a iz računalne pismohrane Zavoda za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku KBC Split kontrolni nalazi serumskog keratinina i klirensa kreatinina. Vrijeme praćenja je bilo do 1. siječnja 2019. godine. Imunoflorescentni preparati analizirani su na Olympus invertiranom fluorescentnom mikroskopu IX51 i slikani na povećanju 400 x digitalnom kamerom (Olympus, Japan), na 10 nepreklapajućih polja. Slike su obrađene pomoću CellA Imaging Software za mikroskopiju (Olympus Life Sciences Microscopy) te analizirane pomoću ImageJ softvera (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Preparati bojeni imunohistokemijski pregledani su na svjetlosnom mikroskopu Olympus BX41, slikani u cijelosti pomoću digitalne kamere Olympus DP26 na povećanju 200 x i analizirani u programu CellSense Standard Life Science.

3.5. Analiza

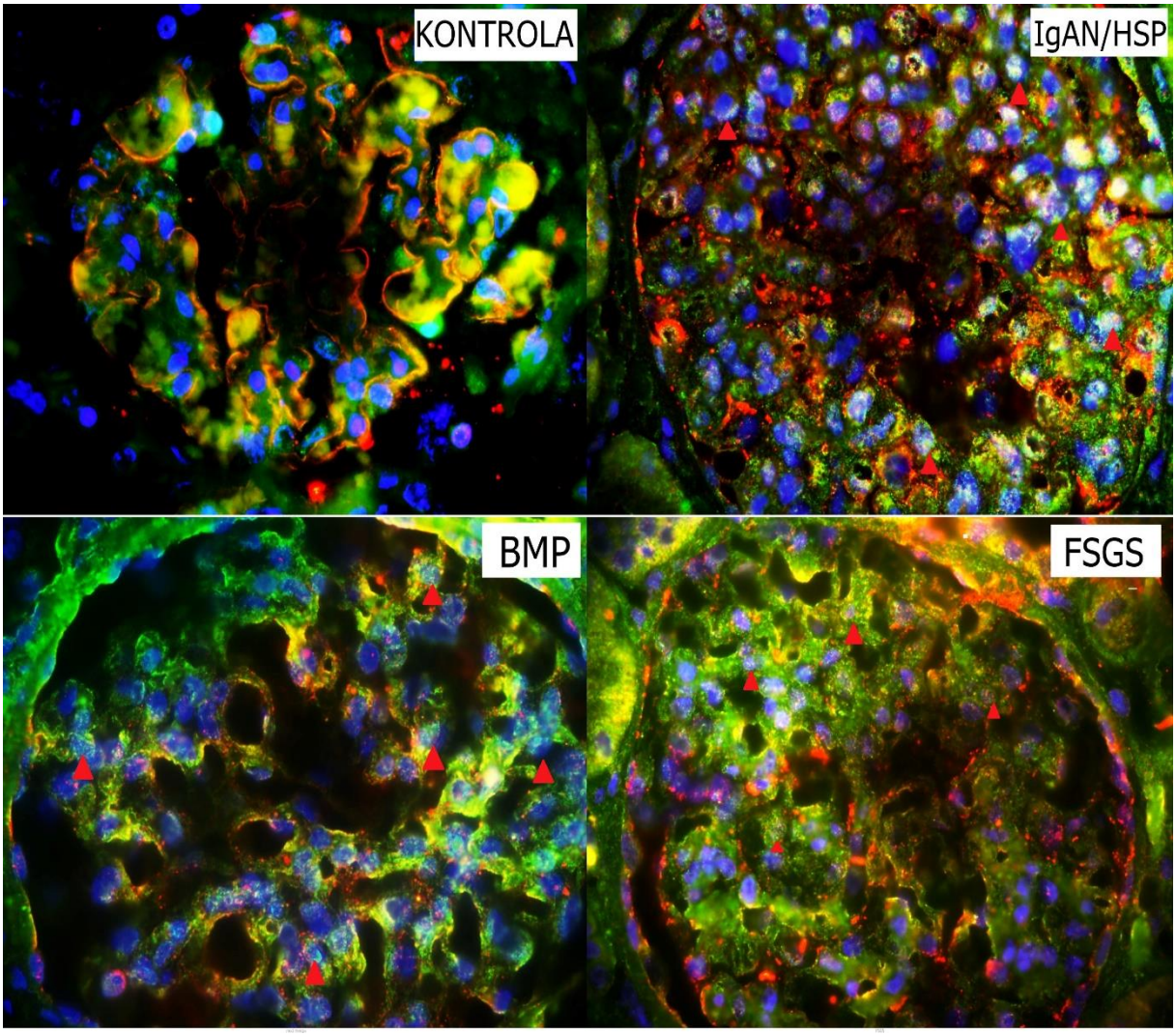
Analiziran je imunohistokemijski izražaj dendrina, CTGF i c-Myb.

3.5.1. Analiza izražaja dendrina

Na slikama dvostrukog imunoflorescentnog bojenja u podocitima je izražena kolokalizacija dendrina i nefrina kao biljega podocita (Slika 20 i 21).

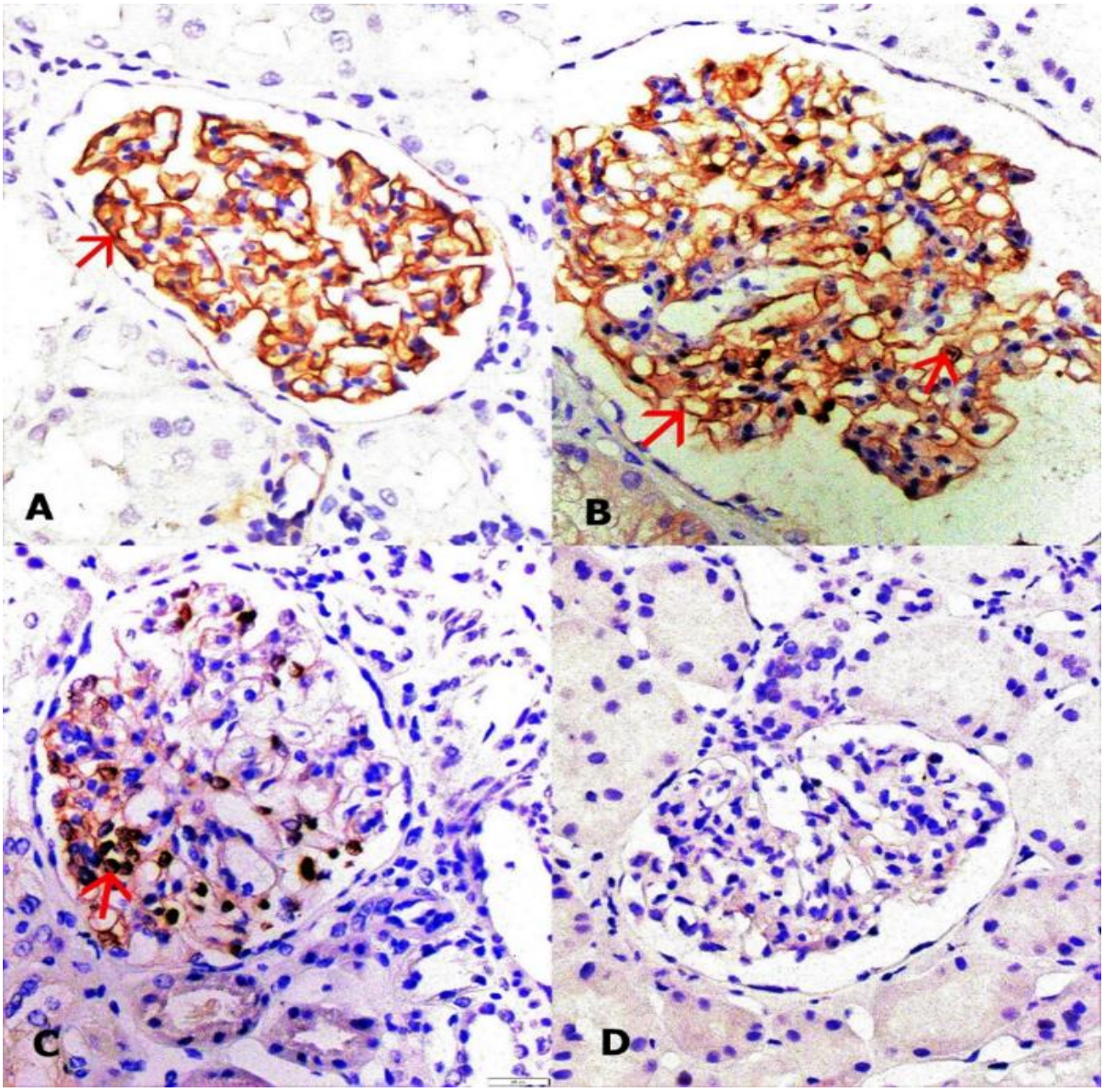


Slika 20. Izražaj dendrina u kontrolnoj skupini i glomerularnim bolestima; fluorescentni mikroskop, imunofluorescentno bojanje, 400 x, preklopljeno dendrin (zeleno), nefrin (crveno) i DAPI (plavo)



Slika 21. Nuklearni izražaj dendrina u kontrolnoj skupini i glomerularnim bolestima. fluorescentni mikroskop, imunofluorescentno bojanje, 400 x; preklopljeno dendrin (zeleno), nefrin (crveno) i DAPI (plavo)

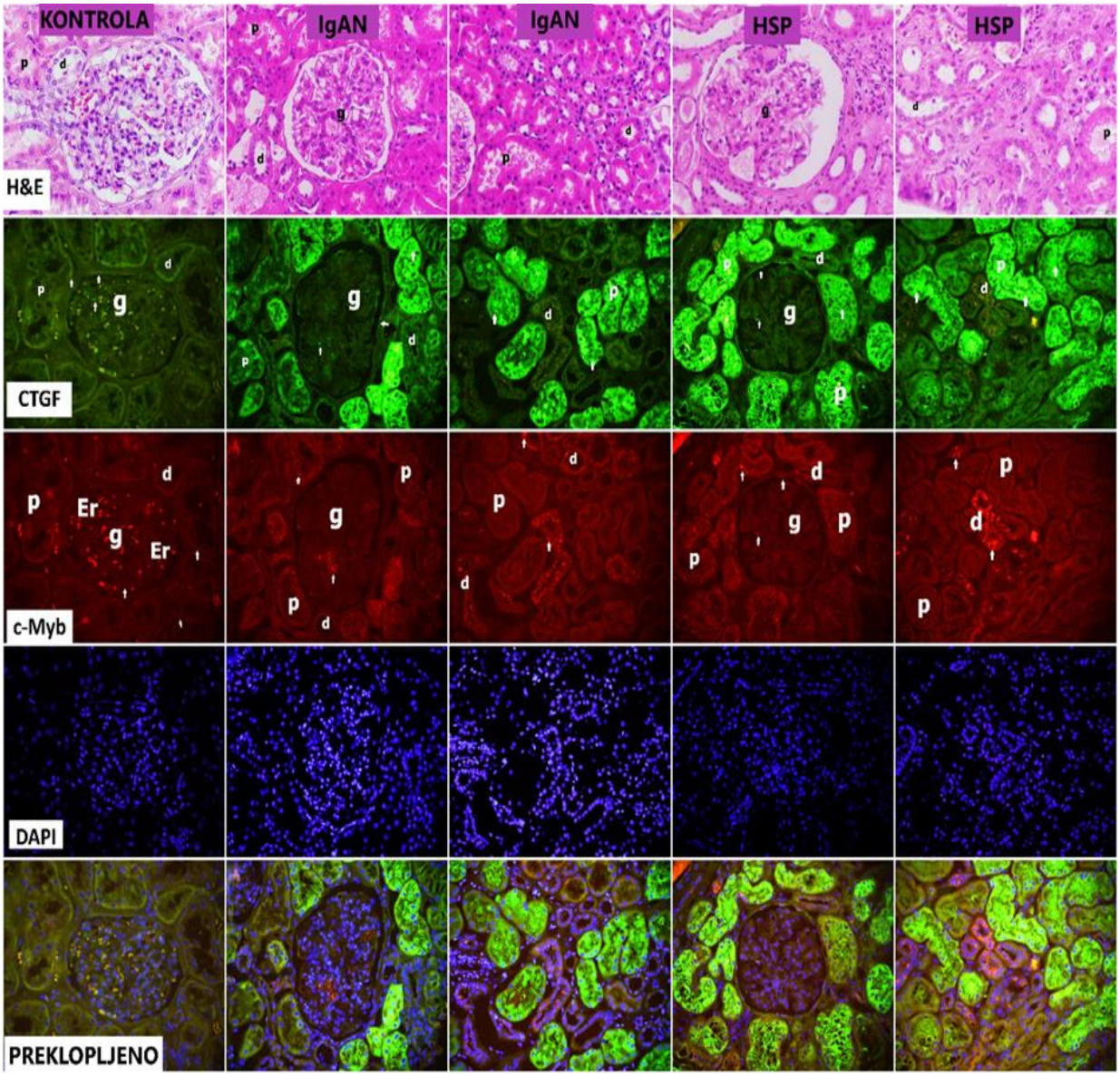
U imunohistokemijskim preparatima je analiziran apsolutni broj dendrin pozitivnih jezgara u svakom glomerulu i izračunata ukupna prosječna vrijednost. Proporcija dendrin negativnih glomerula izračunata je tako da je njihov broj podijeljen s ukupnim brojem glomerula. Predominantni uzorak izražaja dendrina je ocijenjen kao membranski, dualni, nuklearni ili negativni, ovisno o tome je li bojanje za dendrin bilo pozitivno na membrani, jezgri i membrani ili samo jezgri; negativni uzorak značio je negativno membransko i nuklearno bojanje na dendrin uz pozitivnu vanjsku kontrolu (Slika 22).



Slika 22: Uzorak izražaj dendrina: membranski (A), dualni (B), nuklearni (C) ili negativan (D). anti-Dendrin/HRP, 400 x

3.5.2. Analiza izražaja CTGF i c-Myb

U glomerulima je izražaj CTGF u citoplazmi, odnosno c-Myb u jezgri glomerularnih stanica analiziran u svakom glomerulu kao apsolutni broj pozitivnih stanica i izračunata zajednička srednja vrijednost. U tubularnom epitelu je apsolutni broj epitelnih stanica s pozitivnim izražajem CTGF odnosno c-Myb podijeljen s ukupnim brojem epitelnih stanica u kanalićima (Slika 23).



Slika 23. Izražaj CTGF i c-Myb u kontrolnoj skupini, IgAN i HSP, fluorescentni mikroskop, imunofluorescentno bojenje, 400 x; d-distalni tubul, Er-eritrociti, g-glomerul, p-proksimalni kanalić

3.6. Statistička raščlamba

Za statističku analizu korišten je statistički paket SPSS (verzija 19 za Windows; SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Razina statističke značajnosti je bila $P < 0,05$, a svi intervali pouzdanosti (CI) na razini od 95%. Kvalitativni podaci (spol, prisutnost hematurije i arterijske hipertenzije izraženi su kao broj (N) i postotak (%). Kvantitativne varijable (klirens kreatinina, proteinurija, udio intersticijske fibroze, tubularne atrofije i globalno skleroziranih

glomerula) prikazani su kao medijan (minimum-maksimum). Fisherov egzaktni test korišten je u analizi tablica kontingencije kad su ispitivane veličine uzoraka bile male. Razlike u kvalitatitivnim varijablama između ispitivanih skupina analizirane su Fisherovim egzaktnim testom, a u numeričkim neparametrijskim nepovezanim varijablama Kruskal-Wallis testom i u post hoc analizi Mann-Whitney-evim ili Dunovim testom. Za izračun stupnja povezanosti korišten je Spearmanov koeficijent korelacije (Rho).

3.7. Etička načela

Disertacija je sukladna sa svim primjenjivim svjetskim smjernicama i preporukama, čiji je cilj osigurati pravilno ophođenje i rukovanje s biološkim materijalima, u ovom slučaju tkivom bubrega iz parafinskog bloka. Svi prikupljeni podatci su korišteni isključivo u istraživačke svrhe, bez navođenja bilo kakvih osobnih ili drugih podataka o bolesnicima. Istraživanja su odbrena od strane Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Split, studija 1: Ur.br: 2181-147-01/06/M.S.-18-2 i studija 2: Ur.br: 2181-147-01/06/M.S.-19-2). Istraživanje je provedeno u skladu s načelima Helsinške deklaracije.

4. REZULTATI

U istraživanje je uključeno 48 ispitanika s glomerulopatijom. Imunohistokemijska analiza izražaja dendrina urađena je u 25 ispitanika, imunoflorescentna analiza CTGF i c-Myb u 15 ispitanika, a u 8 ispitanika analizirana su sva tri biljega. U kontrolnoj skupini je bilo 12 ispitanika podvrgnutih nefrektomiji 2018. godine zbog svijetlostaničnog karcinoma bubrega; u bioptičkom uzorku analizirano je bubrežno tkivo periferno od tumora. Medijan dobi u kontrolnoj skupini je bio 56 godina (min-maks 52-61 godina), a bilo je 8 ispitanika muškog spola i 4 ženskog spola; svi su imali urednu bubrežnu funkciju u vrijeme nefrektomije uz odsustvo čimbenika rizika za razvoj KBB. U Tablici 4 prikazani su epidemiološki, klinički i laboratorijski pokazatelji u 48 ispitanika s glomerulopatijom.

Tablica 4. Prikaz kliničkih i laboratorijskih pokazatelja u 48 ispitanika s glomerulopatijom.

Ispitanik	Glomerulopatija	Spol	Dob	Hematurija	Povišeni arterijski tlak	sK1 (µmol/L)	KK1 (ml/min)	Proteinurija (mg/dU)	sK2 (µmol/L)	KK2 (ml/min)
1		Ž	15	DA	NE	120	58	970	56	120
2		M	32	DA	DA	143	55	4100	1621	3
3		Ž	37	DA	NE	51	118	1460	62	109
4		M	50	DA	DA	200	32	910	318	18
5		M	15	DA	DA	53	150	3800	98	95
6		Ž	57	DA	DA	71	81	3700	120	42
7		M	15	DA	DA	57	146	778	91	103
8		M	33	DA	DA	98	87	2500	97	76
9		Ž	23	NE	DA	205	29	5400	1200	3
10		Ž	12	DA	NE	45	147	4000	43	147
11		M	17	DA	DA	61	140	374	124	70
12	**IgAN**	M	23	NE	DA	263	28	4500	363	17
13		M	18	NE	DA	82	120	200	98	87
14		Ž	23	NE	NE	50	131	5000	56	114
15		Ž	50	NE	NE	157	33	3400	256	17
16		M	59	NE	DA	495	10	4595	941	5
17		M	50	NE	DA	133	53	2300	213	28
18		M	52	NE	DA	81	96	5250	800	6
19		M	46	NE	DA	109	70	4500	134	47
20		M	52	NE	DA	150	45	1500	114	59
21		M	51	NE	DA	235	27	63	532	9
22		M	19	NE	DA	86	112	9000	92	91
23		M	56	NE	NE	96	76	7221	65	100
24		Ž	13	DA	NE	55	136	1900	53	133
25		M	5	NE	DA	38	184	6450	37	171
26	**HSP**	M	9	DA	NE	43	170	6208	58	148
27		M	65	NE	DA	301	18	4850	354	13
28		Ž	17	DA	NE	76	99	5751	83	87
29		M	14	DA	NE	94	69	2000	127	64
30		M	30	DA	DA	280	25	3100	151	47
31	**BMP**	M	54	NE	NE	85	89	9235	108	63

Ispitanik	Glomerulopatija	Spol	Dob	Hematurija	Povišeni arterijski tlak	sK1 (µmol/L)	KK1 (ml/min)	Proteinurija (mg/dU)	sK2 (µmol/L)	KK2 (ml/min)
32	BMP	M	16	DA	DA	148	59	28254	98	94
33		M	24	NE	DA	83	113	15867	76	114
34		M	3	NE	DA	28	212	13909	39	180
35		Ž	54	NE	NE	180	27	2707	73	76
36		Ž	4	NE	DA	42	159	4253	37	162
37		M	56	NE	DA	129	53	18677	62	103
38	FSGS	M	68	NE	NE	95	71	22720	117	52
39		Ž	35	NE	DA	69	98	8550	72	92
40		M	35	NE	DA	234	30	5200	425	14
41		Ž	8	NE	DA	174	39	8765	490	10
42		Ž	51	DA	DA	119	46	3080	202	24
43		M	62	DA	DA	142	45	5015	552	8
44		Ž	59	DA	DA	65	89	4701	59	91
45		M	42	NE	DA	80	104	11214	139	51
46		M	76	NE	DA	101	62	6380	89	68
47		Ž	17	DA	NE	141	47	558	703	7
48		M	12	NE	DA	46	162	100	105	90

*Kruskal-Wallis test, Mann Whitney test; sK1 - serumski kreatinin u vrijeme biopsije , sK2 - serumski kreatinin na kraju praćenja, KK1 – klirens kreatinina u vrijeme biopsije, KK2 - klirens kreatinina na kraju praćenja

Od 48 ispitanika, 22 su imala IgAN, 8 HSP, 7 BMP i 11 ispitanika FSGS. Medijan životne dobi je iznosio 32,5 godina (min-maks: 3-76 godina). 16 (33%) ispitanika je bilo ženskog i 32 (67%) muškog spola. 31 ispitanik je imao hematuriju, 20 nereguliranu arterijsku hipertenziju, a 40 periferne edeme. Hematurija je bila češća u ispitanika s IgAN i HSP nego u ispitanika s BMP i FSGS (P=0,007). Nije utvrđena razlika među glomerulopatijama u broju ispitanika s nereguliranom arterijskom hipertenzijom (P=0,116). Visina proteinurije u vrijeme biopsije razlikovala se s obzirom na tip glomerulopatije (P=0,005). Razlika je utvrđena između IgAN i HSP, 3550 mg prema 5300 mg (P=0,019), IgAN i FSGS, 3550 mg prema 5200 mg (P=0,034), IgAN i BMP, 3550 mg prema 13909 mg (P=0,003), a između BMP i HSP, 13909 mg prema 5300 mg, je bila granično značajna (P=0,056). Među ispitanicima s različitim glomerulopatijama nije utvrđena značajna razlika u vrijednosti sK i KK u vrijeme biopsije (P=0,823, odnosno P=0,773), ali na kraju praćenja razlika je postojala (P=0,022 odnosno P=0,017). Medijan KK na kraju praćenja bio je snižen u FSGS, 51 ml/min i IgAN, 53 ml/min, a normalan u u HSP, 93,5 ml/min i BMP, 103 ml/min.

Tablica 5. Usporedba medijana (min-maks) praćenih kliničkih i histoloških varijabli u IgAN i HSP.

Varijable	**Ispitanici (N=30)**	**IgAN (N=22)**	**HSP (N=8)**	***P****	**Z**
Klirens kreatinina u trenutku biopsije (ml/min/1.73 m^2)	78,50 (10-184)	75,50 (10-150)	87,50 (18-184)	0,62	-0,49
Proteinurija (mg/dan)	3750 (63-9000)	3550 (63-9000)	5300 (1900-7221)	0,02	-2,34
Kontrolni klirens kreatinina (ml/min/1.73m^2)	67 (3-171)	53 (3-145)	93,5 (13-171)	0,08	-1,71
Globalno sklerozirani glomeruli	0,07 (0-0,62)	0,10 (0-0,62)	0 (0-0,20)	0,07	1,76
Tubularna atrofija	0,01 (0-0,70)	0,04 (0-0,70)	0,01 (0-0,10)	0,05	0,94
Intersticijska fibroza	0,01 (0-0,70)	0,04 (0-0,70)	0,01 (0-0,10)	0,05	0,94

*Mann-Whitney test

Ispitanici s HSP imali su značajno veću proteinuriju u vrijeme biopsije nego ispitanici s IgAN (P=0,02), dok se vrijednosti KK u vrijeme biopsije i KK na kraju praćenja nisu značajno razlikovale (P=0,62 odnosno P=0,08), iako postoji trend lošije bubrežne funkcije u IgAN. Udio tubularne atrofije i intersticijske fibroze je bio značajno veći u IgAN nego u HSP (P=0,05). Potom je analizirana povezanost vrijednosti KK u vrijeme biopsije i KK na kraju praćenja s dodijeljenim MEST-C zbrojem (Tablica 6).

Tablica 6. Usporedba MEST- C zbroja s klirensom kretinina u vrijeme biopsije i na zadnjoj kontroli u 30 ispitanika s IgAN i HSP.

MEST+C zbroj	**Ispitanici (N=30)**	**KK1 (ml/min)**	***P****	**KK2 (ml/min)**	***P****
M0	4	124,5	NA†	88,5	NA†
M1	26	72,5		59	
E0	21	69	1,360	59	0,603
E1	9	99		87	
S0	14	104	0,070	89	0,041
S1	16	49		23	
T0	23	97	0,008	87	0,012
T1 + T2	7	29		17	
C ne	15	70	0,400	42	0,025
C da	15	87		94	

*Mann Whitney test; †NA – non applicable (nije primjenjivo), M-mezangijska hipercelularnost, E-endokapilarna hipercelularnost, S-segmentalna glomeruloskleroza, T-tubularna atrofija/intersticijska fibroza, C-polumjeseci (engl. *crescents*)

S1 i T1+T2 su bili povezani s nižim KK na kraju praćenja ($P < 0,05$). S obzirom na samo 4 ispitanika u M0 skupini, statistička analiza nije bila moguća, ali postoji trend razlike prema M1. Prisutnost polumjeseca u vrijeme biopsije je povezana s višim vrijednostima KK na kraju praćenja (P=0,025).

Od 11 ispitanika s FSGS, 6 je imalo klasičnu, 4 perihilarnu, a 1 vršnu varijantu. Urađena je usporedba laboratorijskih i histoloških pokazatelja između BMP i FSGS, ali je utvrđena samo značajna razlika u medijanu KK na kraju praćenja (Z=-2,81 P=0,01) (Tablica 7).

Tablica 7. Usporedba BMP i FSGS po laboratorijskim i morfološkim pokazateljima.

Varijable	**Svi bolesnici (N=18)**	**BMP (N=7)**	**FSGS (N=11)**	***P****	**Z**
Klirens kreatinina u trenutku biopsije (ml/min/1.73 m^2)	66,5 (27-212)	81 (27-212)	62 (30-162)	0,39	-0,86
Proteinurija (mg/dan)	7465 (100-28254)	13909 (2707-28254)	5200 (100-22720)	0,15	-1,45
Kontrolni klirens kreatinina (ml/min/1.73 m^2)	72 (7-180)	103 (63-180)	51 (7-92)	0,01	-2,81
Globalno sklerozirani glomeruli	0 (0-0,50)	0,04 (0-0,05)	0,05 (0-0,50)	0,86	0,18
Tubularna atrofija	0,01 (0-0,35)	0 (0-0,10)	0,07 (0-0,44)	0,40	0,84
Intersticijska fibroza	0,01 (0-0,35)	0 (0-0,10)	0,05 (0-0,35)	0,37	0,90

4.1. Analiza izražaja dendrina

Imunohistokemijsko bojanje na dendrin urađeno je u 33 ispitanika s glomerulopatijom. Njihovi klinički i laboratorijski pokazatelji prikazani su u Tablici 8.

Tablica 8. Prikaz kliničkih i laboratorijskih pokazatelja u 33 ispitanika s glomerulopatijom u kojih je analiziran dendrin

Ispitanik	Dijagnoza	Spol	Dob	Hematurija	Arterijski tlak	sK1 (µmol/L)	KK1 (ml/min)	Proteinurija (mg/dU)	sK2 (µmol/L)	KK2 (ml/min)
1	IgAN + HSP	Ž	37	DA	NE	51	118	1460	62	109
2		M	50	DA	DA	200	32	910	318	18
3		M	15	DA	DA	53	150	3800	98	95
4		Ž	12	DA	NE	45	147	4000	43	147
5		Ž	23	NE	NE	50	131	5000	56	114
6		Ž	50	NE	NE	157	33	3400	256	17
7		M	52	NE	DA	81	96	5250	800	6
8		M	46	NE	DA	109	70	4500	134	47
9		M	52	NE	DA	150	45	1500	114	59
10		M	51	NE	DA	235	27	63	532	9
11		M	19	NE	DA	86	112	9000	92	91
12		M	9	DA	NE	43	170	6208	58	148
13		Ž	17	DA	NE	76	99	5751	83	87
14		M	14	DA	NE	94	69	2000	127	64
15		M	30	DA	DA	280	25	3100	151	47
16	BMP	M	54	NE	NE	85	89	9235	108	63
17		M	16	DA	DA	148	59	28254	98	94
18		M	24	NE	DA	83	113	15867	76	114
19		M	3	NE	DA	28	212	13909	39	180
20		Ž	54	NE	NE	180	27	2707	73	76
21		Ž	4	NE	DA	42	159	4253	37	162
22		M	56	NE	DA	129	53	18677	62	103
23	FSGS	M	68	NE	NE	95	71	22720	117	52
24		Ž	35	NE	DA	69	98	8550	72	92
25		M	35	NE	DA	234	30	5200	425	14
26		Ž	8	NE	DA	174	39	8765	490	10
27		Ž	51	DA	DA	119	46	3080	202	24
28		M	62	DA	DA	142	45	5015	552	8
29		Ž	59	DA	DA	65	89	4701	59	91
30		M	42	NE	DA	80	104	11214	139	51
31		M	76	NE	DA	101	62	6380	89	68
32		Ž	17	DA	NE	141	47	558	703	7
33		M	12	NE	DA	46	162	100	105	90

U raspodjeli ispitanika po spolu je bilo 12 (36%) ženskog i 21 (64%) muškog spola, medijana životne dobi 35 godina (min-maks: 3-76 godina). 13 (39%) ispitanika je imalo hematuriju, 22 (67%) arterijsku hipertenziju, 30 (90%) periferne edeme. Prosječna vrijednost proteinurije u vrijeme biopsije je bila 5000 mg/dU (min-maks: 63-28254 mg/dU), KK u vrijeme biopsije 71 (min-maks: 27-212) ml/min, a KK na kraju praćenja 68 ml/min (min-maks: 6-180 ml/min).

Nije nađena statistički značajna razlika u praćenim kliničkim i laboratorijskim pokazateljima između skupine ispitanika s upalnim glomerulopatijama (IgAN i HSP) i skupine ispitanika s neupalnim glomerulopatijama (FSGS i BMP) (Tablica 9).

Tablica 9. Klinički pokazatelji u upalnim (IgAN i HSP) i neupalnim (BMP i FSGS) glomerulopatijama u 33 ispitanika u kojih je analiziran izražaj dendrina.

	Varijable		**Glomerulopatija**				***P***
			upalna		**neupalna**		
			IgAN (n=11)	**HSP (n=4)**	**MCD (n=7)**	**FSGS (n=11)**	
U vrijeme biopsije	Hematurija	da	4	4	1	4	0,169*
	arterijska hipertenzija	da	7	1	5	9	0,163*
	proteinurija (mg/dU)	≥ 3400	6	2	6	9	0,126*
	klirens kreatinina (ml/min)	median (min-maks)	96 (27-150)	84 (25-170)	89 (27-212)	62 (30-162)	0,800**
Na zadnjoj kontroli	klirens kreatinina (ml/min)	median (min-maks)	59 (6-147)	75,5 (47-148)	103 (63-180)	51 (7-92)	0,942**

*Fisher's exact test **Mann Whitney test

Uzorak izražaja dendrina određen je za svakog ispitanika prema prevladavajućem uzorku na cijelom preparatu. Nuklearni uzorak utvrđen je u devet (27,27%) ispitanika, dualni u 16 (48,48%) i negativni u 8 (24,24%) ispitanika. U tablici 10 prikazani su uzroci izražaja dendrina i laboratorijski pokazatelji.

Tablica 10. Prikaz uzorka izražaja dendrina i laboratorijski pokazatelji u 33 ispitanika s glomerulopatijama.

Ispitanik	Dijagnoza	Broj dendrin pozitivnih jezgara (medijan)	Proporcija dendrin negativnih glomerula (x 100=%)	Uzorak izražaja dendrina	sK1 (µmol/L)	KK1 (ml/min)	Proteinurija (mg/dU)	sK2 (µmol/L)	KK2 (ml/min)
1		4,60	0	nuklearan	51	118	1460	62	109
2		5,60	0	dualan	200	32	910	318	18
3		0	1	negativan	53	150	3800	98	95
4		3,85	0	dualan	45	147	4000	43	147
5		1,50	0,50	dualan	50	131	5000	56	114
6		1,50	0,50	dualan	157	33	3400	256	17
7	**IgAN**	0	1	negativan	81	96	5250	800	6
8	**+**	0	1	negativan	109	70	4500	134	47
9	**HSP**	2,33	0,33	nuklearan	150	45	1500	114	59
10		0	1	negativan	235	27	63	532	9
11		2,50	0	dualan	86	112	9000	92	91
12		2,33	0	dualan	43	170	6208	58	148
13		2,43	0	dualan	76	99	5751	83	87
14		0	1	negativan	94	69	2000	127	64
15		1,67	0,5	dualan	280	25	3100	151	47
16		7	0	nuklearan	85	89	9235	108	63
17		4	0	dualan	148	59	28254	98	94
18		6,70	0	dualan	83	113	15867	76	114
19	**BMP**	3,13	0	dualan	28	212	13909	39	180
20		23,12	0	nuklearan	180	27	2707	73	76
21		2,00	0	dualan	42	159	4253	37	162
22		5,88	0,06	nuklearan	129	53	18677	62	103
23		2,18	0,27	dualan	95	71	22720	117	52
24		5	0,03	nuklearan	69	98	8550	72	92
25		0	1	negativan	234	30	5200	425	14
26		1,17	0,86	nuklearan	174	39	8765	490	10
27		3,80	0,40	nuklearan	119	46	3080	202	24
28	**FSGS**	0	1	negativan	142	45	5015	552	8
29		4,89	0	dualan	65	89	4701	59	91
30		9,46	0	dualan	80	104	11214	139	51
31		5,63	0	nuklearan	101	62	6380	89	68
32		0	1	negativan	141	47	558	703	7
33		2,78	0	dualan	46	162	100	105	90

Između skupine upalnih (IgAN i HSP) i neupalnih glomerulopatija (BMP i FSGS) nije nađena značajna razlika u raspodjeli dualnog i nuklearnog uzorka (Fisher's exact test, P=0,299), kao ni dualnog i nuklearnog prema negativnom uzorku izražaja dendrina (Fisher's exact test, P=0,418). Nuklearni izražaj dendrina nije bio povezan s proteinurijom (Rho=0,324, P=0,066) niti udjelom glomerula s negativnim izražajem dendrina (Rho=-0.284, P=0.109). Prema

Spearmanovom koeficijentu korelacije, postojala je negativna povezanost između nuklearnog izražaja dendrina i udjela globalno ožiljno promjenjenih glomerula (Rho=-0,409, P=0,018). Nuklearni izražaj dendrina nije bio povezan s udjelom intersticijske fibroze (Rho=- 0,167, P=0,353) ni tubularne atrofije (Rho=-0.277, P=0,119). Proporcija glomerula s negativnim izražajem dendrina je bila povezana s intersticijskom fibrozom (Rho=0,363, P=0,038), tubularnom atrofijom (Rho=0,437, P=0,011) i globalno ožiljno promijenjenim glomerulima (Rho=0,451, P=0,008). Uzorci izražaja dendrina uspoređeni su između glomerulopatija i kontrole (Tablica 11).

Tablica 11. Nuklearni izražaj dendrina i proporcija glomerula s negativnim izražajem dendrina u 33 ispitanika s glomerulopatijama i kontrolnoj skupini.

Izražaj dendrina medijan (min-maks)	**Glomerulopatija (N=33)**				
	Upalna (n=15)	**Neupalna (n=18)**			
	IGAN + HSP	**BMP**	**FSGS**	**Kontrola**	***P****
Nuklearni izražaj denrina	1,67 (0,00 – 5,60)	5,90 (2,00-23,10)	2,80 (0,00 – 9,50)	0,50 (0,00 – 2,20)	0,004
Proporcija glomerula s negativnim izražajem dendrina	0,50 (0,00 – 1,00)	0,00 (0,00 – 0,06)	0,27 (0,00 – 1,00)	0,00 (0,00- 0,00)	0,003

*Kruskal Wallis test **median (min-maks)

Utvrđena je značajna razlika u nuklearnom izražaju dendrina između ispitanika s glomerulopatijama i kontrole (χ^2 =13,10; P=0,004). Medijan nuklearnog izražaja dendrina je bio veći u skupini neupalnih nego upalnih glomerulopatija, 3,90 prema 1,67 (P=0,028, Z=2,22, r=0,38 95% CI 0,12-4,34). Nuklearni izražaj dendrina je bio veći u BMP nego IgA/HSP (P=0,033) i kontroli (P=0,003), ali nije se značajno razlikovao od FSGS (P=0,363). Između IgAN+HSP i FSGS nije bilo razlike u nuklearnom izražaju dendrina (P=1,000).

Medijan proporcije glomerula s negativnim izražajem dendrina se značajno razlikovao između ispitanika s glomerulopatijom i kontrole (χ^2 =13,60; P=0,003). U IgAN + HSP i FSGS je bio značajno veći nego u kontroli (P=0,015 odnosno P=0,035). U IgAN i HSP je bio za 0,5

veći nego u BMP (Z=2,20, r=0,46; P=0,027). U FSGS je bio veći nego u BMP (Z=2,14; r=0,45; P=0,032). Nije utvrđena razlika između IgAN + HSP i FSGS (P=1,000) te između BMP i kontrole (P=1,000). Nuklearni izražaj dendrina nije bio povezan s KK u vrijeme biopsije (Rho=0,150, P=0,403), ali je značajno pozitivno korelirao s KK na kraju praćenja (Rho=0,433, P=0,012). Utvrđena je značajna negativna korelacija između proporcije glomerula s negativnim izražajem dendrina s KK u vrijeme biopsije (Rho=-0,444; P=0,010) i na kraju praćenja (Rho=-0,626; P <0,001). Proteinurija nije bila povezana s nuklearnim izražajem dendrina (Rho=0,324, P=0,066), kao ni s proporcijom glomerula s negativnim izražajem dendrina (Rho=-0,284, P=0,109). Analiziran je uzorak izražaja dendrina s obzirom na praćene patohistološke i laboratorijske pokazatelje (Tablica 12).

Tablica 12. Povezanost uzorka izražaja dendrina s patohistološkim i laboratorijskim pokazateljima u 33 ispitanika s glomerulopatijom.

	Uzorak izražaja dendrina u 33 ispitanika s glomerularnim bolestima			
Varijabla	**Nuklearni (N=9)**	**Dualni (N=16)**	**Negativni (N=8)**	***P****
Intersticijska fibroza	0,05 (0,00 – 0,35)	0,01 (0,00 – 0,20)	0,10 (0,00 – 0,20)	0,024
Tubularna atrofija	0,01 (0,00 – 0,35)	0,01 (0,00 – 0,20)	0,10 (0,01 – 0,25)	0,017
Globalno ožiljno promijenjeni glomeruli	0,04 (0,00 – 0,35)	0,00 (0,00 – 0,21)	0,17 (0,00 – 0,50)	0,056
Klirens kreatinina u trenutku biopsije (ml/min/1.73m^2)**	53 (27 - 118)	108 (25 - 212)	58 (27 - 150)	0,073
Klirens kreatinina na posljednjoj kontroli (ml/min/1.73m^2)**	68 (10 - 109)	91 (17 - 180)	11,5 (6 - 95)	0,009
Proteinurija (mg/dU)**	6380 (1460 - 18677)	5375 (100 - 28254)	4150 (63 - 5250)	0,208

*Kruskal-Wallis test; **median (min-maks)

Udio intersticijske fibroze i tubularne atrofije su bili povezani s uzorkom izražaja dendrina (χ^2=7,5, P=0,024 odnosno χ2=8,1, P=0,017). Medijan intersticijske fibroze odnosno tubularne

atrofije je bio za 0,09 veći u skupini s uzorkom negativnog izražaja dendrina nego u skupini s dualnim izražajem (r=0,47, P=0,044, odnosno r=0,55; P=0,016). Vrijednost KK na zadnjoj kontroli je bila značajno povezana s uzorkom izražaja dendrina (χ^2=9,30, P=0,009). Mann-Whitney post-hoc analiza nije utvrdila razliku između ispitanika s nuklearnim i dualnim izražajem dendrina (Z=1,20; P=0,234). KK na zadnjoj kontroli je bio niži u ispitanika s negativnim izražajem dendrina nego u onih s nuklearnim izražajem dendrina (Z=2,10 r=0,52; P=0,034) i niži nego u onih s dualnim izražajem (Z=2,80, r=0,59, P=0,004). Nije utvrđena povezanost uzorka izražaja dendrina s klirensom kreatinina u vrijeme biopsije (χ2=5,20, P=0,073), s udjelom globalno ožiljno promjenjenih glomerula (P=0,056), kao ni s proteinurijom (χ2=3,1, P=0,208). Tri slučaja HSP su bili u stadiju 3 i jedan u stadiju 6 po ISKDC klasifikaciji, ali su zbog malog broja u studiji analizirani zajedno s IgAN/HSP i svima je određen MEST-C skor (Tablica 13).

Tablica 13. Raspodjela uzoraka izražaju dendrina i MEST-C skora po Oksfordskoj klasifikaciji u 15 ispitanika s IgAN i HSP.

			DENDRIN			OKSFORDSKA KLASIFIKCIJA				
Ispitanik	**Spol**	**Dob**	**Broj dendrin pozitivnih jezgara***	**Proporcija dendrin negativnih glomerula****	**Uzorak izražaja dendrina**	**M**	**E**	**S**	**T**	**C**
1	Ž	37	4,60	0	nuklearan	1	0	1	0	da
2	M	50	5,60	0	dualan	1	0	0	0	ne
3	M	15	0	1	negativan	1	1	0	0	ne
4	Ž	12	3,85	0	dualan	1	0	0	0	ne
5	Ž	23	1,50	0,50	dualan	1	0	1	0	ne
6	Ž	50	1,50	0,50	dualan	1	0	1	0	da
7	M	52	0	1	negativan	1	0	0	0	da
8	M	46	0	1	negativan	1	0	0	0	da
9	M	52	2,33	0,33	nuklearan	1	1	0	0	da
10	M	51	0	1	negativan	1	0	1	0	ne
11	M	19	2,50	0	dualan	1	1	1	0	ne
12	M	9	2,33	0	dualan	1	0	1	0	da
13	Ž	17	2,43	0	dualan	0	0	1	0	da
14	M	14	0	1	negativan	0	0	1	0	ne
15	M	30	1,67	0,5	dualan	1	1	0	0	da

*medijan;** x 100=%

U skupini IgAN/HSP kod dva bolesnika predominantni uzorak izražaja dendrina je bio nuklearni, kod pet negativan, a u osam dualan. Medijan broja dendrin pozitivnih jezgara i

proporcija dendrin negativnih glomerula se nisu razlikovali ovisno o MEST-C zbroju (svi P > 0,05) (Tablica 14).

Tablica 14. Broj dendrin pozitivnih jezgara u 15 ispitanika s IgAN i HSP prema MEST-C zbroju Oksfordske klasifikacije.

Varijabla		N	Dendrin pozitivne jezgre median (min-maks)	*P**
Mezangijska hipercelularnost	M0	2	1,50 (0,00 – 4,60)	0,941
	M1	13	2,00 (0,00 – 5,60)	
Endokapilarna proliferacija	E0	11	1,50 (0,00 – 5,60)	0,549
	E1	4	2,40 (0,00 – 3,85)	
Segmentalna skleroza	S0	7	2,30 (0,00 – 5,60)	0,376
	S1	8	1,50 (0,00 – 4,60)	
IFTA**	T0	15	1,70 (0,00 – 5,60)	/
Polumjeseci	ne	7	2,30 (0,00–5,60)	0,668
	da	8	1,58 (0,00–3,85)	

*Mann-Whitney test; **IFTA intersticijska fibroza i tubularna atofija

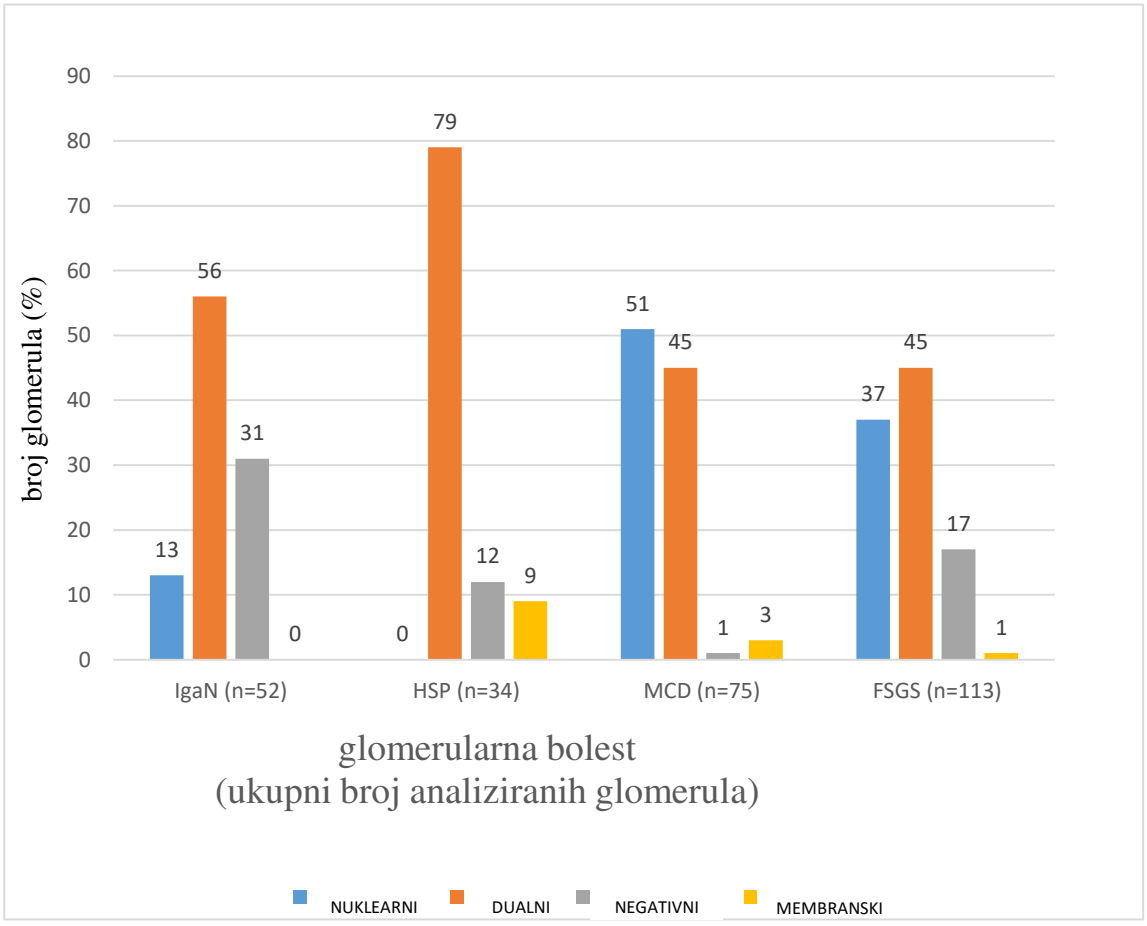
U daljnjem istraživanju je analiziran uzorak izražaja dendrina prema tipu glomerularne bolesti na način da su zbrojeni svi glomeruli u pojedinim tipovima glomerulopatije (Tablica 15).

Tablica 15. Raspodjela uzoraka izražaja dendrina u ukupnom broju glomerula u 33 ispitanika s glomerularnom bolesti

Uzorak izražaja dendrina	ukupni broj analiziranih glomerula po tipu glomerularne bolesti n (%)				
	IgAN (n=52)	**HSP (n=34)**	**BMP (n=75)**	**FSGS (n=113)**	***P****
nuklearni	7 (13)	0 (0)	38 (51)	42 (37)	<0.001
dualni	29 (56)	27 (79)	34 (45)	51 (45)	
negativni	16 (31)	4 (12)	1 (1)	19 (17)	
membranski	0 (0)	3 (9)	2 (3)	1 (1)	

*χ^2 test

Utvrđena je razlika u raspodjeli uzorka izražaja dendrina među glomerulopatijama (χ^2=52; P < 0,001). U IgAN je nuklearni izražaj nađen u 13%, a u HSP ni u jednom glomerulu (χ^2=9,60; P < 0,001). U BMP je bilo 3,9 puta više glomerula s nuklearnim izražajem nego u IgAN (χ^2=28; P < 0,001). U IgAN je bilo 3,1 puta manje glomerula s nuklearnim izražajem dendrina nego u FSGS (χ^2=19,60; P < 0,001). U BMP je nuklearni izražaj nađen u više od pola glomerula, a u HSP ni u jednom (χ^2=28,20; P < 0,001). U HSP je dualni izražaj bio 1,8 puta češći nego u FSGS (χ^2=19,60; P < 0,001). U BMP je negativni izražaj dendrina bio značajno manji nego u FSGS, 17% i IgAN, 31% (χ^2=12,10; P < 0,001 i χ^2=28; P < 0,001). U HSP je udio dualnih glomerula 1,8 puta bio veći nego u FSGS (χ^2=19,6; P < 0,001). Prikazana je raspodjela uzorka izražaja dendrina u ukupnom broju glomerula po tipu glomerulopatije (Slika 24).



Slika 24. Raspodjela uzorka izražaja dendrina u po tipu glomerulopatije.

4.2. Analiza izražaja CTGF i c-Myb

Izražaj CTGF i c-Myb analiziran je u 23 ispitanika s IgAN i HSP i 8 kontrola. Raspodjela po kliničkim i laboratorijskim pokazateljima prikazana je u Tablici 16.

Tablica 16. Raspodjela po kliničkim, laboratorijskim i patološkim pokazateljima u 23 ispitanika s IgAN i HSP kojima je analiziran izražaj CTGF i c-Myb.

Ispitanik	Bolest	Spol	Dob	Klinička obilježja		Laboratorijski nalazi					Patološki nalazi		
				hematurija	hipertenzija	sK1	KK1	proteinurija	sK2	KK2	IF	TA	GSG
1	IgAN	Ž	15	da	ne	190	33	970	56	160,2	0,01	0,01	0,09
2		M	32	da	da	143	52,8	4100	1621	3	0,05	0,05	0,20
3		Ž	37	da	ne	51	124	1460	62	99	0,02	0,02	0,077
4		M	50	da	da	200	33	910	318	19,2	0,1	0,1	0
5		M	15	da	da	53	108	3800	98	90	0,1	0,1	0,1
6		Ž	57	da	da	71	81	3700	120	43,8	0,05	0,01	0,13
7		M	15	da	da	57	159	778	91	91,8	0	0	0
8		M	33	da	da	98	137,4	2500	97	123,6	0	0	0,27
9		Ž	23	ne	da	205	30	5400	1200	3	0,3	0,2	0,62
10		Ž	12	da	ne	45	181	4000	43	180,6	0,05	0,05	0
11		M	17	da	da	61	160,8	374	124	67,2	0,01	0,01	0,07
12		M	23	ne	da	263	28	4500	363	28,2	0,7	0,7	0,27
13		M	18	ne	da	82	112,8	200	98	82,2	0	0	0
14		Ž	23	ne	ne	50	111	5000	56	114	0,01	0,01	0,05
15		Ž	50	ne	da	157	33	3400	568	6	0,2	0,2	0,21
16		M	59	ne	da	495	19,2	4595	941	5	0,55	0,55	0,36
17		M	50	ne	da	133	53	2300	213	22,8	0,5	0,5	0,50
18	HSP	M	56	ne	ne	82	92	2000	65	100	0,1	0,1	0,09
19		Ž	13	da	ne	55	138	1900	53	140	0	0	0
20		M	5	ne	da	38	355,2	6450	37	262,2	0	0	0
21		M	9	da	ne	43	170	6208	53	129	0,01	0,01	0
22		M	65	ne	da	301	19,2	4850	354	15	0	0	0
23		Ž	17	da	ne	76	99	5751	83	86	0,01	0,01	0,03

Medijan životne dobi je bio 23 godine (min-maks: 5-65 godina). U ispitivanoj skupini je bilo 17 ispitanika s IgAN i 6 s HSP, 14 (61%) muškog i 9 (39%) ženskog spola. U deset bolesnika s IgAN i tri bolesnika s HSP, bolest se prezentirala hematurijom. Trinaest bolesnika s IgAN i dva s HSP su imali arterijsku hipertenziju. Proteinuriju nefrotskog ranga imalo je 8 ispitanika s IgAN i 4 ispitanika s HSP. Udio tubularne atrofije, intersticijske fibroze i globalno skleroziranih glomerula je negativno korelirao s KK u vrijeme biopsije: TA: Rho=-0,533, P=0,009; IF: Rho=-0,476, P=0,022; GSG: Rho=-0,577, P=0,004) i KK na kraju praćenja (TA: Rho=-0,550, P=0,013; IF: Rho=-0,556, P=0,006; GSG: Rho=-0,629, P=0,004). Veličina proteinurije nije bila povezana s udjelom kroničnih patoloških promjena (svi $P > 0,05$). Usporeba medijana praćenih laboratorijskih i patoloških pokazatelja prikazana je u tablici 17.

Tablica 17. Usporedba medijana (min-maks) analiziranih laboratorijskih i patoloških pokazatelja u 23 ispitanika s IgA i HSP.

Varijable	**Svi bolesnici (N=23)**	**IgAN (N=17)**	**HSP (N=6)**	***P****	**Z**
Serumski kreatinin u trenutku biopsije (µmol/L)	82 (38-495)	98 (45-495)	65,5 (38-301)	0,256	1,16
Proteinurija (g/dan)	3,800 (0,200-7,221)	3,400 (0,200-5,400)	6,104 (1,900-7,221)	0,006	2,70
Kontrolni serumski kreatinin (µmol/L)	98 (37-1621)	120 (43-1621)	59 (37-354)	0,044	2,00
Globalno ožiljno promijenjeni glomeruli	0,077 (0-0,62)	0,10 (0-0,62)	0 (0-0,09)	0,024	2,20
Tubularna atrofija	0,010 (0-0,70)	0,050 (0-0,70)	0,005 (0-0,10)	0,074	1,82
Intersticijska fibroza	0,020 (0-0,70)	0,050 (0-0,70)	0,005 (0-0,10)	0,062	1,90

*Mann-Whitney test

Ispitanici s HSP imali su veću proteinuriju u vrijeme biopsije (P=0,006) i višu vrijednost KK na kraju praćenja od ispitanika s IgAN (P=0,044). Za IF i TA postoji trend razlike, jer je njihov udio bio veći u IgAN. Za razliku od IgAN, u HSP nije bilo globalno ožiljno promjenjenih glomerula (P=0,024). U Tablici 18 prikazani su rezultati analize izražaja CTGF i c-Myb u glomerulima i kanalićima ispitanika s IgAN i HSP.

Tablica 18. Prikaz raspodjele po izražaju CTGF i c-Myb i klirensa kreatinina u 23 ispitanika s IgAN i HSP.

		CTGF (medijan)		c-Myb (medijan)		Klirens kreatinina	
Ispitanik	**Bolest**	**glomeruli**	**kanalići**	**glomeruli**	**kanalići**	**KK1**	**KK2**
1		2,67	0,005	3,75	0,14	33	160,2
2		3	0,08	4,5	0,066	52,8	3
3		0,87	0,03	0,25	0,017	124	99
4		2,4	0,03	0,2	0,07	33	19,2
5		1,25	0,1	1,75	0,056	108	90
6		0,67	0,019	0,5	0,04	81	43,8
7		5	0,024	3,5	0,134	159	91,8
8		0	0,14	1,5	0,05	137,4	123,6
9		47,17	0,269	0,67	0,036	30	3
10	IgAN	0	0,205	3	0,022	181	180,6
11		1,5	0,54	0,5	0,057	160,8	67,2
12		0,5	0,025	0,5	0,017	28	28,2
13		1	0,4	3,67	0,03	112,8	82,2
14		0,5	0,044	0	0,033	111	114
15		3	0,007	0	0,059	33	6
16		5	0,17	1	0,048	19,2	5
17		8,2	0,11	3	0,05	53	22,8
23		1	0,178	1	0,01	92	100
24		1,36	0,05	1	0,11	138	140
25		0,33	0,07	0	0,00971	355,2	262,2
26	HSP	2,75	0,19	1,2	0,11	170	129
27		0,67	0,39	1,67	0,11	19,2	15
28		0,22	0,03	0,11	0,05	99	86

Između IgAN i HSP nije bilo razlike u medijanu izražaja CTGF (Z=1,19, P=0,256) i c-Myb (Z=0,843, P=0,431) u glomerulima i kanalićima (Z=0,841, P=0,431, odnosno Z=0,211, P=0,865). Kako nije dokazana značajna razlika, zajedno su uspoređeni s kontrolom (Tablica 19).

Tablica 19. Usporedba medijana izražaja CTGF i c-Myb u glomerulima i kanalićima između ispitanika s IgAN/HSP i kontrole.

		IgAN/HSP (N=23)	Kontrolna skupina (N=8)			
Varijabla		**median (min-maks)**				***P****
CTGF	kanalići	0,08 (0,005 – 0,540)	0,009 (0,0006 – 0,030)	Z=3,4 r=0,61	95% CI:0–0,14	<0,001
	glomeruli	1,25 (0 – 47,200)	1,94 (0,670 – 9,300)	Z=0,791		0,437
c-Myb	kanalići	0,05 (0,0097 – 0,140)	0,009 (0,0012 – 0,069)	Z=2,94 r=0,52	95% CI:0,02–0,06	0,002
	glomeruli	1 (0 – 4,500)	0 (0 – 1,710)	Z=2,8 r=0,50	95% CI:0,40–1,60	0,005

*Mann Whitney test

Izražaj CTGF i c-Myb u kanalićima i c-Myb u glomerulima značajno se razlikovao između IgAN/HSP i kontrole (svi P < 0,05), za razliku od izražaja CTGF u glomerulima (P=0,437). Nije utvrđena povezanost između izražaja CTGF i c-Myb s udjelom IFTA-e i globalno ožiljno promijenjenih glomerula (svi P > 0,05) kao ni sa varijablama iz MEST-C skora. Medijan glomerularnog izražaja c-Myb je pokazao graničnu razliku s obzirom na stupanj skleroze te je iznosio 0,5 u S1, a 1,35 u S0 (P=0,057).

Sinkroni izražaj CTGF i c-Myb nije nađen u glomerulima ni kanalićima (P=0,167 odnosno P=0,205). Utvrđena je pozitivna povezanost između glomerularnog i tubularnog izražaja c-Myb (Rho=0,522, P=0,003), ali ne CTGF (P=0,355). Nije utvrđena značajna razlika u izražaju CTGF i c-Myb s obzirom na arterijsku hipertenziju (svi P > 0,05). Medijan broja c-Myb pozitivnih stanica kanalića je bio veći u ispitanika s hematurijom nego bez hematurije: 0,057 prema 0,034 (Z=2,14, P=0,030, r=0,446). Izražaj tubularnog CTGF i c-Myb pokazao je negativnu povezanost sa životnom dobi (Rho=-0,358, P=0,048 i Rho=-0,398, P=0,026).

Ispitanici su prema vrijednosti KK u vrijeme biopsije podijeljeni u „hiperfiltratore“ (KK>140 ml/min), ispitanike s urednim vrijednostima KK (60–140 ml/min) i ispitanike sa smanjenim KK (<60 ml/min); četvrta je bila kontrolna skupina. Izražaj CTGF i c-Myb je analiziran na razini kanalića i glomerula (Tablica 20).

Tablica 20. Raspodjela medijana izražaja CTGF i c-Myb u kanalićima i glomerulima prema razini klirensa kreatinina u vrijeme biopsije ispitanika s IgAN/HSP.

Varijable median (min-maks)		Kreatinin klirens u vrijeme biopsije (KK1)				*P**
		KK>140 ml/min (N=6)	**KK=60-140 ml/min (N=8)**	**KK<60 ml/min (N=9)**	**Kontrolna skupina (N=8)**	
CTGF	kanalići	0,145 (0,024-0,540)	0,047 (0,019-0,400)	0,080 (0,005-0,390)	0,009 (0,0006-0,03)	0,005
	glomeruli	1,375 (0-5)	0,770 (0-1,360)	3 (0,500-47,170)	1,945 (0,670-9,290)	0,015
c-Myb	kanalići	0,057 (0,009-0,134)	0,037 (0,010-0,110)	0,059 (0,017-0,140)	0,009 (0,001-0,069)	0,016
	glomeruli	1,475 (0-3,500)	0,750 (0-3,670)	1 (0-4,500)	0 (0-1,710)	0,039

*Kruskal-Wallis test

Kruskal-Wallisovim testom dokazana je statistički značajna razlika u izražaju između ispitivanih skupina, a u *post-hoc* analizi korišten je Dunnov test (Tablica 21).

Tablica 21: Usporedba skupina klasificiranih prema vrijednostima klirensa kreatinina u vrijeme biopsije i izražaja CTGF i c-Myb: prikaz P vrijednosti

Skupine prema KK1*	CTGF kanalići	CTGF glomeruli	c-Myb kanalići	c-Myb glomeruli
Povišeni: normalni	NS	NS	NS	NS
Povišeni: sniženi	NS	NS	NS	NS
Povišeni: kontrola	0,005	NS	0,020	0,020
Normalni: sniženi	NS	0,004	NS	NS
Normalni: kontrola	0,006	0,002	0,009	0,060* NS
Sniženi: kontrola	0,009	NS	0,002	0,020

Dunn post-hoc test; *Skupina 1 (N=6): KK >140 ml/min, skupina 2 (N=8): KK = 60-14 ml/min, skupina 3 (N=9): KK <60 ml/s, skupina 4 (N=8): kontrolna. NS nije značajno

Nije uočena razlika u izražaju tubularnog CTGF te tubularnog i glomerularnog c-Myb među skupinama bolesnika neovisno o vrijednosti klirensa kreatinina u trenutku biopsije, ali se svaka skupina značajno razlikovala od kontrolne.

Medijan praćenja ispitanika je bio 7 godina (min-maks: 1–21 godina). Za svakog ispitanika procijenjen je godišnji pad GF zbog senilne involucije bubrega neovisno o posljedicama glomerulonefritisa. S obzirom na varijabilnost duljine praćenja ispitanika, od dobivenog predviđenog KK oduzeta je vrijednost stvarnog KK na zadnjoj kontroli i rezultat uspoređen s izražajem CTGF i c-Myb. Prema Spearmanovom koeficijentu korelacije dobivena je značajna pozitivna povezanost s glomerularnim i tubularnim izražajem c-Myb (Rho=0,589, P=0,002 odnosno Rho=0,588, P=0,002) i tubularnim izražajem CTGF (Rho=0,591, P=0,001). Nije nađena povezanost s glomerularnim izražajem CTGF (Rho=0,101, P=0,623). Na kraju praćenja u ovoj studiji 5 ispitanika je doseglo terminalni stadij KBB i bubrežna funkcija im je bila nadomještana postupkom intermitentne hemodijalize. U tih ispitanika je glomerularni izražaj CTGF bio za 9,9 veći nego u ispitanika koji nisu bili na hemodijalizi (P=0,002, Z=-3,130).

5. RASPRAVA

Analizom bubrežne biopsije utvrđuje se patološka dijagnoza i prisutnost akutnih i kroničnih patoloških promjena relevantnih za prognozu KBB (10,218). Intersticijska fibroza i tubularna atrofija, globalna glomeruloskleroza i vaskularna skleroza su kronične promjene čiji udio može predskazati ishod bubrežne funkcije. IFTA je vrlo dobar, ali nesavršen prognostički pokazatelj (216). Prema Menn-Josephy, bolesnici s udjelom intersticijske fibroze većim od 50% još uvijek mogu imati normalnu bubrežnu funkciju i bolest u 21% bolesnika neće u sljedećih pet godina napredovati u terminalni stadij KBB, no jednako su mogući obrnuti slučajevi (219). Na svijetu 850 milijuna ljudi boluje i 1,2 milijuna godišnje umire od KBB (8). Zbog toga je neophodno stalno tragati za pouzdanim prognostičkim biljezima primjenjivima u svakodnevnom radu (220). U literaturi je malo studija na humanom bioptičkom materijalu o ranom izražaju biljega koji mogu potaknuti mehanizme što dovode do kasnijeg nepovoljnog ishoda KBB. U ovoj disertaciji ispitan je značaj izražaja dendrina, CTGF i c-Myb kao mogućih ranih prognostičkih pokazatelja ishoda bolesti u različitim primarnim glomerulopatijama u ljudi.

Bolesti glomerula su najčešći uzrok terminalnog stadija KBB (8). U glomerulima podociti imaju središnju ulogu u održavanju normalne funkcije pa njihovo oštećenje, apoptoza i posljedična podocitopenija predstavljaju patofiziološki preduvjet za nastanak glomeruloskleroze (8,183). Podocit se u reakciji na oštećenje morfološki i funkcionalno mijenja, a EMT je u spektru tih promjena. Funkcionalnost filtracijske barijere osiguravaju podociti svojim nožicama i sintetiziranim proteinima. Dendrin je smješten na membrani podocita uz filtracijsku barijeru, a nakon ozljede podocita može translocirati u jezgru i promovirati apoptozu. Prema studiji Asuname i suradnika, koju naši rezultati potvrđuju, nuklearni dendrin je biljeg podocitne ozljede, a broj dendrin pozitivnih jezgara pokazatelj aktivnosti bolesti i rane progresije u glomerulosklerozu (177). Utvrdili smo razliku u izražaju i uzorku izražaja dendrina u glomerulima između upalnih (IgAN i HSP) i neupalnih glomerulopatija (podocitopatija BMP i FSGS). Nuklearni izražaj dendrina nađen je u obje skupine ispitanika, ali je broj dendrin pozitivnih jezgara bio značajno veći u skupini podocitopatija. Moguće objašnjenje je da su u BMP i FSGS primarno ozljeđeni podociti, a u IgAN i HSP mezangijske stanice pa oštećenje podocita nastaje sekundarno, djelovanjem mezangijskih humoralnih čimbenika (221,222). Nuklearni izražaj dendrina opisan je u malim studijama u različitim vrstama glomerularnih bolesti. Kodama je opisao nuklearni izražaj

dendrina u 14 odraslih bolesnika s IgAN i povezao ga s akutnom glomerularnom ozljedom i prvom etapom u razvoju podocitopenije (179). Asanuma je usporedio izražaj dendrina u ispitanika s NS - po tri ispitanika s BMP, FSGS i membranskom nefropatijom (MN) i četiri ispitanika s lupus nefritisom (LN) sa kontrolnom skupinom od pet ispitanika koji su imali manje glomerularne nepravilnosti (177). Značajno više dendrin pozitivnih jezgara nađeno je ispitanika s MN, FSGS i LN nego u ispitanika s BMP i kontroli, u kojih je bilo manje od 5 dendrin pozitivnih jezgara po glomerulu (177). Dunér i suradnici analizirali su izražaj dendrina u pet ispitanika s BMP. Nisu našli translokaciju u jezgru već relokaciju dendrina s pukotinaste membrane u citoplazmu podocita u zoni gubitka nožica, pa je nejasno je li preraspodjela uzrok ili posljedica gubitka podocitnih nožica (223). Za razliku od navedenih studija, u našoj studiji je nuklearni izražaj dendrina utvrđen u sedam ispitanika s BMP, na temelju čega pretpostavljamo da se nuklearna translokacija dendrina može očekivati u ozljedi podocita neovisno o tipu glomerularne bolesti. Različita opažanja u studijama možda su zbog malih i heterogenih skupina ispitanika te je, prije donošenja definitivnih zaključaka, potrebna analiza većeg uzorka ispitanika s BMP.

Translokacija dendrina s membrane u jezgru podocita predstavlja dinamičan, postupan i složen proces, reguliran brojnim pro- i antiapoptotskim mehanizmima i signalnim putevima (35,182). U studiji smo za svakog ispitanika, analizom svih glomerula u preparatu, utvrdili predominantni uzorak izražaja dendrina koji je mogao biti membranski, dualni, nuklearni ili negativni. Njihova usporedba s laboratorijskim pokazateljima pokazala je značajnu povezanost između uzorka negativnog izražaja dendrina i vrijednosti KK na kraju praćenja (za 56,6 ml/min niži nego u ispitanika s nuklearnim izražajem, za 79,5 ml/min niži nego u ispitanika s dualnim izražajem). Pretpostavljamo da negativni izražaj dendrina znači njegovo trajno gašenje u kronično oštećenim glomerulima i to zbog gubitka podocita te je *dendrin negativni glomerul* prognostički nepovoljan pokazatelj. Becherucci i suradnici su istaknuli važnost dendrina na putu glomeruloskleroze i opisali kako slijedi. Ograničena smrt podocita izaziva hipertrofiju preživjelih podocita. Ako njihov gubitak prijeđe kompenzatorni prag, daljnji korak je aktivacija parijetalnih epitelnih stanica i njihova diferencijacija u podocite. Ako taj kompenzacijski mehanizam nije učinkovit, inducira se mezangij i zatvara lumen kapilare skleroziranjem. Dendrin modulira sve te složene procese (167). Udio *dendrin negativnih glomerula* u našem istraživanju je bio najviši u IgAN i FSGS, a u BMP je uočen samo jedan takav glomerul. Po našem najboljem saznanju, to su prvi takvi podaci u literaturi.

Osim s bubrežnom funkcijom, proporcija dendrin negativnih glomerula je pozitivno korelirala s udjelom kroničnih histoloških promjena.Veći udio globalno skleroziranih glomerula je bio povezan s manjim brojem dendrin pozitivnih jezgara. Slično tome, Kodama u uzorku IgAN nalazi više dendrin pozitivnih jezgara ako su manje zastupljeni glomeruloskleroza, mezangijska proliferacija, polumjeseci i adhezija Bowmanove čahure (179). U našoj studiji je broj dendrin pozitivnih jezgara pozitivno korelirao s vrijednošću KK na kraju praćenja, a nije s KK u vrijeme biopsije. Kodama je utvrdio negativnu povezanost nuklearnog izražaja dendrina sa sK i pozitivnu povezanost s KK u vrijeme biopsije (179). To znači da je lošija funkcija bubrega praćena manjim brojem dendrin pozitivnih jezgara. Autori su analizirali apsolutni broj dendrin pozitivnih jezgara, bez analize dendrina na membrani i sagledavanja translokacije dendrina kao etapnog procesa. Prema našim rezultatima, preciznije je vrijednovati dendrin kroz uzorak izražaja nego kroz apsolutni broj dendrin pozitivnih jezgara.

U budućim studijama treba vidjeti može li translokacija dendrina biti reverzibilna *in vivo* i kakav je učinak imunosupresivnog liječenja, kojeg u ovom radu nismo uzeli u obzir. Uočili smo da su neki ispitanici na zadnjoj kontroli imali poboljšanje bubrežne funkcije unatoč jasnom nuklearnom dendrinu u vrijeme biopsije. U eksperimentalnim istraživanjima na kulturi podocita u mediju koji sadrži 10% FBS (*fetal bovine serum*), podociti su pokazivali dualni izražaj dendrina, a nakon promjene na 0,2% FBS kroz 24 h, dendrin je bio isključen iz podocitne jezgre. Nakon ponovnog dodatka proapoptotičkog čimbenika TGF-β1, obnovljena je nuklearna lokalizacija dendrina (35). U drugom pokusu u kulturi fibroblasta je izražaj TGF-β bio snižen nakon primjene deksametazona, što upućuje na jedan od mogućih učinaka kortikosteroidne terapije. Ipak, mogućnost reverzne translokacije dendrina iz jezgre na membranu podocita ostaje nejasna.

Drugi biljeg od interesa, CTGF je istražen usporedbom ispitivane skupine (IgAN i HSP) i kontrole. Prema literaturi, u zdravom zrelom bubregu je CTGF izražen u citoplazmi podocita (189,191,196). Tako je u kontrolnoj skupini izražaj CTGF nađen u citoplazmi podocita i parijetalnog epitela i ponegdje u kanalićima. Međutim, u ispitivanoj skupini nađen je značajno jači izražaj CTGF u proksimalnim kanalićima nego u kontroli, dok na razini glomerula razlika nije uočena. Slične rezultate imaju drugi istraživači. Prema Ito, izražaj CTGF je povišen u upalnim glomerularnim i tubulointerstucijskim bolestima i povezan je sa staničnom proliferacijom i akumulacijom matriksa (196). U različitim vrstama glomerularnih bolesti

koje cijele ožiljkavanjem, uključujući IgAN, povišen je izražaj CTGF, a u glomerulosklerozi je negativan (191,196).

CTGF je multifunkcionalan, u fiziološkim uvjetima sudjeluje u različitim procesima, a u patološkim uvjetima je čimbenik fibroze i EMT (224). Međutim, u zadnje vrijeme se ističe uloga CTGF kao biljega ranog stadija fibroze. Lopes i suradnici su u seriji različitih glomerularnih bolesti analizirali mRNK profibrotičkih čimbenika (TGF-β1, CTGF i VEGF-A) i usporedili ih s imunohistokemijskim izražajem CTGF, HHF35 i stupnjem IF na preparatima obojenim bojom *Sirius Red* (225). Molekularni izražaj TGF-β, CTGF i VEGF-A je pokazao značajnu pozitivnu korelaciju s izmjerenim postotkom IF, na način da je povezanost bila najjača za HHF35, umjerena za *Sirius Red*, a najniža za CTGF (225). CTGF mRNA je naslabije korelirala s IF pa autori predlažu CTGF kao potencijalni biljeg rane aktivne fibroze koja ima veći potencijal remodeliranja (225). U drugoj studiji u ANCA pozitivnom glomerulonefritisu, Hilhorst i suradnici su pokazali da je bazalna plazmatska koncentracija CTGF korelirala s nastankom fibroznih polumjeseca u kontrolnim biopsijama bubrega i lošijim bubrežnim ishodom (193). Pozitivno imunohistokemijsko CTGF bojanje u vrijeme biopsije je bilo povezano s prisutnošću celularnih, a ne fibrocelularnih/fibroznih polumjeseca, što upućuje da se napredovanjem ožiljkavanja smanjuje izražaj CTGF. Autori predlažu CTGF kao mogući rani biljeg budućeg kroničnog oštećenja bubrega, što je u skladu s nađim rezultatima (193).

Treći biljeg od interesa je nuklearni protein c-Myb, čiji je izražaj uspoređen između skupine ispitanika s IgAN i HSP i kontrolne skupine. To je transkripcijski čimbenik ključan za rast, diferencijaciju i održavanje hematopoetskih i epitelnih stanica (208). U embrionalnom bubregu c-Myb regulira Slug-a; reaktivacija proteina Slug i Snail u zrelom bubregu povezana je s nastankom fibroze (214). U našem radu, u kontrolnoj skupini izražaj c-Myb je bio slab ili odsutan. U ispitivanoj skupini izražaj c-Myb je bio značajno jači i to u glomerulima i predominantno distalnim kanalićima. Prema našem najboljem saznanju, ovo je prvo istraživanje u kojem je analiziran imunohistokemijski izražaj c-Myb u humanim glomerulonefritisima. Ebihara je prije 30-tak godina analizirao izražaj onkogena u mononuklearnim stanicama krvi u 23 bolesnika s IgAN metodom RNK hibridizacije (226). Ustanovljen je značajno veći izražaj c-myc, c-raf, c-fos i c-jun nego u zdravih kontrola, dok je izražaj c-N-ras, c-mos ili c-Myb bio podjednak (226). Povišen izražaj c-Myb dokazan je u aktivnoj fazi sistemnog eritemskog lupusa, čini se da ima ulogu u patogenezi ulceroznog

kolitisa, te je neophodan za transkripciju HIV u T stanicama (213,226). Dok je CTGF poznat kao promotor fibroze i induktor EMT, c-Myb je regulator EMT čimbenika Slug-a i zbog toga je uključen u jedan od mehanizama za nastanak fibroze bubrega. EMT je povezana s pogoršanjem funkcije i progresijom u uznapredovali stadij KBB (227). Međutim, prema recentnim studijama fibroza nije nužno ireverzibilna jer je primjenom anti-CTGF protutijela moguća prevencija nastanka nove i regresija već postojeće fibroze. Rezultati našeg istraživanja su pokazali da je povišeni izražaj i CTGF i c-Myb bio povezan s lošijom funkcijom bubrega na kraju praćenja. S obzirom na varijabilnost duljine praćenja (min-maks: 1–21 godina), za svakog ispitanika je izračunat procijenjeni godišnji pad GF posljedično senilnoj involuciji bubrega i neovisan o glomerulonefritisu. Od dobivene vrijednosti oduzet je stvarno dobiveni KK2, a razlika je korelirana s izražajem CTGF i c-Myb. Veća razlika značila je lošiju funkciju bubrega, a rezultati su pokazali pozitivnu korelaciju s glomerularnim i tubularnim izražajem c-Myb, kao i tubularnim izražajem CTGF.

Da bismo dokazali značaj CTGF i c-Myb kao mogućih ranih biljega i razlučili akutne od kroničnih predskazatelja ishoda, ispitanike smo po vrijednosti KK u vrijeme biopsije podijelili u tri skupine: snižen, uredan ili povišen te ih usporedili međusobno i s kontrolnom skupinom. Skupine se nisu međusobno razlikovale po izražaju CTGF i c-Myb, ali su se sve razlikovale od kontrole. Veća dijagnostička osjetljivost i prediktivna uloga CTGF i c-Myb u odnosu na standardne testove za procjenu bubrežne funkcije pokazana je time što su u ispitanika s urednim ili povišenim KK već započeli mehanizmi bubrežnog oštećenja. Ispitanici s KK višim od 140 ml/min su klasificirani kao „hiperfiltratori“ jer glomerularna hiperfiltracija izravno doprinosi napredovanju KBB i prediktor je nepovoljnog bubrežnog i kardiovaskularnog ishoda (228,229). Glomerularna hiperfiltracija/hipertenzija i posljedični povišeni intrakapilarni tlak uzrokuju hipertrofiju i proširenje mezangija, promjene u interakciji između bazalne membrane i podocita, te hipertrofiju i apoptozu podocita (16). Ova saznanja, temeljena na imunohistokemijskom izražaju ispitivanih biljega, potvrđuju složenost patogeneze kronične bubrežne bolesti i ističu važnost ranog otkrivanja i započimanja liječenja.

Ispitanici se nisu značajno razlikovali po kliničkim pokazateljima. Hematurija, tipična za IgAN i HSP, bila je povezana s većim izražajem c-Myb u kanalićima. Po recentnim saznanjima, mikrohematurija je neovisni prediktor pada glomerularne filtracije u bolesnika s IgAN, uz proteinuriju i M, S i T skor Oksfordske klasifikacije (114,230).

Iako je izražaj sva tri ispitivana biljega bio statistički značajno povezan s ishodom bubrežne funkcije na kraju praćenja, nismo dokazali njihovu povezanost s MEST-C skorom. Međutim, viši broj u Oksfordskoj klasifikaciji i odsustvo polumjeseca povezani su s lošijom bubrežnom funkcijom na kraju praćenja (S1, T1+2, C0). Analiza mezangijske hipercelularnosti nije bila moguća zbog uniformnosti uzorka. Udio kroničnih histoloških promjena nije korelirao s izražajem CTGF i c-Myb. Rezultat je u skladu s radom Lopesa u kojem postotak IFTA-e nije korelirao s izražajem CTGF, što govori u prilog razdvajanja ranih od kasnih pokazatelja bubrežne funkcije (225).

Prikazani rezultati, unatoč ograničenjima zbog malog uzorka i varijabilnosti duljine praćenja, predstavljaju doprinos u ispitivanju ranih pokazatelja lošeg ishoda bubrežne bolesti. Bolje poznavanje patogenetskih mehanizama, kao i saznanja o lokalizaciji, funkciji i izražaju različitih proteina važnih u održavanju homeostaze bubrega mogu dovesti do razvoja novih ciljanih lijekova. Stoga biopsija bubrega, iako invazivna, treba ostati neizostavna dijagnostička metoda.

U našoj kohortnoj studiji ispitanika s različitim glomerulopatijama imunohistokemijski su analizirani biljezi čiji je rani izražaj uključen u mehanizme bubrežnog oštećenja, prije prezentacije standardnih histoloških pokazatelja kronične promjene. Prema našim rezultatima, promijenjeni uzorak izražaja dendrina u glomerulima, kao i povećani izražaj c-Myb u glomerulima te CTGF i c-Myb u kanalićima povezani su s lošijom bubrežnom funkcijom na kraju praćenja. Stoga ih možemo smatrati ranim prognostičkim biljezima pomoću kojih u bioptičkom uzorku razlikujemo bolesnike s većim rizikom za progresiju KBB, koju treba pokušati spriječiti ili prolongirati drugačijim terapijskim pristupom. Standardni patohistološki pokazatelji i izražaj tih biljega u sinergiji s laboratorijskim i kliničkim pokazateljima mogli bi nefrologu i pedijatru nefrologu pomoći u donošenju kliničkih odluka. Stoga bi u budućim studijama ove rezultate trebalo potvrditi složenijim istraživačkim metodama na velikoj kohorti ispitanika s različitim upalnim i neupalnim glomerularnim bolestima.

6. ZAKLJUČCI

1. Utvrđena je razlika u nuklearnom izražaju dendrina između glomerulopatija i kontrolne skupine ($P = 0,004$).
2. Medijan nuklearnog izražaja dendrina je veći u neupalnim nego upalnim glomerulopatijama ($P = 0,028$).
3. Translokacija dendrina se pojavljuje u svim glomerulopatijama, uključujući bolest minimalnih promjena.
4. Uzorak izražaja dendrina, definiran kao membranski, dualni, nuklearni i negativni, razlikuje se između pojedinih glomerulopatija i korelira s laboratorijskim pokazateljima bubrežne funkcije ($P < 0,05$).
5. Klirens kreatinina na kraju praćenja je niži u ispitanika s uzorkom negativnog izražaja dendrina nego u ostalima ($P = 0,009$).
6. Izražaj CTGF i c-Myb u kanalićima i c-Myb u glomerulima je veći u ispitanika s IgAN i HSP nego u kontrolnoj skupini (svi $P < 0,05$).
7. Izražaj CTGF i c-Myb je značajno veći u skupinama ispitanika podijeljenih prema vrijednostima klirensa kreatinina u vrijeme biopsije (snižen, uredan ili povišen) nego u kontrolnoj skupini (svi $P < 0,05$).
8. Povišeni izražaj CTGF i c-Myb korelira s lošijom bubrežnom funkcijom na kraju praćenja (svi $P < 0,05$).

7. LITERATURA:

1. Watson D, Yang JYC, Sarwal RD, Sigdel TK, Liberto JM, Damm I, et. al. A Novel Multi-Biomarker Assay for Non-Invasive Quantitative Monitoring of Kidney Injury. J Clin Med. 2019;8(4). pii: E499.

2. Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, Hirst JA, O'Callaghan CA, Lasserson DS, et al. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis. PLoS One. 2016;11(7):e0158765.

3. Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J, et.al. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). Kidney Int. 2005;67(6):2089-100.

4. Said S, Hernandez GT. The link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. J Nephropathol. 2014;3(3):99-104.

5. Gansevoort RT, Correa-Rotter R, Hemmelgarn BR, Jafar TH, Heerspink HJ, Mann JF, et. al. Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention. Lancet. 2013;382(9889):339-52.

6. Orlić L, Martinović Sladoje B. Kardiovaskularne bolesti zbog kronične bubrežne bolesti.MEDIX • 2012 (ožujak/travanj). XvIII • broj 98/99.

7. Naylor KL, Kim SJ, McArthur E, Garg AX, McCallum MK, Knoll GA. Mortality in Incident Maintenance Dialysis Patients Versus Incident Solid Organ Cancer Patients: A Population-Based Cohort. Am J Kidney Dis. 2019;73(6):765-776.

8. Wiggins RC. The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases. Kidney Int. 2007;71(12):1205-14.

9. Đorđević G, Štifter S, Borovac B, Bembić M. Glomerular diseases: a review of the literature and of the epidemiology of biopsy proven glomerular diseases diagnosed in KBC Rijeka. Medicina fluminensis. 2016;52(3):272-282.

10. Luciano RL, Moeckel GW. Update on the Native Kidney Biopsy: Core Curriculum 2019. Am J Kidney Dis. 2019;73(3):404-415.

11. Astor BC, Shaikh S, Chaudhry M. Associations of endogenous markers of kidney function with outcomes: more and less than glomerular filtration rate. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2013;22(3):331-5.

12. Uwaezuoke SN, Ayuk AC, Muoneke VU, Mbanefo NR. Chronic kidney disease in children: Using novel biomarkers as predictors of disease. Saudi J Kidney Dis Transpl. 2018;29(4):775-784.

13. Schelling JR. Tubular atrophy in the pathogenesis of chronic kidney disease. Pediatr Nephrol. 2016; 31(5):693-706.

14. Foster MC, Coresh J, Hsu CY, Xie D, Levey AS, Nelson RG, et. al. Serum β-Trace Protein and β2-Microglobulin as Predictors of ESRD, Mortality, and Cardiovascular Disease in Adults With CKD in the Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study. Am J Kidney Dis. 2016;68(1):68-76.

15. Segerer S, Kretzler M, Strutz Fet al. Mechanisms of tissue injury and repairin renal diseases. In: Schrier R (ed). Diseases of the Kidney and Urinary Tract. Lippincott, Philadelphia, 2007.

16. Schlondorff DO. Overview of factors contributing to the pathophysiology of progressive renal disease. Kidney Int. 2008;74(7):860-6.

17. Meyer TW. Tubular injury in glomerular disease. Kidney Int. 2003;63(2):774-87.

18. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. J Clin Invest. 2009; 119(6): 1420–1428.

19. Santos F, Moreira C, Nóbrega-Pereira S, Bernardes de Jesus B. New Insights into the Role of Epithelial–Mesenchymal Transition during Aging. Int J Mol Sci. 2019; 20(4): 891.

20. Carew RM, Wang B, Kantharidis P. The role of EMT in renal fibrosis. Cell Tissue Res. 2012;347(1):103-16.

21. Yao J, Ke Z, Wang X, Peng F, Li B, Wu R. Epithelial-mesenchymal transition and apoptosis of renal tubular epithelial cells are associated with disease progression in patients with IgA nephropathy. Mol Med Rep. 2014;10(1):39-44.

22. Filipovic N, Vukojevic K, Bocina I, Saraga M, Durdov MG, Kablar B, et al. Immunohistochemical and electronmicroscopic features of mesenchymal-to-epithelial transition in human developing, postnatal and nephrotic podocytes. Histochem Cell Biol. 2017;147(4):481-495.

23. Chen D, Cao G, Liu Q. A-kinase-interacting protein 1 facilitates growth and metastasis of gastric cancer cells via Slug-induced epithelial-mesenchymal transition. J Cell Mol Med. 2019;23(6):4434-4442.

24. Li M, Luan F, Zhao Y, Hao H, Zhou Y, Han W, et al. Epithelial-mesenchymal transition: An emerging target in tissue fibrosis. Exp Biol Med (Maywood). 2016;241(1):1-13.

25. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? Nat Rev Cancer. 2007;7(6):415-28.

26. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. Dev Cell. 2008;14(6):818-29.

27. Savagner P, Yamada KM, Thiery JP. The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition. J Cell Biol. 1997;137(6):1403-19.

28. Boyer B, Tucker GC, Vallés AM, Franke WW, Thiery JP. Rearrangements of desmosomal and cytoskeletal proteins during the transition from epithelial to fibroblastoid organization in cultured rat bladder carcinoma cells. J Cell Biol. 1989;109(4 Pt 1):1495-509.

29. Herfs M, Hubert P, Suarez-Carmona M, Reschner A, Saussez S, Berx G, et al. Regulation of p63 isoforms by snail and slug transcription factors in human squamous cell carcinoma. Am J Pathol. 2010;176(4):1941-9.

30. Zhang L, Huang G, Li X, Zhang Y, Jiang Y, Shen J, et al. Hypoxia induces epithelial-mesenchymal transition via activation of SNAI1 by hypoxia-inducible factor -1α in hepatocellular carcinoma. BMC Cancer. 2013;13:108.

31. Eddy AA. Molecular Basis of Renal Fibrosis. Pediatr Nephrol. 2000; 15(3-4):290-301. 1. iz liu

32. Liu Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. J Am Soc Nephrol. 2010;21(2):212-22.

33. Zhou D, Liu Y. Renal fibrosis in 2015: Understanding the mechanisms of kidney fibrosis. Nat Rev Nephrol. 2016;12(2):68-70.

34. Kang HM, Ahn SH, Choi P, Ko YA, Han SH, Chinga F, et al. Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis development. Nat Med. 2015;21(1):37-46.

35. Asanuma K, Campbell KN, Kim K, Faul C and Mundel P. Nuclear relocation of the nephrin and CD2AP-binding protein dendrin promotes apoptosis of podocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104 (24): 10134–10139.

36. Moustakas A, Heldin CH. Mechanisms of TGFβ-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. J Clin Med. 2016;5(7). pii: E63.

37. Kriz W, Kobayashi N, Elger M. New aspects of podocyte structure, function, and pathology. Clin Exp Nephrol. 1998; 2: 85-99.

38. Li Y, Kang YS, Dai C, Kiss LP, Wen X, Liu Y. Epithelial-to-mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria. Am J Pathol. 2008;172(2):299-308.

39. Alpers CE, Chang A. The Kidney. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC, editors. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Diseases. Philadelphia: Elsevier;2015. p. 917–8.

40. Chadban SJ, Atkins RC. Glomerulonephritis. Lancet. 2005;365(9473):1797-806.

41. Kitching AR, Hutton HL. The Players: Cells Involved in Glomerular Disease. Clin J Am Soc Nephrol. 2016;11(9):1664-74.

42. Berger J, Hinglais N. [Intercapillary deposits of IgA-IgG]. J Urol Nephrol (Paris). 1968;74(9):694-5.

43. McGrogan A, Franssen CF, de Vries CS. The incidence of primary glomerulonephritis worldwide: A systematic review of the literature. Nephrol Dial Transplant. 2011; 26:414–430.

44. Schena FP, Nistor I. Epidemiology of IgA Nephropathy: A Global Perspective. Semin Nephrol. 2018; 38:435–442.

45. Perše M, Večerić-Haler Ž. The Role of IgA in the Pathogenesis of IgA Nephropathy. Int J Mol Sci. 2019;20(24). pii: E6199.

46. Saha MK, Julian BA, Novak J, Rizk DV. Secondary IgA nephropathy. Kidney Int. 2018;94(4):674-681.

47. Galešić K i sur. Bolesti glomerula - primarne i sekundarne. Zagreb : Medicinska naklada, 2014. ISBN: 9789531766296.

48. Roberts IS, Cook HT, Troynov S, Alpers CE, Amore A, Barratt J et al. The Oxford Classification of IgA Nephropathy: Pathology Definitions, Correlations and Rproducibility. Kidney Int 2009;76(5):546-56.

49. Abraham RS, Barnidge DR, Lanza IR. Assessment of proteins of the immune system. In: Clinical Immunology: Principles and Practice, 4th ed, Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, et al (Eds), Saunders, 2013. p.1145.

50. Yel L. Structure and biologic functions of IgA. UpToDate.2019.

51. Monteiro RC. New insights in the pathogenesis of IgA nephropathy. Nefrologia. 2005;25(2):82-6.

52. Woof JM, Kerr MA. The function of immunoglobulin A in immunity. J Pathol. 2006; 208(2):270-82.

53. Ben Mkaddem S, Rossato E, Heming N, Monteiro RC. Anti-inflammatory role of the IgA Fc receptor (CD89): from autoimmunity to therapeutic perspectives. Autoimmun Rev 2013; 12:666.

54. Aleyd E, Heineke MH, van Egmond M. The era of the immunoglobulin A Fc receptor FcαRI; its function and potential as target in disease. Immunol Rev 2015; 268:123.

55. Suzuki T, Kawaguchi A, Ainai A, et al. Relationship of the quaternary structure of human secretory IgA to neutralization of influenza virus. Proc Natl Acad Sci U S A 2015; 112:7809.

56. Russell MW, Sibley DA, Nikolova EB, Tomana M, Mestecky J. IgA antibody as a non-inflammatory regulator of immunity. Biochem Soc Trans 1997; 25:466.

57. Moldoveanu Z, Moro I, Radl J, Thorpe SR, Komiyama K, Mestecky J. Site of catabolism of autologous and heterologous IgA in non-human primates. Scand J Immunol. 1990;32:577–583.

58. Weigel PH, Yik JH. Glycans as endocytosis signals: the cases of the asialoglycoprotein and hyaluronan/chondroitin sulfate receptors. Biochim Biophys Acta. 2002;1572:341–363.

59. Conley ME, Delacroix DL. Intravascular and mucosal immunoglobulin A: two separate but related systems of immune defense? Ann Intern Med. 1987;106:892–899.

60. Lechner SM, Papista C, Chemouny JM, Berthelot L, Monteiro RC. Role of IgA receptors in the pathogenesis of IgA nephropathy. J Nephrol. 2016;29:5–11.

61. Nguyen C, König K, Tam FWK, Hopfer H, Molyneux K, Binet FI et al. Higher serum galactose-deficient immunoglobulin A1 concentration is associated with stronger mesangial cellular inflammatory response and more severe histologic findings in immunoglobulin A nephropathy. Clin Kidney J. 2018;12(2):232-238.

62. Suzuki H, Kiryluk K, Novak J, Moldoveanu Z, Herr AB, Renfrow MB, Wyatt RJ, Scolari F, Mestecky J, Gharavi AG, Julian BA. The pathophysiology of IgA nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2011;22:1795–1803.

63. Hwang VJ, Ulu A, van Hoorebeke J, Weiss RH. Biomarkers in IgA nephropathy. Biomark Med. 2014;8(10):1263-77.

64. Yeo SC, Cheung CK, Barratt J. New insights into the pathogenesis of IgA nephropathy. Pediatr Nephrol. 2018;33(5):763-777.

65. Woof JM, Russell MW. Structure and function relationships in IgA. Mucosal Immunol. 2011;4(6):590-7.

66. Suzuki H, Moldoveanu Z, Hall S, et al. IgA1-secreting cell lines from patients with IgA nephropathy produce aberrantly glycosylated IgA1. J Clin Invest. 2008; 118:629.

67. Novak J, Julian BA, Tomana M, Mestecky J. IgA glycosylation and IgA immune complexes in the pathogenesis of IgA nephropathy. Semin Nephrol. 2008; 28:78.

68. Suzuki H, Fan R, Zhang Z, et al. Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity. J Clin Invest. 2009; 119:1668.

69. Barratt J, Eitner F, Feehally J, Floege J. Immune complex formation in IgA nephropathy: a case of the 'right' antibodies in the 'wrong' place at the 'wrong' time? Nephrol Dial Transplant. 2009; 24:3620.

70. Harper SJ, Pringle JH, Wicks AC, Hattersley J, Layward L, Allen A, Gillies A, Lauder I, Feehally J. Expression of J chain mRNA in duodenal IgA plasma cells in IgA nephropathy. Kidney Int. 1994;45:836–844.

71. Harper SJ, Allen AC, Pringle JH, Feehally J. Increased dimeric IgA producing B cells in the bone marrow in IgA nephropathy determined by in situ hybridisation for J chain mRNA. J Clin Pathol. 1996;49:38–42.

72. Feehally J, Beattie TJ, Brenchley PE, Coupes BM, Mallick NP, Postlethwaite RJ. Sequential study of the IgA system in relapsing IgA nephropathy. Kidney Int. 1986;30:924–931.

73. Coppo R, Mazzucco G, Martina G, Roccatello D, Amore A, Novara R, Bargoni A, Piccoli G, Sena LM. Gluten-induced experimental IgA glomerulopathy. Lab Investig. 1989;60:499–506.

74. Papista C, Lechner S, Ben Mkaddem S, LeStang MB, Abbad L, Bex-Coudrat J, Pillebout E, Chemouny JM, Jablonski M, Flamant M, Daugas E, Vrtovsnik F, Yiangou M, Berthelot L, Monteiro RC. Gluten exacerbates IgA nephropathy in humanized mice through gliadin–CD89 interaction. Kidney Int. 2015;88:276–285.

75. Park HJ, Hahn WH, Suh JS, Kim MJ, Kang SW, Lee JS, et al. Association between Toll-like receptor 10 (TLR10) gene polymorphisms and childhood IgA nephropathy. Eur J Pediatr. 2011;170:503–509.

76. McCarthy DD, Kujawa J, Wilson C, Papandile A, Poreci U, Porfilio EA, et al. Mice overexpressing BAFF develop a commensal flora-dependent, IgA-associated nephropathy. J Clin Invest. 2011;121:3991–4002.

77. Zhai YL, Zhu L, Shi SF, Liu LJ, Lv JC, Zhang H. Increased APRIL expression induces IgA1 aberrant glycosylation in IgA nephropathy. Medicine (Baltimore). 2016;95:e3099.

78. Muto M, Manfroi B, Suzuki H, Joh K, Nagai M, Wakai S, Righini C, Maiguma M, Izui S, Tomino Y, Huard B, Suzuki Y. Toll-like receptor 9 stimulation induces aberrant expression of

a proliferation-inducing ligand by tonsillar germinal center B cells in IgA nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2017;28:1227–1238.

79. Rodrigues JC, Haas M, Reich HN. IgA Nephropathy. Clin J Am Soc Nephrol. 2017;12(4):677-686.

80. Fellstrom BC, Barratt J, Cook H, Coppo R, Feehally J, de Fijter JW et al. Targeted-release budesonide versus placebo in patients with IgA nephropathy (NEFIGAN): a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2b trial. Lancet. 2017;389(10084):2117-2127.

81. Lafayette RA, Canetta PA, Rovin BH, Appel GB, Novak J, Nath KA et al. A randomized, controlled trial of rituximab in IgA nephropathy with proteinuria and renal dysfunction. J Am Soc Nephrol. 2017;28:1306–1313.

82. Gao R, Wu W, Wen Y, Li X. Hydroxychloroquine alleviates persistent proteinuria in IgA nephropathy. Int Urol Nephrol. 2017;49(7):1233-1241.

83. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02062684: BRIGHT-SC: Blisibimod Response in IgA Nephropathy Following At-Home Treatment by Subcutaneous Administration

84. Smith AC, de Wolff JF, Molyneux K, Feehally J, Barratt J. O-glycosylation of serum IgD in IgA nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2006;17:1192–1199.

85. Lin X, Ding J, Zhu L, Shi S, Jiang L, Zhao M, Zhang H. Aberrant galactosylation of IgA1 is involved in the genetic susceptibility of Chinese patients with IgA nephropathy. Nephrol Dial Transplant. 2009;24:3372–3375.

86. Berger J, Yaneva H, Nabarra B, Barbanel C. Recurrence of mesangial deposition of IgA after renal transplantation. Kidney Int. 1975;7:232–241.

87. Floege J. Recurrent IgA nephropathy after renal transplantation. Semin Nephrol. 2004;24:287–291.

88. Silva FG, Chander P, Pirani CL, Hardy MA. Disappearance of glomerular mesangial IgA deposits after renal allograft transplantation. Transplantation. 1982;33:241–246.

89. Yanagawa H, Suzuki H, Suzuki Y, Kiryluk K, Gharavi AG, Matsuoka K, Makita Y, Julian BA, Novak J, Tomino Y. A panel of serum biomarkers differentiates IgA nephropathy from other renal diseases. PLoS One. 2014; 9:e98081.

90. Berthoux F, Suzuki H, Thibaudin L, Yanagawa H, Maillard N, Mariat C, Tomino Y, Julian BA, Novak J. Autoantibodies targeting galactose-deficient IgA1 associate with progression of IgA nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2012; 23:1579–1587.

91. Huang ZQ, Raska M, Stewart TJ, Reily C, King RG, Crossman DK, et al. Somatic mutations modulate autoantibodies against galactose-deficient IgA1 in IgA nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2016;27:3278–3284.

92. Waldherr R, Rambausek M, Duncker WD, Ritz E. Frequency of mesangial IgA deposits in a non-selected autopsy series. Nephrol Dial Transplant. 1989;4:943–946.

93. Varis J, Rantala I, Pasternack A, Oksa H, Jantti M, Paunu ES, et al. Immunoglobulin and complement deposition in glomeruli of 756 subjects who had committed suicide or met with a violent death. J Clin Pathol. 1993;46:607–610.

94. Suzuki K, Honda K, Tanabe K, Toma H, Nihei H, Yamaguchi Y. Incidence of latent mesangial IgA deposition in renal allograft donors in Japan. Kidney Int. 2003;63:2286–2294.

95. Kiryluk K, Moldoveanu Z, Sanders JT, et al. Aberrant glycosylation of IgA1 is in-herited in both pediatric IgA nephropathy and Henoch-Schonlein purpuranephritis. Kidney Int. 2011;80(1):79–87.

96. Coppo R, Amore A, Gianoglio B, Reyna A, Peruzzi L, Roccatello D, et al. Serum IgA and macromolecular IgA reacting with mesangial matrix components. Contrib Nephrol. 1993;104:162–17.

97. Kokubo T, Hiki Y, Iwase H, Tanaka A, Toma K, Hotta K, et al. Protective role of IgA1 glycans against IgA1 self-aggregation and adhesion to extracellular matrix proteins. J Am Soc Nephrol. 1998;9:2048–2054.

98. Suwanichkul A, Wenderfer SE. Differential expression of functional Fc-receptors and additional immune complex receptors on mouse kidney cells. Mol Immunol. 2013;56:369-379.

99. Layward L, Allen AC, Hattersley JM, Harper SJ, Feehally J. Low antibody affinity restricted to the IgA isotype in IgA nephropathy. Clin Exp Immunol. 1994;95:35–41.

100. Maillard N, Wyatt RJ, Julian BA, Kiryluk K, Gharavi A, Fremeaux-Bacchi V, et al. Current understanding of the role of complement in IgA nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2015;26:1503–1512.

101. Dimke H, Maezawa Y, Quaggin SE. Crosstalk in glomerular injury and repair. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2015;24(3):231-8.

102. Coppo R. Corticosteroids in IgA Nephropathy: Lessons from Recent Studies. J Am Soc Nephrol. 2017;28(1):25-33.

103. Selvaskandan H, Cheung CK, Muto M, Barratt J. New strategies and perspectives on managing IgA nephropathy. Clin Exp Nephrol. 2019;23(5):577-588.

104. Cheung CK, Barratt J. Is IgA nephropathy a single disease? In: Tomino Y (ed) Pathogenesis and treatment in IgA nephropathy. Springer, Japan, 2015;3–17.

105. Pozzi C, Andrulli S, Pani A, Scaini P, Del Vecchio L, Fogazzi G, et al. Addition of azathioprine to corticosteroids does not benefit patients with IgA nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2010;21:1783–1790.

106. Alamartine E, Sauron C, Laurent B, Sury A, Seffert A, Mariat C. The use of the Oxford classification of IgA nephropathy to predict renal survival. Clin J Am Soc Nephrol. 2011;6: 2384–2388.

107. Coppo R, Troyanov S, Bellur S, Cattran D, Cook HT, Feehally J, et al. Validation of the Oxford classification of IgA nephropathy in cohorts with different presentations and treatments. Kidney Int. 2014;86(4):828–36.

108. Rauen T, Eitner F, Fitzner C, Sommerer C, Zeier M, Otte B, et al. Intensive supportive care plus immunosuppression in IgA nephropathy. N Engl J Med. 2015;373(23):2225.

109. Rauen T, Fitzner C, Eitner F, Sommerer C, Zeier M, Otte B, et al. Effects of two immunosuppressive treatment protocols for IgA nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2018;29(1):317–25.

110. Feehally J. Immunosuppression in IgA nephropathy: guideline medicine versus personalized medicine. Semin Nephrol. 2017;37(5):464–77.

111. Tam FWK, Pusey CD. TESTING corticosteroids in IgA nephropathy: a continuing challenge. Clin J Am Soc Nephrol. 2018;13(1):158–60.

112. Natale P, Palmer SC, Ruospo M, Saglimbene VM, Craig JC, Vecchio M et al. Immunosuppressive agents for treating IgA nephropathy. Cochrane Database Syst Rev. 2020;3:CD003965.

113. Shu D, Xu F, Su Z, Zhang J, Chen C, Zhang J, et al. Risk factors of progressive IgA nephropathy which progress to end stage renal disease within ten years: a case-control study. BMC Nephrol. 2017;18(1):11.

114. Coppo R, D'Arrigo G, Tripepi G, Russo ML, Roberts ISD, Bellur S, et al. Is there long-term value of pathology scoring in immunoglobulin A nephropathy? A validation study of the Oxford Classification for IgA Nephropathy (VALIGA) update. Nephrol Dial Transplant. 2018. doi: 10.1093/ndt/gfy302. [Epub ahead of print]

115. Placzek WJ, Yanagawa H, Makita Y, Renfrow MB, Julian BA, Rizk DV, et al. Serum galactose-deficient-IgA1 and IgG autoantibodies correlate in patients with IgA nephropathy. PLoS One. 2018;13(1):e0190967.

116. Chen O, Zhu XB, Ren P, Wang YB, Sun RP, Wei DE. Henoch Schonlein Purpura in children: clinical analysis of 120 cases. Afr Health Sci. 2013;13(1):94-9.

117. Čekada N, Šestan M, Held M, Frković M, Sršen S, Vrljičak K et al. Henoch-Schönleinov purpurni nefritis u djece: iskustva dvaju tercijarnih centara za pedijatrijsku i adolescentnu reumatologiju Republike Hrvatske u razdoblju od 2006. do 2017. godine. Liječ Vjesn. 2019;141:115–123.

118. Piram M, Mahr A. Epidemiology of immunoglobulin A vasculitis (Henoch-Schönlein): current state of knowledge. Curr Opin Rheumatol. 2013;25(2):171-8.

119. Audemard-Verger A, Pillebout E, Guillevin L, Thervet E, Terrier B. IgA vasculitis (Henoch-Shönlein purpura) in adults: Diagnostic and therapeutic aspects. Autoimmun Rev. 2015;14(7):579-85.

120. Heineke MH, Ballering AV, Jamin A, Mkaddem SB, Monteiro RC, Van Egmond M. New insight in the pathogenesis of immunoglobulin A vasculitis (Henoch-Schönlein purpura). Autoimmunity Reviews. 2017;16(12):1246-1253.

121. Davin JC, Ten Berge IJ, Weening JJ. What is the difference between IgA nephropathy and Henoch-Schonlein purpura nephritis? Kidney Int. 2001;59:823-834.

122. Yang YH, Tsai IJ, Chang CJ, Chuang YH, Hsu HY, Chiang BL. The interaction between circulating complement proteins and cutaneous microvascular endothelial cells in the development of childhood Henoch-Schönlein purpura. PLoS One. 2015;10:e0120411.

123. Jelusic M, Sestan M, Cimaz R, Ozen S. Different histological classifications for Henoch-Schönlein purpura nephritis: which one should be used? Pediatr Rheumatol Online J. 2019;17(1):10.

124. ubaci

125. Yang YH, Wang SJ, Chuang YH, Lin YT, Chiang BL. The level of IgA antibodies to human umbilical vein endothelial cells can be enhanced by TNF-α treatment in children with Henoch–Schönlein purpura. Clin Exp Immunol. 2002;130:352-357.

126. Del Papa N, Guidali L, Sala A, Buccellati C, Khamashta MA, Ichikawa K, et al. Endothelial cells as target for antiphospholipid antibodies. Human polyclonal and monoclonal anti-beta 2-glycoprotein I antibodies react in vitro with endothelial cells through adherent beta 2-glycoprotein I and induce endothelial activation. Arthritis Rheum. 1997;40:551-561.

127. Yang YH, Chang CJ, Chuang YH, Hsu HY, Yu HH, Lee JH, et al. Identification and characterization of IgA antibodies against β2-glycoprotein I in childhood Henoch-Schönlein purpura. Br J Dermatol. 2012;167(4):874-81.

128. Yang YH, Lai HJ, Huang CM, Wang LC, Lin YT, Chiang BL. Sera from children with active Henoch-Schönlein purpura can enhance the production of interleukin 8 by human umbilical venous endothelial cells. Ann Rheum Dis. 2004;63(11):1511-3. (63 iz heineke)

129. Yang YH, Huang YH, Lin YL, Wang LC, Chuang YH, Yu HH, et al. Circulating IgA from acute stage of childhood Henoch-Schönlein purpura can enhance endothelial interleukin (IL)-8 production through MEK/ERK signalling pathway. Clin Exp Immunol. 2006;144(2):247-53. (64 iz heineke)

130. Dedeoglu F, Kim S. IgA vasculitis (Henoch-Schönlein purpura): Management. UpToDate.2019.

131. Vivarelli M, Massella L, Ruggiero B, Emma F. Minimal Change Disease. Clin J Am Soc Nephrol. 2017;12(2):332-345.

132. Eddy AA, Symons JM. Nephrotic syndrome in childhood. Lancet. 2003;362:629–639.

133. Gdadegesin R, Smoyer WE. Nephrotic syndrome. In: Comprehensive Pediatric Nephrology, edited by Geary DF, Scaefer F., Philadelphia, Mosby Elsevier, 2008, pp 205–218.

134. Ranganathan S. Pathology of podocytopathies causing nephrotic syndrome in children. Front Pediatr. 2016;4:32.

135. Pardo V, Riesgo I, Zilleruelo G, Strauss J. The clinical significance of mesangial IgM deposits and mesangial hypercellularity in minimal change nephrotic syndrome. Am J Kidney Dis. 1984;3:264–269.

136. Herlitz LC, Bomback AS, Stokes MB, Radhakrishnan J, D'Agati VD, Markowitz GS. IgA nephropathy with minimal change disease. Clin J Am Soc Nephrol. 2014;9:1033–1039.

137. Avner ED, Harmon WE, Niaudet P, Yoshikawa N, Emma F, Goldstein SL. Idiopathic Nephrotic Syndrome in Children: Clinical Aspects. Pediatric Nephrology, 7th Ed., Berlin, Springer, 2016, pp 2730.

138. Waldman M, Crew RJ, Valeri A, Busch J, Stokes B, Markowitz G, et al. Adult minimal-change disease: Clinical characteristics, treatment, and outcomes. Clin J Am Soc Nephrol. 2007;2: 445–453.

139. Pereira WF, Brito-Melo GE, Guimarães FT, Carvalho TG, Mateo EC, Simões e Silva AC. The role of the immune system in idiopathic nephrotic syndrome: A review of clinical and experimental studies. Inflamm Res. 2014;63:1–12.

140. Sahali D, Sendeyo K, Mangier M, Audard V, Zhang SY, Lang P, et al. Immunopathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome with relapse. Semin Immunopathol. 2014;36:421–429.

141. Wang Y, Wang YP, Tay YC, Harris DC. Role of CD8(+) cells in the progression of murine adriamycin nephropathy. Kidney Int. 2001;59:941–949.

142. van den Berg JG, Weening JJ. Role of the immune system in the pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome. Clin Sci (Lond). 2004; 107:125–136.

143. Kim SH, Park SJ, Han KH, Kronbichler A, Saleem MA, Oh J, et al. Pathogenesis of minimal change nephrotic syndrome: an immunological concept. Korean J Pediatr. 2016;59(5):205-11.

144. Bertelli R, Bonanni A, Di Donato A, Cioni M, Ravani P, Ghiggeri GM. Regulatory T cells and minimal change nephropathy: In the midst of a complex network. Clin Exp Immunol. 2016; 183:166–174.

145. Liu LL, Qin Y, Cai JF, Wang HY, Tao JL, Li H, Chen LM, Li MX, Li XM, Li XW.: Th17/Treg imbalance in adult patients with minimal change nephrotic syndrome. Clin Immunol 2011:139;314–320.

146. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. Nat Rev Immunol. 2006;6:295–307.

147. Audard V, Pawlak A, Candelier M, Lang P, Sahali D. Upregulation of nuclear factor-related kappa B suggests a disorder of transcriptional regulation in minimal change nephrotic syndrome. PLoS One. 2012;7:e30523.

148. Shimada M, Araya C, Rivard C, Ishimoto T, Johnson RJ, Garin EH. Minimal change disease: a "two-hit" podocyte immune disorder? Pediatr Nephrol. 2011;26(4):645-9.

149. Kienzl-Wagner K, Waldegger S, Schneeberger S. Disease Recurrence-The Sword of Damocles in Kidney Transplantation for Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis. Front Immunol. 2019;10:1669.

150. Lennon R, Singh A, Welsh GI, Coward RJ, Satchell S, Ni L, et al. Hemopexin induces nephrin-dependent reorganization of the actin cytoskeleton in podocytes. J Am Soc Nephrol. 2008;19: 2140–2149.

151. Clement LC, Avila-Casado C, Macé C, Soria E, Bakker WW, Kersten S, et al. Podocyte-secreted angiopoietin-like-4 mediates proteinuria in glucocorticoid-sensitive nephrotic syndrome. Nat Med. 2011;17:117–122.

152. Cara-Fuentes G, Segarra A, Silva-Sanchez C, Wang H, Lanaspa MA, Johnson RJ, et al. Angiopoietin-like-4 and minimal change disease. PLoS One. 2017;12(4):e0176198.

153. Ollero M, Sahali D. Inhibition of the VEGF signalling pathway and glomerular disorders. Nephrol Dial Transplant 30. 2015;1449–1455.

154. McCaffrey J, Lennon R, Webb NJ. The non-immunosuppressive management of childhood nephrotic syndrome. Pediatr Nephrol. 2016;31:1383–1402.

155. Hahn D, Hodson EM, Willis NS, Craig JC. Corticosteroid therapy for nephrotic syndrome in children. Cochrane Database Syst Rev. 2015;3:CD001533.

156. Rovin BH, Caster DJ, Cattran DC, Gibson KL, Hogan JJ, Moeller MJ, et al. Management and treatment of glomerular diseases (part 2): conclusions from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. Kidney Int. 2019;95(2):281-295.

157. Rich AR. A hitherto undescribed vulnerability of thejuxtamedullary glomeruli in lipoid nephrosis. Bull Johns Hopkins Hosp.1957;100:173–186.

158. D'Agati VD, Fogo AB, Bruijn JA, Jennette JC. Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal. Am J Kidney Dis. 2004; 43(2):368-82.

159. D'Agati VD, Kaskel FJ, Falk RJ. Focal segmental glomerulosclerosis. N Engl J Med. 2011;365(25):2398-411.

160. Nagata M, Kobayashi N, Hara S. Focal segmental glomerulosclerosis; why does it occur segmentally? Pflugers Arch. 2017;469(7-8):983-988.

161. Hogg R, Middleton J, Vehaskari VM. Focal segmental glomerulosclerosis--epidemiology aspects in children and adults. Pediatr Nephrol. 2007;22(2):183-6.

162. Kopp JB. Focal segmental glomerulosclerosis and collapsing glomerulopathy syndromes. In: Essentials of Chronic Kidney Disease, edited by Fadem SZ, editor, Hauppauge, Nova Science Publishers, 2015.

163. Schachter AD. Computational simulation of renal biopsy accuracy in focal segmental glomerulosclerosis. Pediatr Nephrol. 2006; 21(7):953-7.

164. Testagrossa L, Azevedo Neto R, Resende A, Woronik V, Malheiros D. Immunohistochemical expression of podocyte markers in the variants of focal segmental glomerulosclerosis. Nephrol Dial Transplant. 2013;28(1):91-8.

165. Rosenberg AZ, Kopp JB. Focal Segmental Glomerulosclerosis. Clin J Am Soc Nephrol. 2017;12(3):502-517.

166. Han MH, Kim YJ. Practical Application of Columbia Classification for Focal Segmental Glomerulosclerosis. Biomed Res Int. 2016;2016:9375753.

167. Becherucci F, Lazzeri E, Romagnani P. A road to chronic kidney disease: toward glomerulosclerosis via dendrin. Am J Pathol. 2015;185(8):2072-5.

168. Gallon L, Leventhal J, Skaro A, Kanwar Y, Alvarado A. Resolution of recurrent focal segmental glomerulosclerosis after retransplantation. N Engl J Med. 2012;366:1648–1649.

169. Winnicki W, Sunder-Plassmann G, Sengölge G, Handisurya A, Herkner H, Kornauth C, et al. Diagnostic and Prognostic Value of Soluble Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor (suPAR) in Focal Segmental Glomerulosclerosis and Impact of Detection Method. Sci Rep. 2019;9(1):13783.

170. Barisoni L, Schnaper HW, Kopp JB. A proposed taxonomy for the podocytopathies: A reassessment of the primary nephrotic diseases. Clin J Am Soc Nephrol. 2007;2:529–542.

171. Brenner BM, Mackenzie HS. Nephron mass as a risk factor for progression of renal disease. Kidney Int Suppl. 1997;63:S124–S127.

172. Cattran DC, Appel GB, Hebert LA, Hunsicker LG, Pohl MA, Hoy WE, et al. North America Nephrotic Syndrome Study Group: A randomized trial of cyclosporine in patients with steroid-resistant focal segmental glomerulosclerosis. Kidney Int. 1999;56:2220–2226.

173. Fogo AB. Causes and pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis. Nat Rev Nephrol. 2015;11(2):76-87.

174. Müller-Deile J, Schenk H, Schiffer M. [Minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis]. Internist (Berl). 2019;60(5):450-457.

175. Pérez V, López D, Boixadera E, Ibernón M, Espinal A, Bonet J et al. Comparative differential proteomic analysis of minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis. BMC Nephrol. 2017;18(1):49.

176. Maas RJ, Deegens JK, Smeets B, Moeller MJ, Wetzels JF. Minimal change disease and idiopathic FSGS: manifestations of the same disease. Nat Rev Nephrol. 2016;12(12):768-776.

177. Asanuma K, Akiba-Takagi M, Kodama F, Asao R, Nagai Y, Lydia A, et al. Dendrin location in podocytes is associated with disease progression in animal and human glomerulopathy. Am J Nephrol. 2011;33(6):537-49.

178. Xiao Z, Rodriguez PQ, He L, Betsholtz C, Tryggvason K, Patrakka J. Wtip- and gadd45a-interacting protein dendrin is not crucial for the development or maintenance of the glomerular filtration barrier. PLoS One. 2013;8(12):e83133.

179. Kodama F, Asanuma K, Takagi M, Hidaka T, Asanuma E, Fukuda H, et al. Translocation of dendrin to the podocyte nucleus in acute glomerular injury in patients with IgA nephropathy. Nephrol Dial Transplant. 2013;28(7):1762-72.

180. Weins A, Wong JS, Basgen JM, Gupta R, Daehn I, Casagrande L, et al. Dendrin ablation prolongs life span by delaying kidney failure. Am J Pathol. 2015;185(8):2143-57.

181. Ihara K, Asanuma K, Fukuda T, Ohwada S, Yoshida M, Nishimori K. MAGI-2 is critical for the formation and maintenance of the glomerular filtration barrier in mouse kidney. Am J Pathol. 2014;184(10):2699-708.

182. Shirata N, Ihara KI, Yamamoto-Nonaka K, Seki T, Makino SI, Oliva Trejo JA, et al. Glomerulosclerosis Induced by Deficiency of Membrane-Associated Guanylate Kinase Inverted 2 in Kidney Podocytes. J Am Soc Nephrol. 2017;28(9):2654-2669.

183. Huang Z, Zhang L, Chen Y, Zhang H, Yu C, Zhou F, et al. RhoA deficiency disrupts podocyte cytoskeleton and induces podocyte apoptosis by inhibiting YAP/dendrin signal. BMC Nephrol. 2016;17(1):66.

184. Huang J, Wu S, Barrera J, Matthews K, Pan D. The hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating yorkie, the drosophila homolog of YAP. Cell. 2005;122(3):421–434.

185. Pan D. The hippo signaling pathway in development and cancer. Dev Cell. 2010;19(4):491–505.

186. Campbell KN, Wong JS, Gupta R, Asanuma K, Sudol M, He JC, et al. Yes-associated protein (YAP) promotes cell survival by inhibiting proapoptotic dendrin signaling. J Biol Chem. 2013;288(24):17057-62.

187. Falke LL, Goldschmeding R, Nguyen TQ. A perspective on anti-CCN2 therapy for chronic kidney disease. Nephrol Dial Transplant. 2014;29(supple 1):30–37.

188. Toda N, Mukoyama M, Yanagita M, et al. CTGF in kidney fibrosis and glomerulonephritis. Inflamm Regen. 2018;38:14.

189. Sánchez-López E, Rodrigues Díez R, Rodríguez Vita J, et al. [Connective tissue growth factor (CTGF): a key factor in the onset and progression of kidney damage]. Nefrologia. 2009;29(5):382-91.

190. Ivkovic S, Yoon BS, Popoff SN, Safadi FF, Libuda DE, Stephenson RC et al. Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. Development. 2003;130(12):2779-91.

191. Goldschmeding R, Aten J, Ito Y, et al. Connective tissue growth factor: just another factor in renal fibrosis? Nephrol Dial Transplant. 2000;15(3):296-9.

192. Ito Y, Goldschmeding R, Bende R, Claessen N, Chand M, Kleij L, et al. Kinetics of connective tissue growth factor expression during experimental proliferative glomerulonephritis. J Am Soc Nephrol. 2001;12(3):472-84.

193. Hilhorst M, Kok HM, Broekhuizen R, van Paassen P, van Breda Vriesman P, Goldschmeding R, et al. Connective tissue growth factor and the cicatrization of cellular crescents in ANCA-associated glomerulonephritis. Nephrol Dial Transplant. 2015;30(8):1291-9.

194. Ramazani Y, Knops N, Elmonem MA, Nguyen TQ, Arcolino FO, van den Heuvel L et al. Connective tissue growth factor (CTGF) from basics to clinics. Matrix Biol. 2018;68-69:44-66.

195. Lipson KE, Wong C, Teng Y, et al. CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. Fibrogenesis Tissue Repair. 2012;5:S24.

196. Ito Y, Goldschmeding R, Kasuga H, et al. Expression patterns of connective tissue growth factor and of TGF-beta isoforms during glomerular injury recapitulate glomerulogenesis. Am J Physiol Renal Physiol. 2010;299(3):F545-58.

197. Ito Y, Aten J, Nguyen TQ, Joles JA, Matsuo S, Weening JJ et al. Involvement of connective tissue growth factor in human and experimental hypertensive nephrosclerosis. Nephron Exp Nephrol. 2011;117(1):e9-20.

198. Ito Y, Aten J, Bende RJ, Oemar BS, Rabelink TJ, Weening JJ et al. Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis. Kidney Int. 1998;53(4):853-61.

199. Rupprecht HD, Keil A, Hofer G, Schocklmann HO. Regulation of gene expression in cultured rat mesangial cells (MC) by NO: downregulation of connective tissue growth factor (CTGF). J Am Soc Nephrol1999; 10: 579 (abstract).

200. Brigstock DR. The Connective Tissue Growth Factor/Cysteine-Rich61/Nephroblastoma overexpressed (CCN)family. Endocrine Rev. 1999; 20(2): 189–206.

201. Richeldi L, Fernández Pérez ER, Costabel U, Albera C, Lederer DJ, Flaherty KR, et al. Pamrevlumab, an anti-connective tissue growth factor therapy, for idiopathic pulmonary fibrosis (PRAISE): a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet Respir Med. 2020;8(1):25-33.

202. Adler SG, Schwartz S, Williams ME, Arauz-Pacheco C, Bolton WK, Lee T et al. Phase 1 study of anti-CTGF monoclonal antibody in patients with diabetes and microalbuminuria. Clin J Am Soc Nephrol. 2010;5(8):1420-8.

203. Yokoi H, Mukoyama M, Nagae T, Mori K, Suganami T, Sawai K et al. Reduction in connective tissue growth factor by antisense treatment ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis. J Am Soc Nephrol. 2004;15(6):1430-40.

204. Jensen J, Gentzkow G, Berman G, Senne L, Jewell M, Connall TP et al. Anti-CTGF Oligonucleotide Reduces Severity of Postsurgical Hypertrophic Scars in a Randomized, Double-Blind, Within-Subject, Placebo-Controlled Study. Plast Reconstr Surg. 2018;142(2):192e-201e.

205. Wang X, Angelis N, Thein SL. MYB - A regulatory factor in hematopoiesis. Gene. 2018;665:6-17.

206. Ganter B. and Lipsick JS. Myb and oncogenesis. Adv Cancer Res. 1999;76, 21-60.

207. Bergholtz S, Andersen TO, Andersson KB, Borrebaek J, Luscher B, Gabrielsen OS. The highly conserved DNA-binding domains of A-, B-and c-Myb differ with respect to DNA-binding, phosphorylation and redox properties. Nucleic Acids Res. 2001;29, 3546-56.

208. George LO, Ness AS. Situational Awareness: Regulation of the Myb Transcription Factor in Differentiation, the Cell Cycle and Oncogenesis. Cancers (Basel). 2014; 6(4):2049–2071.

209. Dudek H. and Reddy EP. Identification of two translational products for c-myb. Oncogene. 1989;4,1061-6.

210. Mucenski ML, McLain K, Kier AB, Swerdlow SH, Schreiner CM, Miller TA, et al.A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. Cell. 1991;65, 677-89.

211. Vegiopoulos A, Garcia P, Emambokus N, Frampton J. Coordination of erythropoiesis by the transcription factor c-Myb. Blood. 2006;107,4703-10.

212. Kasper LH, Fukuyama T, Lerach S, Chang Y, Xu W, Wu S, et al. Genetic interaction between mutations in c-Myb and the KIX domains of CBP and p300 affects multiple blood cell lineages and influences both gene activation and repression. PloS One. 2013;8,e82684.

213. Ramsay RG, Barton AL, Gonda TJ. Targeting c-Myb expression in human disease. Expert Opin Ther Targets. 2003;7(2):235-48.

214. Tanno B, Sesti F, Cesi V, Bossi G, Ferrari-Amorotti G, Bussolari R, et al. Expression of Slug is regulated by c-Myb and is required for invasion and bone marrow homing of cancer cells of different origin. J Biol Chem. 2010;285(38):29434-45.

215. Boutet A, Esteban MA, Maxwell PH, et al. Reactivation of Snail genes in renal fibrosis and carcinomas: a process of reversed embryogenesis? Cell Cycle. 2007;6(6):638-42.

216. Boutet A, A De Frutos C, Maxwell PH, et al. Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney. EMBO J. 2006;25(23):5603–5613.

217. Fry EA, Inoue K. c-MYB and DMTF1 in Cancer. Cancer Invest. 2019;37(1):46-65.

218. Damjanov I, Jukić S, Nola M. Patologija, 2. izdanje, Zagreb: Medicinska naklada, 2008. ISBN 978-953-176-365-3.

219. Menn-Josephy H, Lee CS, Nolin A, Christov M, Rybin DV, Weinberg JM, et al. Renal Interstitial Fibrosis: An Imperfect Predictor of Kidney Disease Progression in Some Patient Cohorts. Am J Nephrol. 2016;44(4):289-299.

220. Norouzi J, Yadollahpour A, Mirbagheri SA, Mazdeh MM, Hosseini SA. Predicting Renal Failure Progression in Chronic Kidney Disease Using Integrated Intelligent Fuzzy Expert System. Comput Math Methods Med. 2016;2016:6080814.

221. Menon MC, Chuang PY, He JC. Role of podocyte injury in IgA nephropathy. Contrib Nephrol. 2013:181;41–51.

222. Lai KN, Leung JC, Chan LY, Saleem MA, Mathieson PW, Tam KY et al. Podocyte injury induced by mesangial-derived cytokines in IgA nephropathy. Nephrol Dial Transplant. 2009;24(1):62-72.

223. Dunér F, Patrakka J, Xiao Z, Larsson J, Vlamis-Gardikas A, Pettersson E, et al. Dendrin expression in glomerulogenesis and in human minimal change nephrotic syndrome. Nephrol Dial Transplant. 2008;23(8):2504-11.

224. Yin Q, Liu H. Connective Tissue Growth Factor and Renal Fibrosis. Adv Exp Med Biol. 2019;1165:365-380.

225. Lopes TG, de Souza ML, da Silva VD, Dos Santos M, da Silva WIC, Itaquy TP, et al. Markers of renal fibrosis: How do they correlate with podocyte damage in glomerular diseases? PLoS One. 2019;14(6):e0217585.

226. Ebihara I, Nakamura T, Suzuki S, Tomino Y, Koide H. Proto-oncogene expression in peripheral blood mononuclear cells in IgA nephropathy. Kidney Int. 1991;39(5):946-53.

227. Rodríguez-Iturbe B, Johnson RJ, Herrera-Acosta J. Tubulointerstitial damage and progression of renal failure. Kidney Int. 2005; 68: 82–86.

228. Helal I, Fick-Brosnahan GM, Reed-Gitomer B, Schrier RW. Glomerular hyperfiltration: definitions, mechanisms and clinical implications. Nat Rev Nephrol. 2012;8(5):293-300.

229. Reboldi G, Verdecchia P, Fiorucci G, Beilin LJ, Eguchi K, Imai Y, et al. Glomerular hyperfiltration is a predictor of adverse cardiovascular outcomes. Kidney Int. 2018;93(1):195-203.

230. Bobart SA, Alexander MP, Shawwa K, Vaughan LE, Ghamrawi R, Sethi S, et al. The association of microhematuria with mesangial hypercellularity, endocapillary hypercellularity, crescent score and renal outcomes in immunoglobulin A nephropathy. Nephrol Dial Transplant. 2019. pii:gfz267.

8. SAŽETAK

Cilj: Glomerularne bolesti su uzrok terminalnog stadija kronične bubrežne bolesti u 90% slučajeva. Podociti imaju centralnu ulogu u patogenezi glomerularnih bolesti i opadanju bubrežne funkcije. Ovisno o dužini i intenzitetu oštećenja, podociti hipertrofiraju i prolaze epitelijalno-mezenhimalnu pretvorbu ili umiru apoptozom. Glomeruloskleroza, intersticijska fibroza i tubularna atrofija su standardna obilježja KBB i predskazatelji bubrežnog ishoda, ali se traže rani prognostički biljezi. Dendrin je zdravom odraslom bubregu izražen na bazalnoj membrani podocita, a CTGF i c-Myb rijetko, ako ikad u podocitima i tubularnom epitelu. Cilj studije je analizirati njihov izražaj u GB i ispitati korelaciju s bubrežnom funkcijom u vrijeme biopsije i na kraju praćenja.

Metode: Uzorak sadrži podatke o 48 ispitanika s primarnim GB dijagnosticiranim u razdoblju 1996.-2018. godine u Kliničkom bolničkom centru Split. Parafinski blokovi bubrežnog tkiva prikupljeni su iz arhive Odjela za patologiju, a klinički podaci iz povijesti bolesti Klinike za nefrologiju i Klinike za dječje bolesti. Urađena je imunohistokemijska analiza korištenjem protutijela na dendrin, c-Myb i CTGF. Izražaj dendrina je uspoređen između upalnih GB (IgGA/HSP) i podocitopatija (BMP i pFSGS), a izražaj CTGF i i c-Myb između IgA/HSP i kontrole. Izražaj svih biljega je uspoređen s laboratorijskim pokazateljima bubrežne funkcije u vrijeme biopsije i na kontroli.

Rezultati: Medijan životne dobi je iznosio 32,5 godina (min-maks: 3-76) godina. Šesnaest (33%) ispitanika je bilo ženskog spola, a trideset i dva (67%) muškog spola. Broj dendrin pozitivnih jezgara je bio viši u podocitopatijama nego u IgAN i HSP. Uzorak izražaja dendrina definiran je kao membranski, dualni, nuklearni i negativni. Uzorak negativnog izražaja bio je povezan s nižim kontrolnim klirensom kreatinina. Medijan izražaja CTGF u citoplazmi tubularnog epitela je bio veći u IgAN/HSP nego u kontroli ($P < 0,001$). Nuklearni izražaj c-Myb u glomerulima i tubulima je bio veći u IgAN/HSP nego kontroli ($P=0,005$ i $P=0,002$). U praćenju, pad bubrežne funkcije bio je povezan s većim glomerularnim i tubularnim izražajem c-Myb, kao i CTGF (svi $P < 0,05$).

Zaključak: Negativan izražaj dendrina i povećani izražaj c-Myb i CTGF su povezani s lošijom bubrežnom funkcijom na kraju praćenja te ih možemo smatrati novim, ranim prognostičkim pokazateljima progresivne KBB.

9. SUMMARY

Title: Significance of expression of dendrin, connective tissue growth factor and c-Myb as early markers of chronic kidney disease in primary glomerular diseases - a cohort study

Aim: Glomerular diseases (GD) cause 90% of end-stage chronic kidney disease (CKD) cases. Podocytes have central role in pathogenesis of glomerular diseases and impaired renal function. Depending on the length and intensity of damage, they become hypertrophic, undergo epithelial-mesenchymal transition, or die. Glomerular sclerosis, as well as interstitial fibrosis and tubular atrophy, are good, but imperfect predictors of CKD and new early predictors are needed. In adult kidney, dendrin is normaly expressed in podocyte slit membrane and CTGF and c-Myb are rarely, if ever, expressed in podocytes and tubular cells. Aim of the study is to analyze their expression in GD and correlate with renal function after follow-up period.

Methods: The sample contains data of 48 patients with primary GD (22 IgAN, 8 HSP, 7 BMP and 11 pFSGS cases) diagnosed in period 1996-2018 in University Hospital Centre of Split. Clinical data were collected from hospital records. Median of age was 32.5 (min-max: 3-76) years. Paraffin blocks of percutaneous renal biopsies were collected from Department of pathology. Immunohistochemistry/immunofluorescence was performed using antibodies to dendrin and c-Myb/CTGF, consecutively. Dendrin expression was compared between IgA/HSP and podocytopathies MCD and FSGS, and c-Myb and CTGF expression between IgA/HSP and controls - 12 patients who underwent nephrectomy due to renal cancer and had normal renal function. Further, the expresssion was correlated with laboratory parameters of renal function in time of the biopsy and at the end of follow-up.

Results: Dendrin nuclear translocation occurs in different types of GD, including MCD, and dendrin expression presents in different patterns. Proportion of dendrin negative glomeruli correlated with lower creatinine clearance at the time of biopsy and at last follow-up (P=0.010 and P < 0.001, respectively). The cytoplasmic tubular CTGF expression was higher in IgAN/HSP than in controls ($P < 0.001$). The nuclear c-Myb expresssion in glomeruli and tubules was higher in IgAN/HSP than controls ($P < 0.05$). In the follow-up, decline in renal function correlated with glomerular and tubular c-Myb, as well as tubular CTGF expression ($P < 0.05$). **Conclusions**: The proportion of dendrin negative glomeruli, as well as upregulated c-Myb and CTGF expression, might be early indicators of late worse renal outcome.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI:

Ime i prezime: Maja Mizdrak

Adresa: Hercegovačka 15, Split

Kontakt: 098/190 8840

E-mail: mizdrakmaja@gmail.com

Državljanstvo: Republike Hrvatske

Datum i mjesto rođenja: 17.07.1990., Zadar

IZOBRAZBA:

1996.-2004. Osnovna škola „Kman - Kocunar“ Split

2004.-2008. I. gimnazija Split (jezično usmjerenje)

2008.-2014. Studij Medicine na Medicinskom fakultetu Split (2. mjesto na rang listi svih kandidata)

2015.- danas: Poslijediplomski doktorski studij „Biologija novotvorina“ Medicinski fakultet Split

RADNO ISKUSTVO:

10./2014. - 2/2015. Zavod za hitnu medicinu Splitsko dalmatinske županije (pripravnički staž za doktore medicine)

11/2015. - danas: specijalizacija iz nefrologije, Klinički bolnički centar Split

2019. /2020.: asistent na Katedri za patofiziologiju, Medicinski fakultet Split

MATERINSKI JEZIK:

- Hrvatski jezik

OSTALI JEZICI:

- Engleski jezik

- Njemački jezik

NAGRADE I PRIZNANJA:

2012. Dekanova nagrada za najboljeg studenta

2013. izabrana među top 10 studenata Sveučilišta u Splitu za susret s dobitnicom Nobelove nagrade Adom Yonath

2015. Dekanova pohvalnica za studente koji su diplomirali s prosječnom ocjenom > 4.5 (prosjek ocjena po ECTS 4.712)

PUBLIKACIJE:

Mizdrak M, Filipović N, Vukojević K, Čapkun V, Mizdrak I, Durdov MG. Prognostic value of connective tissue growth factor and c-Myb expression in IgA nephropathy and Henoch-Schönlein purpura-A pilot immunohistochemical study. Acta Histochem. 2020 Feb;122(2):151479.

Mizdrak M, Vukojević K, Filipović N, Čapkun V, Benzon B, Durdov MG. Expression of DENDRIN in several glomerular diseases and correlation to pathological parameters and renal failure - preliminary study. Diagn Pathol. 2018;13(1):90.

Mizdrak M, Džamonja G, Filipović Grčić P. Incidence of Central Nervous System Tumors in Patients Hospitalized at Split University Hospital Centre During a Ten-Year Period (January 1, 2004 - December 31, 2013). Acta Clin Croat. 2017;56(4):781-788.