

# Protein ADAMTS-4 kao mogući biološki biljeg kronične bubrežne bolesti

---

**Kovačević Vojtušek, Ivana**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2023**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:601987>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-22**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivana Kovačević Vojtušek**

**Protein ADAMTS-4 kao mogući biološki  
biljeg kronične bubrežne bolesti**

**DOKTORSKI RAD**



**Zagreb, 2023. godina**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivana Kovačević Vojtušek**

**Protein ADAMTS-4 kao mogući biološki  
biljeg kronične bubrežne bolesti**

**DOKTORSKI RAD**

**Zagreb, 2023. godina**

Disertacija je izrađena kao translacijsko istraživanje u Odjelu za proteomiku, Centra za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta u Zagrebu i Zavodu za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Dio istraživanja proveden je u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju KBC-a Zagreb.

Mentor: prof. dr. sc. Lovorka Grgurević

Sumentor: izv. prof. dr. sc. Mario Laganović

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Lovorki Grgurević na ustrajnom i dosljednom mentoriranju tijekom cijelog procesa izrade doktorske disertacije, počevši od idejnog koncepta, provođenja istraživanja i pisanja disertacije.

Zahvaljujem su-mentorima doc. dr. sc. Mariu Laganoviću na pomoći pri formiranju ispitivanih skupina, prikupljanju materijala i konstruktivnim savjetima.

Zahvaljujem dr. sc. Mariji Burek Kamenarić na velikoj pomoći u izradi poglavlja rezultata, doc. dr. sc. Steli Bulimbašić na ustrajnoj pomoći u analizi tkivnih uzoraka, doc. dr. sc. Ruđeru Novaku i svim suradnicima Odjela za proteomiku, prof. dr. sc. Marijani Ćorić te doc. dr. sc. Vanji Ivkoviću na pomoći u pojedinim segmentima statističke obrade.

Zahvaljujem medicinskim sestrama Zavoda za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju na nesebičnoj pomoći prilikom sakupljanja uzoraka ispitanika, kao i djelatnicima Odjela za tipizaciju tkiva KBC-a Zagreb na primarnoj obradi i skladištenju bioloških uzoraka.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Renati Žunec na majčinskoj potpori, znanstvenom savjetovanju, prijateljskoj brizi i pomoći tijekom cijelog perioda izrade disertacije.

Zahvaljujem svojoj obitelji, roditeljima, a posebno suprugu i punoljetnim kćerima na strpljenju i razumijevanju potrebe da se doktorska disertacija konačno završi.

Sadržaj.....	
1. UVOD I SVRHA RADA.....	1
1.1. Kronična bubrežna bolest.....	1
1.2. Stanični i molekularni mehanizmi tubulointersticijske fibroze.....	3
1.2.1. Molekularne promjene epitelnih stanica bubrežnih tubula nakon ozljede.....	6
1.2.2. Signalni putevi u bubrežnoj fibrozi.....	8
1.2.3. Uloga pericita i endotelno-pericitne komunikacije u patogenezi bubrežne fibroze.....	13
1.2.4. Uloga i podrijetlo miofibroblasta u bubrežnoj fibrogenezi.....	15
1.2.5. Uloga nespecifičnog imunološkog odgovora u bubrežnoj fibrogenezi.....	16
1.3. Uloga i regulacija izvanstaničnog matriksa u fibrozi bubrega.....	17
1.4. Proteini izvanstaničnog matriksa i njihova raspodjela u bubrežnim odjeljcima.....	17
1.5. Proteinaze izvanstaničnog matriksa.....	19
1.5.1. Matriks metaloproteinaze (MMP).....	20
1.5.2. Disintegrin i metaloproteinaze s motivima trombospondina (ADAMTS).....	21
1.5.2.1. Uloga ADAMTS-4 proteinaze u bolestima krvožilnog sustava.....	24
1.5.2.2. ADAMTS-4 u bubrežnim bolestima i fibrozi.....	25
1.6. Biološki biljezi i uloga proteomskog profiliranja u KBB.....	26
2. HIPOTEZA.....	28
3. CILJEVI I SVRHA ISTRAŽIVANJA.....	29
3.1. Opći cilj.....	29
3.2. Specifični ciljevi.....	29
3.3. Svrha istraživanja i očekivani znanstveni doprinos.....	29
4. MATERIJALI I METODE.....	30
4.1. Ispitanici, materijali i tijek istraživanja.....	30
4.1.1. Ispitanici i prikupljanje uzoraka.....	30
4.1.2. Tijek istraživanja.....	31
4.2. Proteomska analiza.....	32
4.2.1. Obrada i priprema uzoraka.....	33
4.2.2. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima pročišćenim heparinom.....	34
4.2.3. Digestija (razgradnja) proteina peptidazom tripsinom.....	34
4.2.4. Pročišćavanje i ugušćivanje peptida.....	36
4.2.5. Tekućinska kromatografija i spektrometrija masa.....	36
4.2.6. Bioinformatička obrada dobivenih podataka.....	37

4.3. ELISA analiza.....	38
4.3.1. Priprema pločice .....	38
4.3.2. Blokiranje.....	39
4.3.3. Nanošenje kontrolnih i eksperimentalnih uzoraka.....	39
4.3.4. Detekcija proteina .....	39
4.3.5. Primjena streptavidina.....	40
4.3.6. Dodavanje supstrata i zaustavljanje reakcije .....	40
4.4. Imunohistokemijska analiza biopsijskih uzoraka bubrežnog tkiva .....	40
4.4.1. Primarna obrada uzoraka tkiva dobivenih biopsijom bubrega.....	40
4.4.2. Patohistološka analiza bioptata bubrega .....	41
4.4.3. Imunohistokemijska analiza biopsijskih uzoraka .....	42
4.5. Statistička analiza .....	44
5. REZULTATI.....	45
5.1. Profil proteina i pojavnost ADAMTS-4 molekule u krvi i mokraći ispitanika .....	45
5.1.1. Analiza trenda ekspresije proteina proteomskim profiliranjem.....	48
5.1.1.1. Analiza trenda ekspresije proteina u skupinama KBB1 do KBB5 .....	48
5.1.1.2. Analiza <i>outlier</i> proteina .....	50
5.1.1.3. Analiza uremijskih toksina .....	50
5.1.1.4. Analiza proteina s gubitkom ekspresije nakon transplantacije bubrega .....	53
5.1.1.5. Analiza proteina povezanih s izvanstaničnim matriksom.....	54
5.1.2. Analiza ekspresije signalnih puteva proteina obogaćena analizom gena .....	56
5.1.3. ELISA analiza detekcije i distribucije ADAMTS-4 u ispitivanim skupinama.....	62
5.2. Imunohistokemijska analiza ADAMTS-4 i BMP-1 proteina u tkivima bubrega .....	65
5.2.1. Distribucija ADAMTS-4 i BMP-1 proteina u tkivnim odjeljcima bubrega s KBB .....	65
5.2.1.1. Distribucija proteina ADAMTS-4 i BMP-1 u skupini KTR.....	67
5.2.1.2. Distribucija proteina BMP-1 u skupinama NBB i TBB .....	69
5.2.1.3. Distribucija proteina ADAMTS-4 u skupinama s KBB .....	72
5.2.2. Povezanost ekspresije proteina ADAMTS-4 s histološkim parametrima fibroze i upale.....	77
5.2.3. Analiza izražaja ADAMTS-4 u parnim biopsijama transplantiranih bubrega.....	80
6. RASPRAVA .....	84
7. ZAKLJUČAK .....	98
8. SAŽETAK .....	100

9. SUMMARY .....	101
10. LITERATURA .....	102
11. ŽIVOTOPIS .....	127

## **POPIS POKRATA I OZNAKA**

**ADAMTS** – disintegrin i metaloproteinaze s motivom trombospondina (engl. *A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs*)

**ADAMTSL2** – protein sličan disintegrin i metaloproteinazi s motivom trombospondina 2 (engl. *A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs like protein 2*)

**ADPKD** – autosomno dominantna policistična bubrežna bolest (engl. *Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease*)

**AER** – stupanj izlučivanja albumina u 24-satnoj mokraći (engl. *Albumin Excretion Rate*)

**ANOVA** – analiza varijance (engl. *Analysis of Variance*)

**ATP** – adenzin trifosfat (engl. *Adenosine Triphosphate*)

**BMP** – koštani morfogogenetski protein (engl. *Bone Morphogenetic Protein*)

**BMP-1** – koštani morfogogenetski protein 1 ili prokolagen c-proteinaza (engl. *Bone Morphogenetic Protein 1*)

**CCA** – ciklus staničnog mirovanja (engl. *Cell-Cycle Arrest*)

**CD14** – membranski receptor CD14 (engl. *Cluster of Differentiation 14*)

**CRP** – C-reaktivni protein (engl. *C-Reactive Protein*)

**CTGF** – čimbenik rasta vezivnog tkiva (engl. *Connective Tissue Growth Factor*)

**DAMP** – molekulske strukture nastale oštećenjem (engl. *Damage-Associated Molecular Pattern*)

**DNA** – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *Deoxyribonucleic Acid*)

**eGFR** – procijenjena brzina glomerularne filtracije (engl. *Estimated Glomerular Filtration Rate*)

**ECM** – izvanstanični matriks (engl. *Extracellular Matrix*)

**ECM 1** – protein izvanstaničnog matriksa 1 (engl. *Extracellular matrix protein 1*)

**EGFR** – receptor za epidermalni čimbenik rasta (engl. *Epidermal Growth Factor Receptor*)



**EMT** – epitelno-mezenhimalna tranzicija (engl. *Epithelial-to-Mesenchymal Transition*)

**ERK** – kinaza regulirana izvanstaničnim signalom (engl. *Extracellular signal-Regulated Kinase*)

**ESRD** – završni stadij bubrežne bolesti (engl. *End Stage Renal Disease*)

**EV** – izvanstanične vezikule (engl. *Extracellular Vesicles*)

**FGF** – čimbenik rasta fibroblasta (engl. *Fibroblast Growth Factor*)

**Fn14** – receptor za TWEAK (engl. *Receptor for TNF-like Weak Inducer of Apoptosis*)

**FSP1** – specifični čimbenik fibroblasta 1 (engl. *Fibroblast Specific Protein 1*)

**GFR** – brzina glomerularne filtracije (engl. *Glomerular Filtration Rate*)

**Gli 1** – transkripcijski čimbenik onkogeno povezanog s gliomom (engl. *Transcription Factor Glioma-Associated Oncogene Homology*)

**GUK** – glukoza u krvi

**GWAS** – svegenomsko istraživanje povezanosti (engl. *Genome-Wide Association Study*)

**HABP 2** – protein 2 koji veže hijaluronan (*Hyaluronan-Binding Protein 2*)

**HDL** – lipoproteini visoke gustoće (engl. *High Density Lipoproteins*)

**HIF-1 $\alpha$**  – hipoksijom induciran čimbenik 1 alfa (engl. *Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$* )

**IFN $\gamma$**  – interferon gama

**Ig** – imunoglobulin (engl. *Immunoglobulin*)

**IL-1 $\alpha$**  – interleukin-1 alfa

**IL-1 $\beta$**  – interleukin-1 beta

**IL-6** – interleukin-6

**IRAK1** – kinaza 1 povezana s receptorom za interleukin-1 (engl. *Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 1*)

**ITM** – indeks tjelesne mase

**JAK** – Janus kinaze

**JNK** – c-jun n-terminalna kinaza (engl. *c-Jun N-terminal Kinase*)

**KBB** – kronična bubrežna bolest

**KDIGO** – organizacija za poboljšanje globalnih ishoda bubrežnih bolesti (engl. *Kidney Disease Improving Global Outcome*)

**lncRNA** – duga-nekodirajuća ribonukleinska kiselina (engl. *long-noncoding Ribonucleic Acid*)

**LAP** – peptid povezan s latencijom (engl. *Latency Associated Peptide*)

**LATS1/2** – supresorska kinaza velikih tumora 1/2 (engl. *Large Tumor Suppressor Kinase 1/2*)

**LDL** – lipoproteini niske gustoće (engl. *Low Density Lipoprotein*)

**LRG** – leucinom-bogat alfa-2 glikoprotein (engl. *Leucine Rich alpha-2 Glycoprotein*)

**LTBP** – protein koji veže latentni TGF- $\beta$  (engl. *Latent TGF- $\beta$  Binding Protein*)

**MAPK** – mitogenom aktivirane proteinske kinaze (engl. *Mitogen-Activated Protein Kinases*)

**MASP1** – serinska proteaza lektina koji veže manan (engl. *Mannan-Binding Lectin Serine Protease 1*)

**MCP-1** – kemoatraktantni protein monocita-1 (engl. *Monocyte Chemoattractant Protein-1*)

**miRNA** – mikro ribonukleinska kiselina (engl. *micro Ribonucleic Acid*)

**MMP** – matriks metaloproteinaze (engl. *Matrix Metalloproteinases*)

**MST1/2** – Ste20-slična kinaza (engl. *Ste-20-Like Kinase 1/2*)

**mTOR** – vezno mjesto rapamicina u sisavaca (engl. *Mammalian Target of Rapamycin*)

**MXRA 5** – protein povezan s pregradnjom matriksa 5 (*Matrix-Remodeling-Associated Protein 5*)

**NGAL** – lipokalin vezan uz neutrofilnu gelatinazu (engl. *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin*)

**NKD2** – homolog proteina gole kože Drozofile melanogaster 2 (engl. Naked cuticle protein homolog of Drosophila melanogaster 2)

**NLR** – receptori slični oligomerizacijskoj domeni koja veže nukleotide (engl. *Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD)-Like Receptor*)

**NLRP3** – receptori slični oligomerizacijskoj domeni koja veže nukleotide s pirinskom domenom 3 (engl. *NLR Family Pyrin Domain Containing 3*)

**P** – statistička vjerojatnost (engl. *Probability*)

**PBS** – puferirana otopina fosfatnih soli (engl. *Phosphate Buffered Saline*)

**PCPE-1** – pojačivač prokolagen C-endopeptidaze (engl. *Procollagen C-endopeptidase Enhancer 1*)

**PDGFβ** – čimbenik rasta podrijetlom iz trombocita beta (engl. *Platelet-Derived Growth Factorβ*)

**PDGFR-β** – receptor čimbenika rasta podrijetlom iz trombocita beta (engl. *Platelet-Derived Growth Factor Receptor-β*)

**PEDF** – pigmentni čimbenik podrijetlom iz epitela (engl. *Pigment Epithelium-Derived Factor*)

**pEMT** – parcijalna epitelno-mezenhimalna tranzicija (engl. *partial Epithelial-to-Mesenchymal Transition*)

**PI3K** – fosfatidil inozitol 3-kinaze (engl. *Phosphatidylinositol 3-Kinase*)

**PRR** – receptori za prepoznavanje molekularnih struktura (engl. *Pattern Recognition Receptors*)

**SASP** – sekretorni fenotip stanica s izraženim signalnim putevima procesa starenja (engl. *Senescence-Associated Secretory Phenotype*)

**SD** – standardna devijacija

**SGLT2** – kotransporter tipa 2 za natrij i glukozu (engl. *Sodium-glucose Cotransporter-2*)

**SLRP** – mali, leucinom-bogati proteoglikani (engl. *Small, Leucine-Rich Proteoglycans*)

**SMAD** – SMAD signalni put (engl. *Small Mothers Against Decapentaplegic*)

**SNP** – pojedinačni nukleotidni polimorfizam (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*)

**STAT** – provodnik signala i aktivator transkripcije (engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription*)

**TAZ** – transkripcijski koaktivator s PDZ-veznim motivom (engl. *Transcriptional Coactivator with PDZ Binding Motif*)

**TGF- $\beta$ 1** – transformirajući čimbenik rasta beta 1 (engl. *Transforming Growth Factor-Beta 1*)

**TGF- $\beta$  ig-h3** – transformirajućim čimbenikom rasta beta inducirani protein ig-h3 (engl. *Transforming Growth Factor-Beta-induced protein ig-h3*)

**TGFR** – receptor za transformirajući čimbenik rasta beta (engl. *Transforming Growth Factor Receptor*)

**TIMP** – tkivni inhibitori matriks metaloproteinaza (engl. *Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases*)

**TLR** – receptor sličan Toll receptoru Drosophila vrste (engl. *Toll-Like-Receptor*)

**TNF- $\alpha$**  – čimbenik nekroze tumora-alfa (engl. *Tumor Necrosis Factor-Alpha*)

**TNFR** – receptor za čimbenik nekroze tumora alfa (engl. *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Receptor*)

**TRAF** – čimbenik povezan s receptorom za čimbenik nekroze tumora alfa (engl. *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Receptor Associated Factor*)

**TWEAK** – slabi induktor apoptoze sličan čimbeniku nekroze tumora (engl. *TNF-like Weak Inducer of Apoptosis*)

**TYK2** – tirozin kinaza 2 (engl. *Tyrosine Kinase 2*)

**tzv.** – takozvani

**UUO** – unilateralna opstrukcija uretera (engl. *Unilateral Ureteral Obstruction*)

**VCAM-1** – protein adhezije vaskularnih stanica 1 (engl. *Vascular cell adhesion protein*)

**VEGF** – čimbenik rasta vaskularnog endotela (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*)

**VEGFR** – receptor za čimbenik rasta vaskularnog endotela (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*)

**vs** – naspram (*lat. versus*)

**YAP** – engl. *Yes-Associated Protein*

**$\chi^2$**  – vrijednost testa proporcija (engl. *Chi Square Test*)

# 1. UVOD I SVRHA RADA

## 1.1. Kronična bubrežna bolest

Kronična bubrežna bolest (KBB) je općeniti termin za skupinu različitih etioloških entiteta, kojima je zajedničko postupno pogoršanje bubrežne funkcije sve do njenog potpunoga gubitka, kada ju je potrebno nadomjestiti različitim metodama dijalize ili transplantacijom bubrega. Organizacija za poboljšanje globalnih ishoda bubrežnih bolesti (KDIGO, *Kidney Disease Improving Global Outcome*) definira KBB kao poremećaj bubrežne strukture ili funkcije, u trajanju od najmanje 3 mjeseca te uz prisutnost jednog od sljedećih dvaju uvjeta: I) brzina glomerularne filtracije (GFR, engl. *Glomerular Filtration Rate*) manja od 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>; II) prisutnost biljega bubrežnog oštećenja (1). Biljezima bubrežnog oštećenja smatramo: (a) albuminuriju, definiranu izlučivanjem  $\geq 30$  mg albumina u mokraći tijekom 24 sata (AER) ili omjerom albumina i kreatinina  $\geq 30$  mg/g u jednokratnom uzorku mokraće, (b) patološki sediment mokraće, (c) poremećaj histologije bubrežnog tkiva utvrđene biopsijom ili promjenu strukture bubrega utvrđenu slikovnim dijagnostičkim metodama; (d) poremećaj funkcije bubrežnih kanalića i (e) stanje nakon presadbe bubrega (2). Ukoliko se u trenutku pregleda ne može precizno utvrditi trajanje bubrežne bolesti, odnosno procijeniti radi li se o akutnoj ili kroničnoj bubrežnoj bolesti, potrebno je pratiti i ponavljati laboratorijske nalaze. Trenutno nema usuglašenog stava koliko vremensko razdoblje snižene glomerulske filtracije treba prihvatiti kao sigurni kriterij za dijagnozu KBB, ali najčešće se smatra da on mora biti barem 90 dana.

Stupnjevanje težine KBB određujemo temeljem vrijednosti glomerularne filtracije, stupnja albuminurije i etiologije bubrežne bolesti (1). Ključno je stupnjevanje prema vrijednosti GFR izražene u ml/min i korigirane prema standardnoj tjelesnoj površini (1,73 m<sup>2</sup>), temeljem koje razlikujemo 5 stupnjeva KBB: KBB1 s normalnom ili visokom GFR ( $\geq 90$ ); KBB2 s blago sniženom GFR (60-89); KBB3a s blago do umjereno sniženom GFR (45-59); KBB3b s umjereno do teško sniženom GFR (30-44); KBB4 s teško sniženom GFR (15-29); KBB5 s GFR  $\leq 15$ , a koju još nazivamo završnim stadijem KBB (ESRD, iz engl. *End Stage Renal Disease*). Stupnjevima se dodatno pridružuju kategorije albuminurije (A1-A3), pri čemu A1 označava kategoriju bez albuminurije (AER < 30 mg), A2 umjerenu albuminuriju (AER 30-300 mg), a A3 tešku albuminuriju (AER > 300 mg). Ukoliko u bolesnika nisu utvrđeni drugi biljezi bubrežnog oštećenja, tada se izolirani nalaz smanjene glomerularne filtracije, koji bi pripadao u stupanj KBB1 i KBB2, ne smatra dijagnostičkim kriterijem za KBB (1).

Vrijednost glomerularne filtracije može se najtočnije odrediti scintigrafijom ioheksolom/iotalamatom ili manje pouzdanije klirensom kreatinina, no u rutinskoj praksi GFR najčešće se procjenjuje putem široko dostupnih računskih formula za procijenjenu brzinu glomerularne filtracije (eGFR, engl. *estimated Glomerular Filtration Rate*), koje procjenjuju glomerularnu filtraciju temeljem vrijednosti koncentracije kreatinina ili cistatina C u krvi bolesnika. Od dostupnih formula najčešće se koristi CKD-EPI formula, koja je tijekom godina i modificirana (3).

Temeljem procjena iz 2017. godine oko 9% svjetske populacije boluje od KBB, a godišnje od posljedica KBB i pridruženih kardiovaskularnih komplikacija umire oko 2,6 milijuna ljudi (4). Uznapredovala KBB, a posebno ESRD, koja zahtijeva nadomještanje bubrežne funkcije dijalizom, dodatno pridonose gubitku funkcionalnosti i kvalitete života oboljelih. KBB bilježi stalni porast na ljestvici vodećih uzroka smrti u svijetu i temeljem dosadašnjeg trenda procjenjuje se da bi 2040. godine mogla doseći peto mjesto na ljestvici svih uzroka smrti u svijetu (5).

Šećerna bolest najznačajniji je rizični čimbenik za razvoj KBB, dok je povišeni krvni tlak najvažniji rizični čimbenik za razvoj kardiovaskularnih bolesti, povezan i s razvojem KBB (6). Procjena učestalosti primarnih bolesti glomerula značajno varira zbog neujednačenog pristupa dijagnostici ove skupine bubrežnih bolesti. S obzirom da je KBB u ranim stupnjevima obično asimptomatska, značajan trud ulaže se u programe ranog otkrivanja bolesti, koji obuhvaćaju pretraživanje rizičnih skupina najčešće metodom detekcije albumina u mokraći. Poseban trud pridaje se osvješćivanju potrebe za ranom dijagnostičkom biopsijom bubrega u svrhu pravovremenog otkrivanja i liječenja primarnih bolesti glomerula (7).

U terapijskom smislu, specifično liječenje moguće je u slučaju primarnih bolesti glomerula, dok se u bolesnika s drugim uzrocima KBB uglavnom nastoji usporiti napredovanje bolesti dobrom kontrolom krvnog tlaka, regulacijom šećerne bolesti, liječenjem dislipidemije i optimiziranjem dijetetskih mjera (2). U uznapredovalom i završnom stupnju KBB važno je liječenje anemije i adekvatna korekcija poremećaja mineralno-koštanog metabolizma te kvalitetno nadomještanje bubrežne funkcije dijalizom uz maksimalno moguće održavanje kvalitete života bolesnika (8).

Najbolji oblik nadomještanja bubrežne funkcije svakako je transplantacija bubrega, za koju se bolesnici počinju pripremati već tijekom stupnja KBB4. Ipak, dugoročno preživljenje transplantiranog bubrega još uvijek je limitirano brojnim čimbenicima (9). Stoga su značajni naponi usmjereni očuvanju bubrežne funkcije ili bar usporavanju progresije KBB.

Djelomični uspjeh u usporavanju progresije KBB moguće je postići primjenom inhibitora renin-angiotenzinskog sustava, a nedavno značajnu korist u kliničkim studijama pokazuju inhibitori transportera tipa 2 za natrij i glukozu (SGLT2, engl. Sodium-glucose Cotransporter-2) u stanicama proksimalnih kanalića bubrega (10). Ipak, mogućnosti liječenja razvijene KBB i dalje su značajno ograničene. Sve bubrežne bolesti, neovisno o etiologiji, završavaju bubrežnom fibrozom, trajnim oštećenjem bubrežnog tkiva (11). Prepoznavanje ključnog trenutka u procesu fibrogeneze, pri kojem bi bilo moguće fibrogenezu zaustaviti i vratiti sustav u stanje homeostaze, predmet je brojnih aktualnih istraživanja. Uz produbljivanje spoznaja o mnogobrojnim patofiziološkim mehanizmima, značajan napor pridaje se i otkrivanju novih bioloških čimbenika, koji sudjeluju u patogenetskom procesu, a moguće ih je utvrditi u prijelomnom periodu iz krvi ili mokraće bolesnika. Uz dijagnostički značaj, ovakve molekule mogu biti i cilj terapijskih intervencija (12).

Iako pod terminom bubrežne fibroze najčešće podrazumijevamo isključivo tubulointersticijsku fibrozu, značajan znanstveni napredak ostvaren je zadnjih godina i u području razumijevanja patogeneze glomeruloskleroze (13). Oba procesa u konačnici doprinose gubitku funkcionalnog bubrežnog tkiva, a time i razvoja ESRD-a. U glomerulu proces fibroze počinje aktivacijom glomerularnih epitelnih stanica, prvenstveno podocita, uslijed različitih etioloških oštećenja, uključujući i proces glomerularne hiperfiltracije. Posljedično dolazi do aktivacije epitelnih stanica Bowmanove čahure, koje počinju izlučivati kemokine i migriraju u Bowmanov prostor formirajući celularne polumjesece, koji u konačnici postaju fibrozni te cijeli proces vodi ka glomerulosklerozi (14).

## 1.2. Stanični i molekularni mehanizmi tubulointersticijske fibroze

Bubrežna fibroza je s histološkog aspekta definirana patološkim nakupljanjem različitih komponenata izvanstaničnog matriksa (ECM) u prostoru intersticija tkiva bubrega, atrofijom bubrežnih kanalića te propadanjem i nestankom bubrežnih kapilara (15). Iako prisutnost tubulointersticijske fibroze u tkivu bubrega ne korelira dobro s laboratorijskim pokazateljima bubrežnog zatajenja, njen stupanj odlično predskazuje ključne ishode KBB, kao što su brzina postizanja ESRD-a i potreba za nadomjesnim bubrežnim liječenjem. Stoga je stupnjevanje tubulointersticijske fibroze uključeno u gotovo sve patohistološke klasifikacije bubrežnih bolesti, posebno primarnih bolesti glomerula i patologije transplantiranog bubrega (16,17).



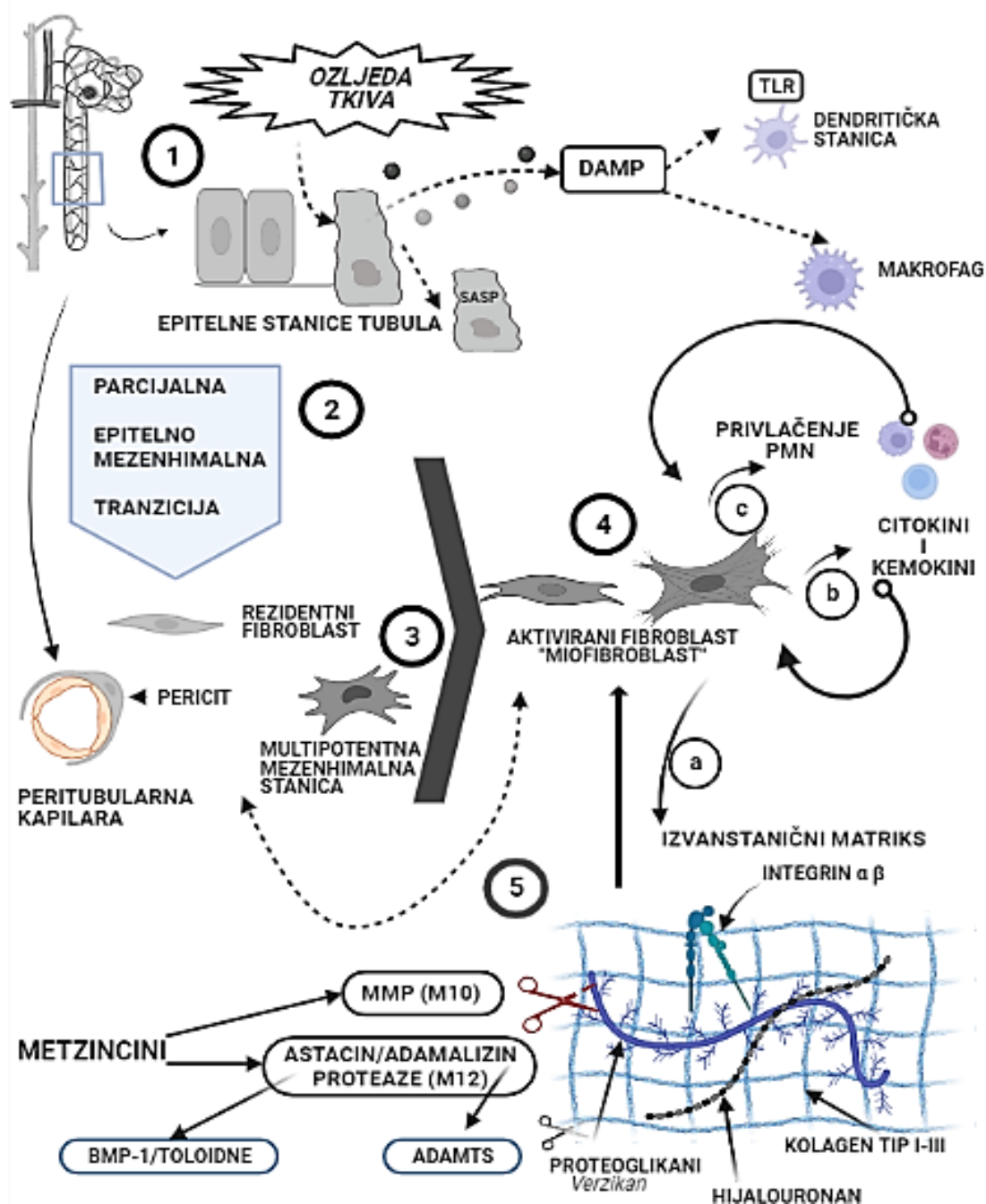
Bubrežnim intersticijem u užem smislu smatramo prostor između tubula, glomerula i peritubularnih kapilara, iako mu strukturalno također pripada i vezivno tkivo područja bubrežnih arteriola te intraglomerularni mezangij. Intersticij se sastoji od bubrežne strome koju čine raznovrsni proteini izvanstaničnog matriksa, u koji su uložene mezangijske i upalne stanice. U širem smislu, peritubularne kapilare i limfatičko žilje, zbog svoje funkcionalne povezanosti s ostalim komponentama izvanstaničnog matriksa, također pripadaju bubrežnom intersticiju (18).

Razumijevanje patogeneze tubulointersticijske fibroze značajno se produbilo tijekom zadnjeg desetljeća (13,19).

Ranije se patogeneza bubrežne fibroze temeljila na paradigmi epitelno-mezenhimalne (EMT, engl. *Epithelial-to-Mesenchymal Transition*), a potom i na endotelno-mezenhimalnoj tranziciji (engl. *Endothelial-to-Mesenchymal Transition*), procesu u kojem bi epitelne stanice proksimalnih tubula i endotelne stanice peritubularnih kapilara, nakon ozljede, poprimale funkcionalna i strukturalna obilježja miofibroblasta, stanica proizvođača izvanstaničnog matriksa u procesu fibrogeneze (20,21). Također je, temeljem kliničkih studija, postalo razvidno da signalni putevi posredovani transformirajućim čimbenikom rasta-beta (TGF- $\beta$ , engl. *Transforming growth factor-beta 1*) nisu jedini generator fibrogeneze i da se isključivo blokadom ovog čimbenika i njegove signalizacije ne može zaustaviti razvoj fibroze (22-26). Fokus istraživanja proširio se u ovom području prema molekularnim i imunološkim mehanizmima u fibrogenezi, čemu je posebno koristio ubrzani razvoj tzv. „omics“ tehnologije.

Nove spoznaje o podrijetlu i funkciji intersticijskih miofibroblasta, procesima aktivacije epitelnih stanica tubula, mehanizmima komunikacije između strukturalnih, mezenhimalnih i upalnih stanica bubrežnog intersticija te spoznaje o aktivnoj ulozi sastavnica izvanstaničnog matriksa u procesu nastanka bubrežne fibroze temelji su današnjeg razumijevanja regulacije procesa fibrogeneze (27-30).

Na Slici 1. pojednostavljeno je prikazan složeni mehanizam regulacije bubrežne fibrogeneze. Ključni segmenti ove regulacije opisani su u sljedećim poglavljima.



Slika 1. Pojednostavljeni prikaz složenih mehanizama regulacije bubrežne fibroze

1) bubrežna ozljeda; 2) parcijalna epitelno-mezenhimalna tranzicija; 3) transformacija miofibroblasta; 4) regulacija i autoregulacija miofibroblasta: a) proizvodnja i lučenje sastavnica ECM-a; b) lučenje kemokina i citokina; c) aktivacija sustava nespecifične imunosti; 5) pregradnja ECM-a. MMP - matriks metaloproteinaze; ADAMTS - disintegrin i metaloproteinaze s motivom trombospondina; DAMP - molekulske strukture nastale oštećenjem; TLR - receptor sličan Toll receptoru Drosophila vrste; PMN - polimorfonuklearni leukociti; SASP - sekretorni fenotip s izraženim signalnim putevima procesa starenja. Slika je izrađena u programu Biorender.com.

### 1.2.1. Molekularne promjene epitelnih stanica bubrežnih tubula nakon ozljede

Ozljeda epitelnih stanica tubula početni je događaj patofiziološkog procesa bubrežne fibrogeneze (31). U istraživanjima povezanosti genskih promjena s pojavnošću bolesti na razini cijeloga genoma (engl. GWAS, *Genome Wide Association Studies*), utvrđeno je da su pojedinačni nukleotidni polimorfizmi (engl. SNP, *Single Nucleotide Polymorphisms*) povezani s pojedinim bubrežnim bolestima, ali ne direktno s poznatim signalnim putevima fibrogeneze (32). GWAS nije utvrdio mutacije gena za ključne profibrotičke signalne molekule, poput TGF- $\beta$ . Ipak, određene mutacije, koje dovode do pojačane proizvodnje i nakupljanja specifičnih proteina u tubularnim stanicama, mogu biti i pokretač procesa fibrogeneze, a SNP, smješteni uz gene za metaboličku aktivnost stanice, mogu u epitelnim stanicama tubula stvarati preduvjete za pokretanje profibrogene signalizacije (33,34).

Kako je već spomenuto, teorija da aktivirane epitelnih stanice tubula, u procesu potpune epitelno-mezenhimalne tranzicije, fenotipski „postaju“ miofibroblasti, otklonjena je znanstvenim spoznajama o njihovom podrijetlu (35). Načelno, prvotna ozljeda dovodi do aktivacije i fenotipskih promjena epitelnih stanica, koje posljedično pojačavaju signalnu komunikaciju s okolnim intersticijem. Aktivacijom epitelnih stanica, u njima se događaju promjene staničnog ciklusa, metaboličke aktivnosti te njenog sekretornog statusa, a sve ove promjene, temeljem recentne literature, objedinjene su pod nazivom parcijalna epitelno-mezenhimalna tranzicija (pEMT) (36). Aktivirane epitelnih stanice pokreću mehanizam svog oporavka, koji uključuje pokretanje procesa programirane stanične smrti (apoptoze) ili regulirane nekroze (tzv. nekroptoze), a u kojima sudjeluju stanice nespecifičnog imunološkog odgovora, posebno makrofagi (37-39). U slučaju ponavljajuće ozljede, proupalni signalni putevi uključeni u proces nekroptoze bivaju preusmjereni u profibrogene. U ovom procesu sudjeluju i tzv. molekulske strukture nastale oštećenjem (DAMP, engl. *Damage associated molecular patterns*), koje su dio sustava nespecifičnog imunološkog odgovora, a oslobađaju se iz stanice nakon ozljede kao znak upozorenja (40). DAMP potom aktiviraju dendritičke stanice i makrofage u svom okolišu, čime dodatno pojačavaju upalni odgovor i pridonose stvaranju proupalnog i profibrogenog izvanstaničnog okruženja. Ponavljajućom ili trajnom ozljedom epitelnih stanica u njima se aktivira mehanizam tzv. odgovora DNA na ozljedu (engl. *DNA-damage response*), koji uključuje prelazak stanice u ciklus G2/M staničnog mirovanja (engl. *Cell-Cycle Arrest*), što kratkoročno štiti stanicu od ozljede, ali dugotrajno mirovanje stanice

aktivira njenu daljnju promjenu u tzv. sekretorni fenotip s izraženim signalnim putevima procesa starenja (SASP, engl. *Senescence-Associated Secretory Phenotype*) (41). Epitelne stanice sa SASP fenotipom karakterizira tzv. patološki sekretom, koji uključuje proizvodnju proinflammatornih citokina poput interleukina-6 (IL-6), čimbenika nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ ), interferona gama (IFN- $\gamma$ ) te kemoatraktantnog proteina monocita-1 (MCP-1/CCL2), koji je poznati biološki biljeg bubrežne fibroze (42). Epitelna stanica SASP fenotipa luči i profibrotičke čimbenike poput TGF- $\beta$  te proteine izvanstaničnog matriksa, koji posreduju u međustaničnoj komunikaciji tijekom razvoja fibroze, poput čimbenika stanične komunikacijske mreže 2 (CCN2; engl. *Cellular Communication Network Factor 2*), prethodno poznatog pod imenom čimbenik rasta vezivnog tkiva (CTGF, engl. *Connective Tissue Growth Factor*). Utvrđeno je da se CCN2/CTGF može nakon izlučivanja ponovo vezati na epitelnu stanicu putem receptora za epidermalni čimbenik rasta (EGFR, engl. *Epidermal Growth Factor Receptor*), što ukazuje na ulogu sustava pozitivne povratne sprege između čimbenika ECM-a i epitelne stanice tubula (Slika 1.) (43). SASP fenotip u humanim stanicama povezan je i sa stvaranjem inflammasoma, koji se javlja kao potreba stanice za rješavanjem nakupljenih, nerazgradivih tvari u vlastitim lizosomima. Proces se odvija putem aktivacije receptora sličnih oligomerizacijskoj domeni, koja veže nukleotide s pirinskom domenom 3 (NLRP3, engl. *NLR family pyrin domain containing 3*), čime se potiče formiranje inflammasoma daljnjom aktivacijom kaspaze 1 uz istovremeno postupno otpuštanje citokina IL-1 $\alpha$ , -1 $\beta$  i IL-18. Formiranje inflammasoma utvrđeno je i u epitelnim stanicama tubula, koje su poprimile SASP fenotip (19).

Epitelne stanice proksimalnih tubula bubrega pripadaju skupini stanica visokog stupnja metaboličke aktivnosti jer sudjeluju u aktivnom transportu velikog broja molekula (44). Stoga akumuliraju veliku količinu energije u obliku adenozin trifosfata (ATP), koju dobivaju većinom oksidacijom slobodnih masnih kiselina (FAO, engl. *fatty acid oxidation*). Kao posljedica ozljede poremećen je proces FAO s posljedičnim nakupljanjem masnih kiselina, što dovodi do promjene oblika stanice i ujedno manjka energije, potrebne za metaboličke procese. Ovakav poremećaj događa se i tijekom fibrogeneze (45). Analizom ekspresije signalnih puteva u KBB nađen je značajno snižen izražaj metaboličkih puteva, vezanih uz proizvodnju energije u mitohondrijima (46). Genetskim istraživanjima utvrđena je povezanost delecije gena za metaboličke procese u epitelnim stanicama proksimalnih tubula s razvojem bubrežne fibroze i gubitkom bubrežne funkcije (47).

Osim navedenih procesa, istražuju se i epigenetske promjene epitelnih stanica povezane s fibrozom. Epigenetska promjena ekspresije pojedinih gena može rezultirati pojačanom proizvodnjom proupalnih i profibrotičkih molekula ili aktivacijom njihovih signalnih puteva tijekom fibrogeneze (48). Na epigenetske promjene mogu utjecati čimbenici unutar stanice, ali i izvanstaničnog prostora. Nakon transplantacije, stanice donorskog bubrega dolaze u dodir s okolišem primatelja što značajno utječe na epigenetske promjene, koje su povezane s razvojem fibroze grafta (49). Epigenetske promjene uključuju metilaciju DNA, modifikacije histona, ali su najdinamičnije promjene vidljive u stvaranju pojedinih mikro ribonukleinskih kiselina (miRNA; engl. *micro Ribonucleic Acid*). MiRNA moduliraju ekspresiju gena vežući se za ciljanu prijemničku RNA čime moduliraju njene daljnje učinke. Promjene u sintezi ili regulaciji miRNA povezane su s kritičnim točkama u procesu aktivacije, ali i supresije fibrogeneze (50). Pojedine miRNA utječu na transkripciju gena za čimbenike stanične adhezije poput E-kadherina kao i represore njihove transkripcije ZEB1 i ZEB2 (engl. *Zinc finger E-box-binding homeobox 1 and 2*). Pojačana ekspresija miRNA-21 utvrđena je u mišjem modelu fibroze transplantiranog bubrega, a njenom inhibicijom postiže se regresija fibroze. Također, na staničnom modelu utvrđeno je da se komunikacija između makrofaga i miofibroblasta djelomično ostvaruje izvanstaničnim vezikulama, koje prenose miRNA-21. Internalizacija ovih endovezikula u miofibroblaste odvija se putem receptora signalnog puta usjeka 2 (NOTCH2, engl. *Notch Receptor 2*), a rezultira proupalnim i profibrotičkim učincima (51). Potpuno novo područje istraživanja bavi se ulogom dugih-nekodirajućih RNA (*lncRNA, long-noncoding Ribonucleic Acid*), koje su u istraživanjima pokazale povezanost s fibrogenozom (49).

### 1.2.2. Signalni putevi u bubrežnoj fibrozi

Signalne puteve u fibrogenezi možemo načelno podijeliti na profibrogene i proupalne, iako neki od njih mogu ostvarivati istovremeno ili alternativno oba učinka. Također, pojedini putevi međusobno se isprepliću u određenom dijelu signalnog slijeda.

#### 1.2.2.1. TGF- $\beta$ /SMAD signalni put

Najpoznatiji i temeljni profibrogeni signalni put u bubrežnoj fibrozi posredovan je čimbenikom rasta TGF- $\beta$ 1 (22). Njegova pojačana ekspresija dokazana je u razvoju kroničnog stadija većine bubrežnih bolesti. Sintetizira se u obliku prekursora, od kojeg se posttranslacijskom modifikacijom oslobađa peptid povezan s latencijom (LAP, engl. *Latency Associated Peptide*),

koji se veže na zreli TGF- $\beta$  homodimer te se potom zajednički vežu na protein koji veže latentni TGF $\beta$  (LTBP, engl. *Latent TGF- $\beta$  Binding Protein*) i s njim formiraju neaktivni kompleks TGF- $\beta$ /LAP/LTBP. Ovaj kompleks nalazi se u izvanstaničnom matriksu, a aktivaciju TGF- $\beta$  posreduju matriks metaloproteinaza-2 i -9, trombospondin i plazmin, oslobađajući ga iz kompleksa. TGF- $\beta$  ostvaruje učinak vezanjem na membranski receptor za transformirajući čimbenik rasta beta 1 (TGFR1), koji potom aktivira TGFR2, a daljnji signalni slijed prenosi se putem SMAD (engl. *Small mothers against decapentaplegic*) transkripcijskih čimbenika. SMAD2 i SMAD3 aktiviraju se fosforilacijom, vežu s citoplazmatskim SMAD4 te se prenose u jezgru. SMAD3 na DNA stimulira prepisivanje gena za profibrogene čimbenike: proteine izvanstaničnog matriksa (kolagen tipa 1,  $\alpha$ -aktin glatkih mišićnih stanica), tkivne inhibitore matriks metaloproteinaza (TIMP, engl. *Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases*), ali stimulira i prepisivanje profibrotičke miRNA i lncRNA. Proces aktivacije SMAD transkripcijskih čimbenika kontroliran je čimbenikom SMAD7, koji je negativni regulator ovog slijeda. Preko SMAD4 djeluju i koštani morfogenetski proteini (BMP, engl. *Bone morphogenetic proteins*). TGF $\beta$ /SMAD komunicira s drugim signalnim putevima uključujući: mitogenom-aktiviranom proteinskom kinazom (MAPK), WNT/ $\beta$ -kateninskim putem, EGFR-om, veznim mjestom rapamicina u sisavaca (mTOR, engl. *Mammalian Target of Rapamycin*) i putem čimbenika p53. EGFR također je prisutan na epitelnoj stanici tubula i vezanjem epidermalnog čimbenika rasta ili TGF- $\alpha$  dolazi do aktivacije kinaze regulirane izvanstaničnim signalom (ERK, engl. *Extracellular signal-Regulated Kinase*) i provodnika signala i aktivatora transkripcije 3 (STAT3, engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*). STAT-3 između ostalog posreduje i promjenu staničnog ciklusa u G2/M- fazu staničnog mirovanja, kao dio procesa parcijalne epitelno-mezenhimalne tranzicije (22).

#### 1.2.2.2. Mitogenom-aktivirane proteinske kinaze

Mitogenom-aktivirane proteinske kinaze, u koje ubrajamo p38MAPK, c-Jun terminalnu kinazu (JNK, engl. *c-Jun N-terminal kinase*) i ERK, mogu biti aktivirane različitim čimbenicima rasta, citokinima i ligandima nespecifičnog imunološkog odgovora. Signalizacija putem JNK aktivira jun i fos transkripcijske čimbenike, koji potiču transkripciju gena za aktivatorski protein-1 (engl. *Activator protein-1*), čija daljnja signalizacija pospješuje profibrotički učinak TGF $\beta$ -1. Ovaj signalni put posreduje i prepisivanje gena za citokine i kemoatraktante leukocita u epitelnoj stanici tubula (52). Primjer posredovanja ove signalizacije u bubrežnoj fibrozi je vezanje angiotenzina 2 na stanice glomerularnog mezangija, koji putem MAPK potiče prepisivanje gena za trombospondin-1, odgovornog za aktivaciju LTGF $\beta$  (53). Mitogenom-

aktivirane proteinske kinaze mogu fosforilirati i SMAD na poticaj TGF $\beta$ 1, čime pospješuju njegov profibrogeni učinak.

#### 1.2.2.3. WNT/ $\beta$ -katenin signalni put

WNT signalni put značajan je u razvoju bubrega. U KBB povećava se aktivnost brojnih molekula, koje imaju sposobnost vezanja za *frizzled* stanični receptor WNT puta, koji se nalazi na epitelnim stanicama tubula, pericitima i fibroblastima, što rezultira njihovim pojačanim izražajem  $\beta$ -katenina. Istraživanja pokazuju da je u fibrogenezi aktivacija ovog puta značajna i rezultira sekrecijom molekula, koje u daljnjem tijeku aktiviraju miofibroblaste u procesu pEMT-e (54). Posebno je zanimljivo da aktivacija ovog signalnog puta u epitelnim stanicama potiče isključivo profibrogene, a ne i proupalne signalne puteve (55). Pokušaj blokade jednog segmenta WNT signalnog puta u eksperimentalnom modelu, primjerice delecijom *Wnt4* u miofibroblastima, rezultira usporavanjem napredovanja bubrežne fibroze. Ipak, neovisno o tom učinku ekspresija  $\beta$ -katenina ostaje povišena, što upućuje na istovremenu uključenost različitih signalnih kaskada istog puta (15).

#### 1.2.2.4. HEDGEHOG signalni put

Poput WNT-a, Hedgehog signalni put (Hh) također je značajan u razvoju bubrega, da bi potom u zdravim stanicama bubrega bio inaktivan. Tijekom fibrogeneze zamijećena je njegova pojačana aktivacija u epitelnim stanicama tubula, a posreduje i komunikaciju između epitelnih i mezenhimalnih stanica intersticija (56). Vezanjem liganda za Hh receptor dolazi do aktivacije transkripcijskog čimbenika *Gli1* te posljedičnog prepisivanja *Gli1* gena. Upravo je putem pojačanog izražaja *Gli1* gena u pericitima, perivaskularnim fibroblastima i matičnim stromalnim stanicama utvrđeno njihovo zajedničko podrijetlo, a pojačani izražaj ovog gena prati se i tijekom njihove transformacije u miofibroblaste (57). Značajnu ulogu Hh puta u bubrežnoj fibrozi potvrđuju eksperimentalni radovi delecije transkripcijskog čimbenika *Gli2*, prekursora aktivacije *Gli1*, u pericitima i perivaskularnim fibroblastima, čime se fibrogeneza prekida (58). Hh signalni put značajan je i za nastanak vaskularnih kalcifikacija velikih krvnih žila u bubregu, ali i u drugim organima. Općenito napredovanjem KBB dolazi do nastanka vaskularnih kalcifikacija. Pod utjecajem uremije, hiperfosfatemije i hiperlipidemije aktivira se Hh signalni put u perivaskularnim stanicama adventicije većih krvnih žila, potiče njihova migracija kroz endotel u lumen, gdje sudjeluju u procesu formiranja kalcifikacija (59).

#### 1.2.2.5. NOTCH/Delta signalni put

NOTCH/Delta također je značajan u razvoju bubrega i određuje sudbinu stanica u procesu diferencijacije. Signalni slijed provodi se između efektorske stanice, koja na svojoj površini ima Delta ili Jagged (Jag) ligand i NOTCH receptora (NOTCH 1-4) na stanici, koja prima signal, a nalazi se u neposrednoj blizini efektorske stanice. NOTCH je transmembranski receptor, koji se konformacijski mijenja vezanjem liganda te se unutrašnji dio receptora odvaja, prelazi u jezgru i potiče prepisivanje NOTCH gena. Kontrola aktivacije ovog puta vrlo je kompleksna i uključuje velik broj poznatih i još nepoznatih mehanizama (60). Aktivnost NOTCH signalnog puta dokazana je u KBB u ljudi i na životinjskom modelu. Smatra se da aktivacija putem NOTCH receptora u epitelnoj stanici tubula dovodi do prepisivanja Twist i Snail transkripcijskih čimbenika, posebno Snail1, koji onda parakrinim putem aktiviraju intersticijske mezenhimalne stanice ili direktno miofibroblaste. I ovaj signalni put smatra se dijelom pEMT-e (61).

#### 1.2.2.6 JAK/STAT signalizacija

Signalizacija Janus kinazama (JAK) posredovana je STAT-om u citoplazmi stanice koji nakon dimerizacije ulazi u jezgru i potiče prepisivanje ciljnih gena. JAK obitelj sadrži 4 različite kinaze: JAK 1-3 te tirozin kinazu 2 (TYK2, engl. *Tyrosine Kinase 2*) koje djeluju putem šest različitih citoplazmatskih prijenosnika STAT-a, a odgovorne su za razvoj i sazrijevanje imunološkog sustava, hematopoeze, ali i bubrežnih bolesti poput dijabetičke bolesti bubrega i autosomno dominantne policistične bolesti bubrega (62). JAK su prisutne na epitelnim stanicama tubula, mezangijskim stanicama i podocitima. Ligandi JAK-a uglavnom su citokini ili čimbenici rasta, čija je ekspresija, kao i ekspresija samih JAK-a pojačana tijekom fibrogeneze (63). Međutim, istraživanja u tom području nisu jednoznačna i pokazuju da se inhibicijom STAT3 signalizacije fibrogeneza može i usporiti i da se JAK-STAT signalizacijom može spriječiti razvoj bubrežne fibroze na mišjem modelu opstruktivne uropatije, unilateralnom opstrukcijom uretera (UUO) (64,65).

#### 1.2.2.7. TWEAK/Fn14 signalni slijed

Slabi induktor apoptoze sličan čimbeniku nekroze tumora (TWEAK, engl. *TNF-like Weak Inducer of Apoptosis*) pripada obitelji čimbenika nekroze tumora (*TNF*, engl. *Tumor Necrosis Factor*). Veže se za Fn14, receptor iz skupine receptora za čimbenike nekroze tumora (TNFR, engl. *Tumor Necrosis Factor Receptor*) putem kojeg ostvaruje daljnji komunikacijski signal s unutarstaničnim čimbenikom povezanim s receptorom za čimbenik nekroze tumora alfa (TRAF, engl. *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Receptor Associated Factor*).



Ovaj signalni slijed u konačnici dovodi do prepisivanja gena koji, ovisno o vrsti stanice, mogu rezultirati proliferacijom, upalom ili staničnom smrću. TWEAK može aktivirati i čimbenik NF- $\kappa$ B netipičnim slijedom. TWEAK je izražen u epitelnim, mezangijskim stanicama i podocitima. U proupalnom miljeu TWEAK može u epitelnoj stanici pospješiti apoptozu. Zajedno s čimbenikom nekroze tumora-alfa (TNF- $\alpha$ ) i interferonom gama (IFN $\gamma$ ) sudjeluje u procesu nekroptoze. TWEAK u fibroblastima potiče prepisivanje i izlučivanje upalnih citokina (66). In vitro aktivira pretvorbu pericita u miofibroblaste te je odgovoran za njihovu proizvodnju citokina (67). Izražaj TWEAK-a u mišjem modelu povezan je s razvojem upale i fibroze, a njegovom inhibicijom proces se zaustavlja (66).

#### 1.2.2.8. Signalizacija izvanstaničnim vezikulama

Zadnjih godina otkriveno je da stanice mogu komunicirati i putem direktnog međusobnog prijenosa unutarstaničnih molekula izvanstaničnim vezikulama (EV, engl. *Extracellular Vesicles*), najčešće njihovom podvrstom, egzosomima. Egzosomi mogu prenositi različite stanične proteine, miRNA, lncRNA, mRNA i lipide (68). Utvrđeno je da EV mogu prelaziti iz sistemske cirkulacije u endotelne stanice kapilara te epitelne stanice tubula bubrega. Zanimljivo je da se egzosomi matičnih stanica, koji prenose specifičnu miR-146a-5p, mogu iz urina transportirati u oštećenu tubularnu stanicu bubrega, gdje se potiče prepisivanje gena za kinazu-1 povezanu s receptorom za interleukin-1 (IRAK1, engl. *Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 1*), što posljedično smanjuje oksidativni stres i upalu (69). Egzosomi, koji sadrže pojedine vrste miRNA, prenose se iz oštećene epitelne stanice u fibroblaste kao jedan od oblika komunikacije obuhvaćen u procesu pEMT (70).

#### 1.2.2.9. HIPPO signalni put

Hippo ili Salvador-Warts-Hippo (SWH), imenovan prema ključnoj kinazi ovog signalnog puta (Hippo kinaza), otkrivenog u vinske mušice, regulira rast i staničnu prilagodbu tijekom razvoja organa u životinja. Specifično ime nastalo je iz činjenice da blokiranje ovog puta dovodi do nekontroliranog rasta i fenotipske sličnosti s nilskim konjem (engl. *hippopotamus*). Učinak se u ljudi ostvaruje putem aktivacije nekoliko ključnih kinaza, Ste20-slične kinaze (MST1/MST2, engl. *Ste-20-Like Kinase 1/2*) te supresorske kinaze velikih tumora (LATS1/LATS2, engl. *Large Tumor Suppressor Kinase 1/2*), koje posljedično fosforiliraju ko-transkripcijske čimbenike YAP (engl. *Yes-Activated Protein*) i transkripcijski koaktivator s PDZ-veznim motivom (TAZ, engl. *Transcriptional coactivator with PDZ binding motif*), čime ih zadržavaju u citoplazmi, pospješujući njihovu razgradnju i onemogućavaju njihov transkripcijski

potencijal u jezgri. YAP i TAZ utječu na prepisivanje gena vezanih uz modulaciju staničnog ciklusa, potencijala stanične prilagodbe u organima te modulacije izvanstaničnog matriksa i potencijala stanične pokretljivosti (71). Hippo signalni put nema svoje specifične receptore, već odgovara na promjenu mehanicističkih odnosa među stanicama kao i promjenu odnosa između stanica i izvanstaničnog matriksa. Ovaj poticaj takozvanom mehanoregulacijom potvrđen je i u bubrežnoj fibrogenezi. Aktivira se promjenama proteinskih kompleksa odgovornih za međustaničnu komunikaciju, ali i direktnom komunikacijom s ECM-om, najčešće putem integrina. Ovakva aktivacija vjerojatno dovodi do otvaranja pora na jezgrinoj membrani, čime se povećava utok YAP-a i TAZ-a u jezgru i aktivira transkripcija. Hippo ima i višestruke interakcije s drugim signalnim putevima, poput Wnt i MAPK puteva. YAP/TAZ čimbenici smatraju se značajnim u regenerativnoj medicini i najviše se istražuju u području regeneracije srčanog mišićnog tkiva (72). Povezanost s bubrežnom fibrozom opisana je u literaturi, a valja izdvojiti zanimljivo istraživanje Xu i suradnika u kojem je delecijom gena za MST1/MST2 u epitelnoj stanici tubula postignuta hiperaktivacija transkripcije putem YAP/TAZ čimbenika, koja je potom bila povezana s pojačanim izražajem fibroze. Delecijom YAP ili TAZ signalnih molekula fibrotički fenotip stanice povlači se, što rezultira smanjenim izražajem fibroze (73). Postoji značajna razlika među spolovima, vezana uz utjecaj ovog puta na nastanak bubrežne fibroze, koja je vjerojatno povezana i s ko-aktivacijom ovih transkripcijskih čimbenika putem EGFR-a, za kojeg je poznato da se različito aktiviraju u žena i muškaraca (74). Zanimljivo je da se učinak na polarizaciju makrofaga u procesu nastanka bubrežne fibroze, a koji je posredovan signalizacijom WNT puta (WNT5a), ostvaruje također putem YAP-TAZ čimbenika, što ukazuje na međusobnu komunikaciju ovih puteva u segmentu aktivacije čimbenika nespecifičnog imunološkog sustava (75).

### 1.2.3. Uloga pericita i endotelno-pericitne komunikacije u patogenezi bubrežne fibroze

Tijekom fibrogeneze događaju se strukturalne i funkcionalne promjene peritubularnih kapilara, koje se očituju povećanjem broja vakuola u endotelnim stanicama, fokalnim proširenjima subendotelnog prostora, a kasnije i zadebljanjem bazalne membrane. U konačnici se broj kapilara u intersticiju znatno smanjuje (engl. *capillary rarefaction*), što dovodi do posljedične ishemije i pogoršanja funkcije okolnih tubula (76). Teorija „kronične hipoksije tubulointersticija“ kao glavnoga generatora bubrežne fibroze u KBB postoji unazad 20-ak godina, ali je recentnim istraživanjima, posebice spoznajama o funkciji hipoksijom induciranog čimbenika 1 alfa (HIF-1 $\alpha$ , engl. *Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$* ) dodatno potvrđen njen značaj.

Značajnu ulogu u tom procesu imaju periciti (Gli1+ mezenhimalne stanice) koji se u ranoj fazi fibrogeneze odvajaju od stijenke peritubularnih kapilara i postaju miofibroblasti (57). Dokaz da periciti na ovaj način sudjeluju u inicijalizaciji fibrogeneze potvrđen je istraživanjem na mišjem modelu koje je pokazalo da je ablacija pericita u zdravih miševa sama po sebi dovoljna za pokretanje procesa, te posljedično zbog hipoksije dovodi do ozljede epitelnih stanica tubula (77). Poznato je da postoji komunikacija između endotelnih stanica peritubularnih kapilara i okolnih pericita. U ranoj fazi stanice pojačavaju komunikaciju koja posljedično dovodi do odvajanja i transformacije pericita. Ova komunikacija ostvaruje se čimbenikom rasta podrijetlom iz trombocita (PDGF $\beta$ , engl. *Platelet-Derived Growth Factor* $\beta$ ) kojeg luče endotelne stanice, a putem vezanja na istovjetni receptor na pericitima (PDGFR $\beta$ , engl. *Platelet-Derived Growth Factor Receptor*- $\beta$ ) (78). Blokadom receptora za čimbenik rasta vaskularnog endotela (VEGFR) na endotelnoj stanici blokira se i početni komunikacijski signal, što ukazuje na primarnu ulogu endotelnih stanica u ovom procesu (79).

Zanimljivo istraživanje Schrimpf C i suradnika, koji su analizirali ekspresiju gena u pericitima tijekom ranog perioda nakon stanične ozljede, pokazalo je da periciti u održavanju homeostaze peritubularnih kapilara koriste i mogućnost pojačavanja ekspresije TIMP3 kao odgovora na pojačanu ekspresiju ADAMTS1 proteaze u endotelnoj stanici (80). Utvrđeno je da ekspresija molekula ADAMTS 1 i ADAMTS 2 na mišjem modelu UUO raste nakon bubrežne ozljede, što dodatno ukazuje na mogući značaj ADAMTS proteaza u početnoj fazi fibrogeneze, tijekom destabilizacije peritubularnih kapilara.

Uloga pericita u proizvodnji eritropoetina, regulirana s HIF-1 $\alpha$  problematizirana je u literaturi radi njegovog potencijalnog profibrogenog učinka (81,82). Ideja o profibrogenom učinku HIF-1 $\alpha$  potencirana je primjenom novih lijekova u liječenju anemije bubrežne bolesti koji inhibiraju učinak prolil hidroksilaze te na taj način povećavaju njegovu raspoloživost, a time i proizvodnju eritropoetina (83). Pan i suradnici su 2021. godine pokazali na mišjem modelu UUO da HIF stabilizacija u pericitima povećava dostupnost eritropoetina, ali da istovremeno ne utječe na fibrogenezu (84).

Može se zaključiti da je uloga pericita u održavanju homeostaze bubrežnog intersticija od velike važnosti, a gubitak ili promjena funkcije pericita može voditi u KBB.

#### 1.2.4. Uloga i podrijetlo miofibroblasta u bubrežnoj fibrogenezi

Istraživanja genetskog markiranja staničnih linija pokazala su da miofibroblasti u bubrežnoj fibrozi potiču od samoobnavljajućih FOXD1<sup>+</sup> progenitorskih stanica, važnih u razvoju epitelnih, endotelnih, ali i mezenhimalnih stanica bubrega (85,86). Temeljem praćenja podrijetla stanica postavljeno je načelo da tri različite vrste rezidualnih mezenhimalnih stanica, periciti, multipotentne mezenhimalne stromalne stanice i tzv. rezidualni fibroblasti, u procesu fibrogeneze fenotipski „postaju“ miofibroblastima (35). Periciti, kako je ranije opisano, priliježu uz bazalnu membranu endotelnih stanica peritubularnih kapilara i s njima komuniciraju. Multipotentne mezenhimalne stromalne stanice također se nalaze uz peritubularne kapilare na mjestima njihova grananja i čine oko 5-10% stanica intersticija u odraslog čovjeka. Populacija multipotentnih mezenhimalnih stromalnih stanica povećava se tijekom fibrogeneze i one u konačnici čine oko 60% populacije miofibroblasta. Preostalih 40% pripada pretvorbi iz pericita i rezidentnih fibroblasta (28). Određeni broj istraživanja upućuje da stanice preteče miofibroblasta mogu poticati i iz koštane srži, što se odnosi na multipotentne mezenhimalne stromalne stanice i populaciju kolagen-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> fibrocita koji poput monocita dolaze u bubrežni tkivo tijekom upale (87). Dodatno je istražena i uloga tranzicije makrofaga u miofibroblaste u proupalnom okolišu, za koju je utvrđeno da doprinosi intersticijskoj fibrozi u nativnim, ali transplantiranim bubrezima (88, 89). Ipak, unatoč prijedlozima o dominantnom podrijetlu miofibroblasta, ključni radovi pokazali su da se gubitkom funkcije ili ablacijom rezidualnih mezenhimalnih stanica usporava ili potpuno onemogućava proces fibrogeneze (57).

Najnovija istraživanja metodom sekvencioniranja RNA pojedinačnih stanica utvrdila su da većina stanica u fibrotičnom bubregu, koje pojačano izražavaju gen za kolagen 1 (COL1A1<sup>+</sup>), imaju izražen i PDGFR $\beta$  (PDGFR $\beta$ <sup>+</sup>), tipični biljeg rezidentnih mezenhimalnih stanica i miofibroblasta (90). Također utvrđeno je da je populacija PDGFR $\beta$ <sup>+</sup> rezidentnih mezenhimalnih stanica, iz koje nastaju miofibroblasti, zaista genetski raznolika te da obuhvaća pericite (NOTCH3<sup>+</sup> /RGS5<sup>+</sup> /PDGFR $\alpha$ <sup>-</sup>) i dvije različite vrste fibroblasta (Meg3<sup>+</sup>/PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> i COLEC11<sup>+</sup> /CXCL12<sup>+</sup>), a da oni u tijeku transformacije mijenjaju gensku ekspresiju ključnih biljega fibroze. U fazi razvijene bubrežne fibroze većina stanica, koje proizvode komponentne ECM-a (COL1A1<sup>+</sup>), ima izražen i PDGFR $\alpha$  i  $\beta$  te Postn (PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> PDGFR $\beta$ <sup>+</sup>POSTN<sup>+</sup>) čime se smatra da je po prvi put definiran kompletni transkripcijski biljeg miofibroblasta (90). Također, u mišjem modelu bubrežne fibroze, a i humanom bubrežnom tkivu s razvijenom tubulointersticijskom fibrozom većina PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>/PDGFR $\beta$ <sup>+</sup>/POSTN<sup>+</sup> MFB izražava i inhibitor signalnog puta WNT 2 (NKD2). Iako se radi o inhibitoru WNT signalnog puta, u fibrogenezi

bubrega pokazao se kao aktivator jednog dijela WNT puta i time kao moguća ciljna molekula za antifibrotičku terapiju.

Miofibroblast je ključna stanica fibrogeneze koja, osim proizvodnje ključnih proteina ECM-a, luči upalne kemokine i citokine, uključujući i kemotaktičke čimbenike leukocita (28,91). Navedene molekule, uključujući i određene komponente ECM-a, povratno ponovo djeluju na same miofibroblaste i podržavaju njihov aktivni status. Time se proces perpetuira. (Slika 1.). Njihovu aktivaciju podržavaju i DAMP molekule koje se na miofibroblaste vežu putem receptora sličnih Toll receptoru *Drosophila* vrste (TLR, engl. *Toll-Like-Receptor*). DAMP putem TLR-a istovremeno stimulira i preteče miofibroblasta, pericite i fibroblaste (92).

#### 1.2.5. Uloga nespecifičnog imunološkog odgovora u bubrežnoj fibrogenezi

Nespecifični imunološki odgovor sudjeluje u inicijaciji, ali i daljnjem razvoju fibrogeneze. Uključen je u patogenezu većine primarnih bolesti glomerula kao i oštećenja transplantiranog bubrega (93). Stanice i medijatori upale nespecifičnog imunološkog sustava prepoznate su zadnjih godina kao ključni čimbenici u patogenezi kronične bolesti bubrega (94). Neutrofili, dendritičke i NK stanice sudjeluju u ranijim fazama bubrežnih bolesti, dok su makrofagi značajni tijekom cijelog procesa bubrežnog oštećenja, uključujući prijelaz iz akutnog u kronično bubrežno zatajenje (95). Makrofagi se u procesu nastanka bubrežne bolesti mogu regrutirati iz koštane srži, no poznato je da su u tkivu bubrega od fetalne dobi prisutni rezidentni makrofagi. Recentno je analizom genske ekspresije u bubrežnim tkivima zdravih fetalnih i odraslih bubrega čovjeka definirana prisutnost i raspodjela imunoloških stanica, čime je potvrđeno da rezidentni makrofagi naseljavaju bubrežno tkivo još tijekom prenatalnog razdoblja (96). U procesu prijelaza akutnog u kronično oštećenje bubrega značajne su tzv. fenotipske promjene makrofaga u kojima oni na poticaj čimbenika okoliša mijenjaju svoju funkciju i sekretorni potencijal, što se manifestira i promjenom biljega na njihovoj staničnoj membrani, a time i potencijalnih molekula koje ih mogu aktivirati. Naglašavaju se dvije krajnosti ili tzv. polarizacija makrofaga u kojoj oni, nakon početne ozljede tkiva, poprimaju proinflamatorni fenotipski obrazac M1, luče proupalne citokine te privlače nove monocite iz krvi u upalno područje, a potom dominira M2 anti-upalni obrazac, načelno zadužen za smirivanje upale i regeneraciju tkiva (97).

U okviru M2 obrasca postoji i dodatna podjela na M2a, M2b i M2c, pri čemu je značajno napomenuti da M2c makrofage može stimulirati TGF- $\beta$ , IL-10, ali i glukokortikoidi koji

istovremeno utječu i na remodeliranje ECM-a. Nije do kraja definirano djeluju li M2c makrofagi pod utjecajem MMP-a pro- ili antifibrogeno (98). Najznačajniji poticaj za polarizaciju makrofaga u smjeru M1 ostvaruje se DAMP molekulama, izlučenim iz epitelnih stanica tubula nakon ozljede. One se na makrofage vežu putem TLR receptora, kako je već opisano u 1.2.1. Protrahirana ili ponavljajuća ozljeda zadržava makrofage u M1 fenotipu, čime se podržava kronična upala i onemogućava proces regeneracije. Zaključno, obje fenotipske krajnosti (M1 i M2) značajne su u patogenezi KBB (99).

U novim istraživanjima propituju se i mogućnosti djelovanja na metaboličke procese imunoloških stanica, uključenih u bubrežne bolesti, što uključuje i fibrogenozu (100).

### 1.3. Uloga i regulacija izvanstaničnog matriksa u fibrozi bubrega

Sve prethodno navedene molekularne promjene na razini bubrežnih stanica u konačnici dovode do prekomjerne proizvodnje sastavnica ECM-a, što je glavno morfološko obilježje bubrežne fibroze. Povijesno se smatralo da se radi isključivo o pasivnom procesu odlaganja sastavnica ECM-a, dok je danas poznato da su sastavnice ECM-a i aktivno uključene u procese međustanične signalizacije te i samoregulaciju vlastite proizvodnje i funkcije (30). Značajnu ulogu imaju i tkivne proteinaze ECM-a koje trajno reguliraju njegovu pregradnju na različite načine (101).

ECM se tijekom života, a posebice razdoblja razvoja organa, trajno pregrađuje pod utjecajem raznolikih čimbenika rasta i citokina. Slično se događa u ranoj fazi fibrogenoze kada se nakon primarne, etiološki različite ozljede tkiva ECM aktivira, strukturno mijenja, omogućava ulazak upalnih stanica, a sve u cilju pokušaja popravka nastale ozljede. Ovakav aktivni, promjenjivi oblik ECM-a naziva se „privremeni matriks“ (102). Trajna ili ponavljajuća ozljeda usmjerava promjenu „privremenog matriksa“ u tipični kolagenom bogati matriks koji je glavno obilježje uznapredovale fibroze svih organa, uključujući i bubreg.

### 1.4. Proteini izvanstaničnog matriksa i njihova raspodjela u bubrežnim odjeljcima

Anatomski gledano, ECM se u kori bubrega nalazi u području glomerularnog mezangija (glomerularni ECM) i tubulointersticija, ali je i sastavni dio stijenke i okolnog prostora velikih bubrežnih krvnih žila. Medularni intersticij je u fiziološkom smislu zastupljeniji od kortikalnog, ali je nedovoljno istražen u bubrežnoj fibrozi, kao i područje bubrežnog hilusa, čašica i bubrežne kapsule. U fiziološkim uvjetima pojedini proteini ECM-a različito su zastupljeni u

glomerulima i intersticiju. Tijekom patološkog procesa i ranog perioda fibrogeneze izražaj pojedinih proteina mijenja se, što ih tada čini potencijalnim biološkim biljezima bubrežne fibroze (103).

U glomerularnom području značajno je razlikovati proteine ECM-a glomerularne bazalne membrane i glomerularnog mezangija. Najznačajniji proteini, povezani prognostički s bolestima glomerula i fibrozom u području glomerularne bazalne membrane su: laminin, kolagen tip IV, transmembranski kolagen tip XVII, nidogeni i heparan sulfat proteoglikani. Od heparan sulfat proteoglikana u ovom su području prisutni agrin i perlekan. U području ECM-a glomerularnog mezangija, koji komunicira s izvan glomerularnim prostorom u području vaskularnog pola, u fiziološkim uvjetima uglavnom se nalaze: fibronektin, kolagen tip IV i V, laminin A, B1 i B2, hondroitin sulfat i heparan sulfat proteoglikani, od kojih su u ovom području zastupljeni: perlekan, kolagen tip XVIII i bamakan. Mali proteoglikani (dekorin, biglikan, fibromodulin i lumikan), koji se inače u fiziološkim uvjetima nalaze isključivo u području tubulointersticija, mogu biti pojačano izraženi i u ovom području u bolestima glomerula (dekorin i biglikan u IgA nefropatiji) (104).

U području bubrežnog intersticija ECM sadrži kolagen tipa I, III, V, VI, VII i XV, sulfatne i ne-sulfatne glikozaminoglikane, glikoproteine i polisaharide. Izražaj pojedinih komponenti mijenja se tijekom fibrogeneze. Općenito, u razvijenoj fibrozi dominantno se nakupljaju kolagen tipa 1 i 3. Glikoproteini, fibronektin i trombospondin-1 (TSP-1) uključeni su u organizaciju ECM-a u fiziološkim uvjetima, ali i pojačano izraženi s napredovanjem KBB. TSP-1 mogući je medijator rane faze fibroze putem aktivacije TGF- $\beta$  (105).

Proteoglikane tubulointersticija možemo podijeliti na male, leucinom-bogate proteoglikane (SLRP, engl. *small leucine rich glycoproteins*): dekorin, biglikan, lumikan i fibromodulin te velike: hijaluronan i verzikan. Osim uloge hidracije i mehaničke stabilizacije ECM-a, proteoglikani vežu i čimbenike rasta te su izvor profibrotičkih čimbenika rasta poput LTGF $\beta$  ili čimbenika rasta fibroblasta 2 (FGF2). Pojačani izražaj biglikana i dekorina u KBB potvrđen je u eksperimentalnim modelima, ali i bubrežima s KBB u ljudi. Dekorin, za razliku od biglikana, ima antifibrotički potencijal (106).

Hijaluronan i verzikan glavne su komponente „privremenog matriksa“. Ekspresija verzikana u tubulointersticijskom prostoru zdravih tkiva bubrega utvrđena je još 1996. godine (107). Hijaluronan učestalo na sebe veže susjedne molekule (hijaloadherine), a s verzikanom tvori strukture poput užeta, koje se najčešće nalaze u neposrednoj okolini stanica i utječu na njihovu

funkciju. Verzikan luče stromalne/intersticijske stanice, ali ga mogu izlučivati i upalne stanice (leukociti i makrofagi). I hijaluronan i verzikan ulaze u interakciju s upalnim stanicama te potenciraju pro- ili anti-upalne učinke. Velika molekula hijaluronana veže se na stanice ili putem CD44 receptora, kojim posreduje antiupalne učinke, ili putem TLR2 i TLR4 receptora, kojim posreduje proupalne i profibrogene učinke. Cjelovita molekula verzikana kao i njeni fragmenti, tzv. verzikini, djeluju na upalne stanice indirektno putem vezivanja s hijaluronom, ali mogu se i direktno vezati na CD44 receptor mijeloidnih stanica i TLR receptore makrofaga, što rezultira izlučivanjem proupalnih citokina (108). Verzikini nastaju razgradnjom verzikana, koje posreduju proteinaze ECM-a, uključujući i članove obitelji ADAMTS proteaza, ADAMTS-4 i ADAMTS-1 (109). Hijaluronan i verzikan imaju značajnu ulogu u transformaciji „privremenog“ u profibrotički matriks, koju ostvaruju uglavnom putem mehanoregulacijskih signalnih puteva, podržavajući na taj način trajnu stimulaciju miofibroblasta (110). U eksperimentalnim modelima na kulturi stanica pojačani izražaj verzikana poticao je transformaciju fibroblasta u miofibroblaste (111). U konačnici, pojačana ekspresija verzikana povezana je s progresijom KBB u biopsijskim uzorcima bubrežnih tkiva u ljudi (112).

### 1.5. Proteinaze izvanstaničnog matriksa

Proteinaze ili proteolitički enzimi ECM-a sudjeluju u fiziološkoj pregradnji (engl. *turnover*), modeliranju i razgradnji ECM-a. Dodatno, one mijenjaju ulogu pojedinih proteina ECM-a na način da proteolitičkim procesuiranjem aktiviraju pojedine proteine u određenom kaskadnom lancu ili pak razgradnjom proteina omogućavaju stvaranje novih aktivnih proteinskih fragmenata (113). Na taj se način proteinaze mogu smatrati i signalnim molekulama, što ih dodatno čini potencijalnim izvorom bioloških biljega fibroze. Najznačajnije proteinaze ECM-a pripadaju u veliku nadobitelj cink-metaloproteinaza, tzv. metzincina (engl. *metzincin*). Oko 200 proteinaza u sisavaca, koje pripadaju ovoj obitelji, imaju vrlo različite uloge u organizmu, ali ih strukturalno karakteriziraju dvije glavne odrednice: metioninski ostatak (Met) na aktivnom enzimskom mjestu i istovjetni slijed aminokiselina povezanih s cinkovim ionom na katalitičkom mjestu, čime se i prepoznaje njihova evolucijska povezanost (114). Metzicini mogu biti vezani uz staničnu membranu ili se nalaziti slobodno u međustaničnom prostoru. Većina metalo-proteinaza odgovornih za pregradnju ECM-a svrstana je u dvije obitelji: matriks-metaloproteinaze (M10) i astacin/adamalazine (M12). Unutar obitelji M12, astacinska podobitelj (M12A) obuhvaća BMP-1 i meprine, a adamalazinska (M12B) obuhvaća



ADAMTS. Iako su se donedavno matriks metaloproteinaze smatrale ključnima u procesima pregradnje ECM-a u procesu fibroze, danas se fokus istraživanja širi prema ADAMTS proteinazama, pa i meprinima.

### 1.5.1. Matriks metaloproteinaze (MMP)

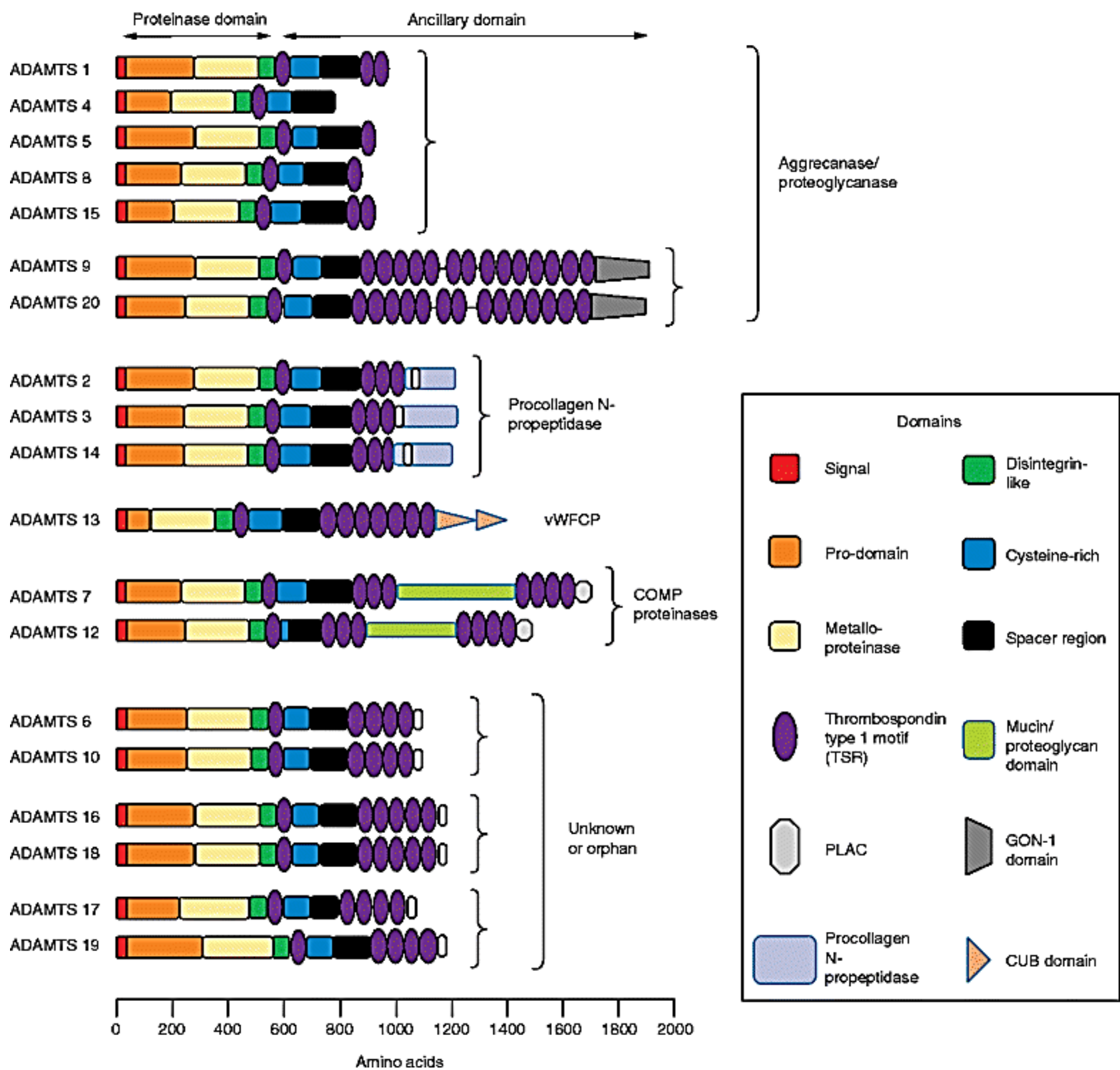
Obitelj MMP smatra se glavnim predstavnikom proteinaza ECM-a te je i najistraženija skupina u bubrežnim bolestima. MMP sudjeluju u procesuiranju proteina ECM-a (kolagena, glikoproteina, velikih proteoglikana i drugih proteina), ali i aktivaciji signalnih molekula koje se nalaze ili ulaze u ECM tijekom patološkog procesa (kemokini, čimbenici rasta). MMP sudjeluju u međustaničnoj signalizaciji te komunikaciji stanica s ECM-om. Temeljem njihove strukture razlikujemo 6 podtipova MMP-a: kolagenaze (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18), gelatinaze (MMP-2, MMP-9), stromalazine, matrilizine, MMP vezane za staničnu membranu i ostale (115). Sve MMP-e stvaraju se kao proenzimi i kasnije aktiviraju. Tkivni inhibitori metaloproteinaza (TIMP) najvažniji su inhibitori MMP-a i kontroliraju njihovu aktivnost. Glomerularne, tubularne i rezidentne intersticijske stanice luče MMP-e. Kolagenaza MMP-1, koja razgrađuje kolagen tipa 3, povezana je s eksperimentalnim modelom bubrežne fibroze u životinja, a njena razina bila je povišena u krvi bolesnika s autosomno dominantnom policističnom bolesti bubrega (ADPKD). Suprotno tome, njena koncentracija u krvi bolesnika s ESRD-om nije bila povišena (116, 117). Zanimljivo je da se u najranijoj fazi nakon bubrežne ozljede zamjećuje pojačani izražaj kolagenaza (MMP-1), a potom pojačana ekspresija gelatinaza (118). Gelatinaze nisu izražene u zdravom tkivu bubrega, ali njihova proizvodnja u procesu pEMT biva potaknuta različitim signalnim putevima (TGF $\beta$ /SMAD, MAPK, NOTCH). Dokazano je da citokini rane faze bubrežne ozljede, TNF-a i MCP-1, stimuliraju proizvodnju gelatinaza MMP-2 i -9 (119). Koncentracija MMP-9 u plazmi postupno raste u bolesnika tijekom napredovanja KBB, a čini se da istovremeni porast plazmatske koncentracije inhibitora TIMP-1 nije efikasan u supresiji MMP-9 (120). MMP-7 iz skupine matrilizina povezana je s različitim bubrežnim bolestima kao i samom BF (121). MMP-7 razgrađuje različite komponente ECM-a (fibronektin, laminin, elastin, kolagen tip 4), uključujući i velike proteoglikane poput vezikana. Pojačani izražaj MMP-7 povezan je s KBB u eksperimentalnim modelima UUO te u bolesnika s dijabetičkom nefropatijom i lupusnim nefritisom (115). MMP-7 nije prisutan u zdravom bubregu, ali je njegova ekspresija nađena u epitelnim stanicama tubula tijekom procesa parcijalne EMT tijekom koje posreduje daljnju signalizaciju WNT/kateninskim putem (122).

Njegov značaj u procesu fibrogeneze temelji se na istraživanju bubrežne fibroze na UUU modelu tijekom kojeg su miševi s ablacijom gena za MMP-7 bili zaštićeni od razvoja bubrežne fibroze (123). Iz skupine MMP-a vezanih za staničnu membranu, MMP-14 bio je pojačano izražen u bioptičkim uzorcima bolesnika s dijabetičkom nefropatijom (124). Zadnjih godina istraživanja MMP-a utvrdila su da njihova uloga u bolestima, uključujući i fibrogenezu, nije ograničena samo na puko proteolitičko djelovanje, nego da su mnogi učinci MMP-a posredovani njihovim ne-proteolitičkim djelovanjem, koje uključuje posredovanje i kontrolu međustanične signalizacije, komunikacije između stanica i ECM-a te regulaciju procesa upale i regeneracije tkiva. Primjer takvog ne-proteolitičkog djelovanja je interakcija gelatinaze MMP-2 s  $\alpha V\beta 3$  integrinom, posljedičnim pokretanjem signalnog slijeda i pojačanog lučenja čimbenika HIF-1 $\alpha$ , što u konačnici potiče proces fibrogeneze (115). Ne-proteolitički učinci gelatinaze MMP-9 također su predmet recentnih istraživanja. Ove spoznaje o ne-proteolitičkim učincima MMP-a otvorile su potrebu za detaljnim proučavanjem metaloproteinaza iz astacinsko/adamalizinske obitelji koje imaju važnost u samom procesu pregradnje i remodeliranja ECM-a (113).

### 1.5.2. Disintegrin i metaloproteinaze s motivima trombospondina (ADAMTS)

Disintegrin i metaloproteinaze s motivima trombospondina (ADAMTS) pripadaju podobitelji adamalizina (M12B) zajedno s poznatijim transmembranskim proteinima skupine Disintegrin i metaloproteinaza (ADAM). ADAMTS proteinaze su sekretorne molekule i djeluju slobodno u izvanstaničnom prostoru. Kataliziraju reakcije brojnih supstrata, čiji se broj svakodnevno povećava proteomskim istraživanjima, a odgovorne su za vrlo različite funkcije u organizmu, koje uključuju i reorganizaciju ECM-a tijekom organogeneze. S obzirom na široku rasprostranjenost njihovih supstrata u organizmu, poremećena ekspresija ADAMTS proteaza povezana je sa širokim spektrom bolesti od kojih je najviše istražena povezanost s osteoartritisom, vaskularnim bolestima, aterosklerozom i trombotičkom-trombocitopeničnom purpurom (125). Danas poznajemo 19 različitih ADAMTS proteaza, a građene su od metaloproteinazne i tzv. pomoćne domene. Ključni dio metaloproteinazne domene je katalitička jedinica koja sadrži tri histidinska ostatka raspoređena oko atoma cinka te lančani niz metionina (Met dio). Iako ispred katalitičke jedinice postoji prodomena, smatra se da njeno odvajanje nije nužno za aktivaciju ADAMTS proteaza. U sastavu metaloproteinazne domene nalazi se i disintegrinski segment (engl. *disintegrin-like*) koji je ime dobio po uzoru na srodnu

ADAM obitelj, ali ADAMTS proteinaze nemaju sposobnost vezanja za integrine te se smatra da je ovaj segment krivo imenovan. Pomoćna domena je karboksi terminalna regija koja sadrži trombospondin tip-1 motiv (TSR), domenu bogatu cisteinom i „*spacer*“ domenu. TSR je niz od 50-ak aminokiselina istovjetnih molekuli trombospondina 1. *Spacer* regija je varijabilna i može sadržavati 103-160 aminokiselina. Nakon *spacer* regije slijedi još različiti broj TSR-a te pojedini segmenti ključni za prepoznavanje ciljnog supstrata (126). ADAMTS proteinaze možemo podijeliti u 4 skupine prema funkciji, koje su odraz filogenetskog podrijetla: hijalektanaze, prokolagen peptidaze, ADAMTS-13 te ADAMTS proteinaze povezane s fibrilinom i fibronektinom. Struktura ADAMTS proteinaza prikazana je na Slici 2., prilagođenoj prema Kelwick i suradnicima (126). U hijalektanaze ubrajamo dvije skupine proteaza koje pokazuju visoki stupanj strukturalne sličnosti u području pomoćne domene, a imenovane su prema prvom otkrivenom supstratu. Prva skupina su agrekanaze (ADAMTS-1, -4, -5, -8, -15), a druga proteoglikanaze (ADAMTS-9 i -20), iako obje djeluju na mnoge proteoglikane u cijelom organizmu. Agrekanaze dobile su ime prema svom prvom otkrivenom supstratu, proteoglikanu agrekanu, ali djeluju i na brevikan, neurokan, verzikan, biglikan, relin itd. Prokolagen-N-peptidaze (ADAMTS-2, -3, -14) odgovorne su za sazrijevanje trostruke ovojnice kolagenskih fibrila. I hijalektanaze i prokolagen peptidaze procesuiraju ekstracelularni matriks tijekom organogeneze, ali i u patološkim procesima. Proteinaza ADAMTS-13 jedini je član svoje skupine, procesuira von Willebrandov čimbenik i time zaustavlja proces zgrušavanja, a njen nedostatak rezultira trombotičkim trombocitopeničnim purpustom. U četvrtu funkcionalnu skupinu pripadaju 4 strukturalno slična para: ADAMTS-7 i -12 koji procesuiraju hondroitin-sulfatne lance u hrskavici; ADAMTS-16 i -18, povezani s bolestima korneje oka; ADAMTS-6 i -10, povezani sa smetnjama provođenja u srčanom mišiću te ADAMTS-17 i -19, povezani s bolestima srčanih zalistaka. Mutacije u posljednja dva para povezane su sa sindromom Weill-Marchesani tip 1 (126).



Slika 2. Shematski prikaz obitelji ADAMTS proteinaza. Preuzeto iz Genome Biol 2015.;16:113. doi 10.1186/s13059-015-0676-3; (126)

### 1.5.2.1. Uloga ADAMTS-4 proteinaze u bolestima krvožilnog sustava

ADAMTS-4 izoliran je 1999. godine pod imenom agrekanaza-1 te kao prvi otkriveni član ADAMTS proteaza predstavlja i u građevnom smislu najmanju, osnovnu strukturalnu jedinicu ADAMTS proteaza, čija pomoćna domena završava sa „*spacer*“ regijom (127). ADAMTS-4 aktivira se u stanici odvajanjem prodomene i signalnog peptida, što rezultira stvaranjem triju mogućih formi molekule različite mase (68, 53 i 40 kDa) koje se izlučuju u ECM, što ga razlikuje od drugih ADAMTS proteaza, koje se aktiviraju u samom ECM-u (128). Tortorella i suradnici su 2000. godine pokazali da je TSR regija molekule ključna za prepoznavanje tada jedinog poznatog supstrata, agrekana (129). Uz agrekan do danas je otkriven značajan broj supstrata proteinaze ADAMTS-4 koji se nalaze na različitim mjestima u organizmu: verzikan, relin, biglikan, brevikan, matrilin -3 i hrskavični oligomerni protein (COMP). Njeni glavni inhibitori su  $\alpha$ -2 makroglobulin i TIMP-3 (130, 131). Iako je uloga ADAMTS-4 proteinaze najbolje istražena u patogenezi osteoartritisa, rasprostranjenost njegovog drugog supstrata verzikana u krvnim žilama kao i njegova uloga u patogenezi ateroskleroze potakla je i istraživanja usmjerena k ispitivanju uloge ADAMTS-4 u bolestima kardiovaskularnog sustava (109,132,133). ADAMTS-4 pojačano je izražena u aterosklerotskom plaku infiltriranom makrofagima (134).

Verzikan i njegova proteaza ADAMTS-4 imaju značajnu ulogu u formiranju, ali i posljedičnoj destabilizaciji aterosklerotskog plaka (135). U životinjskim modelima pokazano je da povećani protok krvi putem tlačnog opterećenja dovodi do pojačane fragmentacije verzikana u sklopu pregradnje ECM-a stijenke krvne žile, a u kojem sudjeluje i ADAMTS-4 proteaza (136, 137). Istovremena pojačana ekspresija verzikana i ADAMTS-4 proteinaze utvrđena je imunohistokemijskom metodom u području aterosklerotskog plaka karotidne arterije bolesnika, podvrgnutih operaciji radi značajne stenoze karotidnih arterija (138). Primjenom različitih inhibitornih molekula u procesu aterogeneze na staničnom modelu ateroskleroze postiže se između ostalog i smanjenje ekspresije molekule ADAMTS-4 u makrofagima, što potkrepljuje značaj ADAMTS-4 proteinaze u aterosklerozi (139). Također, povišena koncentracija ADAMTS-4 molekule utvrđena je u bolesnika s koronarnom bolesti srca, a njegova koncentracija dodatno je rasla u onih bolesnika koji su imali nestabilnu koronarnu bolest (140, 141). U radu Rena i suradnika nađena je povezanost razine ADAMTS-4 proteinaze u krvi bolesnika operiranih radi torakalne aneurizme, a njegov izražaj povezan je s disekcijom

aneurizmatički promijenjene žile (142). Povećanu koncentraciju ADAMTS-4 u krvi imali su i bolesnici operirani radi disecirajućih aneurizama aorte (143).

Povezanost izražaja ADAMTS-a u upalnom miljeu ateroskleroze pokazuje i njegovu ulogu vezanu uz upalu per se. Povezanost ADAMTS-4 s upalom izvrsno je prikazana u istraživanju Boyda i suradnika iz 2020. godine u kojem se ova proteaza pokazala mogućom poveznicom između akutnog infektivnog upalnog zbivanja i susljednih početnih fibrogenetskih zbivanja u plućnom parenhimu. Ponovo je utvrđena ključna uloga makrofaga, ali i fibroblasta u proizvodnji ADAMTS-4 molekule (144). Činjenica da upalni citokini poput IL-1, TNF, IL-17, kao i profibrogeni, poput TGF $\beta$  potiču sekreciju ADAMTS-4 molekule dodatno potkrepljuju njen značaj u procesu upale i transformaciji upale prema fibrozi (145).

#### 1.5.2.2. ADAMTS-4 u bubrežnim bolestima i fibrozi

Ideja o ADAMTS-4 proteinazi kao potencijalnom čimbeniku u kroničnoj bubrežnoj bolesti proizlazi, s jedne strane, iz nekoliko znanstvenih radova koji su povezali neke od ADAMTS proteinaza s bubrežnom fibrogenozom, te istraživanja koja ukazuju na ulogu njegovog supstrata vezikana u progresiji KBB, s druge strane (80, 91, 112). Grgić i suradnici pronašli su pojačanu gensku ekspresiju ADAMTS proteaza (ADAMTS-2 i ADAMTS-12) u bubrežnim fibroblastima tijekom njihove transformacije u miofibroblaste (91). Armutcu i suradnici 2019. godine utvrdili su pojačanu ekspresiju ADAMTS-1, -12 i -15 u bubrezima s razvijenom bubrežnom fibrozom u animalnom modelu adriamićinske nefropatije (146). Ekspresija ADAMTS-4 molekule utvrđena je u proksimalnim i distalnim tubulima bubrega fetalnih i odraslih miševa (147). U pilot istraživanju Grgurević i suradnici proteomskom analizom opazili su ADAMTS-4 molekulu u bolesnika liječenih hemodijalizom. Također u eksperimentalnom modelu bilateralne 5/6 nefrektomije u štakora primjena ADAMTS-4 povećala je progresiju BF i mortalitet eksperimentalnih životinja, dok je primjenom protutijela na ADAMTS-4 ovaj efekt bio otklonjen (148).

Genska ekspresija ADAMTS-4 utvrđena je u tkivima bubrega ispitanika s membranskom nefropatijom 2018. godine. S obzirom na metodologiju u istom istraživanju nije mogla biti utvrđena točna lokalizacija pojačanog izražaja ove molekule u bubregu. Bolesnici uključeni u studiju bili su pretežno u stupnju KBB1 (149).

## 1.6. Biološki biljezi i uloga proteomskog profiliranja u KBB

Značajna heterogenost objavljenih istraživanja provedenih na različitim populacijama bolesnika s KBB otežava identifikaciju cirkulirajućih bioloških biljega koji se javljaju tijekom napredovanja bubrežne fibrogeneze te onemogućava predviđanje bubrežnih ishoda povezanih s napredovanjem KBB. Primjerice, Mansour i suradnici sistematskim pregledom literature utvrdili su da bi se pojavnost u krvi i mokraći samo triju molekula: TGF- $\beta$ , kemoatraktantnog proteina monocita-1 (MCP-1) i matriks metaloproteinaze-2 mogla povezati s histološki utvrđenim stupnjem fibroze bubrega (42). S obzirom na dosadašnje spoznaje o povezanosti izražaja proteaza ECM-a s bubrežnom fibrozom i njihovog različitog pojavljivanja tijekom procesa fibrogeneze te moguće direktne uloge u patogenezi bubrežnih bolesti, proteinaze ECM-a, osobito ADAMTS proteinaze značajan su izvor novih bioloških biljega KBB (103). Metoda proteomske analize bazirana na spektrometriji masa, kombinaciji s drugim „omics“ metodama, uspješno se koristi u istraživanjima novih zanimljivih molekula u KBB, što uključuje i istraživanja proteaza ECM-a (150, 151). Najnovija istraživanja koriste tehnologiju proteomike za utvrđivanje novih supstrata pojedinih matriks-metaloproteinaza (152). U ovim istraživanjima proteini plazme tretirani ciljanom proteazom prvotno su razdvojeni tehnikom elektroforeze na gelu, a potom analizirani spektrometrijom masa promatrajući razlikovnost proteina (potencijalnih supstrata) između tretirane i netretirane plazme zadanom proteazom. Danas se više koristi tzv. *shot-gun* tehnika, bez prethodnog razdvajanja proteina elektroforezom na gelu (153). Spektrometriji masa prethodi priprema, koja uključuje denaturaciju proteina, razlaganje disulfidnih veza, alkilaciju cisteinskih završetaka i digestiju proteina tripsinom, a potom razdvajanje proteina tehnikom tekuće kromatografije. S obzirom da ova tehnika sama po sebi nije kvantitativna metoda, kvantifikacija se provodi označavanjem ionskim biljezima na mjestu određenog aminokiselinskog ostatka tipičnog za katalitičko mjesto. Različitim tehnikama očitavanja indirektno se utvrđuje količina određenog proteina ili proteinaze. Alternativno se radi financijskih razloga uspješno koristi tzv. *label-free* semi-kvantitativna proteomska analiza koja se bazira na odnosu prisutnosti pojedinog promatranog proteina između ispitivanih uzoraka. Ova tehnika uspješno je korištena u otkrivanju novih supstrata gelatinaze MMP-9 (151).

Proteomske analize dinamike, odnosno razlikovnosti u pojavljivanju proteina tijekom nastanka i progresije KBB, mogla bi pridonijeti utvrđivanju novih bioloških biljega KBB. Dosadašnja proteomska istraživanja molekularnog profila proteina u KBB nisu opsežna. Glorieux i

suradnici usporedili su proteomski profil 14 bolesnika u stupnju KBB 2+3 s profilom 15 bolesnika u stupnju KBB 5 na hemodijalizi te u konačnoj analizi našli razlike u izražaju za 39 proteina između ovih dviju skupina (154). Dodatnom analizom bioloških puteva u istom istraživanju skupina bolesnika u KBB 5 imala je viši izražaj proteina iz grupe reaktanata akutne upale te pojedine komponente komplementa u odnosu na stupanj KBB2+3. Nađene su i razlike u izražaju koagulacijskih parametara, ali smjer promjene nije bio jednoznačan. U istoj analizi nađena je većina poznatih uremijskih toksina koji su bili očekivano značajnije prisutni u KBB 5. Dodatna ELISA analiza učinjena je za 4 proteina koji su pokazali dinamiku povećanja prema KBB 5, a ranije nisu opisani u literaturi: čimbenik komplementa D, lizosom C, leucinom-bogat alfa-2 glikoprotein (LRG, engl. *Leucine-Rich alpha-2 Glycoprotein*) i glikoprotein bogat histidinom. Učinjenom korelacijom s eGFR prva tri proteina pokazala su inverznu korelaciju s eGFR. U istom istraživanju tijekom progresije KBB utvrđen je porast koncentracije lizosoma C i LRG-a.

Romanova i suradnici analizirali su proteom bolesnika u stupnju 5 KBB koji još nisu započeli liječenje dijalizom (155). Od 27 proteina, koji su pokazali razliku u izražaju između ispitivane skupine i zdravih kontrola, kao kandidati za biološke biljege KBB predloženi su serumski  $\alpha$ -1 antitripsin i HSP-90B2 (engl. *heat shock protein*). U radu Higashisake i suradnika, kao biomarker KBB predložen je C1q komponenta komplementa, koja je značajno porasla u uzorku plazme bolesnika s KBB, a tendencija porasta korelirala je sa stupnjem smanjenja glomerulske filtracije. (156).

S obzirom na značajnu ulogu proteza ECM-a kao biljega bubrežne fibroze na histološkoj razini, povezivanje njihovog histološkog izražaja s profilom proteoma tijekom napredovanja KBB mogao bi dodatno doprinijeti razumijevanju patogeneze KBB.



## **2. HIPOTEZA**

Protein ADAMTS-4 novi je biološki biljeg kronične bubrežne bolesti, povezan sa stupnjem progresije bolesti i histološkim pokazateljima fibroze bubrega.

### **3. CILJEVI I SVRHA ISTRAŽIVANJA**

#### **3.1. Opći cilj**

Istražiti pojavnost i razlike u pojavljivanju proteina ADAMTS-4 u krvi i mokraći bolesnika u različitim stupnjevima kronične bubrežne bolesti, u bolesnika u završnom stupnju bolesti, liječenih peritonejskom ili hemodijalizom te bolesnika s transplantiranim bubregom.

#### **3.2. Specifični ciljevi**

1. Utvrditi stupanj kroničnih promjena intersticija, glomerula i krvnih žila u patohistološkom materijalu bioptata bubrega bolesnika, u kojih je učinjena medicinski indicirana dijagnostička biopsija bubrega i istražiti povezanost fibroze s izražajem proteina ADAMTS-4.

2. Istražiti utjecaj metode dijalize na koncentraciju proteina ADAMTS-4 u krvi.

3. Istražiti razliku u pojavnosti ADAMTS-4 proteina između bolesnika s kroničnom bubrežnom bolesti prije i nakon transplantacije bubrega.

4. Istražiti utjecaj imunosupresivnog liječenja na pojavljivanje ADAMTS-4 proteina u krvi i mokraći bolesnika s KBB.

5. Istražiti razlike u koncentraciji proteina ADAMTS-4 između skupina bolesnika s različitim uzrocima kronične bubrežne bolesti.

#### **3.3. Svrha istraživanja i očekivani znanstveni doprinos**

Znanstveni doprinos rada nova je spoznaja o pojavnosti ADAMTS-4 proteina u krvi i mokraći bolesnika s kroničnom bubrežnom bolesti te njegovoj pojačanoj imunohistokemijskoj ekspresiji u tkivima nativnih i transplantiranih bubrega s KBB. ADAMTS-4 u ovom je istraživanju po prvi put povezan s napredovanjem bubrežne fibroze u biopsijskim uzorcima tkiva bubrega s KBB. Nove spoznaje dobivene ovim istraživanjem postavljaju temelj za daljnja istraživanja ADAMTS-4 proteina, kao mogućeg biološkog biljega kronične bubrežne bolesti.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Ispitanici, materijali i tijek istraživanja

#### 4.1.1. Ispitanici i prikupljanje uzoraka

U prosječno istraživanje pojavnosti ADAMTS-4 u krvi i mokraći bolesnika s KBB uključeno je ukupno 150 ispitanika; 135 bolesnika s KBB, liječenih u Zavodu za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju KBC-a Zagreb u razdoblju od siječnja 2017. do prosinca 2018. godine te kontrolna skupina od 15 zdravih dobrovoljaca (ZDR). Bolesnici su odabrani temeljem pretraživanja Bolničkog informatičkog sustava o njihovoj aktualnoj bubrežnoj funkciji te su potom u sljedećim dolascima u različite segmente Zavoda za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju uključivani u istraživanje s ciljem formiranja ukupno 8 skupina bolesnika u svim fazama kronične bolesti bubrega: 5 skupina od po 15 bolesnika od prvog do petog stupnja kronične bubrežne bolesti (KBB1-KBB5), 1 skupina od 15 bolesnika na peritonejskoj (PD) i 1 skupina od 15 bolesnika na hemodijalizi (HD), 1 skupina od 30 bolesnika nakon transplantacije bubrega (TB) te 1 skupine od 15 zdravih kontrolnih ispitanika (ZDR), ukupno 9 skupina ispitanika. Stratifikacija bolesnika u KBB skupine učinjena je temeljem procjene glomerulske filtracije (eGFR) izračunate putem CKD-EPI formule prema aktualnoj vrijednosti njihovog serumskog kreatinina, dobi, spola i rase (3). Izračun veličine uzorka adekvatne statističke snage učinjen je prema preporukama iz radova Nyangoma i sur. i Cairnsa i sur. te usporedbom sa sličnim radovima (157-158).

Svi ispitanici detaljno su obaviješteni o tijeku i svrsi istraživanja te su potpisali suglasnost za sudjelovanje. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo KBC-a Zagreb (EP-16/106-2) te Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Zagrebu. U istraživanje nisu bile uključene osobe mlađe od 18 godina, bolesnici s dokazanim zloćudnim, sistemskim autoimunim, reumatskim ili bolestima središnjeg živčanog sustava, osobe s mentalnim poremećajima i poremećajima ponašanja te bolesnici s akutnom kardiovaskularnom ili infektivnom bolesti.

Uzorci krvi i mokraće prikupljeni su tijekom rutinskih kontrola ili bolničkog liječenja prema načelima Dobre kliničke prakse. U bolesnika liječenih hemodijalizom uzorkovanje je rađeno tijekom redovitog dolaska na postupak dijalize, i to prije i nakon postupka. Uzorci krvi uzimani su u epruvete sa 3,8% natrijevim citratom u omjeru citrata i krvi od 1:9, a uzorci mokraće (20 ml) u čiste epruvete. Potom je krv centrifugirana na 3000 okretaja tijekom 15 minuta pri temperaturi od 4 °C te su alikvoti plazme, dobiveni centrifugiranjem, pohranjeni u hladnjaku

na -80 °C u Odjelu za tipizaciju tkiva KBC-a Zagreb. Uzorci mokraće centrifugirani su i pohranjeni na isti način. Pred analizu uzorci su na ledu transportirani u Odjel za proteomiku te su dalje čuvani na -80°C do trenutka analize.

Uzorci tkiva bubrega za imunohistokemijsku analizu izražaja proteina uzimani su naknadno iz smrznutih parafinskih rezova bioptata ispitanika, u kojih je biopsija bubrega učinjena temeljem kliničke indikacije, istovremeno s uzimanjem uzoraka krvi ili iz pohranjenog materijala neke od ranijih biopsija. Kliničke indikacije za biopsiju bubrega uključivale su porast kreatinina, pojavu proteinurije, aktivni sediment urina, a u transplantiranih bubrega sumnju na odbacivanje ili drugu etiologiju. Biopsije su provedene standardiziranom procedurom, primjenom igle vodilice uz vizualizaciju ultrazvukom u stacionarnim odjelima Zavoda za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju KBC-a Zagreb (159). Uzorci biopsijskog tkiva transportirani su u gazici natopljenoj fiziološkom otopinom u Klinički zavod za patologiju i citologiju KBC-a Zagreb, gdje je dalje uslijedila standardizirana obrada materijala tkiva. Materijal uzoraka biopsija bubrega darivatelja učinjenih na dan transplantacije („nulte biopsije“) prikupljen je iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KBC-a Zagreb. Iz arhive su za istraživanje upotrebljeni isključivo tkivni rezovi „nultih biopsija“ bubrega koji su transplantirani bolesnicima uključenim u istraživanje.

#### 4.1.2. Tijek istraživanja

Translacijsko istraživanje provedeno je na tri lokacije: Zavodu za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju KBC-a Zagreb, Odjelu za proteomiku Centra za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta u Zagrebu te Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju KBC-a Zagreb.

Svi klinički podaci relevantni za ovo istraživanje prikupljeni su tijekom pregleda bolesnika, a laboratorijski podaci iz Bolničkog informatičkog sustava KBC-a Zagreb. Klinički i laboratorijski podaci o darivateljima bubrega prikupljeni su iz baze podataka o darivateljima Eurotransplanta (engl. *Donor data*). Laboratorijski i klinički podaci ispitanika uključenih u analizu imunohistokemijskog izražaja proteina u tkivima bubrega odgovarali su datumu provedene biopsije bubrega, neovisno je li biopsija provedena prospektivno ili je korišten materijal iz arhive.

Prikupljeni uzorci plazme ukupno 150 ispitanika, klasificiranih u 9 skupina, nakon puliranja analizirani su na prisutnost proteina tehnikom proteomske analize korištenjem uređaja za masenu spektroskopiju.

Određivanje koncentracije proteina ADAMTS-4 u plazmi i mokraći bolesnika učinjeno je metodom ELISA-e u 79 od 150 ispitanika iz 9 opisanih skupina.

Obje navedene analize provedene su u Odjelu za proteomiku Centra za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

Analiza imunohistokemijskog izražaja ADAMTS-4 proteina provedena je u 53 ispitanika s kroničnom bolesti bubrega, na dostupnim biopsijskim uzorcima tkiva uzetim istovremeno s uzorkovanjem krvi ili pohranjenim ranije u arhivi Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KBC-a Zagreb. U 19 ispitanika radilo se o biopsiji nativnih bubrega (NBB), a u 34 o biopsiji transplantiranog bubrega (TBB). Kao kontrolna tkiva za IHK analizu, bez prisustva kronične bolesti bubrega, korišteni su arhivirani uzorci 8 „nultih“ biopsija bubrega darivatelja (KTR). Odsutnost kriterija za KBB u navedenoj skupini utvrđena je temeljem podataka iz baze darivatelja Eurotransplanta (engl. *Donor dana report*), a prema kriterijima: eGFR>90 ml/min, odsutnost proteinurije i strukturnih promjena bubrega. Kao usporedbena molekula za IHK analizu korišten je koštani morfogenetski protein 1 (BMP-1; engl. *Bone morphogenetic protein 1*).

Dodatna analiza parova biopsija obuhvatila je 15 od 34 bolesnika s transplantiranim bubregom (15 TBB) u kojoj je uspoređena istražena razlika imunohistokemijskog izražaja ADAMTS-4 proteina između biopsija bubrega učinjenih u pojedinom vremenskom intervalu nakon transplantacije (TBB) i pripadajućih „nultih biopsija“ (TBB0), učinjenih u aktu transplantacije bubrega (15 TBB-TBB0 parova). Sve patohistološke i imunohistokemijske analize tkiva bubrega učinjene su u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju KBC-a Zagreb.

#### 4.2. Proteomska analiza

Za određivanje profila proteina u plazmi i mokraći bolesnika s različitim stupnjevima kronične bolesti bubrega korištena je metoda tekućinske kromatografije u kombinaciji sa spektrometrijom masa na uređajima Easy-nLC 1200 (Thermo Scientific) i Q Exactive Plus (Thermo Scientific). Uloga proteomske analize u ovom istraživanju je ispitati pojavnost

različitih proteina u pojedinom stupnju KBB te usporediti promjene pojavnosti proteina tijekom napredovanja KBB, s ciljem potencijalnog utvrđivanja novih bioloških čimbenika KBB.

#### 4.2.1. Obrada i priprema uzoraka

##### a) Združivanje uzoraka

Smrznuti uzorci plazme otopljeni su te su potom svi uzorci unutar 9 skupina bolesnika (ZDR, KBB1-KBB5, HD, PD, TB) združeni (engl. *pooling*). Za HD skupinu formirana su dva uzorka, i to prije (HD-P) i nakon postupka hemodijalize (HD-N), čime je za daljnju analizu ukupno formirano 10 uzoraka volumena 15 mL po eksperimentalnoj skupini.

##### b) Pročišćavanje (purifikacija) uzoraka na heparinskim kolonama

Purifikacija uzoraka provedena je na heparinskim kolonama volumena 5 ml (HiTrap TM Heparin HP, GE Healthcare Europe GmbH). Za purifikaciju su korišteni ekvilibracijski pufer (engl. *binding buffer/washing*): 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH=7 i pufer za eluaciju proteina s kolone: 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 0.5 M NaCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 1.0 M NaCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 2 M NaCl; pH=7. Korištene su i šprice volumena 5 i 10 ml, igla za aspiraciju plazme, epruvete za kolekciju prolaznih i eluatnih frakcija, te acetona za precipitaciju eluatnih frakcija.

Postupak purifikacije proveden je prema sljedećem protokolu:

b-1) Kolona je fiksirana na stalku i ekvilibrirana s 10 ml navedenog ekvilibracijskog pufera. Prvih 5 ml koristilo se za ispiranje prezervacijske tekućine u koloni, a potom drugih 5 ml za dodatno ispiranje.

b-2) Uzorak plazme potom je propušten kroz kolonu na način da se plazma iglom aspirira u špricu, potom se igla odstrani, a šprica fiksira na gornji dio kolone, kako bi se izbjeglo prskanje. Tijekom postupka korištena je zaštitna oprema za rad s biološkim materijalom (kuta, rukavice, naočale). Na donji, izlazni dio kolone postavljena je epruveta koja sakuplja svih 15 ml propuštene frakcije uzorka. Pojedini uzorak propušten je kroz kolonu dva puta čime se omogućilo potpunije vezanje proteina na heparinska zrnca. Nevezana frakcija proteina skupljena je i pohranjena na -20 °C.

b-3) Nakon propuštanja uzoraka, kolona je dva puta isprana s 10 ml navedenog ekvilibracijskog pufera (*washing buffer*), čime smo uklonili sve nevezane proteine i pripremili kolone za eluiranje.

b-4) U postupku eluiranja proteina s elucijskim puferom koristili smo razrijeđenja pufera s 3 različita udjela NaCl-a (0,5 M, 1 M i 2 M). Prvo je provedeno eluiranje puferom uz 0,5 M, potom 1 M i nakon toga 2 M NaCl, na način da se po 5 ml pufera propusti kroz kolonu, a eluat sakuplja po 1 ml u 5 epruveta. Ukupna dobivena količina eluatne frakcije dobivena propuštanjem svih triju razrijeđenja pufera na jednoj koloni iznosila je 15 puta po 1 ml.

b-5) U sljedećem koraku učinjena je precipitacija proteina iz eluatnih frakcija uz primjenu acetona rashlađenog na -20 °C. U epruvete s eluatima proteina dodan je rashlađeni aceton u razrjeđenju 1:4, epruvete su vorteksirane kako bi se sadržaj homogenizirao i inkubirane na -80 °C tijekom noći. Sljedećeg dana epruvete su centrifugirane 10 minuta na 18.000 g, dekantirane te je pažljivo odstranjen supernatant kako bi proteinski talozi ostali na dnu epruvete. Potom je sadržaj epruveta osušen na sobnoj temperaturi tijekom 20 minuta. Uzorci su potom otopljeni u 1 M Urea/50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>.

#### 4.2.2. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima pročišćenim heparinom

U uzorcima pročišćenim heparinom potrebno je odrediti koncentraciju proteina kako bi se prije digestije proteina koncentracije proteina u uzorcima ujednačile. Koncentracija proteina u istraživanju određena je korištenjem komercijalno dostupnog kompleta kemikalija, BioRad RC DC Protein Assay Kit II, na način da se alikvot uzorka razrijedi destiliranom vodom u omjeru 1:5 i nakon toga odredi koncentracija proteina prema uputama proizvođača BioRad RC DC Protein Assay Kit II. Apsorbancija proteina izmjerena je pri valnoj duljini 690 nm, korištenjem uređaja SpectraMax i3x (Molecular Devices LLC.)

#### 4.2.3. Digestija (razgradnja) proteina peptidazom tripsinom

U sljedećem koraku proteini se razgrađuju peptidazom tripsinom u peptide, koji će potom biti analizirani tekućinskom kromatografijom i masenom spektrometrijom. Kako bi se poboljšala učinkovitost digestije, proteini se prethodno denaturiraju urejom i potom izlažu djelovanju jodoacetamida (alkilirajućeg agensa). Jodoacetamid se kovalentno veže na bočne lance cisteina, te sprječavajući ponovno stvaranje disulfidnih mostova i renaturaciju proteina.

Digestija proteina provedena je prema sljedećem protokolu:

- 1) Odvojen je uzorak od 40 µg proteina te pomiješan s 200 µl 8 M otopine ureje u filteru za centrifugiranje koji „propušta“ proteine manje od 30 kDa. Filter je umetnut u epruvetu od 1,5 ml te centrifugiran na 14000 g 30 min pri sobnoj temperaturi.
- 2) Na filter za centrifugiranje dodano je novih 200 µl 8 M otopine ureje i uzorak je centrifugiran na 14000 g 20 min pri pri sobnoj temperaturi.
- 3) Iz tubice Eppendorf od 1,5 ml odstranjena je 8 M ureja prikupljena tijekom prethodnih dvaju koraka (engl. flow through).
- 4) Na filter za centrifugiranje dodano je 100 µl 55 mM jodoacetamida otopljenog u 8 M ureji. Uzorak je kratko vorteksiran te inkubiran 20 min na sobnoj temperaturi, u mraku.
- 5) Uzorak je centrifugiran na 14000 g 10 min pri sobnoj temperaturi.
- 6) Na filter za centrifugiranje dodano je 100 µl 8 M ureje te je uzorak centrifugiran na 14000 g 15 min pri sobnoj temperaturi. Ovaj je korak ponovljen dva puta.
- 7) Uzorku je dodano 100 µl 50 mM otopine amonijevog bikarbonata te je uzorak centrifugiran na 14000 g 10 min pri sobnoj temperaturi. Ovaj je korak ponovljen dva puta.
- 8) Uzorku je dodano 75 µl 50 mM otopine amonijevog bikarbonata i tripsina u omjeru 50:1 te je kratko vorteksiran.
- 9) Kako bi se spriječilo isparavanje uzorka, vrh epruvete zaštićen je parafilmom te je uzorak inkubiran preko noći na 37 °C.
- 10) Filter za centrifugiranje premješten je u novu tubicu Eppendorf od 1,5 ml i centrifugiran na 14000 g 15 min na sobnoj temperaturi.
- 11) Uzorku je dodano 50 µl 50 mM otopine amonijevog bikarbonata te je centrifugiran na 14000 g 10 min na sobnoj temperaturi.
- 12) Uzorku je dodano 50 µl 0.5 M otopine natrijevog klorida te je centrifugiran na 14000 g 10 min na sobnoj temperaturi.
- 13) Filtrat u epruveti sadrži otopinu triptičkih peptida koja je zakiseljena do pH 2,5-3 dodavanjem 30 µl 20% octene kiseline, čime je završen ukupni postupak digestije.



#### 4.2.4. Pročišćavanje i ugušćivanje peptida

U ovom se koraku triptički peptidi koncentriraju i pročišćavaju od zaostalih soli (amonijeva bikarbonata i natrijeva klorida) koje ometaju ionizaciju peptida u spektrometru masa.

Pročišćavanje i koncentriranje peptida provedeno je prema sljedećem protokolu:

- 1) U nastavak pipete od 100  $\mu$ l uglavljen je materijal C18 (tzv. Stage Tips-Stop And Go Extraction), prethodno navlažen dodavanjem 100  $\mu$ l metanola. Stage Tips je potom centrifugiran na sobnoj temperaturi tijekom 2 min na 1300 g, ispran s 200  $\mu$ l 0,5% octene kiseline (otopina A), ponovo centrifugiran na 1300 g 3 min na sobnoj temperaturi.
- 2) U Stage tips dodan je uzorak pročišćenih peptida te je ponovo centrifugiran na sobnoj temperaturi tijekom 5 minuta na 1300 g.
- 3) Stage Tips ispran je s 200  $\mu$ l 0.5 % octene kiseline (otopina A) i ponovo centrifugiran na sobnoj temperaturi tijekom 3 minute na 1300 g.

Peptidi su eluirani s materijala C18 (Stage tips) u mikrotitarsku pločicu s 96 jažica, na način da je Stage Tips uglavljen na plastičnu štrcaljku, a peptidi su isprani pomoću 40  $\mu$ l otopine koja sadrži 80% acetonitrila (ACN) i 20% otopine A (otopina B).

Centrifugiranjem na vakuum-centrifugi (Eppendorf Concentrator 5301) tijekom 10 min pri 30 °C i 200 g uparen je zaostali ACN. U ovom koraku triptički peptidi pročišćavaju se od zaostalih soli (amonijeva bikarbonata i natrijeva klorida) koje ometaju ionizaciju peptida u spektrometru masa. Peptidi se istovremeno i koncentriraju kako bi se bolje nanijeli na tekućinski kromatograf.

#### 4.2.5. Tekućinska kromatografija i spektrometrija masa

Pročišćeni peptidi razdvojeni su temeljem polariteta i analizirani pomoću nano-skale HPLC sustava Easy-nLC 1200 (Thermo Scientific) spojenog s Q Exactive Plus spektrometrom masa (Thermo Scientific) kroz nano-elektrosprej LC-MS sučelje. Peptidi su u otapalu "A" (0,5% AcOH u vodi) nanoseni na nanokolonu duljine 25 cm pakiranu C18 materijalom (PepMap, ThermoFischer) i razdvojeni kroz 45-minutni gradijent 10-70% otapala „B“ (80% ACN, 0,5% AcOH u vodi) s protokom od 250 nL/min. Automatizirani ciklusi mjerenja spektrometra masa uključivali su puno skeniranje MS i skeniranje MS/MS do deset najintenzivnijih iona, koristeći

se dinamičkim isključenjem kako bi se izbjeglo prekomjerno fragmentiranje (analiza) peptida najveće koncentracije. Puni skenovi MS ( $m/z$  od 300 do 2000) dobiveni su u Orbitrap analizatoru na rezoluciji od 70,000 s unutrašnjom kalibracijom pomoću tzv. „lock“ mase. Uzorci su analizirani u tehničkim duplikatima.

#### 4.2.6. Bioinformatička obrada dobivenih podataka

Eksperimentalne podatke, odnosno spektre pojedinih fragmentiranih peptida bioinformatički smo analizirali kako bi se dobile informacije važne za biološki sustav. Peptidi su identificirani i kvantificirani uporabom računalnog programa Thermo Scientific Proteome Discoverer softwera verzija 2.4. Eksperimentalni spektri pretraženi su uporabom SequestHT i Mascot pretraživača i uspoređeni s humanom bazom proteina dostupnom na internetskim stranicama baze UniProt (Proteome ID: UP000005640). Za *in silico* digestiju humanih proteina odabrana je peptidaza tripsin. Maksimalna dopuštena pogreška postavljena je na uobičajenih 0,01, a minimalna duljina peptida za identifikaciju proteina podešena je na sedam aminokiselina. Proteini identificirani s najmanje jednim peptidom smatrani su relevantnima za daljnju analizu. Prikupljeni proteomski podaci pohranjeni su uporabom Proteom eXchange Consortium softwera u on-line javnu proteomsku bazu podataka PRIDE (Identifikator seta podataka: PXD033427). Analiza značajnih bioloških puteva uz analizu obogaćivanja genima (engl. *Gene enrichment analysis*) učinjena je uporabom Funrich 3.1.3. softwera (160). Statistička značajnost unutar bioloških puteva definirana je kao statistički značajna za  $p < 0,05$ , prema učinjenom hipergeometrijskom testu, korigiranom za Bonferronijevu korekciju. Nakon pretraživanja literature utvrđeni su najznačajniji putevi koji su prikazani u rezultatima. Individualna identifikacija proteina, pronađenih samo u određenoj istraživačkoj skupini (engl. *outliers*) dobivena je prema Binarnom kodu da/ne za svaku grupu proteina. Individualni proteini prikazani su Termo mapom ili u tablici sa stupićima (engl. *bars*) prema njihovoj relativnoj ekspresiji u eksperimentalnoj skupini i analizirani semikvantitativno. Za svaki protein analiziran je trend ekspresije u skupinama i promjena ekspresije u odnosu na kontrolnu skupinu (ZDR). Termo mapa izrađena je u besplatnom programu Morpheus, dostupnom na internetu.

### 4.3. ELISA analiza

Za određivanje koncentracije ADAMTS-4 proteina u plazmi i mokraći bolesnika s različitim stupnjevima KBB korištena je indirektna imunoenzimaska metoda ELISA, kitom Human ADAMTS-4 DuoSet ELISA DY4307-05 R&D, Minneapolis, MN.

Analizirani su uzorci plazme i mokraće od 79 ispitanika: 32 u stupnjevima KBB1-KBB5, 7 iz PD skupine, 5 iz HD skupine, 30 iz TB skupine te 5 iz ZDR skupine. Za 5 ispitanika iz HD grupe odvojeno su analizirani uzorci prije (HD-P) i nakon postupka hemodijalize (HD-N) te je u konačnici ukupan broj pojedinačnih uzoraka za analizu iznosio 84.

Postupak je proveden prema uputama proizvođača, a rezultati su očitani spektrofotometrijom na uređaju SpectraMax i3x (Molecular Devices LLC, 3860 N First Street, San Jose, CA 95134, USA) pri valnoj duljini od 450 nm. Svi uzorci i standardizirane kontrole analizirani su u duplikatu, a za uzorke, čiji je rezultat pokazao individualni koeficijent varijabilnosti (CV) veći od 25%, testiranje je ponovljeno. Spektrofotometrijski rezultati analizirani su u računalnom programu Softmax Pro 7.0.3. Software (Molecular Devices LLC).

Tijekom postupka korišteni su pufer za prekrivanje (engl. *phosphate buffered saline*, PBS), pufer za razrjeđivanje reagensa i blokiranje nespecifičnog vezanja (1% BSA (engl. *bovine serum albumin*) u PBS) i pufer za ispiranje (0,1% Tween u PBS).

ELISA analiza provedena je prema sljedećoj proceduri:

#### 4.3.1. Priprema pločice

- 1) Smrznuti uzorci u mikroepurvetama smješteni su na stalak i odloženi u hladnjak na +4°C tijekom noći kako bi se postupno otopili.
- 2) Vezno protutijelo razrijeđeno je u PBS-u 120 x na radnu koncentraciju te je u svaku od 96 jažica stavljeno po 100 ul otopine.
- 3) Potom je pločica pokrivena i inkubirana tijekom noći na + 4°C.
- 4) Svaka jažica isprana je dva puta s po 400 µl pufera za ispiranje. Nakon svakog ispiranja tekućina je u potpunosti odstranjena, a nakon zadnjeg ispiranja pufer je u potpunosti odstranjen.

#### 4.3.2. Blokiranje

- 6) Pločica je blokirana dodavanjem 300  $\mu\text{l}$  pufera za blokiranje reagensa u svaku jažicu.
- 7) Potom je inkubirana na sobnoj temperaturi tijekom sat vremena.
- 8) Nakon toga isprana je prema istovjetnom protokolu navedenom pod točkom 4).

#### 4.3.3. Nanošenje kontrolnih i eksperimentalnih uzoraka

U ovom koraku uslijedilo je nanošenje kontrolnih i eksperimentalnih uzoraka u ukupnoj količini od 100  $\mu\text{l}$  po jažici, neovisno radi li se o nerazrijeđenom ili razrijeđenom uzorku.

- 9) Kontrolni uzorci nanose se na sljedeći način:

U prvoj jažici nalazi se nerazrijeđena kontrola, a nakon toga kontrole su razrijeđene na način da se 10,5  $\mu\text{l}$  kontrolnog uzorka razrijedilo sa 409,5  $\mu\text{l}$  pufera za razrjeđivanje i nanijelo 200  $\mu\text{l}$  u prvu sljedeću kontrolnu jažicu. Potom se sadržaj resuspendirao, aspiriralo 100  $\mu\text{l}$  i dodalo u sljedeću jažicu. Postupak je nastavljen tako do zadnje jažice u koju je stavljeno samo 100  $\mu\text{l}$  čistog pufera za razrjeđivanje.

- 10) Eksperimentalni uzorci nanijeli su se nerazrijeđeni u duplikatu po 100  $\mu\text{l}$  u svaku jažicu.
- 11) Pločice su prekrivene i inkubirane tijekom 2 sata na sobnoj temperaturi.
- 12) Potom je uslijedilo ispiranje kao pod točkom 4).

#### 4.3.4. Detekcija proteina

- 13) Dodano je po 100  $\mu\text{l}$  sekundarnog antitijela radnog razrijeđenja (1:60) u svaku jažicu.
- 14) Pločica je ponovo prekrivena i inkubirana 2 sata na sobnoj temperaturi.
- 15) Potom je isprana kao pod točkom 4).

#### 4.3.5. Primjena streptavidina

16) U svaku je jažicu potom dodano 100  $\mu$ l razrijeđene otopine streptavidina, kao pripreme za očitavanje (razrijeđen je puferom za razrjeđivanje u omjeru 1:40).

17) Pločica je ponovo pokrivena i inkubirana 20 minuta na sobnoj temperaturi, bez izlaganja direktnom svjetlu.

18) Potom je isprana kao pod točkom 4).

#### 4.3.6. Dodavanje supstrata i zaustavljanje reakcije

19) Dodano je 100  $\mu$ l otopine supstrata u svaku jažicu.

20) Pločica je inkubirana 20 minuta na sobnoj temperaturi bez izlaganja svjetlu.

21) U svaku je jažicu dodano 50  $\mu$ l otopine za zaustavljanje te je pločica nježno protresena kako bi se sadržaj u jažicama pomiješao.

#### 4.3.7. Očitavanje na optičkom čitaču

22) Očitavanje je provedeno čitačem namještenim na valnu duljinu od 450 nm.

### 4.4. Imunohistokemijska analiza biopsijskih uzoraka bubrežnog tkiva

#### 4.4.1. Primarna obrada uzoraka tkiva dobivenih biopsijom bubrega

Biopsijski materijal dostavlja se u laboratorij na gazici namočenoj fiziološkom otopinom u žurnoj proceduri. Potom je pristupljeno standardiziranoj obradi i pripremi materijala za analizu, koja je uključila rutinsku analizu svjetlosnim (SM) i elektronskim mikroskopom (EM) te imunofluorescencu (IF) (161). Materijal biopsije bubrega darivatelja, učinjen u aktu transplantacije („nulta biopsija“), nije rutinski analiziran elektronskim mikroskopom.

Priprema uzoraka za ove analize učinjena je prema sljedećem protokolu:

1) Prije rezanja tkivo biopsije analizirano je disekcijskim mikroskopom pod povećanjem 20-40 puta, kako bi se bolje prikazale strukture od interesa te se tkivo razdijelilo za svaku od triju gore navedenih analiza posebno, osim u slučaju „nultih“ biopsija transplantiranih bubrega. Ključno je da se za SM analizu uzme dio koji sadrži minimalno 10 glomerula, dok je za EM i IF dovoljno 2-5 glomerula.

2) Tkivo za SM potom se inkubira u formalinu, dehidrira alkoholom, uklopi u parafin i nakon toga rade se serijski rezovi pomoću mikrotoma debljine od 3  $\mu\text{m}$ . Rezovi su se obojali rutinski hemalaun-eozinom, PAS bojenjem, Masson-trikromnim i bojenjem po Jonesu.

3) Tkivo za EM fiksiralo se u McDowellovu fiksativu, potom tretiralo osmijevim tetroksidom, uranijem acetatom i dehidriralo acetonom te je potom uklopljeno u sintetičku smolu Agar. Rezovi se rade na ultramikrotomu i debljine su 0,5-1  $\mu\text{m}$  te se oboje toluidinom. Potom se dijelovi u kojima ima glomerula i tubula režu još na ultra tanke rezove koji se stavljaju na bakrene mrežice i očitavaju elektronskim mikroskopom.

#### 4.4.2. Patohistološka analiza bioptata bubrega

Za potrebe ovog istraživanja koristili smo samo analize učinjene svjetlosnim mikroskopom. Svi uzorci rutinski su obrađeni i IF i EM.

Analiza SM učinjena je standardiziranom tehnikom kojom se analiziraju detaljno sva područja bubrežnog tkiva: područje glomerula, tubula i intersticija. Analiza ima cilj prepoznati odjeljak u kojem se događa primarni patološki proces, procijeniti rasprostranjenost bolesti te njenu aktivnost i/ili kronicitet. Aktivnost i kronicitet izraženi su kvalitativno i kvantitativno, različitim histološkim pokazateljima (engl. *histology scores*). U analizi biopsija transplantiranih bubrega sve aktivne i kronične promjene izražene su histološkim pokazateljima prema dijagnostičkim kriterijima utvrđenim na konferenciji Banff radne skupine iz 2017. godine (17). Standardiziranom okularnom metodom je za sve analizirane bioptate nativnih bubrega (NBB) procijenjen stupanj intersticijske fibroze i tubularne atrofije (IFTA): 0 ( $\leq 5\%$ ); 1 (6-25%); 2 (26-50%) ili 3 ( $> 50\%$ ). Analogno IFTA-i, u bioptatima transplantiranih bubrega se, prema Banff dijagnostičkim kriterijima, prisutnost intersticijske fibroze definira kroničnim intersticijskim stupnjem (ci) kao: 0 =  $\leq 5\%$ , 1 (6-25%), 2 (26-50%) ili 3 ( $> 50\%$ ), a prisutnost tubularne atrofije (ct) gradiira temeljem udjela atrofičnih u ukupnom broju tubula kore bubrega kao ct stupanj: 0 =  $\leq 5\%$ , 1 (6-25%), 2 (26-50%) ili 3 ( $> 50\%$ ). Osim navedenih, za usporedbene analize izražaja

proteina ADAMTS-4 i BMP-1 s histološkim promjenama u transplantiranim bubrezima korišteni su, prema Banff dijagnostičkim kriterijima, i sljedeći pokazatelji: stupanj intersticijske upale (i), stupanj upale tubula-tubulitis (t), udio intersticijske fibroze uz prisutnu upalu (iIFTA), stupanj ukupne upale u intersticiju ( $t_i = i + iIFTA$ ), stupanj upale peritubularnih kapilara-peritubularni kapilaritis (PTCitis). U svim biopstatima stupnjevan je i udio kronično promijenjenih glomerula (glomeruloskleroza-GS) kao: 0-odsutna, 1-blaga (<25%), 2-umjerena (25-50%) ili 3-teška (>50%). Akutno tubularno oštećenje stupnjevano je kao 0 (odsutno ili blago) ili 1 (umjereno do teško).

#### 4.4.3. Imunohistokemijska analiza biopsijskih uzoraka

Imunohistokemijsko bojanje biopsijskih uzoraka tkiva bubrega na proteine ADAMTS-4 učinjeno je naknadno na rezovima tkiva, dobivenog iz parafinskih blokova. Kao usporedbena molekula korištena je dokazana profibrogena molekula BMP-1. Cijeli postupak, koji uključuje pre-tretiranje uzoraka, deparafinizaciju i inkubaciju antitijelima, proveden je automatizirano na uređaju Dako Omnis, proizvođača Agilent Technologies, CA prema sljedećoj proceduri:

##### 1) Priprema uzoraka

Uzorci tkiva iz parafinskih blokova narezani su na debljinu od 4  $\mu\text{m}$  na način da su od tkiva jednog ispitanika narezana 4 uzorka, dva za svako pojedinačno bojenje (ADAMTS-4 i BMP-1) te su položeni na odvojena stakalca. Stakalca su potom osušena tijekom 1 sata na 60 °C, kako bi se tkivo fiksiralo za stakalce.

##### 2) Deparafinizacija i rehidracija

Nakon što su stakalca ohlađena odstranjen je parafin primjenom sredstva Clarify (American Mastertech, Lodi, CA). Nakon toga uslijedio je proces rehidracije uzoraka uz primjenu etanola i konačno ispiranje vodom tijekom 5 minuta. Proces je vođen automatizirano na uređaju Dako Omnis (Dako Omnis platform, Agilent Technologies, CA).

##### 3) Oslobođanje antigena (izlaganje epitopa)

U sljedećem koraku učinjeno je kidanje veza među aminokiselinama, kao posljedice ranije fiksacije formalinom. Na taj način dolazi do oslobođanja antigena, odnosno epitopa, kako bi se omogućilo vezanje ciljnog antitijela u sljedećem koraku postupka. Ovaj postupak učinjen je

pomoću sredstva Dako Flex TRS Low (Agilent Technologies, CA) uz zagrijavanje na 97°C tijekom 30 minuta.

#### 4) Inkubacija antitijelima

U ovom koraku stakalca su inkubirana primarnim antitijelima odvojeno za ADAMTS-4 i za BMP-1.

Za ADAMTS-4 upotrebljeno je primarno zečje poliklonalno ADAMTS-4 antitijelo, proizvođača Abcam, Cambridge, MA, u razrijeđenju 1:200 i inkubirano tijekom 60 minuta, a potom Dako GV800 HRP-konjugirano sekundarno antitijelo, proizvođača Agilent Technologies, CA tijekom 20 minuta.

Za ekspresiju proteina BMP-1 stakalca su pretretirana u niskom pH (pH=6,0) te inkubirana primarnim poliklonalnim zečjim antitijelom HPA014572, proizvođača Sigma-Aldrich, Merck, Germany u razrijeđenju od 1:50 tijekom 60 minuta. Nakon toga primijenjen je pojačivač signala primarnog antitijela (Rabbit Linker Dako GV809) tijekom 10 minuta, a nakon toga uslijedila je inkubacija konjugiranim sekundarnim antitijelom Dako GV800 HRP, proizvođača Agilent Technologies, CA tijekom 20 minuta.

#### 5) Aplikacija kromogena i bojanje hematoksilinom

Za vizualizaciju kompleksa antigen-antitijelo provedena je inkubacija kromogenom 3,3'-diaminobenzidine (DAB), koji se veže na HRP sekundarnog protutijela te u konačnici daje crvenkastu boju (EnVision FLEX, Code GV800). Kao kontrastno bojenje ostalih struktura upotrebljen je hematoksilin kao bazno bojenje.

#### 6) Analiza imunohistokemijskog bojenja

Stakalca su analizirana pod svjetlosnim mikroskopom Zeiss Axiostar plus, uz povećanje 200 i 400 puta. Kao pozitivnu kontrolu za ADAMTS-4 u tkivu koristili smo pozitivitet ADAMTS-4 proteina u stijenci intralobularne bubrežne arterije biopsijskog uzorka tkiva, gdje je uzorak obojenja u potpunosti odgovarao literaturnim podacima (138).

Imunohistokemijski izražaj za ADAMTS-4 i BMP-1 analizirao se na odvojenim rezovima za sve uzorke na način da se izražaj utvrđivao zasebno za tri područja bubrežnog tkiva: intersticij, glomerule i tubule. Unutar svakog od tih područja odvojeno su analizirani sljedeći odjeljci: peritubularne kapilare (PTC) i intersticijska stroma (INT) za područje intersticija, glomerularne



kapilare (GC) i Bowmanova čahura (BW) za glomerularno područje te proksimalni (PXT) i distalni tubuli (DT) za tubularno područje. Za svaki od 6 navedenih odjeljaka (PTC, INT, GC, BW, PXT, DT) pojedinog biopsijskog uzorka očitani su imunohistokemijski izražaji i definirani kao pozitivni (+) ili negativni (-). Pozitivnim smo definirali IHC bojenje, koje je bilo zastupljeno u više od 1% promatranog odjeljaka u svakom pojedinom uzorku po uzoru na metodologiju imunohistokemijske analize primijenjene u istraživanjima tumora dojke (162). Graduaciju intenziteta imunohistokemijskog bojenja nismo učinili s obzirom da se radilo o prvom ikada sistematskom istraživanju imunohistokemijskog izražaja molekule ADAMTS-4 u tkivima bubrega s KBB.

#### 4.5. Statistička analiza

Svi klinički, laboratorijski podaci, podaci dobiveni proteomskim i analizama tkiva bubrega pohranjeni su i obrađeni u elektroničkom obliku uz potpuno poštivanje propisanih postupaka za zaštitu osobnih podataka. Normalnost raspodjele kontinuiranih varijabli testirana je D'Agostino-Pearsonovim testom. Mjere centralne tendencije kojima su prikazane varijable su: aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija te medijan (interkvartilni raspon). Koncentracije ADAMTS-4 proteina u plazmi prikazane su kao multiple varijable u grafu s oznakom kutijastog dijagrama za medijan. Normalno raspodijeljene varijable uspoređene su Studentovim t-testom i t-testom za uparene uzorke, a za varijable čija raspodjela odstupa od normalne korišten je Mann-Whitneyjev U-test. Razlike između triju i više skupina testirane su analizom varijance (ANOVA) i Kruskal-Wallisovim testom s Bonferronijevom korekcijom. Kategorijske varijable prikazane su kao apsolutni brojevi i proporcije. Za usporedbu kategorijskih varijabli korišten je Fisherov  $\chi^2$  test. Korelacije su testirane Pearsonovim i Spearmanovim testom. U istraživanje je uključeno 8 skupina po 15 ispitanika te jedna skupina od 30 ispitanika, što je procijenjeno kao adekvatna statistička snaga za proteomsku analizu. Kao razina značajnosti koristit će se p-vrijednost manja od 0,05.

Frekvencije ADAMTS-4 i BMP-1 proteina u biopsijama tkiva iz 3 skupine (KTR, NBB, TBB), kao i usporedba parova, određene su direktnim brojanjem temeljenim na binarnom kodu da/ne temeljem imunohistokemijskog bojenja. Razlike u distribuciji podataka uspoređene su Fisherovim  $\chi^2$  testom s Yates korekcijom. Sve analize učinjene su u MedCalc programu (verzija 19.2.6).

## **5. REZULTATI**

### **5.1. Profil proteina i pojavnost ADAMTS-4 molekule u krvi i mokraći ispitanika**

Profil proteina i pojavnost ADAMTS-4 molekule ispitivana je u krvi i mokraći ukupno 150 ispitanika, raspodijeljenih u 9 skupina: 1 skupina od 15 zdravih kontrolnih ispitanika (ZDR), 5 skupina s 15 bolesnika od prvog do petog stupnja kronične bubrežne bolesti (KBB1-KBB5), skupina s 15 bolesnika na peritonejskoj (PD), skupina s 15 bolesnika na hemodijalizi (HD) i skupina s 30 bolesnika s transplantiranim bubregom (TB). U Tablici 1a prikazani su osnovni podaci i laboratorijski nalazi, a u Tablici 1b osnovna bubrežna bolest i najvažnije kliničke karakteristike ispitanika.

Tablica 1a. Osnovni podaci i laboratorijski nalazi ispitanika

	ZDR	KBB1	KBB2	KBB3	KBB4	KBB5	HD	PD	TB
N	15	15	15	15	15	15	15	15	30
Dob (godine)	42.9± 9.4	36.7± 15.2	54.5± 18.2	56.5± 14.5	60.5± 16.1	60.7± 15.4	49.9± 17.7	48.1± 16.7	51.2± 15.8
Spol ženski N (%)	7(46)	8(53)	7(46)	4(26)	9(60)	6(40)	10(68)	7(46)	5(17)
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	24.3± 2.7	25.1± 4.7	28.7± 6.4	25.7± 5.2	26.3± 4.1	28.3± 5.2	28.0± 9.4	25.5± 4.1	26.8± 5.4
Kreatinin (μmol/L)	72.7± 10.9	74.1± 14.3	88.7± 15.2	158± 23.7	237± 52.2	476± 136	865.9± 187.1	769.2± 183.1	184.9± 64.2
eGFR (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )	104± 10.1	102±1 0.2	74.7± 8.8	39.3± 7.2	21.7± 4.7	10.3± 2.3	<15	<15	39.7± 16.4
Proteinurija (g/24 h)	0.20 (0.1– 0.5)	0.36 (0.2– 1.5)	0.70 (0.3– 1.3)	0.49 (0.4– 1.2)	0.43 (0.4– 3.1)	1.88 (0.7– 3.2)	np	Np	0.47 (0.3– 1.1)
Ureja (mmol/L)	5.0± 1.0	5.0± 1.3	6.2± 1.6	10.5± 3.3	16.6± 4.9	24.3± 4.9	24.6± 6.2	20.5± 5.7	12.7± 4.9
Kolesterol (mmol/L)	4.4± 0.6	5.4± 2.5	4.2± 0.8	4.5± 0.8	5.0± 1.4	5.0± 1.7	3.9± 0.9	5.1± 1.2	4.5± 1.2
Trigliceridi (mmol/L)	1.1± 0.6	1.2± 0.9	1.5± 0.7	1.6± 0.6	2.5± 1.2	2.7± 2.7	2.2± 1.2	2.3± 1.5	2.0± 0.9
HDL (mmol/L)	1.6± 0.3	1.6± 0.4	1.3± 0.4	1.3± 0.4	1.1± 0.6	1.1± 0.3	0.9± 0.3	1.3± 0.5	1.2± 0.4
LDL (mmol/L)	2.4± 0.5	3.3± 2.4	2.2± 0.7	2.1± 0.8	2.8± 1.4	2.7± 1.3	2.1± 0.7	2.9± 1.0	2.6± 1.0
Albumin (g/L)	44±3	39±6	38±3	40±3	37±6.6	40±4	39±2.5	38±4.4	39±5.7
GUK (mmol/L)	4.3± 0.4	4.8± 0.6	5.2± 0.9	5.6± 1.4	5.5± 1.2	5.6± 1.4	6.1± 2.2	5.6± 1.9	5.8± 1.5
CRP (mg/L)	0.9± 0.8	1.2± 1.6	2.8± 1.7	3.3± 3.4	4.0± 4.4	5.1± 5.9	5.5± 6.6	3.8± 4.3	2.0± 2.0

Tablica 1b. Osnovna bubrežna bolest i najvažnije kliničke osobine ispitanika

	ZDR	KBB1	KBB2	KBB3	KBB4	KBB5	HD	PD	TB
<b>OSNOVNA BB n (%)</b>									
Glomerularna	0 (0)	13 (86)	15 (100)	9 (60)	5 (33)	6 (40)	4 (27)	2 (13)	4 (13)
Hipertenzivna	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (13)	5 (33)	2 (13)	0 (0)	2 (13)	3 (10)
AD policistična	0 (0)	1 (7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (7)	2 (13)	1 (7)	0 (0)
Dijabetička	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (7)	1 (7)	1 (7)	3 (20)	12 (40)
Ostali specifični uzroci	0 (0)	1 (7)	0 (0)	2 (13)	2 (13)	2 (13)	5 (33)	5 (33)	3 (10)
Nepoznata	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (7)	2 (13)	3 (20)	3 (20)	2 (13)	8 (27)
<b>KLINIČKE OSOBINE n (%)</b>									
Arterijska hipertenzija	0 (0)	7 (47)	14 (93)	13 (86)	15 (100)	15 (100)	13 (86)	14 (93)	27 (90)
Šećerna bolest	0 (0)	0 (0)	3 (20)	4 (26)	5 (33)	2 (13)	3 (20)	3 (20)	8 (27)
Hiperlipidemija	0 (0)	5 (33)	12 (80)	10 (67)	12 (80)	9 (60)	6 (40)	6 (40)	11 (37)
Ateroskleroza	0 (0)	0 (0)	3 (20)	4 (26)	5 (33)	8 (53)	1 (7)	4 (26)	5 (17)
Osteoartritis	0 (0)	1 (7)	1 (7)	1 (7)	0 (0)	0 (0)	1 (7)	0 (0)	0 (0)
Pušenje	2 (13)	2 (13)	1 (7)	6 (40)	3 (20)	8 (53)	6 (40)	5 (33)	5 (17)
Imunosupresija	0 (0)	2 (13)	2 (13)	2 (13)	0 (0)	1 (7)	0 (0)	1 (7)	30 (100)

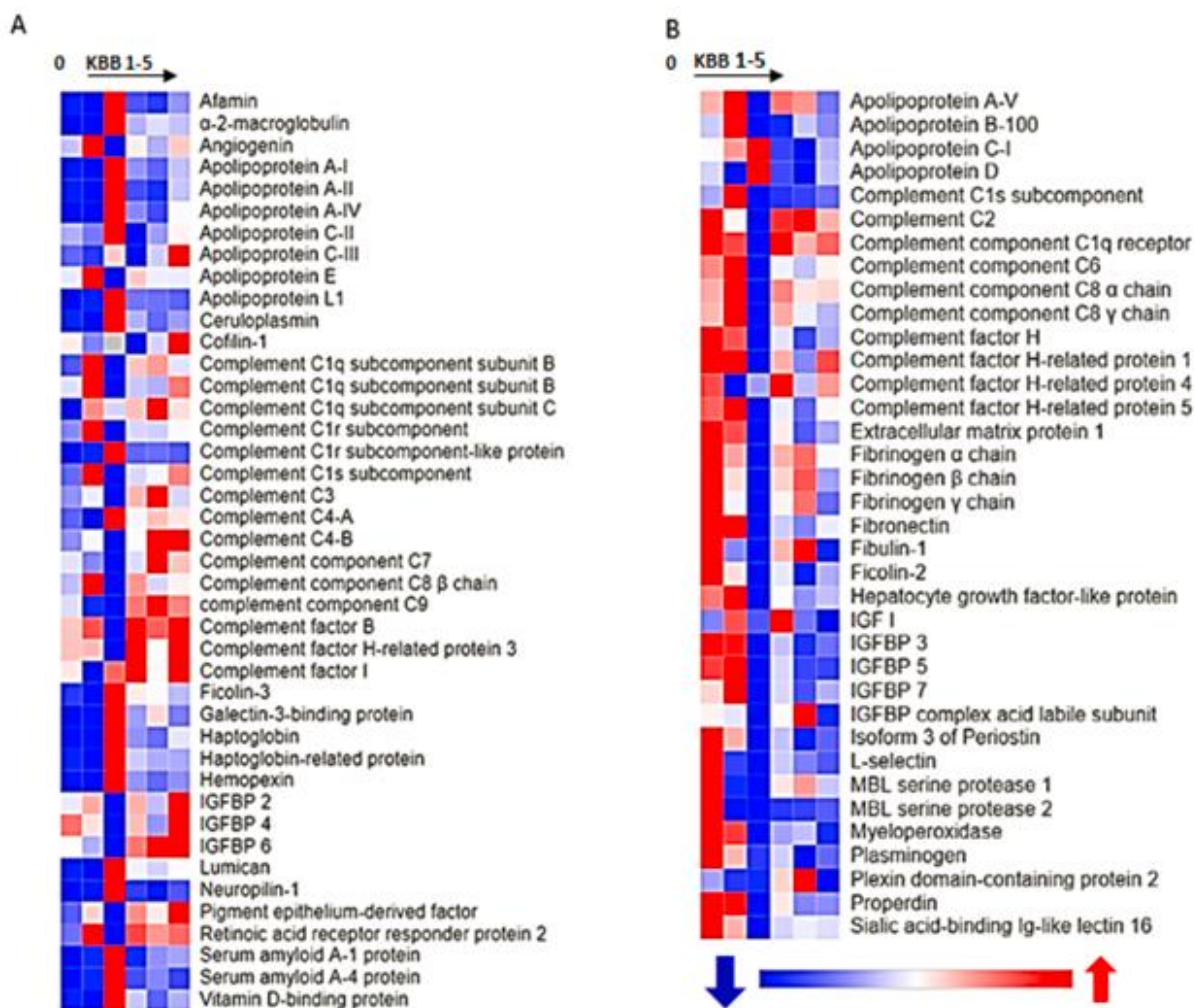
N-ukupan broj bolesnika u skupini; n-broj ispitanika s promatranim obilježjem; np-nije primjenjivo; BB-bubrežna bolest

### 5.1.1. Analiza trenda ekspresije proteina proteomskim profiliranjem

Proteomskom analizom ispitivanih skupina identificirana su ukupno 453 različita proteina, od kojih po pojedinim skupinama: KBB1 356, KBB2 353, KBB3 381, KBB4 375, KBB5 390, PD 387, HD-P 391, HD-N 394, TB 358 proteina. Prikupljeni proteomski podaci pohranjeni su uporabom Proteome Xchange Consortium programske podrške u online javnu proteomsku bazu podataka PRIDE (Identifikator seta podataka: PXD033427). Iz daljnje analize isključeni su standardni proteini, koje redovito nalazimo u plazmi bolesnika, poput albumina. Relativne jačine izražaja proteina utvrđene masenom spektrometrijom (IBAQ) prilagođene su putem formule na postotne udjele pojedinog proteina u ispitivanoj skupini. Potom je za pojedinačni protein izračunat prosječni postotni udio tog proteina za sve skupine zajedno (ZDR, KBB 1-5, PD, HD-P, HD-N, TB), te se promatrao trend kretanja proteina kroz stupnjeve KBB, a u odnosu na prosječnu vrijednost. Također, značajnom tendencijom porasta ili pada trenda proteina između skupina smatrali smo dvostruku promjenu postotnog udjela.

#### 5.1.1.1. Analiza trenda ekspresije proteina u skupinama KBB1 do KBB5

Veliki broj proteina pokazao je značajnu promjenu ekspresije u različitim stupnjevima KBB. Posebno su analizirani razvojni stupnjevi KBB1-5 te je promatran trend ekspresije u odnosu na kontrolnu skupinu. Pomnom analizom trendova pojedinačnih proteina, zatim trendova skupina proteina povezanih zajedničkom funkcijom, utvrđeno je da veliki broj pojedinačnih i/ili funkcijski povezanih proteina značajno mijenja ekspresiju u ranim stupnjevima KBB, odnosno KBB2. Trend ekspresije apolipoproteina, komponenti komplementa, čimbenika koagulacije, čimbenika rasta, komponenti ekstracelularnog matriksa, lektina i drugih signalnih molekula prikazan je termo-mapom na Slici 3.



Slika 3. Termomapa izabranih proteina sa značajnom promjenom ekspresije u stupnju KBB2. U mapi su prikazane promjene izražaja izabranih proteina tijekom razvoja i progresije KBB za skupine ispitanika: 0 – skupina zdravih kontrola (ZDR); skupine ispitanika od stupnja KBB1-5. Nijansama crvene boje prikazana je graduacija pojačane, a nijansama plave graduacija slabije ekspresije proteina, obje u odnosu na prosječnu ekspresiju pojedinačnog proteina u svim ispitivanim skupinama. Stupac A – prikaz proteina s tendencijom porasta ekspresije tijekom progresije KBB i prekretnicom u stupnju KBB2; Stupac B - prikaz proteina s tendencijom pada ekspresije tijekom progresije KBB i prekretnicom u stupnju KBB2.

### 5.1.1.2. Analiza *outlier* proteina

Analizom svih proteina utvrđeno je ukupno 10 proteina, koji su se pojavljivali samo u jednoj skupini ispitanika (iz engl. *outlier*) s KBB te 2 proteina u ZDR skupini. Od 10 proteina utvrđena su 3 u KBB2, 4 isključivo u HD skupini, 2 u ispitanika na oba modaliteta dijalize (HD i PD skupine) te samo 1 protein u TB skupini. Samo 2 od 453 proteina zamijećena su isključivo u ZDR skupini, a da nisu bila prisutna niti u jednoj od skupina s KBB. Rezultati su prikazani u Tablici 2.

Tablica 2. Popis proteina prisutnih isključivo u pojedinoj ispitivanoj skupini (*outlier protein*)

	<b>NAZIV <i>outlier</i> PROTEINA</b>	<b>UniProt ID</b>
ZDR	Teški lanac imunoglobulina-podvrsta 1/OR15-1	A0A075B7D0
	Receptor leukocita sličan podobitelji imunoglobulina tipa 2	Q8N423-1
KBB2	Podjedinica hemoglobina delta	P02042
	Receptor za transferin-1	P02786
	Protein adhezijske vaskularnih stanica 1 (VCAM-1)	P19320-1
HD	Protein sličan SPARC 1	Q14515
	Dermokin	Q6E0U4-1
	Guanilin	Q02747
	Osteopontin	P10451-1
HD+PD	Hondroadherin	O15335
	Protein regeneracije otočića 3-alfa	Q06141
TB	Protein S100-A12	P80511

### 5.1.1.3. Analiza uremijskih toksina

Sljedeća analiza uključila je pretraživanje proteomske baze s ciljem utvrđivanja prisustva uremijskih toksina (UT). Od 453 analizirana proteina utvrđeno je 7 proteina, koji su u literaturi i prema bazama definirani kao uvriježeni UT „srednje” molekulske mase (163). U Tablici 3. prikazani su UT i njihov trend ekspresije u ispitivanim skupinama. Trend porasta ekspresije prema završnom stupnju KBB (KBB5) imalo je 6 od 7 proteina, s različitim omjerom ekspresije u odnosu na kontrolu skupinu (KBB5/ZDR) koja je varirala od 1.47 za angiogenin do maksimalno 6.58 za alfa-1 kiseli glikoprotein 1. Inzulinu sličan čimbenik rasta 1 (IGF-1) imao je trend pada prema KBB-5. Alfa-1 kiseli protein 1 i 2, alfa-1 mikroglobulin te cistatin C imali su daljnji trend povećanja ekspresije prema HD-P skupini, za razliku od PD

skupine u kojoj je ekspresija ova 4 proteina bila podjednaka ekspresiji u hemodijaliznih bolesnika nakon postupka dijalize (HD-N). U TB skupini 4 od 7 proteina imalo je trend pada u odnosu na KBB5, HD-P i PD skupinu. Neovisno o omjeru KBB5/ZDR, 6 od 7 uvriježenih uremijskih toksina, neovisno o tendenciji rasta u završnom stupnju KBB, pokazuje značajnu, naglu promjenu ekspresije proteina u stupnju 2 KBB, kako je ranije prikazano i za izabrane proteine u termo mapi.

Tablica 3. Analiza trenda ekspresije uvriježenih uremijskih toksina u ispitivanim skupinama

UniProt ID	NAZIV PROTEINA	ZDR %	KBB1 %	KBB2 %	KBB3 %	KBB4 %	KBB5 %	HD-P %	HD-N %	PD %	TB %	Prosjeak %	KBB5/ZDR
P02760	Protein AMBP	0,1734	0,1565	0,4685	0,3911	0,2934	0,7393	1,1153	0,6716	0,7776	0,7303	0,5500	4,2630
P03950	Angiogenin	0,0123	0,0288	0,0023	0,0165	0,0115	0,0181	0,0159	0,0251	0,0222	0,0099	0,0160	1,4765
P00746	Čimbenik komplementa D	0,0369	0,0777	0,0196	0,0830	0,0770	0,2330	0,3413	0,4166	0,2546	0,0429	0,1500	6,3185
P01034	Cistatin-C	0,0048	0,0040	0,0015	0,0115	0,0087	0,0217	0,0442	0,0293	0,0323	0,0033	0,0200	4,5239
P02763	Alfa-1-kiseli glikoprotein 1	0,0284	0,0101	0,5677	0,1468	0,0830	0,1872	0,5592	0,0968	0,0715	0,1172	0,1800	6,5864
P19652	Alfa-1-kiseli glikoprotein 2	0,0188	0,0094	0,2294	0,0651	0,0318	0,0545	0,1877	0,0275	0,0289	0,0626	0,0700	2,8911
P05019	Inzulinu sličan čimbenik rasta I	0,0016	0,0032	0,0013	0,0038	0,0015	0,0008	0,0016	0,0009	0,0004	0,0020	0,0020	0,4939

KBB/ZDR – omjer ekspresije između skupina KBB5 i ZDR; prosjeak (%) – prosječna ekspresija proteina; za svaki pojedini protein vrijednost postotka ekspresije u istraživanim skupinama prikazana je crvenom vodoravnom trakom radi boljeg prikaza razlike u ekspresiji između istraživanih skupina

U cilju identificiranja potencijalnih kandidata za nove uremijske toksine provedena je daljnja analiza, koja je uključila izdvajanje proteina, čiji bi profil odgovarao profilu uvriježenih „srednjih” molekula. Za podatke o proteinima korištena je Uniprot baza. Izdvojeni su proteini s trendom porasta u završnom stupnju KBB, uz uvjete da im omjer ekspresije između KBB5 i ZDR iznosi minimalno 1.4, da zadovoljavaju kriterij daljnjeg trenda povećanja ekspresije prema dijalizi (HD-P skupina) te da molekularna masa proteina bude u granicama 0,5-60 kDa prema Durantoni i suradnicima (163). Na ovaj način izdvojena su 57 proteina, od kojih su daljnjim pretraživanjem literature izdvojeni samo oni proteini, koji su u literaturi povezani s bubrežnim bolestima, a ujedno imaju i dokazani sistemski upalni učinak, aterogeni potencijal ili povećavaju rizik od kardiovaskularnih bolesti. Konačno je izdvojeno 15 novih potencijalnih kandidata za UT (Tablica 4 i 5).



Tablica 4. Trend ekspresije potencijalnih kandidata za uremijske toksine

UniProt ID	NAZIV PROTEINA	ZDR %	KBB1 %	KBB2 %	KBB3 %	KBB4 %	KBB5 %	HD-P %	HD-N %	PD %	TB %	Prosjek %	KBB5/ZDR
M0R1Q1	Komplement C3 (fragment)	0,0000	0,0000	0,0000	0,0003	0,0005	0,0005	0,0006	0,0006	0,0003	0,0005	0,0003	np
P11226	Protein C udružen s manozom	0,0008	0,0005	0,0026	0,0010	0,0012	0,0021	0,0021	0,0020	0,0014	0,0026	0,0016	2,4498
Q9Y6Z7	Kolektin-10	0,0006	0,0013	0,0024	0,0017	0,0015	0,0019	0,0025	0,0021	0,0020	0,0018	0,0018	3,0569
P25311	Cink-alfa-2-glikoprotein	0,0002	0,0002	0,0026	0,0008	0,0009	0,0013	0,0033	0,0012	0,0010	0,0017	0,0013	5,5377
P07998	Pankreasna ribonukleaza	0,0009	0,0019	0,0007	0,0035	0,0045	0,0062	0,0151	0,0163	0,0096	0,0102	0,0069	7,0572
P02765	Alfa-2-HS-glikoprotein	0,0163	0,0093	0,3418	0,1302	0,0839	0,1292	0,1463	0,0498	0,0334	0,0801	0,1020	7,9125
P02774	Protein udružen s vitaminom D	0,0418	0,0175	0,7043	0,2833	0,1524	0,2524	0,4807	0,1459	0,0771	0,1906	0,2346	6,0381
P0DJ18	Serumski amiloid A-1	0,0002	0,0007	0,0072	0,0007	0,0022	0,0025	0,0041	0,0027	0,0005	0,0054	0,0026	11,5124
Q66K66	Transmembranski protein 198	0,0029	0,0011	0,0268	0,0088	0,0042	0,0111	0,0377	0,0050	0,0033	0,0161	0,0117	3,8733
P41222	Prostaglandin-H2 D-izomeraza	0,0010	0,0006	0,0020	0,0034	0,0047	0,0058	0,0200	0,0167	0,0104	0,0036	0,0068	5,8695
P07478	Tripsin-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0003	0,0012	0,0006	0,0007	0,0000	0,0003	np
P02766	Transtiretin	0,0241	0,0131	0,1883	0,0494	0,0421	0,0478	0,1545	0,0301	0,0187	0,0979	0,0666	1,9843
P80188	NGAL	0,0000	0,0000	0,0000	0,0003	0,0005	0,0006	0,0033	0,0023	0,0014	0,0000	0,0008	np
H3BPR7	Receptor tirozin-kinaze 3	0,0018	0,0006	0,1311	0,0081	0,0040	0,0172	0,0614	0,0034	0,0019	0,0000	0,0229	9,6401
P28300	Protein-lizin 6-oksidaža	0,0002	0,0000	0,0000	0,0004	0,0004	0,0004	0,0031	0,0013	0,0016	0,0006	0,0008	1,8122

KBB/ZDR – omjer ekspresije između skupina KBB5 i ZDR; prosjek (%) – prosječna ekspresija proteina; za svaki pojedini protein vrijednost postotka ekspresije u istraživanim skupinama prikazana je crvenom vodoravnom trakom radi boljeg prikaza razlike u ekspresiji između istraživanih skupina

Tablica 5. Potencijalni kandidati za uremijske toksine i poveznica s literaturom

UniProt ID	NAZIV PROTEINA	ULOGA U BUBREŽNOJ BOLESTI	REFERENCA	SISTEMSKI UČINAK	REFERENCA
M0R1Q1	Komplement C3 (fragment)	proupalni, profibrogeni	Zhang, 2020 (164)	proaterogeni	Kiss, 2022 (165)
P11226	Protein C udružen s manozom	proupalni, profibrogeni	Satomura, 2010 (166)	↑kardiovaskularni rizik	Poppelaars, 2016 (167)
Q9Y6Z7	Kolektin-10	proupalni, profibrogeni	Qin, 2018 (168)	proaterogeni	Vengen, 2017 (169)
P25311	Cink-alfa-2-glikoprotein	prognostički čimbenik za DN	Elsheikh, 2019 (170)	proaterogeni	Aragonès, 2016 (171)
P07998	Pankreasna ribonukleaza	prognostički čimbenik za ABB	Zechendorf, 2020 (172)	povezanost s KVB	Bedenbender, 2020 (173)
P02765	Alfa-2-HS-glikoprotein	prognostički čimbenik	Kalantary, 2018 (174)	proupalni	Bourebaba, 2019 (175)
P02774	Protein udružen s vitaminom D	prognostički čimbenik za KBB	Denburg, 2015 (176)	proaterogeni	Gasparri C, 2010 (177)
P0DJ18	Serumski amiloid A-1	proupalni, proangiogeni	Liu, 2020 (178)	proangiogeni	Liu, 2020 (178)
Q66K66	Transmembranski protein 198	čimbenik Wnt signalnog puta	Habuka, 2014 (179)	proaterogeni	Weerackoon, 2021 (180)
P41222	Prostaglandin-H2 D-izomeraza	prognostički čimbenik za DN	Bacci, 2015 (181)	prediktor KV rizika	Orenes-Piñero, 2013 (182)
P07478	Tripsin-2	glomerularna lezija	Baricos, 1991 (183)	proaterogeni	Shi, 2020 (184)
P02766	Transtiretin	↑ekspresija u mezangiju	Al-Kafaji, 2010 (185)	proaterogeni	Singhal, 2021 (186)
P80188	NGAL	prognostički čimbenik za ABB	Albert, 2020 (187)	povezanost s KVB	Lindberg, 2016 (188)
H3BPR7	Receptor tirozin-kinaze 3	profibrogeni	Liu, 2016 (189)	proaterogeni	Zhang, 2022 (190)
P28300	Protein-lizin 6-oksidaža	profibrogeni	Niu, 2020 (191)	povezanost s KVB	Rodríguez, 2008 (192)

ABB – akutna bubrežna bolest; KV – kardiovaskularni; KVB – kardiovaskularna bolest; DN – dijabetička nefropatija

#### 5.1.1.4. Analiza proteina s gubitkom ekspresije nakon transplantacije bubrega

Pretraživanjem baze proteina uočeno je da samo 10 od ukupno 453 proteina pokazuju ekspresiju u svim ispitivanim skupinama, osim u skupini nakon transplantacije bubrega (TB).

Tablica 6. Proteini s gubitkom ekspresije u skupini TB

UniProt ID	NAZIV PROTEINA	ZDR %	KBB1 %	KBB2 %	KBB3 %	KBB4 %	KBB5 %	HD-P %	HD-N %	PD %	TB %
Q9HDC9	Protein membrane adipocita	0,0308	0,0424	0,0202	0,0209	0,0224	0,0281	0,0257	0,0200	0,0400	0
H0Y7H7	Protein citokeneze 4	0,0114	0,0081	0,0044	0,0128	0,0063	0,0140	0,0126	0,0191	0,0067	0
P01703	Ig lambda lanac varijabla 1-40	0,0007	0,0006	0,0027	0,0015	0,0026	0,0011	0,0029	0,0030	0,0006	0
Q15063-3	Izoforma 3 periostina	0,0418	0,0304	0,0089	0,0212	0,0103	0,0152	0,0180	0,0138	0,0264	0
P48740-1	MASP-1	0,0017	0,0011	0,0011	0,0014	0,0015	0,0013	0,0006	0,0005	0,0007	0
Q7Z6G3	EF kalcij vezujući protein 2	0,0580	0,0623	0,0122	0,0401	0,0211	0,0813	0,0426	0,0424	0,0531	0
O95497	Panteteinaza	0,0293	0,0365	0,0097	0,0378	0,0276	0,0235	0,0171	0,0176	0,0310	0
H0Y6R4	Čimbenik izmjene gvaninskih nukleotida 1	0,0036	0,0016	0,0007	0,0019	0,0019	0,0020	0,0011	0,0013	0,0021	0
H0YGF6	Citozin deaminaza ssDNA	0,0005	0,0003	0,0003	0,0004	0,0004	0,0005	0,0006	0,0003	0,0002	0
H3BPR7	Receptor tirozin-kinaze 3	0,0018	0,0006	0,1311	0,0081	0,0040	0,0172	0,0614	0,0034	0,0019	0

ssDNA - jednostruka uzvojnica DNA; Ig - imunoglobulin; MASP-1 - serinska proteaza lektina povezanog s mananom; za svaki pojedini protein vrijednost postotka ekspresije u istraživanim skupinama prikazana je crvenom vodoravnom trakom radi boljeg prikaza razlike u ekspresiji između istraživanih skupina

#### 5.1.1.5. Analiza proteina povezanih s izvanstaničnim matriksom

Radi uvida u pojavnost i trend ekspresije proteina iz naše baze, povezanih s izvanstaničnim matriksom (ECM), učinjeno je pretraživanje pojedinačnih proteina uz korištenje podataka iz Uniprot baze proteina te objavljene literature putem Pubmed pretraživača.

Proteini su analizirani prema podskupinama: glikoproteini ekstracelularnog matriksa, kolageni, proteoglikani, ostali proteini povezani s ekstracelularnim matriksom, proteinaze, inhibitori proteinaza i ostali regulatori ekstracelularnog matriksa.

Većina proteina svih navedenih skupina pokazuje značajnu promjenu trenda ekspresije u stupnju KBB2.

Od proteinaza ekstracelularnog matriksa utvrđene su MMP-2 i MMP-9. Nisu utvrđene ADAMTS proteinaze. Od proteinaza iz skupine Disintegrin i metaloproteinaze s motivima trombospondina utvrđen je isključivo protein sličan ADAMTS proteazi 2 (ADAMTSL2), čija je ekspresija bila prisutna u kontrolnoj te skupinama ispitanika na dijalizi.

Izabrani ECM proteini te njihov trend ekspresije prikazan je u Tablici 7.

Tablica 7. Trend ekspresije izabranih proteina povezanih s izvanstaničnim matriksom

UniProt ID	NAZIV PROTEINA	ZDR %	KBB1 %	KBB2 %	KBB3 %	KBB4 %	KBB5 %	HD-P %	HD-N %	PD %	TB %	Prosjeak %
ECM GLIKOPROTEINI												
P02750	LRG	0,0003	0,0000	0,1139	0,0332	0,0219	0,0527	0,0129	0,0069	0,0050	0,0308	0,0278
P02751	Fibronektin	4,0827	4,0184	1,9609	2,8052	2,5204	2,9392	2,6032	3,6586	3,8751	2,9659	3,1430
P23142	Fibulin-1	0,0094	0,0059	0,0046	0,0077	0,0093	0,0049	0,0058	0,0078	0,0103	0,0094	0,0075
Q15582	TGF- $\beta$ ig-h3	0,0135	0,0179	0,0095	0,0165	0,0134	0,0164	0,0197	0,0139	0,0214	0,0198	0,0162
P07996	Trombospondin-1	0,0694	0,0818	0,0440	0,0753	0,0483	0,0943	0,0661	0,0712	0,1271	0,0212	0,0699
P24043	Laminin $\alpha$ -2 podjedinica	0,0006	0,0003	0,0000	0,0004	0,0000	0,0004	0,0000	0,0000	0,0003	0,0000	0,0002
KOLAGENI												
P20908	$\alpha$ -1 lanac kolegena V	0,0047	0,0033	0,0057	0,0058	0,0074	0,0071	0,0095	0,0079	0,0074	0,0062	0,0065
P12111	$\alpha$ -3 lanac kolagena VI	0,0100	0,0171	0,0045	0,0161	0,0143	0,0158	0,0219	0,0188	0,0381	0,0158	0,0172
P39060-1	$\alpha$ -1 lanac kolagena XVIII	0,0165	0,0209	0,0051	0,0223	0,0113	0,0375	0,0463	0,0391	0,0521	0,0123	0,0263
P02461	$\alpha$ -1 lanac kolagena III	0,0022	0,0015	0,0000	0,0004	0,0004	0,0009	0,0012	0,0013	0,0015	0,0004	0,0010
Q05707-1	$\alpha$ -1 lanac kolagena XIV	0,0003	0,0000	0,0000	0,0003	0,0000	0,0003	0,0009	0,0011	0,0010	0,0000	0,0004
PROTEOGLIKANI												
P51884	Lumikan	0,0021	0,0008	0,0398	0,0192	0,0168	0,0206	0,0078	0,0100	0,0047	0,0112	0,0133
Q92954-1	Proteoglikan 4	0,0483	0,0768	0,0248	0,0487	0,0350	0,0256	0,0157	0,0215	0,0260	0,0770	0,0399
P98160	Perlekan	0,0000	0,0000	0,0002	0,0000	0,0000	0,0009	0,0018	0,0021	0,0003	0,0000	0,0005
OSTALI ECM PROTEINI												
Q9NR99	MXRA 5	0,0001	0,0001	0,0022	0,0005	0,0006	0,0011	0,0005	0,0004	0,0008	0,0008	0,0007
P21333	Filamin-A	0,0104	0,0082	0,0034	0,0078	0,0066	0,0061	0,0052	0,0062	0,0130	0,0118	0,0079
Q14520-1	HABP 2	0,1585	0,1413	0,0395	0,1486	0,1120	0,1651	0,0935	0,0993	0,1413	0,1196	0,1219
P08493-1	Matriks Gla	0,0014	0,0013	0,0008	0,0025	0,0014	0,0033	0,0029	0,0016	0,0031	0,0010	0,0019
Q16610	ECM 1	0,7137	0,6078	0,1224	0,4418	0,2275	0,3204	0,3470	0,2458	0,4228	0,2121	0,3661
PROTEINAZE ECM-a												
P08253	MMP 2	0,0209	0,0144	0,0024	0,0139	0,0071	0,0102	0,0127	0,0062	0,0175	0,0061	0,0111
P14780	MMP 9	0,0000	0,0002	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005	0,0001
Q86TH1	ADAMTSL 2	0,0006	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005	0,0005	0,0000	0,0002
INHIBITORI PROTEINAZA												
P01023	$\alpha$ -2 makroglobulin	0,2559	0,2464	4,7757	1,8477	2,1912	1,9817	0,4255	0,3903	0,5175	1,3398	1,3972
P01033	TIMP-1	0,0028	0,0030	0,0008	0,0031	0,0022	0,0034	0,0038	0,0031	0,0043	0,0023	0,0029
P16035	TIMP-2	0,0059	0,0031	0,0006	0,0019	0,0009	0,0022	0,0022	0,0014	0,0038	0,1479	0,0170
OSTALI REGULATORI ECM-a												
P16070	CD44 antigen	0,0002	0,0000	0,0027	0,0006	0,0004	0,0007	0,0022	0,0003	0,0002	0,0006	0,0008
O14786-1	Neuropilin-1	0,0078	0,0092	0,0729	0,0152	0,0098	0,0188	0,0678	0,0113	0,0183	0,0097	0,0241
P36955	PEDF	0,4170	0,7493	0,2710	0,8406	0,7102	1,0759	1,2048	1,0453	1,6273	0,7034	0,8645
Q15113	PCPE-1	0,0023	0,0067	0,0014	0,0067	0,0047	0,0082	0,0080	0,0092	0,0120	0,0068	0,0066

MXRA 5 - protein povezan s pregradnjom matriksa 5, HABP 2 - protein vezan uz hijaluronan 2, ECM 1 - protein izvanstaničnog matriksa 1, MMP - matriks metaloproteinaza, ADAMTSL2 - protein sličan disintegrin i metaloproteinazi s motivom trombospondina, 2, TIMP - tkivni inhibitori matriks metaloproteinaza, PEDF - pigmentni čimbenik podrijetlom iz epitela, PCPE-1 - pojačivač prokolagen C-endopeptidaze; za svaki pojedini protein vrijednost postotka ekspresije u istraživanim skupinama prikazana je crvenom vodoravnom trakom radi boljeg prikaza razlike u ekspresiji između istraživanih skupina

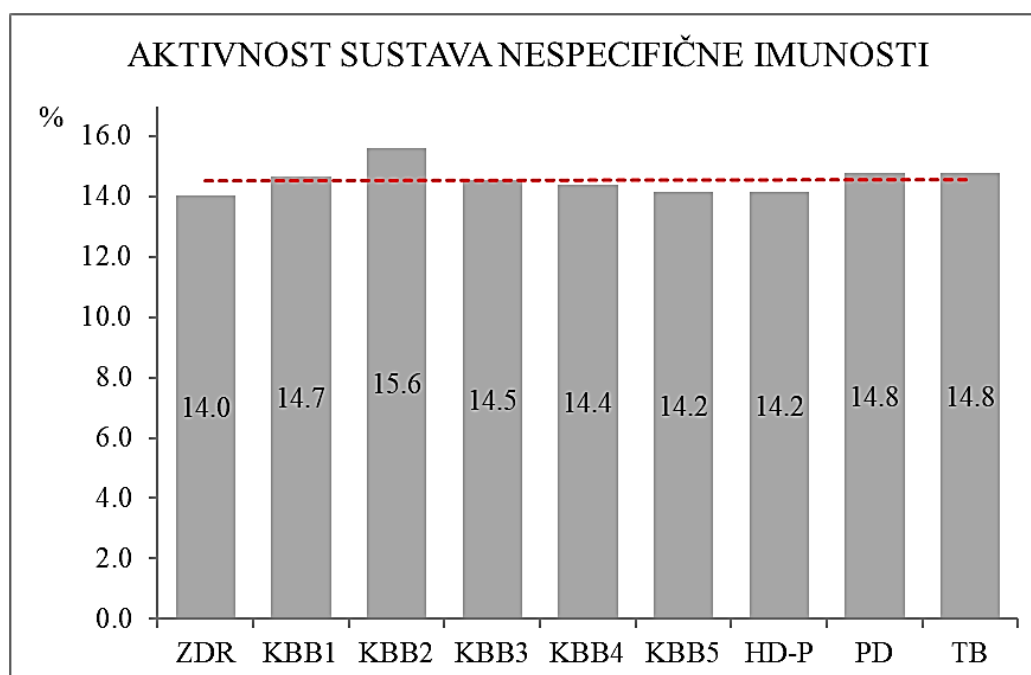
### 5.1.2. Analiza ekspresije signalnih puteva proteina obogaćena analizom gena

Analiza ekspresije signalnih puteva proteina obogaćena analizom gena učinjena je usporedbom udjela seta naše baze podataka s pozadinskim setom gena u Funrich programskoj podršci (Funrich 3.1.1.), dostupnoj putem internetske poveznice. Značajnost ekspresije u ovom programu utvrđena je hipergeometrijskim testiranjem, uz Bonferronijevu korekciju. Statistički značajna ekspresija utvrđena je za pojedine signalne puteve u sklopu imunološkog odgovora, zatim međustanične i komunikacije stanica s izvanstaničnim prostorom osobito putem sustava integrina, pojedinih dijelova kaskade koagulacijskog sustava, kao i metaboličkih puteva lipida i glukoregulacije te posttranslacijskog procesuiranja proteina. U tablici 8. prikazani su svi statistički značajni signalni putevi, naveden je udio seta gena za svaki signalni put za sve ispitivane skupine. Sivom bojom je označen značajniji trend odstupanja u pojedinom stupnju KBB. Najznačajnije promjene trenda ekspresije vidljive su u KBB2 stupnju za aktivnost kaskade komplementa, nespecifičnog imunološkog odgovora, interakcija posredovane integrinima i unutrašnjeg koagulacijskog puta. U ranim stadijima značajnije se mijenja i ekspresija lipidnog metabolizma, a najizraženija promjena ekspresije metabolizma lipoproteina te razgradnje, mobilizacije i transporta lipida događaju se u skupini s transplantiranim bubregom. Grafički su prikazani trendovi ekspresije u ispitivanim skupinama za sustav nespecifične imunosti (Slika 4a.), kaskadu komplementa (Slika 4b.), metabolizam lipoproteina (Slika 5.) i aktivaciju hemostaze (Slika 6.)

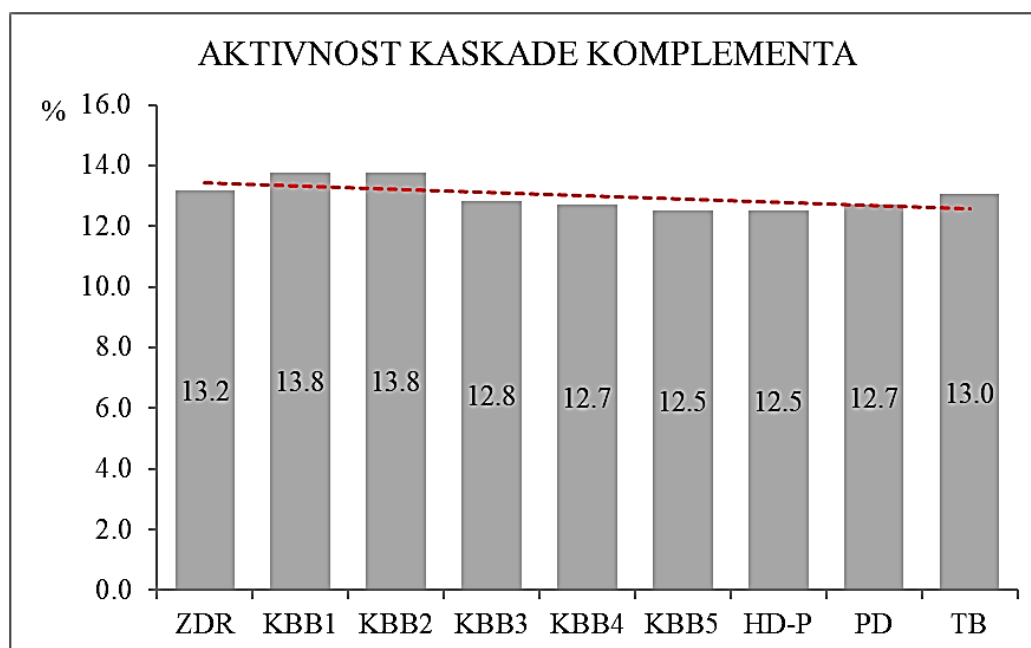
Tablica 8. Ekspresija statistički značajnih signalnih puteva proteina obogaćenih genima

	ZDR	KBB1	KBB2	KBB3	KBB4	KBB5	HD-P	PD	TB
	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Interakcije posredovane $\beta$ 2 integrinima	6,14035	<b>5,50459</b>	<b>6,42202</b>	5,98291	5,9322	5,83333	5,83333	5,9322	6,08696
Interakcije posredovane $\beta$ 3 integrinima	6,14035	<b>6,422</b>	<b>6,422</b>	5,98291	5,9322	5,83333	5,83333	5,9322	6,08696
Interakcije posredovane integrinima	7,89474	<b>8,25688</b>	<b>7,33945</b>	7,69231	0	7,5	0	7,62712	0
Integrini uključeni u angiogenezu	0	0	0	0	6,77966	0	0	0	6,95652
<b>Ukupna aktivnost imunološkog sustava</b>	<b>21,0526</b>	<b>0</b>	<b>22,0184</b>	<b>21,3675</b>	<b>21,1864</b>	<b>20,8333</b>	<b>20,8333</b>	<b>20,339</b>	<b>21,7391</b>
<b>Aktivnost nespecifične imunosti</b>	<b>14,0351</b>	<b>14,6789</b>	<b>15,5963</b>	<b>14,5299</b>	<b>14,4068</b>	<b>14,1667</b>	<b>14,1667</b>	<b>14,4068</b>	<b>14,7826</b>
Aktivacija klasičnog puta komplementa	4,38596	4,58716	4,58716	4,2735	4,23729	4,16667	4,16667	4,23729	4,34783
Aktivnost kaskade komplementa	13,1579	<b>13,7615</b>	<b>13,7615</b>	12,8205	12,7119	12,5	12,5	12,7119	13,0435
Inicijalno pokretanje puta komplementa	7,89474	<b>8,2569</b>	<b>8,2569</b>	7,69231	7,62712	7,5	7,5	7,62712	7,82609
Aktivnost terminalnog puta komplementa	5,26316	<b>5,5046</b>	<b>5,5046</b>	5,12821	5,08475	5	5	5,08475	5,21739
Stvaranje C4 i C2 aktivatora	5,26316	<b>5,5046</b>	<b>5,5046</b>	5,12821	5,08475	5	5	5,08475	5,21739
Transport posredovan hilomikronima	6,14035	<b>6,422</b>	<b>6,422</b>	5,98291	5,9322	6,66667	6,66667	6,77966	5,21739
HDL-om posredovani transport lipida	6,14035	<b>6,422</b>	<b>6,422</b>	5,98291	5,9322	5,83333	5,83333	5,9322	6,08696
Razgradnja, mobilizacija i transport lipida	8,77193	<b>9,1743</b>	<b>9,1743</b>	8,54701	8,47458	9,16667	9,16667	9,32203	<b>7,82609</b>
Metabolizam lipoproteina	8,77193	<b>9,1743</b>	<b>9,1743</b>	8,54701	8,47458	9,16667	9,16667	9,32203	<b>7,82609</b>
Epitelno-mezenhimalna tranzicija	14,0351	<b>13,761</b>	<b>13,761</b>	13,6752	13,5593	13,3333	14,1667	13,5593	13,913
Stvaranje fibrinskog ugruška	18,4211	18,3486	18,3486	17,9487	17,7966	17,5	17,5	17,7966	18,2609
Razgradnja fibrinskog ugruška	3,50877	3,66973	3,66973	3,4188	3,38983	3,33333	3,33333	3,38983	3,47826
Hemostaza	28,0702	<b>28,44</b>	<b>28,44</b>	27,3504	27,1186	26,6667	26,6667	27,1186	27,8261
Intrinzički put koagulacije	10,5263	<b>11,0092</b>	<b>11,0092</b>	10,2564	10,1695	10	10	10,1695	10,4348
Degranulacija trombocita	5,26316	5,50459	0	5,12821	5,08475	5	5	5,08475	5,21739
Regulacija putem čimbenika IGF	7,89474	<b>8,2569</b>	<b>8,2569</b>	7,69231	7,62712	7,5	7,5	7,62712	7,82609
Putevi povezani sa šećernom bolesti	13,1579	12,844	<b>13,7615</b>	12,8205	12,7119	12,5	12,5	12,7119	13,0435
Post-translacijske modifikacije proteina	4,38596	0	4,58716	4,2735	4,23729	4,16667	4,16667	4,23729	4,34783
Aktivacija $\gamma$ -karboksiliranih proteina	4,38596	<b>3,66973</b>	4,58716	4,2735	4,23729	4,16667	4,16667	4,23729	4,34783
$\gamma$ -karboksilacija, prijenos i aktivacija	4,38596	0	4,58716	4,2735	4,23729	4,16667	4,16667	4,23729	4,34783
Transport prekursora iz ER u GT	4,38596	<b>3,66973</b>	4,58716	4,2735	4,23729	4,16667	4,16667	4,23729	4,34783

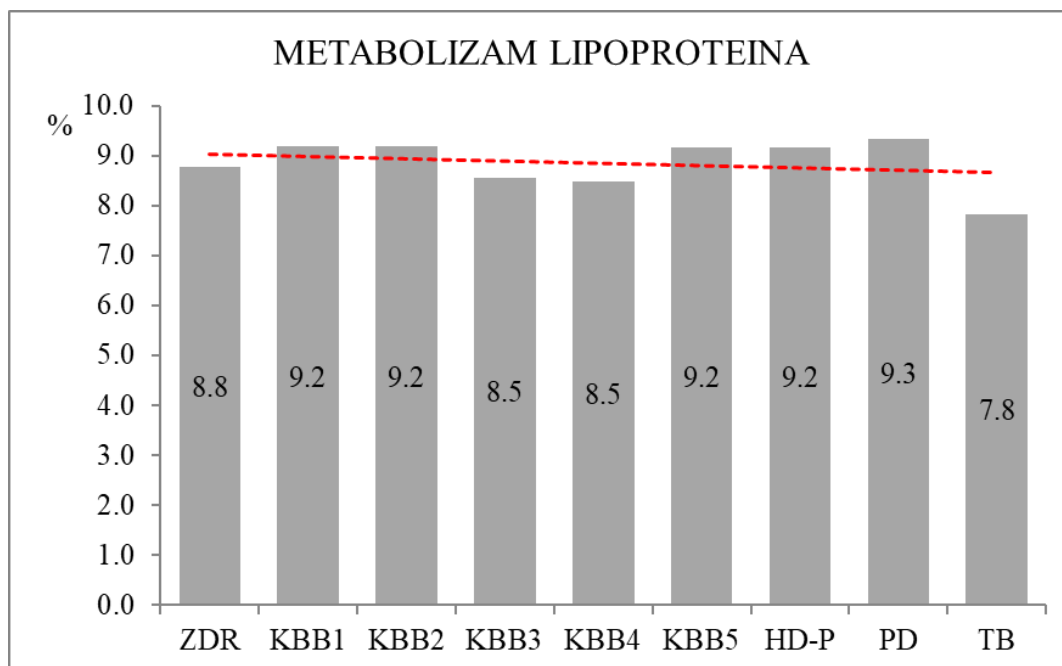
a)



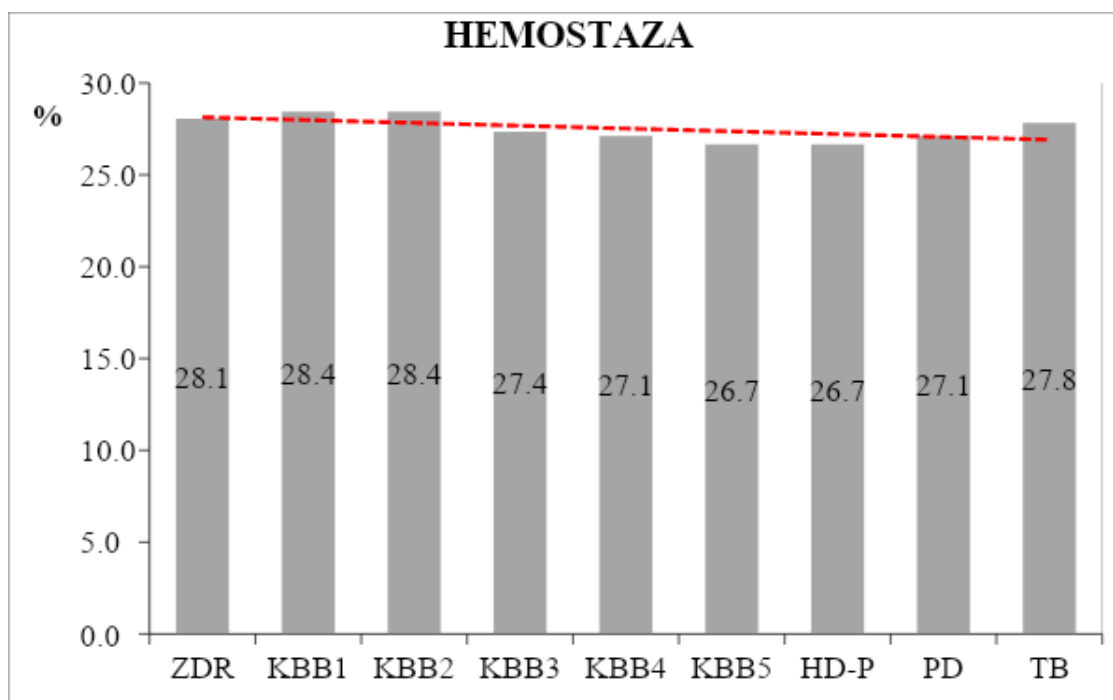
b)



Slika 4a i 4b. Prikazana je aktivnost signalnih puteva: a) nespecifičnog imunološkog odgovora i b) kaskade komplementa u skupinama. Postotak (%) označava udio ekspresije proteina baze podataka dobivene istraživanjem u pozadinskom setu gena programske podrške Funrich. Crvena linija prikazuje linearni trend kretanja ekspresije. Vidljiva je tendencija porasta trenda u stupnju KBB2 za nespecifični imunološki odgovor te KBB1 i 2 za kaskadu komplementa.



Slika 5. Prikazana je aktivnost signalnih puteva metabolizma apolipoproteina. Postotak (%) označava udio ekspresije proteina baze podataka dobivene istraživanjem u pozadinskom setu gena programske podrške Funrich. Crvena linija prikazuje linearni trend kretanja ekspresije. Vidljiva je tendencija porasta trenda u ranom stadiju KBB te ponovo u ESRD, sa značajnim padom ekspresije u TB skupini.





Slika 6. Prikazana je aktivnost signalnih puteva povezanih s hemostazom. Postotak (%) označava udio ekspresije proteina baze podataka dobivene istraživanjem u pozadinskom setu gena programske podrške Funrich. Crvena linija prikazuje linearni trend kretanja ekspresije. Vidljiva je tendencija porasta trenda ekspresije ranim stadijima KBB i pad prema ESRD.

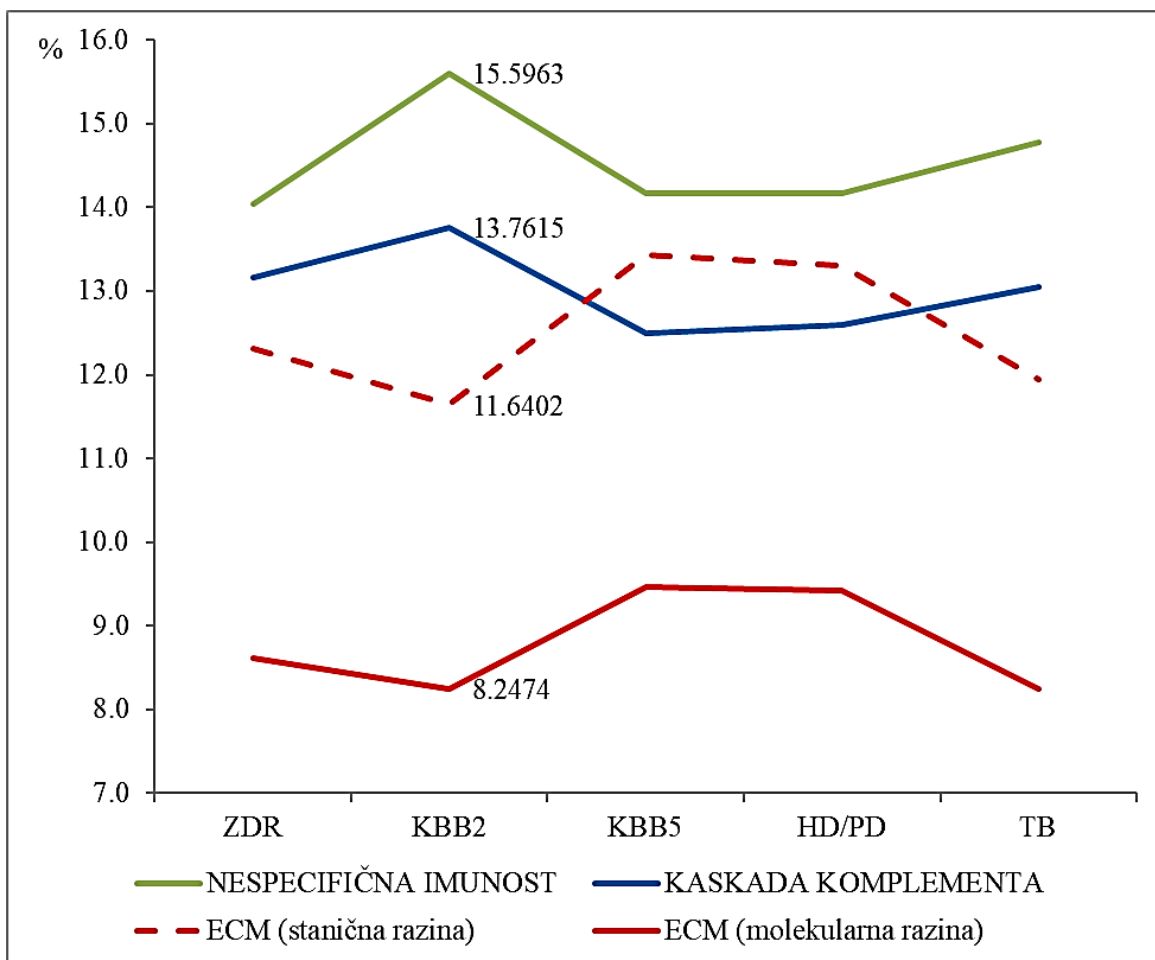
Iz analize ekspresije objedinjenih bioloških puteva za specifične skupine proteina obogaćenih izražajem gena izdvojeni su podaci za skupine proteina povezanih s izvanstaničnim matriksom: ukupni izražaj cijelog izvanstaničnog sustava na staničnoj razini (EC sustav), objedinjeni izražaj sastavnica izvanstaničnog matriksa na staničnoj i molekularnoj razini, objedinjeni izražaj inhibitora proteinaza i metaloproteinaza na molekularnoj razini. Usporedbom udjela seta naše baze podataka s pozadinskim setom gena u Funrich programskoj podršci, izražaj cijelog izvanstaničnog sustava, objedinjenih sastavnica ECM-a na staničnoj i molekularnoj razini te inhibitora proteaza na molekularnoj razini bili su statistički značajni ( $p < 0.0001$ ), za razliku od izražaja metaloproteinaza koji nije bio statistički značajan ( $p > 0.05$ ). Trend izražaja za objedinjene sastavnice ECM-a na staničnoj i molekularnoj razini značajnije pada u stupnju KBB2 u odnosu na kontrolnu ZDR skupinu. Rezultati su prikazani u Tablici 9.

Tablica 9. Analiza ekspresije bioloških puteva proteina ECM-a obogaćenih izražajem gena

	ZDR %	KBB1 %	KBB2 %	KBB3 %	KBB4 %	KBB5 %	HD-P %	PD %	TB %
EC (stanična razina)	77,8325	78,5714	80,9238	77,0334	77,7777	76,8518	77,9816	77,7777	79,1044
ECM (stanična razina)	12,3152	12,2449	<b>11,6402</b>	12,4401	12,0772	13,4259	13,3027	13,4259	11,9403
ECM (molekularna razina)	8,6124	8,9552	<b>8,2474</b>	8,8785	8,0188	9,4594	9,417	9,9547	8,2524
INHIBITORI PROTEINAZA	6,6985	6,9651	6,701	7,0093	7,0754	6,7567	6,7264	6,3348	7,2815
METALOPROTEINAZE *	0.4785	0.9950	10.309	0.9345	14.159	0.9009	0.4484	0.4524	14.563

Postotak (%) označava udio ekspresije gena ECM-a ispitivanih skupina u pozadinskom setu gena programske podrške Funrich. Značajnost ekspresije utvrđena je hipergeometrijskim testiranjem, uz Bonferronijevu korekciju. Svi navedeni putevi su bili značajno izraženi u ispitivanim skupinama osim metaloproteinaza označenih zvjezdicom (\*). Sivom bojom je prikazan izraženiji trend pada izražaja u KBB2.

Na Slici 7. objedinjen je prikaz trend ekspresije sastavnica ECM-a na staničnoj i molekularnoj razini sa sustavom nespecifične imunosti i kaskade komplementa. Vidljiva je značajna promjena trenda ekspresije sustava ECM-a i imunološkog sustava u stupnju KBB2, s različitim smjerom kretanja ekspresije. Oštri pad trenda ekspresije ECM sustava istovremeno prati vidljivi porast ekspresije sustava nespecifičnog imunološkog odgovora i kaskade komplementa. Prema ESRD odnosi se mijenjaju u suprotnom smjeru, s ponovnom tendencijom značajne promjene smjera u TB skupini.

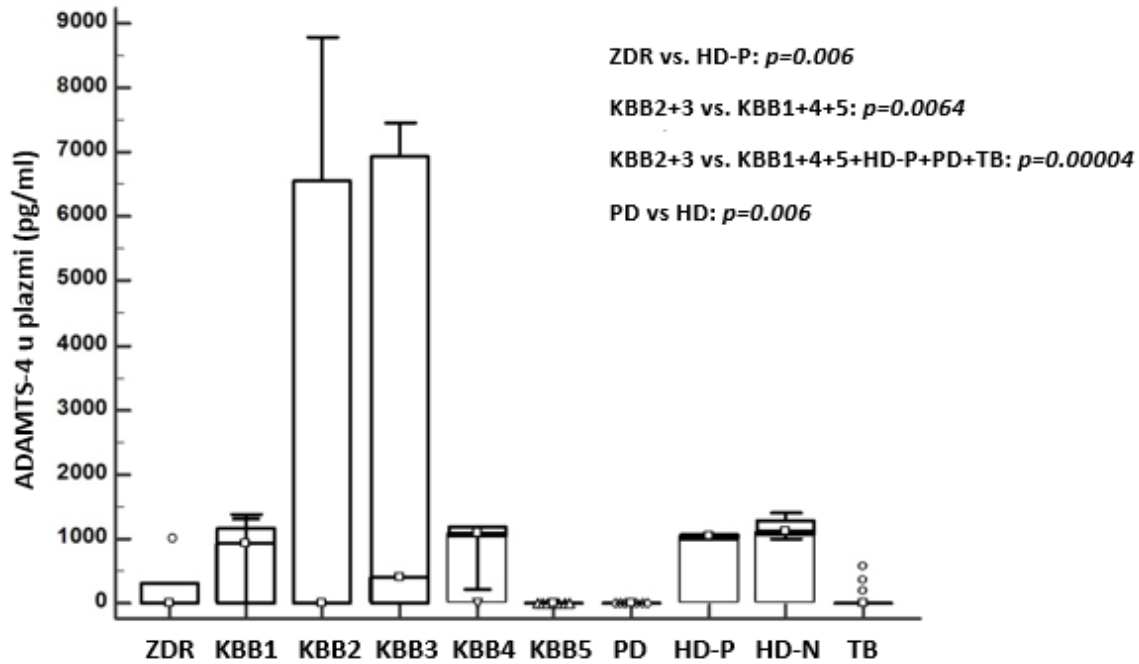


Slika 7. Prikaz odnosa signalnih puteva imunološkog sustava i aktivnosti ECM-a u KBB. Postotak (%) označava udio ekspresije proteina baze podataka dobivene istraživanjem u pozadinskom setu gena programske podrške Funrich.

### 5.1.3. ELISA analiza detekcije i distribucije ADAMTS-4 u ispitivanim skupinama

Analizirani su uzorci plazme i mokraće ukupno 79 ispitanika: 32 u stupnjevima KBB1-KBB5, 7 iz PD skupine, 5 iz HD skupine, 30 iz TB skupine te 5 zdravih ispitanika iz ZDR skupine. Protein ADAMTS-4 utvrđen je ELISA analizom u krvi i mokraći bolesnika s KBB.

Distribucija koncentracija ADAMTS-4 proteina u plazmi ispitanika prikazana je na Slici 8.



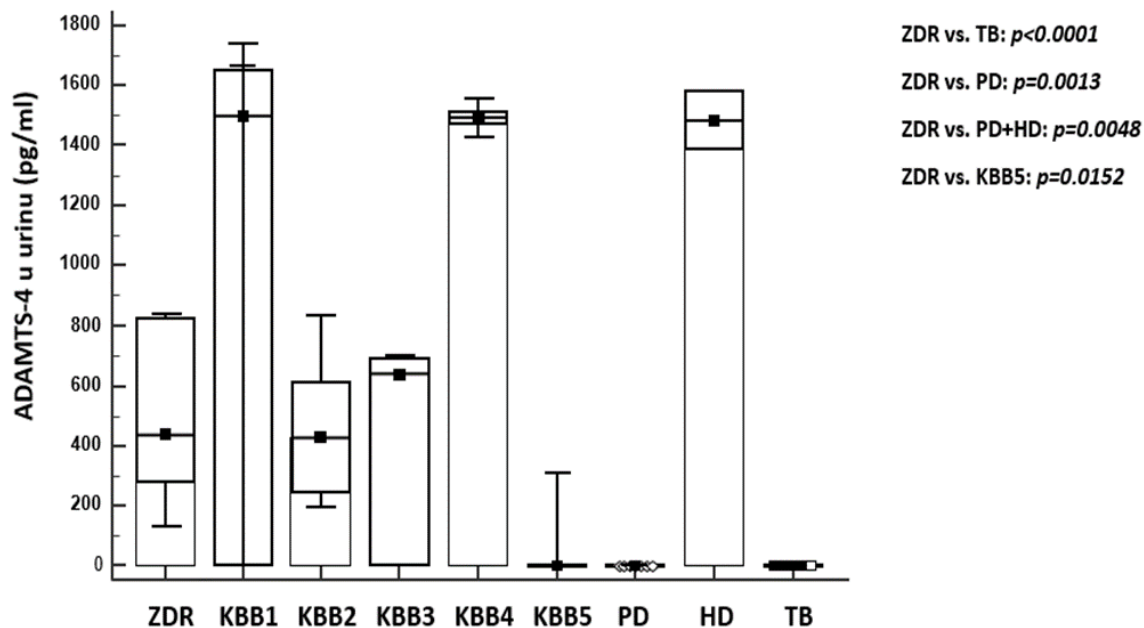
Slika 8. Distribucija koncentracije ADAMTS-4 u plazmi ispitanika prema skupinama

Na slici je prikazan graf distribucije vrijednosti koncentracija izražene kao medijan sa stupnjem pogreške unutar 95% intervala pouzdanosti. Multiple varijable u kutijastom dijagramu prikazane su pravokutnicima koji predstavljaju vrijednosti između gornje i donje kvartile (25 do 75 percentila), srednja linija predstavlja medijan, a linije se protežu od maksimalne do minimalne vrijednosti. Vrijednosti niže ili više od 1,5 puta interkvartilnog razmaka od donje i gornje kvartile smatraju se značajnim odstupanjima i prikazane su točkicama. Statistički značajne razlike među skupinama prikazane su na slici.

Koncentracija proteina ADAMTS-4 u plazmi značajno je varirala među skupinama ispitanika u različitim stupnjevima KBB i nije utvrđena povezanost koncentracije s napredovanjem KBB. Pratio se trend porasta koncentracije od stupnja KBB1 do KBB3, nakon čega se koncentracije smanjuju te je ADAMTS-4 odsutan u ispitanika u stupnju KBB5. Usporedbom najviših

koncentracija ADAMTS-4 između pojedinih skupina s KBB (KBB 1-5, PD, HD, TB) i skupine zdravih ispitanika (ZDR), značajna razlika utvrđena je samo između ZDR i HD skupine (ZDR vs. HD-P; 226 vs. 1032.6;  $p=0.006$ ). Međusobnom usporedbom plazmatskih koncentracija ADAMTS-4 među skupinama s KBB nije nađeno značajne razlike niti za jednu usporedbu ( $p>0.05$ ). Najviše koncentracije ADAMTS-4 utvrđene su u stupnjevima KBB2 i KBB3, a one su se značajno razlikovale od koncentracija ostalih stupnjeva KBB promatranih zajedno (KBB2+3 vs. KBB1+4+5; 2925.1 vs. 613.6;  $p=0.0064$ ) kao i od najviših koncentracija svih ispitivanih skupina zajedno (KBB2+3 vs. KBB1+4+5+HD-B+PD+TB;  $p=0.00004$ ). U skupinama na dijalizi niti jedan ispitanik liječen peritonejskom dijalizom nije imao detektabilni ADAMTS-4 u plazmi, za razliku od ispitanika liječenih hemodijalizom čije su najviše koncentracije ADAMTS-4 u plazmi prije postupka dijalize iznosile 1032.6 pg/ml (PD vs. HD;  $p<0.00001$ ). Koncentracija ADAMTS-4 proteina nije se značajno mijenjala tijekom postupka hemodijalize, što ukazuje da se ADAMTS-4 nije odstranjivao porama filtera (HD-P vs. HD-N; 1032.6 vs. 1171;  $p=0.084$ ). U skupini bolesnika s transplantiranim bubregom samo tri od ukupno 30 ispitanika imalo je detektabilan ADAMTS-4 u plazmi.

ADAMTS-4 bio je prisutan u mokraći u ZDR skupini s medijanom koncentracije 512 pg/ml. Prisutna je značajna varijabilnost njegove koncentracije u urinu među skupinama i nema korelacije s progresijom KBB. Najviše koncentracije zabilježene su u stupnjevima KBB1 i KBB4 (KBB1- 893 pg/ml i KBB4 1491 pg/ml). Nije bilo značajne razlike među skupinama. Kao i u plazmi, koncentracija ADAMTS-4 u mokraći smanjuje se prema ESRD. Svi ispitanici PD skupine su imali održanu diurezu, a ADAMTS-4 nije utvrđen u mokraći niti jednog od tih ispitanika. U HD skupini samo su dva bolesnika imala održanu diurezu i u oba je ADAMTS-4 bio prisutan u mokraći s medijanom koncentracije 1483.5 pg/ml. Ni u jednog od 30 ispitanika TB skupine ADAMTS-4 nije utvrđen u urinu. Distribucija koncentracija ADAMTS-4 proteina u urinu ispitivanih skupina prikazana je na Slici 9.



Slika 9. Distribucija koncentracije ADAMTS-4 u mokraći ispitanika prema skupinama.

Na slici je prikazan graf distribucije vrijednosti koncentracija izražene kao medijan sa stupnjem pogreške unutar 95% intervala pouzdanosti. Multiple varijable u kutijastom dijagramu prikazane su pravokutnicima, koji predstavljaju vrijednosti između gornje i donje kvartile (25 do 75 percentila), srednja linija predstavlja medijan, a linije se protežu od maksimalne do minimalne vrijednosti. Vrijednosti niže ili više od 1,5 puta interkvartilnog razmaka od donje i gornje kvartile smatraju se značajnim odstupanjima i prikazane su točkicama. Statistički značajne razlike među skupinama prikazane su na slici.

U ispitanika skupina KBB1 do KBB5 testirana je razlika u plazmatskoj i urinskoj koncentraciji ADAMTS-4 proteina ovisno o prisutnosti primarne bolesti glomerula kao osnovne bubrežne bolesti, neovisno o stupnju KBB. Nije bilo statistički značajne razlike među ispitivanim skupinama (KBB1-5 sa GN vs. KBB1-5 bez GN, 1934 vs. 398;  $p = 0.09538$  za plazmu i KBB1-5 sa GN vs. KBB1-5 bez GN, 630 vs. 629;  $p = 0.99622$  za mokraću). Ista usporedba učinjena je samo za skupine KBB1-3, s obzirom na aktivnost bolesti u tim stupnjevima bolestima te također nije utvrđena statistički značajna razlika među skupina (KBB 1-3 sa GN vs. KBB1-3 bez GN;  $p = 0.2443$  za plazmu i  $p = 0.9398$  za mokraću).

Za skupine KBB1-5 testirane su razlike u koncentracijama ADAMTS-4 u plazmi i urinu ovisno o prisutnosti komorbiditeta iz tablice 1 (arterijska hipertenzija, šećerna bolest, ateroskleroza, hiperlipidemija, pušenje) te nije bilo statistički značajne razlike (za sve usporedbe  $p > 0.05$ ).

Također je u skupinama KBB1-5 testirana razlika u koncentraciji ADAMTS-4 proteina u plazmi i urinu ovisno o uzimanju imunosupresivne terapije te nije bilo značajne razlike među skupinama s imunosupresivnom terapijom ili bez nje.

## 5.2. Imunohistokemijska analiza ADAMTS-4 i BMP-1 proteina u tkivima bubrega

Imunohistokemijski izražaj proteina ADAMTS-4 analiziran je u biopsijskim uzorcima bubrežnog tkiva: 8 uzoraka bubrežnog tkiva bez KBB (KTR skupina), 19 uzoraka nativnih bubrega (NBB) i 34 uzoraka transplantiranih bubrega (TBB). U svakom uzorku analiziran je IHC izražaj proteina u 6 tkivnih odjeljaka: peritubularne kapilare-PTC, intersticijska stroma-INT, glomerularne kapilare-GC, Bowmanova čahura-BW, proksimalni tubuli-PXT, distalni tubuli-DT. Kao usporedba, na serijskim rezovima tkiva učinjena je imunohistokemijska analiza na BMP-1, molekulu s dokazanim profibrogenim učinkom.

### 5.2.1. Distribucija ADAMTS-4 i BMP-1 proteina u tkivnim odjeljcima bubrega s KBB

Analizirana je distribucija frekvencija ispitanika s pozitivnim imunohistokemijskim izražajem ADAMTS-4 i BMP-1 u svakom od promatranih 6 odjeljaka bubrežnog tkiva za tri skupine ispitanika bolesnika: KTR, NBB i TBB. Testirane su razlike u frekvencijama između skupina s KBB (NBB ili TBB) i kontrolne skupine bez KBB (KTR), kao i razlike u frekvencijama između dviju podskupina unutar KBB skupina: početne KBB (pKBB) koja obuhvaća stupnjeve KBB1 i 2 (eGFR > 60 ml/min) te razvijene KBB (rKBB) koja obuhvaća stupnjeve KBB3-5 (eGFR < 60 ml/min). Kliničke osobine ispitanika, uključenih u ovaj dio istraživanja, prikazane su u Tablici 10.

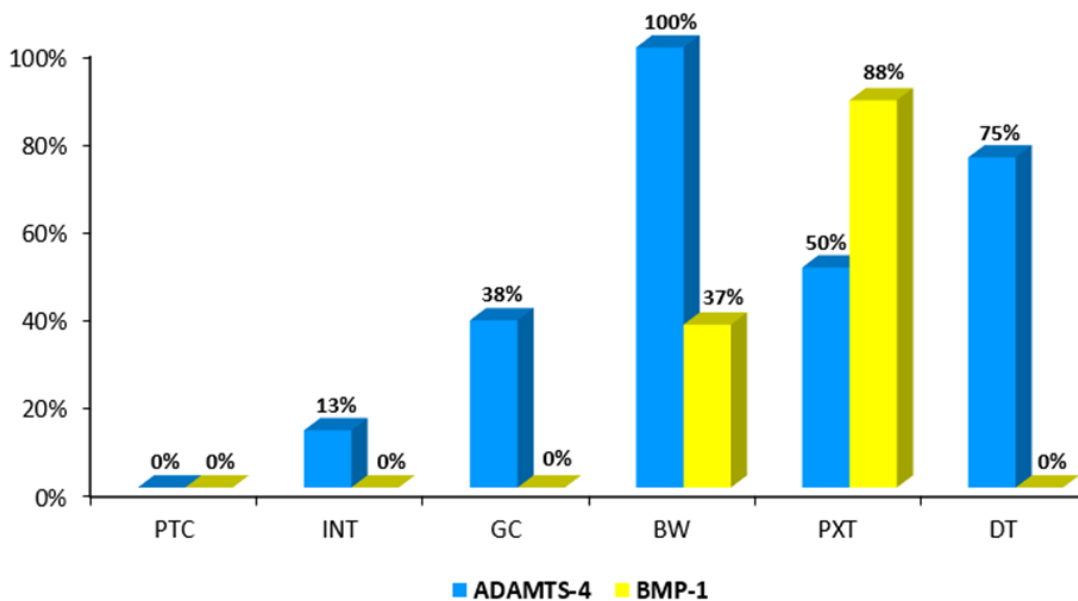
Tablica 10. Kliničke osobine ispitanika za imunohistokemijsku analizu biopsija bubrega

	KTR	NBB	TBB	PAROVI	
				TBB	TBB0
N	8	19	34	15	15
Dob (godine)	53±13	43±17	50±16	51±44	51±7
Spol ženski N (%)	6(75)	12(63)	6(18)	1(7)	9(60)
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	24.3±4.6	26.1±5.7	27.1±5.4	27.9±18.5	25.6±2.2
eGFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	108±28	56±36	37±16	38±64	91±22
Proteinurija (g/24h)	np	3.27±2.7	1.53±1.5	1.22±5.46	Np
<b>KBB n (%)</b>					
bez KBB	8(100)	0(0)	0(0)	0(0)	14(93)
KBB1	0(0)	5(26.3)	0(0)	0(0)	1(6.7)
KBB2	0(0)	4(21.1)	3(8.8)	1(6.7)	0(0)
KBB3	0(0)	2(10.5)	20(58.8)	9(60)	0(0)
KBB4	0(0)	6(31.6)	10(29.4)	5(33.3)	0(0)
KBB5	0(0)	2(10.5)	1(2.9)	0(0)	0(0)
<b>KLINIČKE OSOBINE n (%)</b>					
Arterijska hipertenzija	4(50)	12(63.2)	31(91.2)	13(86.6)	6(40)
Šećerna bolest	0(0)	0(0)	9(26.5)	5(33.3)	0(0)
Hiperlipidemija	0(0)	9(47.4)	13(38.2)	5(33.3)	0(0)
Ateroskleroza	0(0)	2(10.5)	8(13.6)	14(93.3)	0(0)
Pušenje	0(0)	6(31.6)	5(14.7)	1(6.7)	1(6.7)
<b>HISTOLOŠKA DIJAGNOZA n (%)</b>					
Uredan nalaz	8(100)	0(0)	2(5.8)	2(13.3)	13(86.6)
Glomerularna BB	0(0)	17(89.5)	4(11.7)	1(6.6)	0(0)
Hipertenzivna BB	0(0)	1(5.3)	0(0)	0(0)	0(0)
ANCA vaskulitis	0(0)	1(5.3)	0(0)	0(0)	0(0)
TCR	0(0)	0(0)	2(5.8)	1(6.6)	0(0)
ABMR	0(0)	0(0)	5(14.7)	1(6.6)	0(0)
TCR+ABMR	0(0)	0(0)	4(11.7)	1(6.6)	0(0)
BK nefropatija	0(0)	0(0)	3(8.8)	3(20)	0(0)
Nespecifično	0(0)	0(0)	14(41.1)	6(40)	2(13.3)
ATO	6(75)	5(26.3)	8(23.5)	3(20)	8(53.3)

N - ukupan broj bolesnika u skupini; n - broj ispitanika s promatranim obilježjem; np. - nije primjenjivo; BB - bubrežna bolest; TCR - odbacivanje posredovano T-limfocitima; ABMR - odbacivanje posredovano protutijelima; TCR+ABMR - kombinirano odbacivanje; BK nefropatija - BK virusom uzrokovana nefropatija; Nespecifično - nespecificirane kronične promjene ili promjene bez kriterija za specifičnu dijagnozu; ATO - akutno tubularno oštećenje

### 5.2.1.1. Distribucija proteina ADAMTS-4 i BMP-1 u skupini KTR

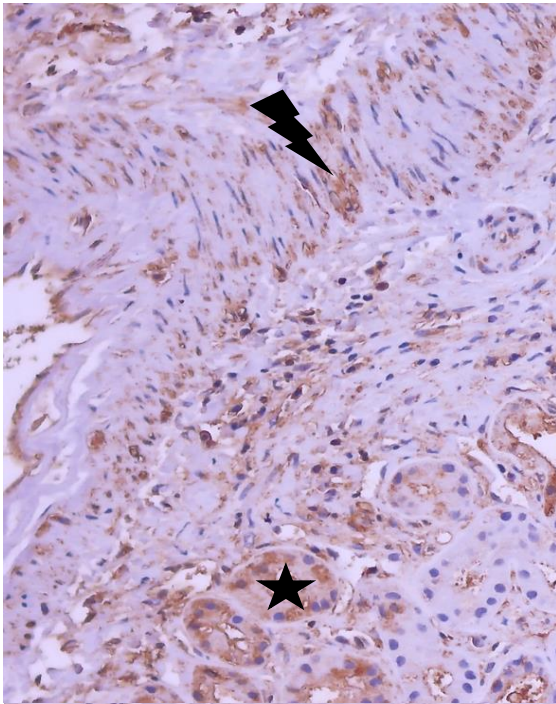
Distribucija frekvencija za oba proteina u skupini KTR (skupina ispitanika bez KBB) prikazana je na Slici 10. BMP-1 je u KTR bio izražen samo u odjeljku proksimalnih tubula (88% ispitanika) i Bowmanove čahure (37% ispitanika). Za razliku od proksimalnih tubula, distalni tubuli bili su negativni za BMP-1 u svih ispitanika skupine KTR. Također, niti jedan ispitanik nije imao izražen BMP-1 u području bubrežnog intersticija (PTC i INT), niti u odjeljku GC-a. ADAMTS-4 je u skupini KTR bio najizraženiji u području Bowmanove čahure (100% ispitanika) te, za razliku od BMP-1, i u području distalnih tubula (75% ispitanika). Za razliku od BMP-1, ADAMTS-4 bio je izražen u odjeljku GC-a u 38% ispitanika. U području bubrežnog intersticija ADAMTS-4 bio je izražen samo u jednog ispitanika (1/8; 13%), i to isključivo u području intersticijske strome (INT), dok je odjeljak PTC-a u svih ispitanika bio imunohistokemijski negativan na ADAMTS-4. Na Slici 11. prikazano je IHC bojenje ADAMTS-4 u jednog ispitanika skupine KTR i u pozitivnoj IHC kontroli.



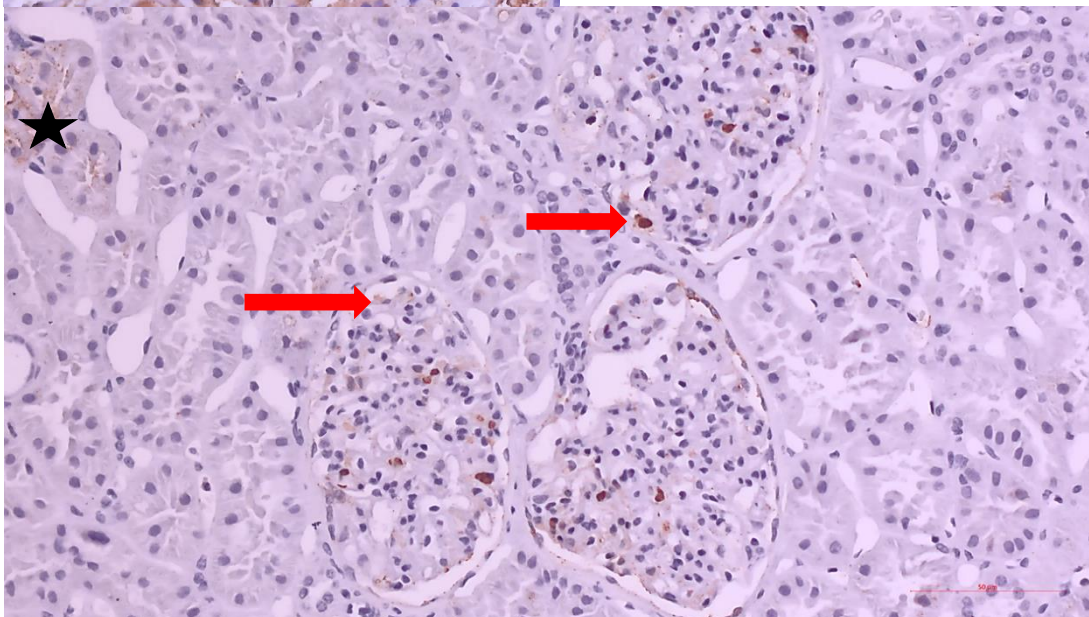
Slika 10. Distribucija ADAMTS-4 i BMP-1 u KTR (kontrolna skupina bez KBB)

Prikazana je učestalost IHC izražaja oba proteina u 6 odjeljaka bubrežnog tkiva. PTC-peritubularne kapilare, INT-intersticijska stroma, GC-glomerularne kapilare, BW-Bowmanova čahura, PXT-proksimalni tubuli, DT-distalni tubuli





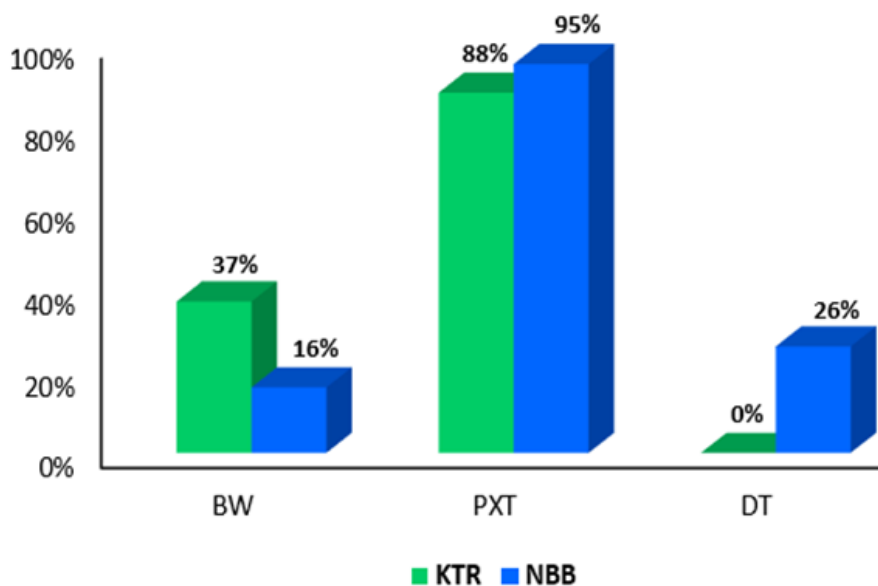
Slika 11. a) Pozitivna kontrola za IHK Prikazano je IHK bojanje ADAMTS-4 proteina u stijenci veće krvne žile bubrežnog tkiva (crna isprekidana strelica). PXT pozitivan na ADAMTS-4 označen je crnom zvjezdicom. Pozitivna kontrola učinjena je temeljem ranije opisanog IHK izražaja molekule u stijenci karotidne arterije (138).



Slika 11. b) Imunohistokemijsko bojenje na ADAMTS-4 u tkivu bubrega bez KBB (KTR) Vidljiv je IHK pozitivitet u nekim od glomerularnih kapilara (GC) označeno crvenom strelicom i pozitivitet u proksimalnom tubulu (PXT) označen crnom zvjezdicom

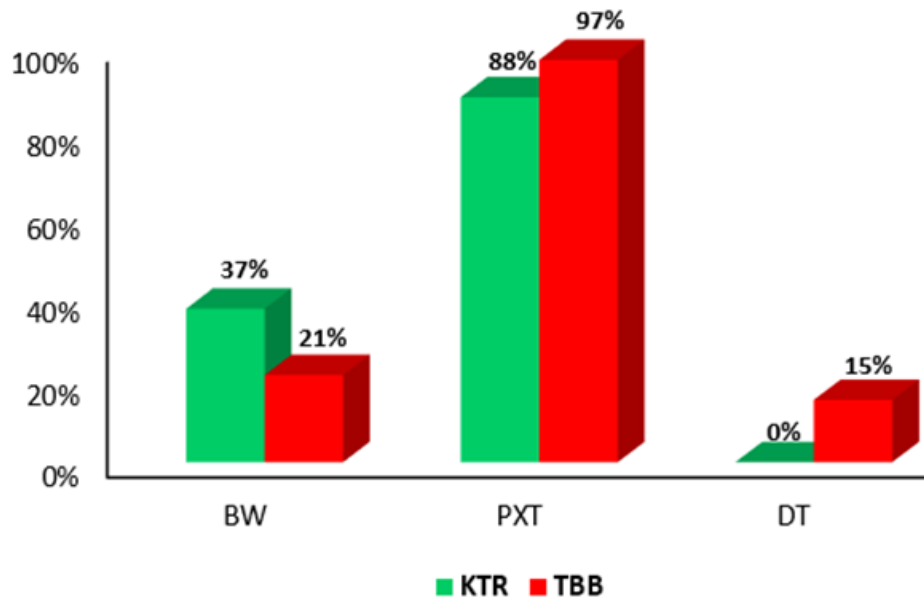
### 5.2.1.2. Distribucija proteina BMP-1 u skupinama NBB i TBB

BMP-1 je u skupinama ispitanika s KBB, slično kao i u kontrolnoj skupini, bio izražen isključivo u tubularnom području i u Bowmanovoj čahuri. Za razliku od skupine KTR, BMP-1 je u skupinama s KBB izražen u distalnim tubulima, ali bez statističke značajne razlike u frekvencijama ispitanika u odnosu na KTR (NBB vs KTR; 31,5% vs 0%;  $p = 0.279$  i TBB vs KTR; 14,7% vs 0%;  $p = 0.563$ ). Nije bilo značajne razlike u pojavnosti BMP-1 u području PXT i BW između skupina s KBB i KTR skupine (NBB vs KTR, 94,7% vs 87,5%;  $p = 1$ ; TBB vs KTR, 97% vs 87,5%;  $p = 0,348$  za PXT te NBB vs KTR 15,8% vs 37,5%;  $p = 0,319$ ; TBB vs KTR, 20,5% vs 37,5%;  $p = 0,369$  za BW). Rezultati su prikazani na slikama 12 i 13.



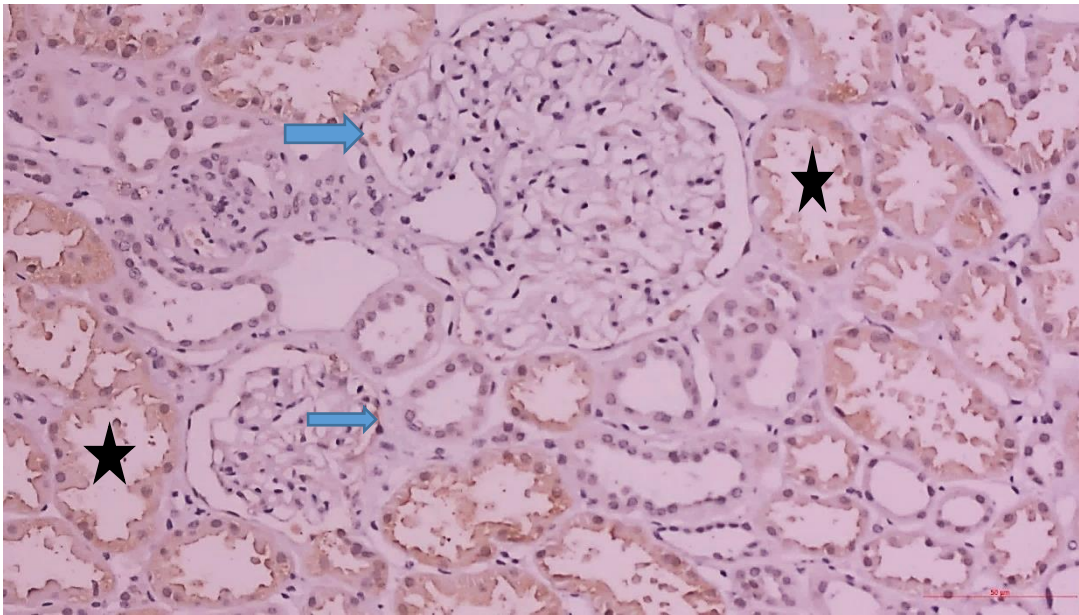
Slika 12. Distribucija BMP-1 u skupini NBB (nativne biopsije bubrega s KBB)

Prikazane su frekvencije bolesnika s pozitivnim IHC izražajem BMP-1 u NBB u usporedbi s KTR za odjeljke Bowmanove čahure (BW), proksimalnih tubula (PXT) i distalnih tubula (DT).

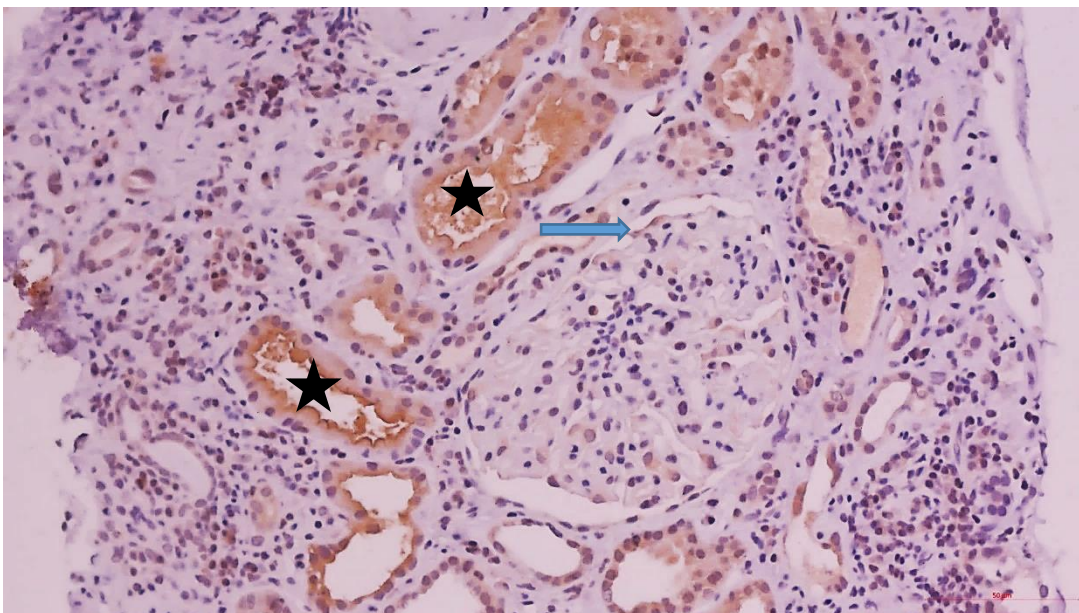


Slika 13. Distribucija BMP-1 u skupini TBB (biopsije transplantiranih bubrega s KBB)  
 Prikazane su frekvencije bolesnika s pozitivnim IHC izražajem BMP-1 u TBB u usporedbi s KTR za odjeljke Bowmanove čahure (BW), proksimalnih tubula (PXT) i distalnih tubula (DT).

a)



b)

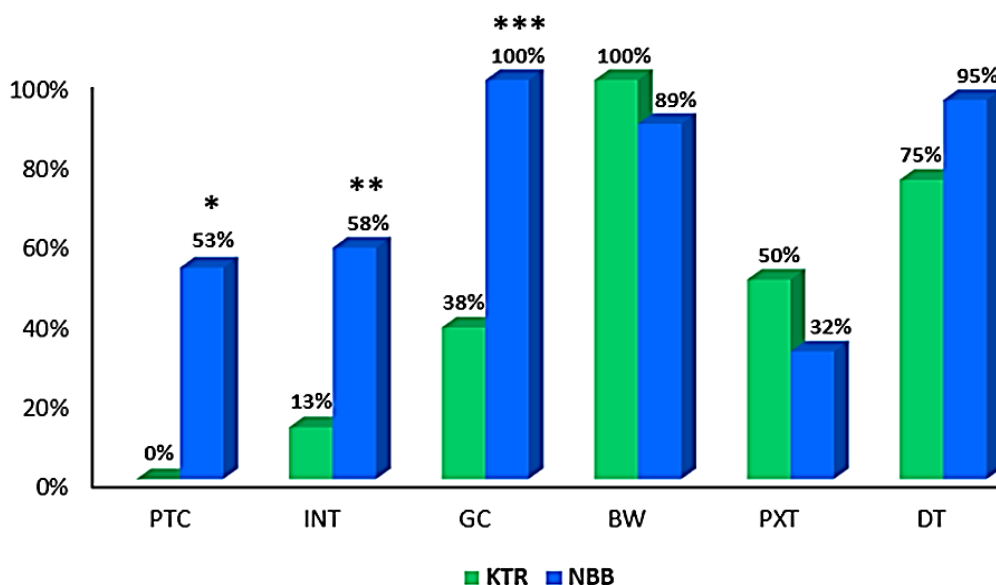


Slika 14. Prikaz imunohistokemijske analize BMP-1 proteina u zdravom i tkivu bubrega s KBB  
a) prikaz IHC bojenja na protein BMP-1 u KTR skupini bez KBB; b) prikaz IHC bojenja na protein BMP-1 u NBB skupini. Vidljiv je pozitivitet u PXT (zvjezdica) i BW (plava strelica). Nema značajne razlike u IHC bojenju između KTR i NBB skupine.

Za sva tri odjeljka (PXT, DT i BW) testirane su razlike među podskupinama temeljem stupnja KBB (pKBB vs. rKBB) te nije bilo značajne razlike ni u NBB ni u TBB skupini (za sve  $p > 0.05$ ). Na Slici 14. prikazano je IHC bojanje na BMP-1 u tkivu bubrega.

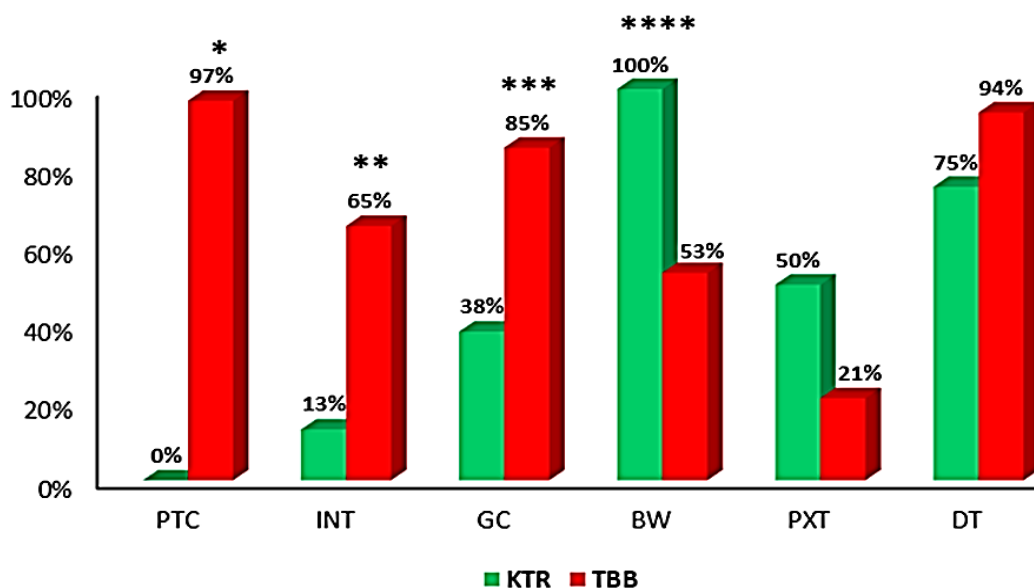
### 5.2.1.3. Distribucija proteina ADAMTS-4 u skupinama s KBB

U obje skupine ispitanika s KBB ADAMTS-4 bio je izražen u svih 6 analiziranih bubrežnih odjeljaka. Distribucija frekvencija ispitanika s pozitivnim IHC izražajem proteina za NBB i TBB skupinu prikazana je na slikama 15. i 16. ADAMTS-4 bio je znatno češće prisutan u području bubrežnog intersticija u ispitanika s KBB u odnosu na KTR skupinu (NBB vs. KTR; 57,9% vs. 14,3%;  $p=0.043$  i TBB vs. KTR; 64,7% vs. 14,3%;  $p=0.015$ ; oboje za područje INT te NBB vs. KTR; 52,6% vs. 0%,  $p=0.025$  i TBB vs. KTR; 97% vs. 0%;  $p<0.001$ ; oboje za PTC). U odjeljku glomerularnih kapilara ADAMTS-4 također je bio značajno češće izražen u ispitanika s KBB (NBB vs. KTR; 100% vs. 37,5%;  $p=0.001$  i TBB vs KTR; 85,3% vs. 37,5%,  $p=0.012$ ). U tubularnom području (PXT i DT) te području BW ADAMTS-4 bio je podjednako izražen u ispitanika s ili bez KBB u skupini nativnih i transplantiranih biopsija bubrega (za sve usporedbe  $p > 0.05$ ).



Slika 15. Distribucija ADAMTS-4 u NBB (nativne biopsije bubrega s KBB)

Prikazane su frekvencije bolesnika s pozitivnim IHC izražajem ADAMTS-4 u NBB u usporedbi s KTR za 6 analiziranih odjeljaka: PTC - peritubularne kapilare, INT - intersticijska stroma, GC - glomerularne kapilare, BW - Bowmanova čahura, PXT - proksimalni tubuli, DT - distalni tubuli. Značajna razlika utvrđena je za područje PTC (\* $p=0.02475$ ), INT (\*\* $p=0.04325$ ) i GC (\*\* $p=0.00069$ ).

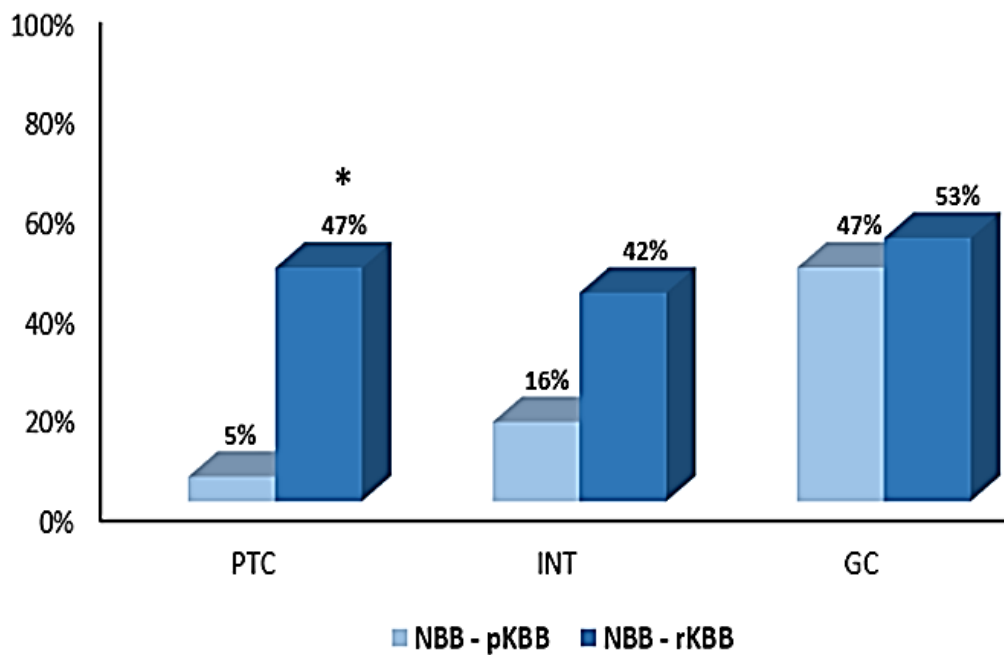


Slika 16. Distribucija ADAMTS-4 u TBB (biopsije transplantiranih bubrega s KBB)

Prikazane su frekvencije bolesnika s pozitivnim IHC izražajem ADAMTS-4 u TBB u usporedbi s KTR za 6 analiziranih odjeljaka: PTC - peritubularne kapilare, INT - intersticijska stroma, GC - glomerularne kapilare, BW - Bowmanova čahura, PXT - proksimalni tubuli, DT - distalni tubuli. Značajna razlika utvrđena je za područje PTC (\* $p < 0.0001$ ), INT (\*\* $p = 0.01462$ ) i GC (\*\* $p = 0.01151$ ), u kojima je frekvencija bila viša u TBB te za područje BW (\*\*\*\* $p = 0.01587$ ) u kojoj je bila niža u TBB u odnosu na KTR.

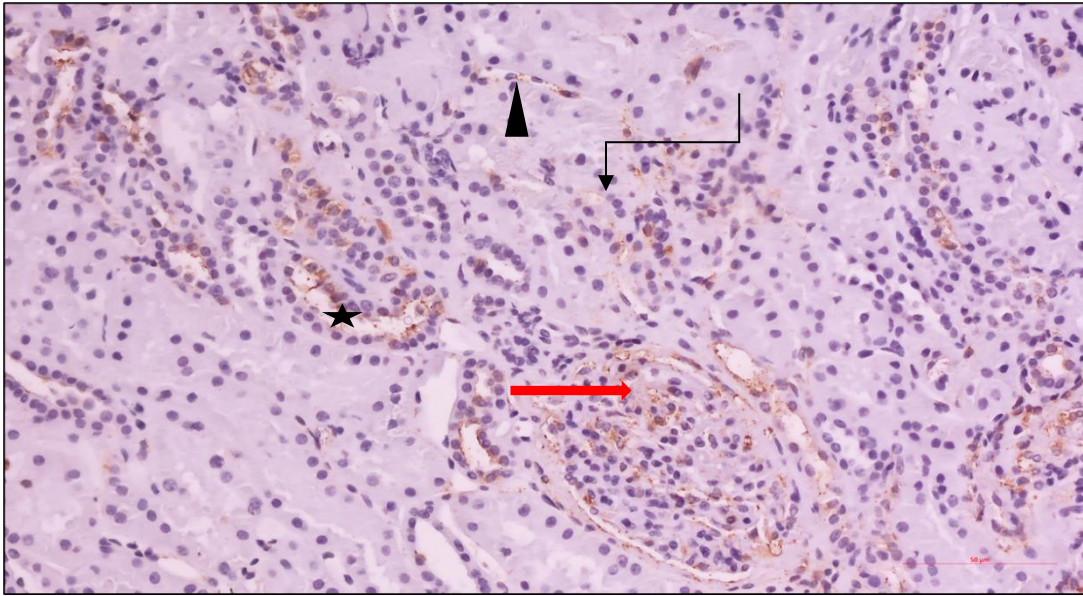
Daljnja analiza usporedbe podskupina temeljem stupnja težine KBB (pKBB vs. rKBB) učinjena je za tri odjeljka (PTC, INT i GC), u kojima je izražaj ADAMTS-4 proteina bio statistički značajno veći u skupinama s KBB usporedno s KTR.

U NBB skupini značajno više ispitanika s razvijenom KBB imalo je pozitivan ADAMTS-4 u području peritubularnih kapilara u odnosu na početnu KBB (rKBB vs. pKBB; 47% vs 5%;  $p = 0.001$ ). Ista usporedba za INT odjeljak bila je marginalno statistički značajna (rKBB vs pKBB; 42% vs 16%;  $p = 0.0690$ ). Nije bilo razlike među podskupinama za odjeljak glomerularnih kapilara (Slika 17.). Prikaz IHK bojenja na ADAMTS-4 u početnom i razvijenom stupnju KBB prikazan je na Slici 18. a i b. U TBB skupini nije bilo razlike u izražaju ADAMTS-4 proteina među podskupinama ispitanika temeljem stupnja težine KBB (Slika 19.)

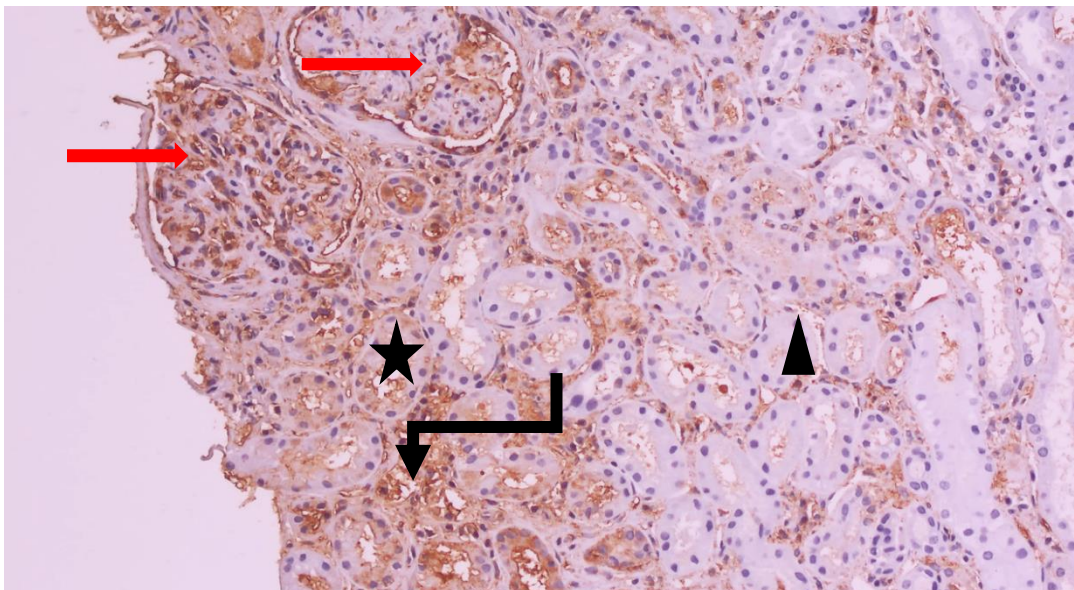


Slika 17. Usporedba izražaja ADAMTS-4 u NBB skupini prema stupnju težine KBB  
 Prikazana je usporedba frekvencija IHK izražaja ADAMTS-4 proteina između podskupina s početnom (pKBB) i razvijenom (rKBB) kroničnom bubrežnom bolesti za tri odjeljka: PTC - peritubularne kapilare, INT - intersticijska stroma, GC - glomerularne kapilare. Učestalost IHK pozitiviteta za ADAMTS-4 značajno je viša u ispitanika s rKBB u odnosu na pKBB u području PTC (\* $p=0.0011$ ) i marginalno statistički različita za područje INT ( $p=0.0690$ ).

a)

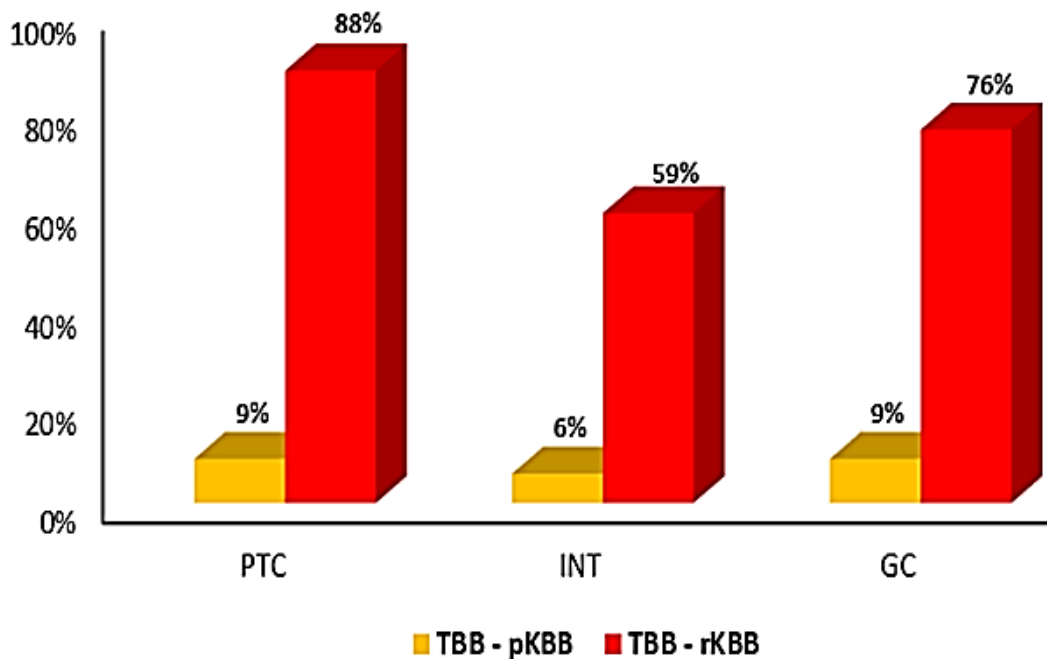


b)



Slika 18. Prikaz IHC bojenja za ADAMTS-4 u početnoj i razvijenoj KBB (nativne biopsije)  
a) Početni stadij KBB u skupini NBB (pKBB-NBB). Vidljiv je pozitivitet u GC (crvena strelica), PTC (crni trokut) i PXT (zvjezdica) te slabi pozitivitet u INT (izvijugana strelica)  
b) Razvijeni stadij KBB u NBB skupini (rKBB-NBB). Vidljiv je izraženi pozitivitet u svim promatranim odjeljcima: GC (crvena strelica), PTC (crni trokut), PXT i izraziti pozitivitet u INT (izvijugana strelica)





Slika 19. Usporedba izražaja ADAMTS-4 u TBB skupini prema stupnju težine KBB  
 Prikazana je usporedba frekvencija IHK izražaja ADAMTS-4 proteina između podskupina s početnom (pKBB) i razvijenom (rKBB) kroničnom bubrežnom bolesti za tri odjeljka: PTC - peritubularne kapilare, INT - intersticijska stroma, GC - glomerularne kapilare. ADAMTS-4 bio je češće prisutan u ispitanika s rKBB u odnosu na pKBB u svim trima područjima, ali razlika nije dosegla statističku značajnost ( $p > 0.05$  za sve usporedbe).

U sljedećoj analizi uspoređene su istovjetne podskupine prema težini KBB između nativnih i transplantacijskih bioptata s KBB. Značajna razlika nađena je samo u usporedbi podskupine pKBB u području PTC (pKBB-NBB vs. pKBB-TBB;  $p=0.0182$ ), dok je izražaj ADAMTS-4 proteina u svim ostalim usporedbama za sva tri ostala bubrežna odjeljka (PTC, INT, GC) bio sličan (pKBB-NBB vs. pKBB-TBB,  $p=0.5227$  i rKBB-NBB vs. rKBB-TBB,  $p=0.4577$ ; oboje za INT; pKBB-NBB vs. pKBB-TBB,  $p=1$  i rKBB-NBB vs rKBB-TBB,  $p=0.3102$ ; oboje za GC te rKBB-NBB vs. rKBB-TBB;  $0.43293$  za PTC).

### 5.2.2. Povezanost ekspresije proteina ADAMTS-4 s histološkim parametrima fibroze i upale

Temeljem prethodnih analiza, kojima je u području bubrežnog intersticija nađen značajno veći izražaj proteina ADAMTS-4 u ispitanika s KBB u odnosu na kontrole, u nastavku smo proveli analizu povezanosti imunohistokemijskog izražaja ADAMTS-4 proteina s histološkim parametrima bubrežne fibroze i upale.

U NBB skupini veći stupanj intersticijske fibroze i tubularne atrofije ( $IFTA \geq 1$ ) bio je značajno povezan s ekspresijom ADAMTS-4 u području peritubularnih kapilara (PTC;  $p = 0.003$ ) te intersticijske strome (INT;  $p = 0.013$ ).

Slično je pokazano i za TBB skupinu u kojoj je veći stupanj intersticijske fibroze ( $B-ci \geq 1$ ) i veći stupanj tubularne atrofije ( $B-ct \geq 1$ ) bio značajno povezan s izražajem ADAMTS-4 u INT ( $p = 0.0053$  i  $p=0.0028$ ), ali ne i PTC odjeljku bubrežnog intersticija ( $p = 1$ ).

Kako bismo utvrdili je li izražaj ADAMTS-4 proteina vezan isključivo uz stupanj intersticijske fibroze i tubularne atrofije ili/i stupanj intersticijske upale, učinjena je za TBB skupinu usporedbena analiza ekspresije ADAMTS-4 proteina s ostalim histološkim biljezima upale i fibroze prema Banff klasifikaciji, koji su uključili: intersticijsku upalu (B-i), tubulitis (B-t), upalu u području intersticijske fibroze (B-iIFTA) te totalnu upalu u fibrotičnom i nefibrotičnom području intersticija (B-ti). Ekspresija ADAMTS-4 proteina u INT je, uz ranije navedene - stupanj intersticijske fibroze (B-ci) i tubularne atrofije (B-ct), bila povezana i sa stupnjem intersticijske upale u područjima IFTA-e (B-iIFTA), kao i s ukupnim stupnjem upale (ti), koje obuhvaća upalu u atrofičnom i neutrofičnom dijelu bubrežnog intersticija. Također ekspresija ADAMTS-4 proteina nije korelirala s prisutnošću peritubularnog kapilaritisa. Svi rezultati prikazani su u Tablici 11.

Potom je u 23 bioptata TBB skupine bez intersticijske fibroze ( $B-ci < 1$ ) testirana povezanost IHK ekspresije ADAMTS-4 proteina s prisutnošću upalnog infiltrata u intersticiju i tubulitisom. Rezultati su prikazani u Tablici 12.

Tablica 11. Usporedba izražaja ADAMTS-4 s histološkim biljezima upale i fibroze (TBB)

	PTC		INT		PXT		DT	
	n/N (%)	P	n/N (%)	P	n/N (%)	P	n/N (%)	P
B-ci >1	11/11 (100)	1,00000	11/11 (100)	<b>0,00531</b>	5/11 (45,5)	<b>0,02376</b>	11/11 (100)	0,54901
B-ci ≤1	22/23 (95,7)		11/23 (47,8)		2/23 (8,7)		21/23 (91,3)	
B-ct ≥1	29/29 (100)	0,14705	22/29 (75,9)	<b>0,00284</b>	7/29 (24,1)	0,33775	28/29 (96,6)	0,27629
B-ct 0	4/5 (80,0)		0/5 (0,0)		0/5 (0,0)		4/5 (80,0)	
B-t ≥1	10/10 (100)	0,70588	9/10 (90,0)	0,06066	4/10 (40,0)	0,15731	9/10 (90,0)	1,00000
B-t 0	23/24 (95,8)		13/24 (54,1)		3/24 (12,5)		23/24 (95,8)	
B-i ≥1	13/13 (100)	1,00000	11/13 (84,6)	0,29872	4/13 (30,8)	0,38677	12/13 (92,3)	1,00000
B-i 0	20/21 (95,2)		11/21 (52,4)		3/21 (14,3)		20/21 (95,2)	
B-iIFTA >1	22/22 (100)	0,35291	18/22 (81,8)	<b>0,00843</b>	7/22 (31,8)	0,06963	21/22 (95,5)	1,00000
B-iIFTA ≤1	11/12 (91,6)		4/12 (33,3)		0/12 (0,0)		11/12 (91,6)	
B-ti >1	17/17 (100)	0,99999	15/17 (88,2)	<b>0,01044</b>	6/17 (35,3)	0,08545	16/17 (94,1)	1,00000
B-ti ≤1	16/17 (94,1)		7/17 (41,2)		1/17 (5,9)		16/17 (94,1)	
B-PTC ≥1	10/10 (100)	1,00000	9/10 (90,0)	0,06066	3/10 (30,0)	0,64445	9/10 (90,0)	1,00000
B-PTC 0	23/24 (95,8)		13/24 (54,1)		4/24 (16,7)		23/24 (95,8)	

Tablica 12. Usporedba izražaja ADAMTS-4 s upalom i tubulitisom u TBB bez fibroze

	PTC		INT		PXT		DT	
	n/N (%)	P	n/N (%)	P	n/N (%)	P	n/N (%)	P
B-t ≥1	6/6 (100)	1,00000	5/6 (83,3)	0,06864	2/6 (33,3)	0,05928	5/6 (83,3)	0,99999
B-t 0	16/17 (94,1)		6/17 (35,3)		0/17 (0,0)		16/17 (94,1)	
B-i ≥1	8/8 (100)	1,00000	6/8 (75,0)	0,08938	2/8 (25,0)	0,11067	7/8 (87,5)	1,00000
B-i 0	14/15 (93,3)		5/15 (33,3)		0/15 (0,0)		14/15 (93,3)	

Usporedba ekspresije BMP-1 proteina učinjena je na isti način samo za područje bubrežnih tubula, temeljem prethodnih rezultata vezanih uz distribuciju BMP-1 proteina u odjeljcima tkiva (Tablica 13).

Tablica 13. Usporedba izražaja BMP-1 s histološkim biljezima upale i fibroze (TBB)

	PXT		DT	
	n/N (%)	P	n/N (%)	P
B-ci >1	11/11 (100)	1,00000	11/11 (100)	1,00000
B-ci ≤1	22/23 (95,7)		21/23 (91,3)	
B-ct ≥1	29/29 (100)	0,14705	4/29 (13,8)	1,00000
B-ct 0	4/5 (80,0)		1/5 (20,0)	
B-t ≥1	10/10 (100)	1,00000	0/10 (0,0)	0,29071
B-t 0	23/24 (95,8)		5/24 (20,8)	
B-i ≥1	13/13 (100)	1,00000	1/13 (7,7)	1,00000
B-i 0	20/21 (95,2)		4/21 (19,1)	
B-iFTA >1	11/12 (91,6)	1,00000	2/12 (16,7)	1,00000
B-iFTA ≤1	22/22 (100)		3/22 (13,6)	
B-ti >1	16/17 (94,1)	0,99999	3/17 (17,6)	0,99999
B-ti ≤1	17/17 (100)		2/17 (11,8)	
B-PTC ≥1	10/10 (100)	1,00000	1/10 (10,0)	1,00000
B-PTC 0	23/24 (95,8)		4/24 (16,7)	

Tablica 14. Usporedba izražaja BMP-1 s upalom i tubulitisom u TBB bez fibroze

	PXT		DT	
	n/N (%)	P	n/N (%)	P
B-t ≥1	6/6 (100)	1,00000	0/6 (0,0)	1,00000
B-t 0	16/17 (94,1)		4/17 (23,5)	
B-i ≥1	8/8 (100)	1,00000	1/8 (12,5)	1,00000
B-i 0	14/15 (93,3)		3/15 (20,0)	

Tijekom analize imunohistokemijskog izražaja ADAMTS-4 u odjeljcima bubrežnog tkiva zamijećeno je da se ADAMTS-4 češće pojavljuje u proksimalnim tubulima s akutnim tubularnim oštećenjem (ATO). Stoga je učinjena analiza povezanosti za NBB i TBB skupinu te je utvrđeno da je ekspresija ADAMTS-4 proteina u proksimalnim tubulima obje skupine statistički značajno veća u ispitanika s akutnim tubularnim oštećenjem (100% vs. 7%;  $p = 0.00052$  za NBB i 88% vs. 0%;  $p < 0.0001$  za TBB skupinu). Ista usporedba učinjena je i za BMP te nisu nađene značajne povezanosti (100% vs. 93% za NBB i 100% vs. 96% za TBB; za obje usporedbe  $p > 0,05$ ).

Testirana je i korelacija ekspresije ADAMTS-4 u PTC s prisutnošću peritubularnog kapilaritisa ( $B\text{-ptc} > 0$ ) i prisutnošću razgradnog produkta komplementa C4d ( $C4d > 0$ ). Ekspresija ADAMTS-4 u PTC nije bila povezana niti s peritubularnim kapilaritisom kapilarama niti s izražajem C4d ( $p = 1$ , za obje testirane korelacije).

Konačno je učinjena analiza povezanosti ekspresije ADAMTS-4 proteina u području glomerularnih kapilara (GC) s prisutnošću kroničnih promjena glomerula (GS). Prisutnost glomeruloskleroze (GS), izražene kao stupanj GS veći od 1, nije bila povezana s ekspresijom ADAMTS-4 proteina u glomerularnim kapilarama ni u NBB ( $p = 1$ ), ni u TBB skupini ( $p = 0.290$ ), a također niti kada je stupanj GS uspoređen s izražajem ADAMTS-4 u GC za obje skupine zajedno ( $p = 0.175$ ).

### 5.2.3. Analiza izražaja ADAMTS-4 u parnim biopsijama transplantiranih bubrega

Usporedbena analiza parnih biopsija transplantiranih bubrega uključila je 15 biopsijskih uzoraka tkiva transplantiranih bubrega (TBB) uzorkovanih u različitom razdoblju nakon transplantacije bubrega i njihovih pripadajućih uzoraka „nultih biopsija“ (TBB0) učinjenih u aktu transplantacije (TBB-TBB0;  $N=15$  parova). Prosječni vremenski period između parnih biopsija iznosio je 690 dana (28-2340). Rezultati analize usporedbe frekvencija prikazani su u Tablici 15. Skupine su se značajno razlikovale prema stupnju intersticijske fibroze (ci), stupnju KBB, kao i IHK izražaju ADAMTS-4 proteina u području intersticija (PTC i INT) te glomerularnih kapilara (GC). Prosječni stupanj intersticijske fibroze (ci) bio je značajno viši u

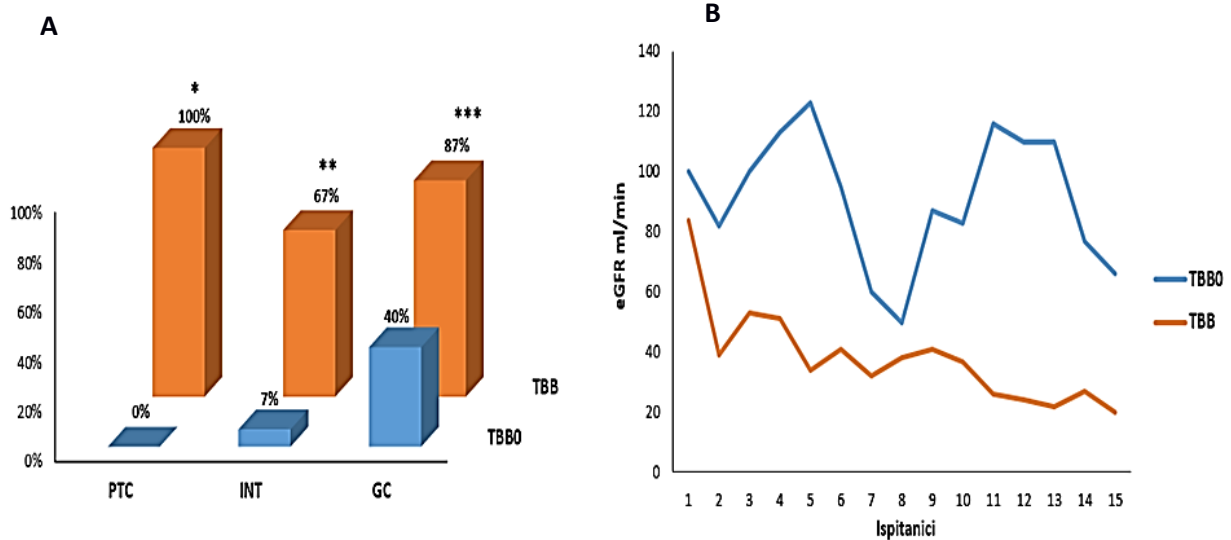
TBB skupini (TBB vs.TBB0; 1,27/0,07;  $p < 0.000157$ ). U području tubula (PXT i DT) te Bowmanove čahure glomerula nije bilo značajne razlike u IHC izražaju ADAMTS-4 proteina između parnih skupina (TBB vs. TBB0;  $p < 0,05$  za PXT, DT i BW).

Tablica 15. Usporedba izražaja ADAMTS-4 u parnim biopsijama transplantiranih bubrega

	<b>TBB0 (N=15)</b>	<b>TBB (N=15)</b>	<b>P</b>
eGFR ml/min/1.73m <sup>2</sup>	91±22	38±64	<0.00001
KBB stupanj	0 (0-3)	3 (2-4)	<0.00001
B-ci	0,07±0,3	1,27±1,0	0,000157
INT n (%)	1 (6,67)	10 (66,7)	0,00169
PTC n (%)	0 (0)	15 (100)	<0.0001
PXT n (%)	6 (40)	2 (13,3)	Ns
DT n (%)	11 (73,3)	15 (100)	Ns
GC n (%)	5 (33,3)	13 (86,7)	0,00778
BW n (%)	14 (93,3)	10 (66,7)	Ns
Biopsija bubrega (broj dana nakon transplantacije)	0	690 (28-2340)	-

N - ukupan broj bolesnika u skupini; n - broj ispitanika s pozitivnim IHC bojenjem na ADAMTS-4; ns - nije statistički značajno; PTC - peritubularne kapilare, INT - intersticijska stroma, GC - glomerularne kapilare, BW - Bowmanova čahura, PXT - proksimalni tubuli, DT - distalni tubuli; B-ci - kronični intersticijski stupanj prema Banff klasifikaciji

Na Slici 20. prikazan je odnos glomerularne filtracije i učestalosti IHK bojenja na ADAMTS-4 u PTC, INT i GC, a na Slici 21. prikazano je IHK bojenje za ADAMTS-4 u jednom paru biopsijskih uzoraka (TBB0-TBB).

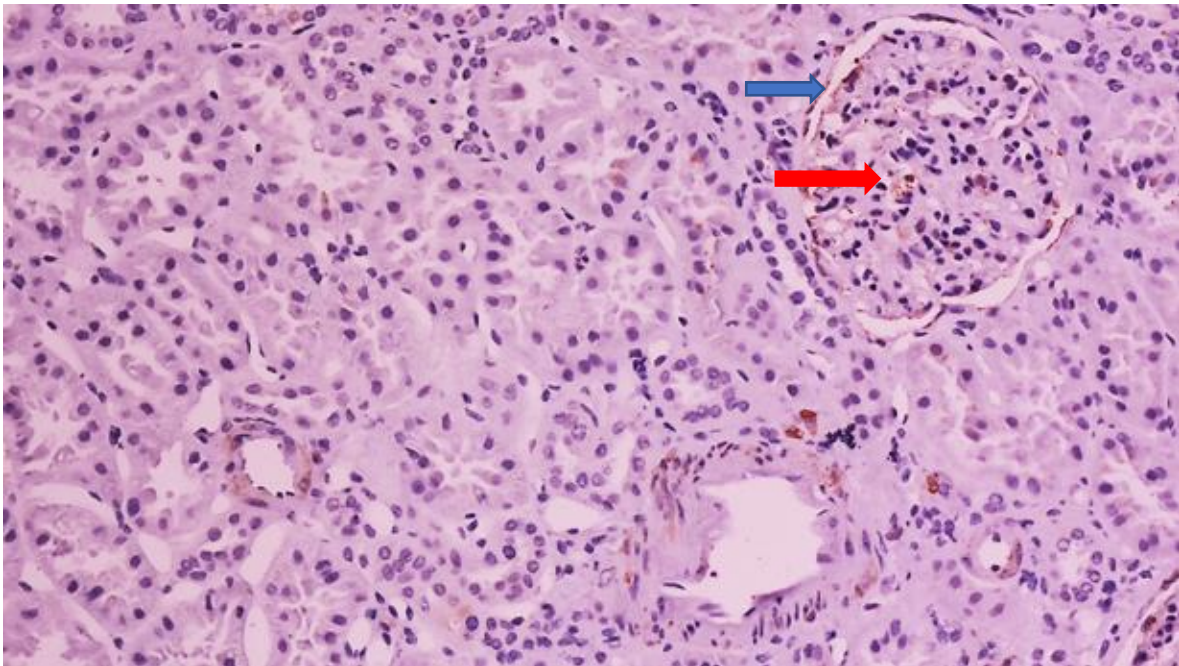


Slika 20. Izražaj ADAMTS-4 proteina i odnos prema glomerularnoj filtraciji u usporedbi parova

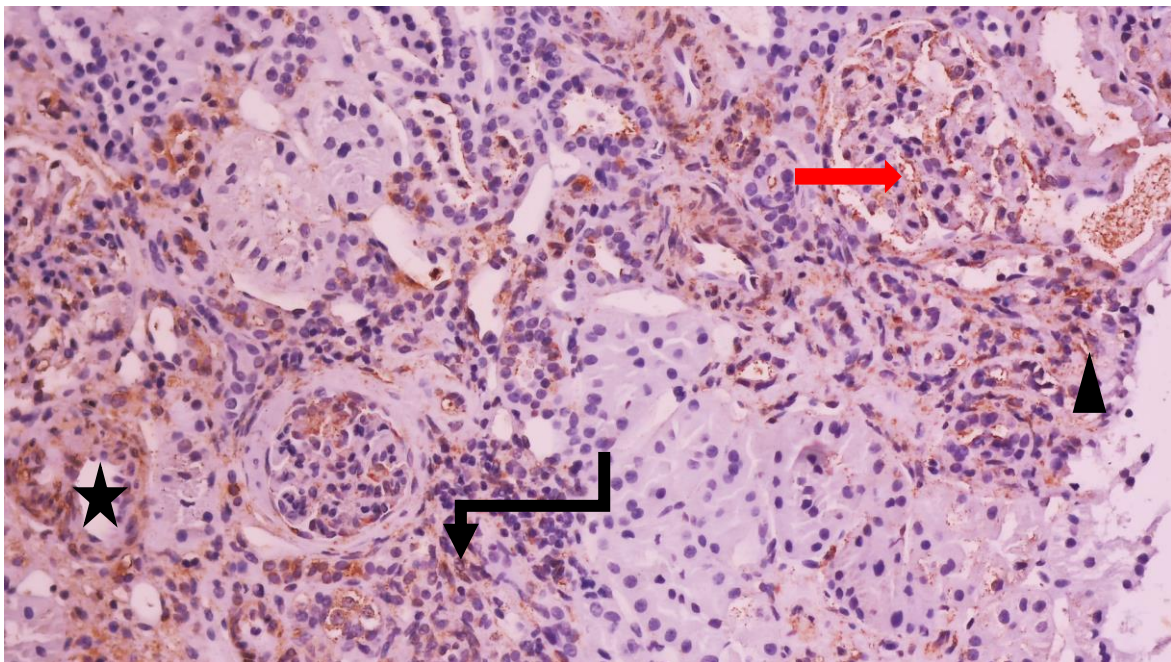
A) prikazana je razlika u IHK ekspresiji ADAMTS-4 između skupine „nultih“ (TBB0) i parnih biopsija transplantiranog bubrega (TBB). Ekspresija ADAMTS-4 značajno je češća u TBB u odnosu na TBB0 skupinu, za PTC ( $p < 0.0001$ ), INT (\*\* $P = 0.00169$ ) te GC (\*\* $P = 0.00778$ ).

B) TBB skupina ima statistički značajno nižu glomerulsku filtraciju u odnosu na TBB0 (37,93 vs. 91,47;  $p < 0.00001$ ).

a)



b)



Slika 21. IHK izražaj proteina ADAMTS-4 u tkivima parnih biopsija transplantiranih bubrega  
Slika prikazuje IHK izražaj ADAMTS-4 u tkivu bubrega pod svjetlosnim mikroskopom (povećanje 100x): a) nulta biopsija - TBB0; bez znakova KBB; b) biopsija bubrega u razdoblju nakon transplantacije - TBB s KBB3; IHK bojenje za ADAMTS-4 prisutno je u GC (crvena zvjezdica), PTC (crni trokut), INT (strelica-skretnica) te PXT (crna zvjezdica).



## 6. RASPRAVA

Mogućnosti liječenja razvijene KBB još uvijek su znatno ograničene. Glavni uzrok tome je nemogućnost utjecaja na proces bubrežne fibrogeneze kada on, uslijed perpetuirane aktivacije višestrukih sistemskih i tkivnih čimbenika, prijeđe u ireverzibilni stadij. U traženju mehanizama, koji bi pomogli u liječenju KBB, između ostalog teži se pronalaženju novih bioloških biljega, uključenih u patogenezu bolesti koji bi svojim pojavljivanjem u krvi ili mokraći bolesnika upućivali na pojavu bolesti u njenoj ranoj fazi, a u idealnom slučaju bili i potencijalni terapijski cilj (193). Naši rezultati proteomskog profiliranja plazme cijelog spektra bolesnika s KBB, uključujući i one nakon transplantacije bubrega, nedvojbeno su pokazali da se ključno procesuiranje bolesti, bez obzira na vrstu i funkciju promatranih skupina proteina, događa u stupnju 2 KBB-i koji bismo mogli nazvati stupnjem-prekretnicom. Prvotnu spoznaju o toj činjenici objavili smo u našim istraživanjima u lipnju 2022. godine (194). Zapaženi trend ekspresije različitih, funkcionalno povezanih skupina proteina kroz stupnjeve KBB1-5 proširili smo analizom trenda ekspresije uremijskih toksina te skupine proteina povezanih s aktivnošću izvanstaničnog matriksa. Molekula ADAMTS-4, koju smo u krvi bolesnika s KBB utvrdili ELISA metodom, pokazivala je sličnu distribuciju s najvišim koncentracijama u ispitanika u stupnju KBB2 i KBB3.

Proteomskom analizom svih ispitivanih skupina utvrdili smo ukupno 453 proteina, čija je prisutnost varirala među skupinama. Ovakvo presječno istraživanje pojedinačnih skupina cijelog spektra kronične bubrežne bolesti, uključujući i bolesnike liječene svim modalitetima nadomještanja bubrežne funkcije, peritonejskom dijalizom, hemodijalizom i transplantacijom bubrega nije do sada objavljeno u literaturi (154, 155, 195, 196). Luczak i suradnici su u analizi usporedbe aterosklerotskog profila proteina među skupinama ispitanika sa ili bez KBB analizirali KBB skupinu na način da su formirali 3 skupine: KBB1-2, KBB3-4 i KBB5 (196). U svom radu opisali su linearni porast koncentracije uremijskih toksina cistatina C i  $\alpha$ -1 mikroglobulina (AMBP) prema završnom stupnju KBB, dok je fetuin A imao obrnuti trend ekspresije. U našem istraživanju smo, sukladno literaturnim podacima i podacima sistematizirane baze uremijskih toksina (database.uremic-toxins.org), utvrdili prisutnost 7 uremijskih toksina karakteristika tzv. „srednjih” molekula, uključujući AMBP i cistatin C. Praćenje trenda kroz odvojene stupnjeve KBB omogućilo nam je uvid u činjenicu da i tipični uremijski toksini, poput AMBP ili pak cistatina C, koji se redovito koristi i u kliničkoj i praksi za izračun glomerulske filtracije, a koji su i u našem istraživanju pokazali profil ponašanja uremijskog toksina, ujedno imali značajnu i naglu promjenu smjera ekspresije u KBB2 stupnju

(197). Neovisno o tome radi li se o značajnijem padu ili porastu ekspresije u KBB2, uremijski toksini potom nakon KBB 3 stupnja pokazuju porast ekspresije prema ESRD. Ova spoznaja mogla bi promijeniti uvriježeno poimanje uremijskih toksina, kao molekula, čija koncentracija isključivo raste u procesu napredovanja bubrežnog zatajenja te u konačnici rezultira uremijskim simptomima, pridonosi sistemskom upalnom odgovoru, aterosklerozi te nastanku vaskularnih kalcifikacija (198). Jedini protein, koji je u našoj analizi pokazao kontinuirani porast kroz sve stupnjeve KBB, je adenzin deaminaza 2, a nije uvršten u popis uremijskih toksina. Glorieux i suradnici su usporedbom proteomskog profila objedinjene skupine KBB2 i KBB3 sa skupinom KBB5 liječenih hemodijalizom utvrdili razliku u ekspresiji za 39 proteina (154). Unutar 39 proteina utvrđeni su i uremijski toksini koji su očekivano pokazali značajno višu ekspresiju u skupini KBB5. Validacijska analiza ELISA metodom učinjena je za 4 proteina koji su pokazivali dinamiku povećanja prema KBB 5, a ranije nisu opisani u literaturi: čimbenik komplementa D, LRG i glikoprotein bogat histidinom. Za prva tri utvrđena je inverzna korelacija s procijenjenom glomerulskom filtracijom. Čimbenik komplementa D, koji je potom uvršten u bazu uremijskih toksina, utvrđen je sada i u našem istraživanju, kao i LRG. I u ovom slučaju detaljniji uvid u trend ekspresije kroz sve stadije KBB pokazao je da čimbenik komplementa D pokazuje nagli trend pada u KBB2, a tek potom nakon KBB3 tipični obrazac uremijskog toksina. Zanimljivo je da se u našem istraživanju molekula leucinom bogat alfa 2 glikoprotein nije ponašao kao uremijski toksin. Nije bila prisutna u kontrolnoj skupini, imala je zatim značajan trend porasta u KBB2, a nakon toga obrazac njene ekspresije prema ESRD-u nije odgovarao obrascu ponašanja uremijskog toksina. Ovo zapažanje potrebno je provjeriti u validacijskoj studiji kvantifikacije proteina drugom karakterizacijskom, odnosno kvantifikacijskom metodom.

Literatura vezana uz kvantifikaciju uremijskih toksina u ESRD-u, kao i odnos njihove koncentracije u ESRD prema koncentraciji u zdravih osoba, vrlo je nekonzistentna i najbolji pokušaj sistematskog objedinjavanja dostupnih literaturnih podataka objavljen je u radu Durantona i suradnika iz 2012. godine (163). Od ukupno 7 uremijskih toksina u našem istraživanju, prema izračunu omjera ekspresije proteina između KBB5 i ZDR skupine, samo IGF-1 nije odgovarao omjerima opisanim u navedenoj publikaciji. Dodatno, iako se u bazi uremijskih toksina, kao i navedenom radu Durantona i suradnika, alfa-1 kiseli glikoprotein spominje isključivo kao jedna molekula, mi smo utvrdili njegova dva podtipa, alfa-1 kiseli glikoprotein 1 i 2. Omjer ekspresije KBB5/ZDR za alfa-1 kiseli glikoprotein 1 i 2 te IGFBP1 u

našem istraživanju bio je značajno veći u odnosu na literaturne podatke za molekulu alfa-1 kiselog glikoproteina (163).

Literaturni podaci, koji su analizirali usporedbu odstranjivanja uremijskih toksina između različitih metoda dijalize, pokazali su kontradiktorne rezultate. Podloga, na kojoj se temelji povoljniji učinak odstranjivanja „srednjih” molekula peritonejskom dijalizom, odnosi se na činjenicu da su u dijalizni proces na peritonejskoj membrani uključene i tzv „velike“ pore koje propuštaju molekule do 60 kDa (199-201). U našem istraživanju 3 uremijska toksina,  $\alpha$ -kiseli glikoprotein 1 i 2 te IGF-1, pokazala su razliku u ekspresiji između HD i PD skupine, s nižim trendom ekspresije u PD skupini. Svih 15 bolesnika u HD skupini liječeni su filterima s visokoprotocnim membranama. Zanimljivo je opažanje da im se ekspresija uremijskih toksina nakon postupka dijalize nije značajnije razlikovala od one prije postupka. Ovakvo opažanje u skladu je s današnjom tendencijom k široj primjeni filtera s porama, koje bi bolje odstranjivale UT „srednje“ molekulske veličine (202). Detaljnija analiza ove problematike temeljem naših rezultata ograničena je premalim brojem ispitanika za usporedbe ove vrste.

Uremijski toksini pokazali su različiti trend ekspresije nakon transplantacije bubrega u odnosu na ESRD. Cistatin C, čimbenik komplementa D, angiogenin te IGF-1 pokazali su značajniji trend pada u TB skupini u odnosu na skupine u ESRD s dijalizom ili bez nje. Suprotno tomu,  $\alpha$ -1 kiseli glikoprotein 1 i 2 te AMBP nisu normalizirali svoj izražaj nakon transplantacije. AMBP je u ranijim istraživanjima imao sniženu ekspresiju u serumu bolesnika s akutnim odbacivanjem transplantiranog bubrega (203). S obzirom da su uzorci ispitanika u našem istraživanju u skupinama združeni, a da je TB skupina heterogena i po histološkoj dijagnozi te uključuje bolesnike s dijagnozama odbacivanja, BK nefropatije, ali i nespecifičnih kroničnih promjena, postoji mogućnost da je to utjecalo na ekspresiju AMPB. Izostanak pada oba tipa alfa-1 kiselog glikoproteina nakon transplantacije može se djelomično tumačiti već ranije opisanim povećanim KBB5/ZDR omjerom za alfa-1 kiseli glikoprotein 1 ili pak eventualnim utjecajem upalnih procesa u heterogenoj TB skupini, s obzirom da se radi o reaktantnu akutne upale (204).

Ravnajući se logikom ponašanja dokazanih UT, od 453 proteina dodatno smo izdvojili one koji bi, prema molekularnoj masi i omjeru ekspresije 5 stadija KBB u odnosu na ZDR skupinu, zadovoljili uvriježene kriterije ponašanja uremijskih toksina, a nakon toga, sistematičnim pregledom literature izdvojili 15 proteina povezanih s bubrežnom bolesti i/ili s kroničnim upalnim stanjima, aterosklerozom ili povišenim rizikom za kardiovaskularne bolesti. U Tablici 4. vidljivo je ponovo da trend ekspresije raste uglavnom tek nakon stupnja KBB3 prema KBB5

i HD-P skupini, a da sve ove molekule pokazuju vidljivu, značajniju promjenu ekspresije u KBB2. Predloženi popis potencijalnih uremijskih toksina potrebno je provjeriti u budućim istraživanjima nekom od metoda direktne detekcije i kvantifikacije pojedinog proteina u većem broju uzoraka ispitanika (ELISA ili Luminex metoda).

Analize ekspresije signalnih puteva proteina, uključujući i analizu obogaćenu genima, poput Funrich analize u našem istraživanju, pokazale su da proteomski profili dobro prikazuju pojačanu aktivaciju imunološkog odgovora tijekom razvoja KBB (155). To se posebno odnosi na sustav kaskade komplementa i nespecifični imunološki odgovor, koji su u našem istraživanju imali vidljivi trend porasta ekspresije u KBB2. Romanova i suradnici analizirali su proteom 26 bolesnika u završnom stupnju KBB, koji nisu započeli postupke dijalize te su našli pojačan izražaj proupalnih citokina i čimbenika sustava komplementa. U istom istraživanju koncentracija  $\gamma$ - podjedinice čimbenika komplementa- 8 (C8- $\gamma$ ) utvrđena metodom ELISA-e bila je tri puta niža u ESRD u odnosu na kontrole. U našem istraživanju isti čimbenik pokazivao je nešto nižu ekspresiju u KBB5 u odnosu na ZDR, ali je značajan trend pada u odnosu na ZDR bio vidljiv u KBB2 i TB skupini. Čimbenici sustava komplementa u našem istraživanju značajno su se razdvojili temeljem statusa ekspresije upravo u KBB2 stupnju.

Ulogu aktivacije sustava komplementa u KBB pokazalo je istraživanje Higashisaka i suradnika koji su pratili razliku izražaja proteina između uzoraka krvi, koja dotiče u bubreg te uzoraka iz venske krvi, uzorkovane iz nadbubrežnih vena u bolesnika sa sumnjom na funkcionalni adenom nadbubrežne žlijezde (156). Usporedbom skupina bolesnika prema stupnju glomerularne filtracije, koncentracija C1q podjedinice komplementa bila je značajno viša u venskom sustavu skupine s nižom glomerularnom filtracijom. Isto je potvrđeno i na mišjem modelu dijabetičke nefropatije u istom istraživanju. U našem istraživanju također je zamijećen trend pada aktivnosti sustava komplementa prema KBB5 i dijalizi, s ponovnom tendencijom porasta u TB skupini.

Sukladno drugim istraživanjima, u ispitivanim skupinama utvrdili smo statistički značajno aktiviran sustav metabolizma lipida. Komponentne apolipoproteinskog metabolizma pokazale su, slično čimbenicima kaskade komplementa, značajnu promjenu trenda u KBB2 (205). Posebno zanimljivim jest zamijećeni pad trenda aktivnosti apolipoproteinske signalizacije nakon transplantacije bubrega. Potrebna su daljnja istraživanja u tom smislu koja bi donijela jasnije spoznaje.

Također je utvrđena statistički značajna aktivacija unutarstanične, međustanične, kao i komunikacije između stanica i ECM-a, posredovana  $\beta$ -integrinima, što je sukladno literaturnim podacima.

Dinamika proteina i proteaza ECM-a bubrežnog intersticija, ali i glomerularnog mezangija značajan su dio procesa fibrogeneze. Iz našeg proteoma izdvojili smo molekule koje su prema literaturi povezane s KBB ili bubrežnom fibrozom, a uključene u procese signalizacije, pregradnje ili reorganizacije ECM-a na tkivnoj ili sistemskoj razini te prikazali trend njihovog kretanja u skupinama bolesnika cijelog spektra KBB. I ovdje je vidljiva značajna promjena trenda ekspresije u KBB2 za većinu izabranih proteina.

Od obitelji kolagena utvrdili smo ekspresiju  $\alpha$ -1 lanca kolagena tipa III i V,  $\alpha$ -3 lanca kolagena tipa VI,  $\alpha$ -1 lanca kolagena tip XIV te izoformu 2  $\alpha$ -1 lanca kolagena tip XVIII. Kolagen tip I, inače značajno prisutan u intersticijskom matriksu kod KBB, nije utvrđen našom analizom (30).

Kolagen tip VI tek je nedavno izoliran iz bubrega u prostoru između bazalne membrane i intersticijskog matriksa te povezan s bubrežnom bolesti (206). U procesu njegove pregradnje sudjeluje matrikin endotrofin (ETP) koji cijepa  $\alpha$ -3 lanac kolagena odmah nakon njegova izlučivanja. Sparding i suradnici pokazali su u nedavno objavljenom istraživanju da je razina endotrofina u krvi bolesnika s I gA nefropatijom i ANCA vaskulitisom viša od zdravih kontrola te da se dodatno povećava u višim stupnjevima KBB (207). Također je utvrđena korelacija između serumske razine endotrofina u bolesnika obje ispitivane skupine i histološkog stupnja intersticijske fibroze. U našem je istraživanju alfa-3 lanac kolagena IV bio prisutan u svim stupnjevima KBB, pokazivao je trend porasta prema KBB-5, što je u skladu s rezultatima Sparding i suradnika, a uzlazni trend nastavio se i u bolesnika na PD. Nakon transplantacije prati se silazni trend, ali ekspresija ostaje viša u odnosu na ZDR skupinu. Yepes-Calderon i suradnici utvrdili su da je serumska razina kolagena VI bila povezana sa stupnjem IFTA-e u protokolarnim biopsijama bubrega u razdoblju od 6 mjeseci nakon transplantacije, dok je istovjetna korelacija izostala u kasnijem praćenju (208).

Kolagen tip XIV pripada u skupinu nefibrilarnih kolagena i strukturalno se povezuje s drugim tipovima kolagena ili susjednim molekulama ECM-a, poput lumikana i dekorina. Uvidom u objavljene literaturne podatke do sada nema izvještaja o povezanosti izražaja ovog tipa kolagena i KBB. Naši podatci pokazuju njegovu pojačanu ekspresiju u stupnjevima 3 i 5 KBB uz uzlazni trend prema dijaliznim skupinama (PD i HD-P). Izlučuju ga fibroblasti, a opisana je

njegova uloga u regeneraciji miocita i plućnoj fibrozi, te prisutnost u koži, gdje se strukturalno povezuje s trombospondinom-5 (101). Genska ekspresija kolagena XIV utvrđena je u uroepitelnim tumorima bubrega te je korelirala s lošijim ishodom bolesti (209). Moguću povezanost ovog tipa kolagena i njegov značaj u KBB potrebno je provjeriti u susljednim istraživanjima.

Kolagen tip XVIII spominje se, prema literaturi, kao dio urinarnog proteoma u KBB (210). Endostatin, N-terminalni fragment kolagena tipa XVIII, koji se odvaja djelovanjem metaloproteinaza, dokazani je inhibitor angiogeneze, povezan i s KBB (211). Proteomski profil ekspresije Izoforme 2  $\alpha$ -1 lanca kolagena tip XVIII u KBB nije do sada opisana u literaturi. Naši rezultati pokazuju da mu se ekspresija naglo smanjuje u KBB2, a nakon toga značajno raste i ostaje visoka u dijaliznim skupinama te ponovo pada nakon transplantacije. Zanimljivo je da je trend naglog pada ekspresije u KBB2 zajedničko obilježje za kolagen tipa III, VI, i XVIII u našem istraživanju, dok se kolagen tipa V ponaša različito, odnosno izražen je podjednako u svim stupnjevima KBB uz dodatni porast prema dijalizi. Uvriježeno je razmišljanje da se smanjeni izražaj različitih kolagena u KBB povezuje s njegovom potrošnjom u izgradnji ECM-a, pa bi se moglo spekulirati da se to događa u KBB2. Ovakvo opažanje do sada nije objavljeno u literaturi.

Protein povezan s pregradnjom matriksa 5 izražen je u ECM-u zdravog bubrega, a ekspresija mu se povećava tijekom razvoja bubrežne fibroze. Osnovna uloga ovog proteina nije poznata. Temeljem dosadašnjih istraživanja poznato je da na njega utječe TGF- $\beta$  signalni put, no nije jasno djeluje li on tijekom fibrogeneze kao pro ili anti-fibrogeni čimbenik. Nema podataka u literaturi o njegovoj prisutnosti u serumu bolesnika kroz stadije KBB. U našem istraživanju, slično ponašanju drugih proteina ECM-a, pokazuje nagli porast ekspresije u KBB2 stupnju (212).

Lumikan, proteoglikan iz skupine malih leucinom bogatih proteoglikana (SLRP), dio je hiperproduktivnog ECM-a tijekom napredovanja različitih tipova bubrežnih bolesti. Njegova akumulacija, posebice u razvijenoj dijabetičkoj nefropatiji, utvrđena je analizama skupina gena eksprimiranih iz fibrotično promijenjenih uzoraka glomerula, dobivenih mikrodisekcijom bubrežnog tkiva tijekom razvoja bolesti (213). Lumikan je u našoj analizi pokazao nagli trend porasta u KBB2 stupnju. U navedenom istraživanju Feng i suradnika opisana je i pojačana ekspresija gena za fibulin 1, fibromodulin i MMP-2. Fibulin-1 je temeljem istraživanja Neimana i suradnika predložen i kao potencijalni biomarker poremećaja bubrežne funkcije (214).

Suprotno ranijim istraživanjima, fibulin-1 u našem proteomskom profiliranju nije pokazao razliku u svojoj ekspresiji u KBB u odnosu na kontrolnu skupinu, niti je njegova ekspresija rasla prema završnom stupnju i dijalizi. Dodatno, ekspresija mu se nije mijenjala ni nakon transplantacije bubrega.

Kao što je spomenuto, LRG je predložen od Glorieux i suradnika kao kandidat za uremijski toksin. U našem istraživanju nađena je podvarijanta LRG1 koji je serumski glikoprotein, nepotpuno razjašnjene funkcije, a akumulira se u plazmi tijekom upalnih zbivanja, posebno autoimunih bolesti (154). Yang i suradnici su 2020. povezali serumsku koncentraciju ovog proteina u serumu s histološkom aktivnosti lupusnog nefritisa (215). Iako su u tom istraživanju pokazali slabu tendenciju porasta u stupnjevima uznapredovale KBB, važno je uočiti da je LRG1 bio značajno povišen već u stupnju 1 i 2 KBB u odnosu na kontrole, što je vrlo slično ponašanju ove molekule u našem istraživanju, gdje se pojavljuje oštar pik u stupnju 2 KBB, a tek značajnije slabija ekspresija u završnim stupnjevima KBB.

Proteini glomerularnog proteoma, prema istraživanju Lennona i suradnika iz 2014. godine, mogu biti isključivo dio bazalne membrane glomerula, ali i tzv. glomerularnog ECM-a (216, 217). U našem istraživanju utvrdili smo laminin  $\alpha$ -2 podjedinicu, perlecan i fibulin 1, koji se nalaze dominantno u BM te transformirajući čimbenik čimbenika rasta-beta induciran ig-h 3 i Matriks Gla protein, koji se nalaze u glomerularnom ECM-u. Trend ekspresije laminina  $\alpha$ -2 u našem istraživanju nije u skladu s dosadašnjim publikacijama. Opisano je da se nalazi isključivo u promijenjenom glomerularnom miljeu, a da nestaje kasnije s razvojem KBB (218, 219). Naša analiza pokazuje da je njegova ekspresija prisutna u ZDR skupini, zatim pokazuje značajan trend pada do KBB2, a nakon toga je prisutan u KBB3, KBB5 i PD. Unatoč vidljivu trendu ekspresije i bez obzira što se radi o relativnoj kvantifikaciji, ipak treba napomenuti da je udio laminina, čiju smo ekspresiju pratili, bio izrazito nizak u odnosu na ostale proteine u pojedinoj skupini (u ZDR skupini 0,005%).

Transformirajući čimbenik rasta-beta induciran ig-h 3 je glikoprotein prisutan u području glomerularnog ECM-a, dio je vaskularne komponentne jukstaglomerularnog aparata kao i ravnog dijela (pars recta) proksimalnih tubula. Njegova pojačana ekspresija povezana je s tubulointersticijskom fibrozom na modelu ciklosporinske nefropatije u miševa te u dijabetičkoj bolesti bubrega (220, 221). Ekspresija ovog čimbenika tijekom progresije KBB nije se značajno razlikovala od ZDR skupine, uz iznimku blagog porasta trenda u HD i PD skupini.

Pojačana ekspresija perlekana opisana je u IgA nefropatiji i kroničnoj disfunkciji transplantiranog bubrega (30). U našem se istraživanju perlekan nije značajnije pojavljivao tijekom razvoja i napredovanja KBB, nego se ponašao sličnije profilu uremijskog toksina, sa značajnijom ekspresijom u stupnju KBB5 i na dijalizi.

Razina Matrix Gla proteina u serumu povezana je u bolesnika s KBB sa stupnjem vaskularnih kalcifikacija i krutosti krvnih žila. Njegova aktivacija ovisi o dostupnosti vitamina K u organizmu i u aktivnom obliku sprečava kalcifikacije krvnih žila. Ukoliko ne dođe do aktivacije razina njegova inaktivnog oblika u serumu, raste i povezana je s lošim kardiovaskularnim ishodima (222). U našoj analizi pokazuje oštar trend pada u KBB2, a ekspresija mu raste prema dijalizi, što bi moglo odgovarati opisanom nakupljanju njegova inaktivnog oblika.

Pojedini ECM proteini (protein ekstracelularnog matriksa 1, filamin-A, protein udružen s hijalouronom 2, proteoglikan 4), pojedine matriks metaloproteinaze poput MMP-2, pojačivač prokolagen C-endopeptidaze 1, ali i inhibitor metaloproteinaze 1 (TIMP-1), pokazuju zanimljivi profil proteomske ekspresije, koji je suprotan prethodno opisanim ECM komponentama. Naime, ovi proteini značajno su prisutni u zdravih ispitanika, trend im ostaje podjednak ili tek blago snižen u KBB1, a nakon toga se uočava nagli pad ekspresije u KBB2, da bi potom u većine ekspresija ponovo porasla u KBB3, uz daljnji varijabilni tijek ovisan o pojedinačnom proteinu. Slično je opisano ranije za izoformu 2 kolagena XVIII i alfa-1 lanac kolagena III. Ovakav tijek mogao bi se spekulativno tumačiti aktivnim sudjelovanjem pojedinih proteina, odnosno njihovom potrošnjom na tkivnom nivou tijekom najaktivnijeg perioda u patofiziološkom smislu razvoja KBB, što posljedično dovodi do njihova naglog nestanka iz plazme ili alternativno razgradnjom proteina uslijed istovremene aktivacije njihovih inhibitora na sistemskom nivou. Zanimljiv je primjerice odnos proteomskog trenda ekspresije proteina udruženog s hijalouronom 2 (HABP2) i CD44 receptora za hijalouron, koji se ponašaju potpuno suprotno u KBB2. HABP2 je izvanstanična serinska proteaza koja veže hijaluronan, ima ulogu u hemostazi, ali i regulira propusnost krvnih žila vezano uz upalu (223). CD44 je receptor za hijaluronan kojim se prenosi signalizacija, kojoj je cilj zaustaviti aktivnost upale i spriječiti daljnju progresiju upalne aktivnosti i njeno preusmjeravanje k procesu fibrogeneze, kao što je to opisano u poglavlju 1.3.1.

Dodatno su zanimljivi *outlier* proteini, koji su se u našoj analizi pojavili u stupnju KBB2, protein adhezije vaskularnih stanica 1 (VCAM-1) i receptor za transferin-1, a koji su u literaturi povezani s bubrežnom bolešću i fibrozom. VCAM-1 je u istraživanjima povezan s progresijom



albuminurije, odnosno stupnjem dijabetičke nefropatije te histološkim parametrima aktivnosti bubrežne bolesti u bolesnika s lupusnim nefritisom (224, 225). Također je u drugim istraživanjima detektiran u bolesnika na dijalizi, a njegova koncentracija utvrđena metodom ELISA-e korelirala je s hemodinamskim parametrima arteriovenske fistule (226). Naši rezultati i rezultati drugih istraživanja upućuju na potrebu preciznije analize aktivnosti ove molekule tijekom razvoja KBB s točnim pozicioniranjem njene uloge u dijagnostici KBB.

Uloga Receptora za transferin-1 proučavana je u svjetlu negativnih aspekata metabolizma željeza i oksidativnih procesa na bubrežnu fibrozu. Yasamura i suradnici pokazali su na mišjem modelu streptozocinske dijabetičke nefropatije i UUO da genska modifikacija molekule dovodi do promjena u razvoju fibroze u oba modela (227). Nema podataka o sistematičnom praćenju ekspresije ovog proteina tijekom razvoja KBB te su potrebna daljnja istraživanja.

Ukupna analiza proteina ekstracelularnog matriksa obogaćena izražajem gena pokazala je da se trend ekspresije sastavnica ECM-a na molekularnom i staničnom nivou, izražen udjelom naših proteina unutar ukupne baze gena povezanih s ECM, vidljivo mijenja u stupnju 2 KBB i da se to događa istovremeno s promjenom izražaja signalnih puteva nespecifičnog imunološkog odgovora i kaskade komplementa. Pojačana aktivnost signalnih puteva nespecifičnog imunološkog odgovora u ranim stupnjevima KBB, potkrijepljena brojnim literaturnim podacima, vidljiva je i u našem istraživanju (67).

S obzirom da je iz literature poznato da sastavnice ECM-a i čimbenici nespecifičnog imunološkog odgovora djeluju povezano u procesu fibrogeneze na tkivnoj razini, naše detaljno proteomsko profiliranje upotpunilo je literaturne podatke i pokazalo da se interakcija ovih dvaju sustava vidi i na sistemskoj razini i da je ona najizraženija u stupnju KBB2 (108).

Iako u proteomskoj analizi u plazmi bolesnika nije utvrđena ADAMTS-4 proteinaza, njena prisutnost utvrđena je ELISA analizom. Sistemski profil ADAMTS-4 molekule u KBB vrlo je sličan profilu ranije spomenutih sastavnica ECM-a. Uz ogradu usporedbe različitih metoda utvrđivanja proteina, značajan porast koncentracije ADAMTS-4 u KBB2 nalikuje proteomskom profilu ranije opisanih molekula. Visoka koncentracija ostaje prisutna u KBB3, da bi potom padala i bila ispod razine detekcije u KBB5 i PD skupini. Zanimljivo, ADAMTS-4 ponovo se nakuplja u ispitanika na hemodijalizi, što je u skladu s ranijim opažanjima Grgurevic L. i suradnika (148). U TB skupini ADAMTS-4 utvrđen je samo u 3 bolesnika. Može se spekulirati da je u metodološkom smislu na njegovu detekciju utjecala imunosupresivna

terapija, po čemu se ova skupina značajno razlikovala od drugih ispitivanih skupina. Ipak u analizi usporedbe koncentracija ADAMTS-4 molekule u skupinama KBB1-5 nije nađena značajna razlika kada se promatrao status uzimanja imunosupresivne terapije. S obzirom na mali broj ispitanika ovu usporedbu potrebno je uzeti s rezervom i provjeriti u budućim istraživanjima. S druge strane, zanimljivo je da smo proteomskom analizom izdvojili skupinu od 9 proteina koji su bili prisutni u svim ispitivanim skupinama, osim u TB skupini, što je djelomično slično ponašanju ADAMTS-4 molekule, utvrđene ELISA-om. Neki od tih proteina sudjeluju i u procesu signalizacije tijekom fibrogeneze, poput čimbenika uključenih u lektinski put aktivacije komplementa (MASP1) te izoforme 3 perostina, koji sudjeluje u adheziji stanica i utječe na vezanje BMP-1 molekule u izvanstaničnom matriksu (228).

Temeljem literaturnih podataka, ADAMTS-4 do sada nije utvrđen niti proteomskim istraživanjima, koja su analizirala široki spektar proteina ekstracelularnog matriksa, neovisno o bubrežnim bolestima (217). Za razliku od matriks metaloproteinaza, koje su proteomskim istraživanjima povezane s KBB, ADAMTS proteaze (ADAMTS 2, 7, 9, 10, 16-18) utvrđene su isključivo u istraživanju Glorieux i suradnika iz 2015. godine. Ekspresija ADAMTS proteaza nije se u istom istraživanju razlikovala među promatranim skupinama ranog u odnosu na završni stadij KBB (154).

U našem istraživanju prvi put je u ispitanika s KBB utvrđena ekspresija proteina sličnog ADAMTS proteazi 2 (ADAMTSL2). Ovaj protein istražuje se u patogenezi srčane fibroze (229).

Utvdili smo i prisutnost MMP 2 i MMP 9, dviju funkcionalno povezanih matriks metaloproteinaza koje sudjeluju u razgradnji kolagena, što je u skladu s ranijim istraživanjima povezanosti ovih MMP s KBB (230). Zanimljivo, trend ekspresije MMP 2, gledajući njegovo kretanje od ZDR skupine sa značajnim padom ekspresije u KBB2, bio je vrlo sličan trendu njenih tkivnih inhibitora TIMP-1 i TIMP-2.

Za razliku od njih, visoka razina ekspresije  $\alpha$ -2 makroglobulina, sistemskog inhibitora različitih klasa proteinaza, uključujući i proteinaze ECM-a (MMP i ADAMTS), ali tkivne inhibitore proteaza (TIMP-1 i 2), u stupnju KBB2, mogla bi hipotetski biti povezana sa smanjenom ekspresijom njegovih navedenih supstrata (101, 231). Međusobne odnose proteinaza i njihovih inhibitora tijekom razvoja KBB potrebno je dodatno istražiti validacijskim metodama.

Proces fibrogeneze, kao što je detaljno razrađeno u uvodu, počinje pojačanom signalizacijom iz oštećene epitelne stanice, koja se potom prenosi u intersticij tijekom procesa tzv. parcijalne epitelno-mezenhimalne tranzicije. U tom razdoblju pojačava se signalizacija između endotelne stanice peritubularnih kapilara i priležećih pericita koja, između ostalog, rezultira i promjenama kapilara, prvim vidljivim strukturalnim promjenama u razvoju bubrežne fibroze (76, 77, 232). Zanimljivo, neuropilin 1, su-receptor VEGFR-a, kojim se ostvaruje endotelno pericitna komunikacija na razini peritubularnih kapilara, također pokazuje značajan pik ekspresije u stupnju KBB2 u našem istraživanju (79). Neuropilin 1 je i regulator vaskularne propusnosti u bubregu jer je integritet bazalne membrane kapilara povezan s ekspresijom ove molekule (233).

Potencijal većine bioloških biljega KBB, izoliranih iz krvi bolesnika, počiva na povezanosti njihove razine u krvi sa stupnjem napredovanja bolesti. Istražujući prisutnost i ulogu ADAMTS-4 proteinaze u biopsijskim uzorcima tkiva bubrega s različitim stupnjevima KBB, uključujući i posttransplantacijske biopsije, prvi put smo utvrdili da je imunohistokemijska ekspresija ove molekule u različitim odjeljcima bubrežnog tkiva češća u bolesnika s KBB u odnosu na kontrolnu skupinu (234). Njegovu prisutnost u tkivu bubrega s KBB usporedili smo s IHK izražajem molekule BMP-1, koja je ranije potvrđena kao profibrogena molekula (235). BMP-1 bio je izražen gotovo isključivo u području bubrežnih tubula, a učestalost ekspresije mu se u tom području nije mijenjala tijekom razvoja KBB. Kada se primijenila graducija intenziteta IHK bojenja bubrežnih tubula, tada je viši stupanj intenziteta bio povezan s akutnim tubularnim oštećenjem (rezultati nisu prikazani). Ovaj opažaj mogao bi biti podloga budućim istraživanjima povezanosti BMP molekule s akutnom ozljedom bubrega. Učestalost IHK pozitiviteta ADAMTS-4 molekule u području peritubularnih kapilara raste s napredovanjem KBB, a viši stupanj intersticijske fibroze (IFTA > 1) povezan je s češćom ekspresijom ADAMTS-4 molekule u intersticijskoj stromi i peritubularnim kapilarama. Isto je razvidno i u transplantiranim bubrezima, gdje je ekspresija ADAMTS-4 proteina u intersticijskom odjeljku bila povezana sa stupnjem intersticijske fibroze i tubularne atrofije. Dodatna analiza usporedbe u TBB skupini sa svim kroničnim biljezima oštećenja, prema Banff klasifikaciji, pokazala je povezanost IHK izražaja ADAMTS-4 u INT sa stupnjem intersticijske upale u područjima IFTA-e (B-iIFTA) i ukupnim stupnjem upale bubrežnog intersticija (B-ti). Kada smo iz analize izostavili bolesnike s intersticijskom fibrozom (B-ci  $\geq$  1) i usporedili izražaj ADAMTS-4 molekule u tkivu isključivo sa stupnjem upale (B-i score), nije bilo povezanosti između izražaja ove molekule i razine upale u bubrežnom tkivu. Također, IHK bojenje ADAMTS-4 molekule u PTC nije bio povezan s prisutnošću peritubularnog kapilaritisa. Poznato je da je ADAMTS-

4 povezan s bolestima kardiovaskularnog sustava i to strukturalnim bolestima poput aneurizme i disekcijske aorte kao i aterosklerotskim bolestima, poput koronarne bolesti srca i ateroskleroze karotidnih arterija. U oba slučaja ADAMTS-4 proteaza angažirana je u procesu regeneracije tkiva, njen izražaj potvrđen je u makrofagima, koji infiltriraju takva područja i skoro uvijek je molekula ADAMTS-4 u takvom miljeu pridružena svom široko rasprostranjenom substratu verzikanu (128, 138). S obzirom da je razina ekspresije verzikana povezana s napredovanjem KBB u mišjem modelu adriamicinske nefropatije, a pojačani izražaj mu je utvrđen i u biopsijskim uzorcima bubrega s KBB, moglo bi se lako pretpostaviti da je isti model međudjelovanja ADAMTS-4 molekule i njenog supstrata verzikana prisutan tijekom bubrežne fibrogeneze (112).

Promjena dinamike imunološkog sustava u KBB događa se na sistemskoj i tkivnoj razini (94, 236). U našem istraživanju proteomskim profiliranjem KBB pokazano je da razina signalizacije u sustavu nespecifičnog imunološkog odgovora počinje rasti tijekom KBB1, a najizraženija je u stupnju KBB2. Sličan trend porasta, iako u manjem opsegu, vidljiv je i za signalni sustav kaskade komplementa, čije pak pojedinačne komponente pokazuju ili značajan porast ili značajan pad trenda ekspresije u KBB2. Brojna istraživanja potvrdila su važnu ulogu makrofaga u procesu rane fibrogeneze, a promjena njihovog fenotipa jedan je od ključnih događaja, koji preusmjeravaju proces upale i regeneracije tkiva u proces ireverzibilne fibrogeneze (89, 99). Stoga bi se moglo reći da je prepoznavanje trenutka tranzicije fenotipa makrofaga u tkivu bubrega važno i za procjenu potencijalnog terapijskog djelovanja na fibrogenezu. Molekule, koje bi bile povezane s ovom tranzicijom, mogle bi biti koristan signal. Pojačana ekspresija ADAMTS-4 u makrofagima povezuje se u literaturi s različitim upalnim stanjima, a koja potencijalno također vode prema procesu fibrogeneze (134, 139, 144, 145, 237).

Pojačan genski izražaj srodnih ADAMTS proteaza (ADAMTS 2 i 12) dokazan je u stanicama koje svojim obilježjima pripadaju transformacijskim miofibroblastima u ranoj fazi bubrežne fibrogeneze (80). ADAMTS 1 bio je pojačano izražen u aktiviranim pericitima, kao dio procesa endotelno-pericitne komunikacije. U istom istraživanju utvrđen je i pojačan izražaj ADAMTS-4 molekule, iako on nije dosegao razinu statističke značajnosti.

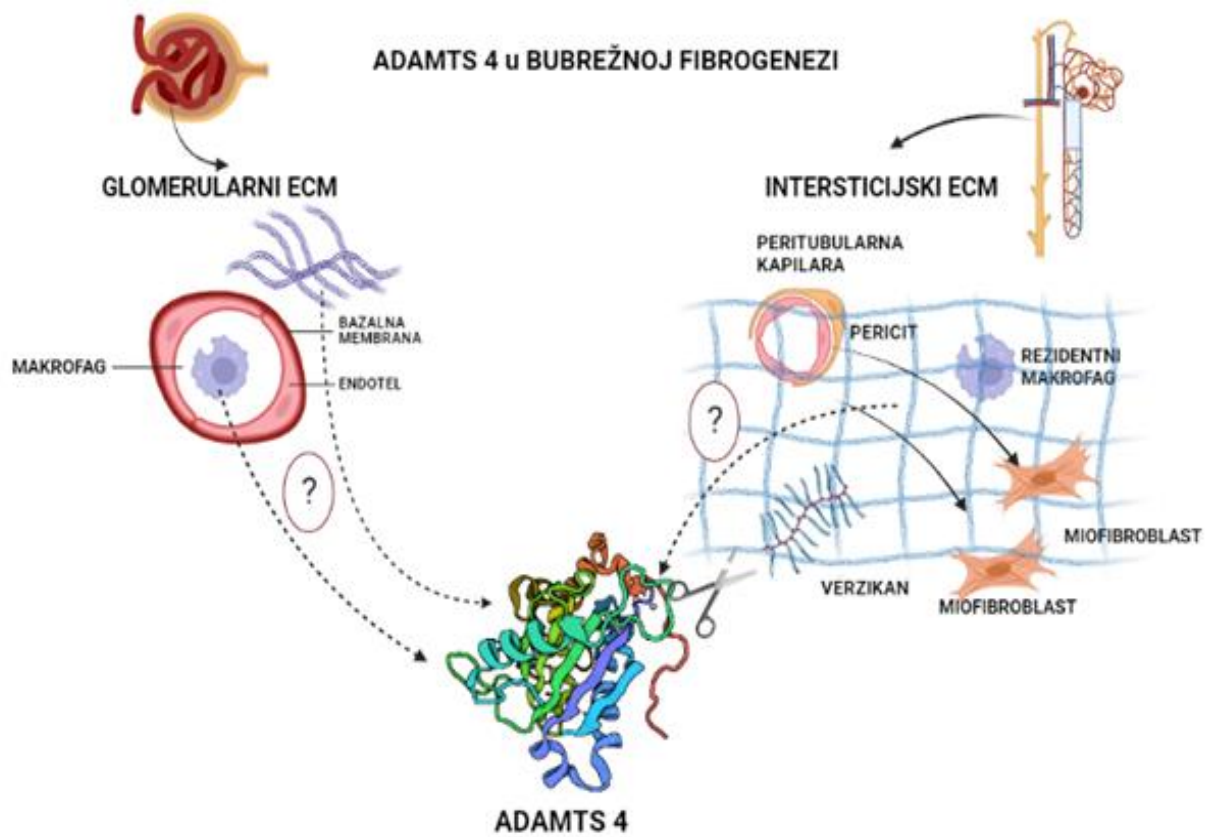
Sve navedeno u skladu je s našim opažanjem da se IHK ekspresija ADAMTS-4 molekule u peritubularnim kapilarama pojavljuje u samom početku razvoja KBB, dominantno u KBB1, da bi joj se nakon toga izražaj konsektivno povećavao u području intersticijske strome, prateći povećanje količine ECM-a. S druge pak strane, ekspresiju ADAMTS-4 molekule u

glomerularnim kapilarama zamijetili smo već u kontrolnoj skupini bez KBB, i to čak u 37% biopsijskih uzoraka, a taj izražaj povećavao se tijekom napredovanja KBB. Vrlo slično zamijećeno je i u analizi parnih transplantacijskih biopsija. Zanimljivo, ta rana faza ekspresije ADAMTS-4 u GC odlikovala se linearnim IHK pozitivitetom u stijenci kapilare, ali i točkastim IHK pozitivitetom unutar lumena (Slika 11.b). Temeljem toga moglo bi se pretpostaviti da se radi o istovremenoj ekspresiji ADAMTS-4 molekule u područjima uz bazalnu membranu glomerularne kapilare, tzv. glomerularnog ECM-a, kao i ekspresiji u staničnim elementima u samom lumenu kapilare, što bi potencijalno moglo odgovarati ekspresiji u makrofagima. Detaljniju karakterizaciju ovog opažanja potrebno je provesti u sljedećim istraživanjima. Hipotetski je moguće da u području intersticija postoje i dva različita izvora pojačane proizvodnje ADAMTS-4 molekule tijekom fibrogeneze, a spekulativno bi to mogli biti sistemski/tkivni makrofagi i periciti. Hipotetsko pozicioniranje ADAMTS-4 molekule u bubrežnoj fibrogenezi prikazano je na Slici 22.

U konačnici, usporedbom parnih biopsijskih uzoraka (TX0-TBB), u kojima je uspoređen IHK izražaj ove molekule u istom bubrežnom tkivu s vremenskim odmakom tijekom kojeg dolazi do napredovanja KBB i intersticijske fibroze na histološkoj razini, utvrdili smo da se ekspresija molekule ADAMTS-4 povećava s porastom stupnja KBB i količinom intersticijske fibroze. Ako bismo toj spoznaji pridodali i činjenicu da se ADAMTS-4 u plazmi ispitanika s KBB ponaša u stupnju KBB2 vrlo slično molekulama, koje su već ranije povezane s bubrežnim bolestima, tada bismo ADAMTS-4 molekulu mogli gledati u svjetlu novog potencijalnog biljega KBB.

Glavno ograničenje ovog istraživanja jest da se radi o presječnom, a ne longitudinalnom istraživanju ispitivanih skupina te nije bila moguća potpuna ujednačenost skupina temeljem pridruženih i osnovne bubrežne bolesti. Djelomično je ovo ograničenje prevladano usporedbom parnih biopsija transplantiranih bubrega. Dodatno ograničenje uvida u ulogu osnovne bubrežne bolesti na ekspresiju proteina, uključujući i ADAMTS-4, prisutno je radi udruživanja uzoraka u proteomskoj analizi, koja je imala za cilj dobivanje vidljivije ekspresije ključnih proteina u pojedinim ispitivanim skupinama, čime se pak dobilo na biološkoj raspoloživosti molekula.

S obzirom da istraživanje donosi potpuno novo otkriće ADAMTS-4 molekule u kroničnoj bubrežnoj bolesti i pozicionira ovu molekulu na mjesto potencijalnog novog biološkog biljega, potrebna su daljnja temeljita istraživanja koja bi potvrdila ili otklonila rezultate dobivene našim istraživanjem.



Slika 22. Hipotetsko pozicioniranje ADAMTS-4 molekule u bubrežnoj fibrogenezi.

Slika je izrađena u programu Biorender.com.

## 7. ZAKLJUČAK

1. Temeljem provedenog istraživanja možemo zaključiti da je KBB2 stupanj prekretnica brojnih patogenetskih procesa važnih u razvoju KBB, a očituje se značajnim promjenama trenda ekspresije pojedinačnih proteina, kao i signalnih puteva imunološkog, metaboličkog, koagulacijskog i regenerativnog sustava.
2. Uvriježeni uremijski toksini „srednje molekulske mase“, utvrđeni proteomskom analizom, pokazuju značajnu promjenu trenda ekspresije u stupnju KBB2. Temeljem karakteristika promjena trenda ekspresije pojedinih proteina kroz stadije KBB i njihove literaturne povezanosti s bubrežnom bolesti i/ili sistemskom upalom krvnih žila i kardiovaskularnih bolesti, utvrđeno je 15 novih kandidata za uremijske toksine. Potrebna su susljedna validacijska istraživanja za provjeru ovog rezultata.
3. Molekula ADAMTS-4 utvrđena je po prvi puta u perifernoj krvi i mokraći ispitanika sa kroničnom bubrežnom bolesti metodom ELISA-e, što smo i objavili 2022. godine (234). Koncentracija ove molekule u plazmi, u stupnju KBB2 i KBB3, bila je značajno viša u odnosu na sve ostale ispitivane skupine, što je u skladu s prethodno navedenim opažanjem vezano uz prekretnicu u stupnju KBB2.
4. Koncentracija ADAMTS-4 proteinaze u krvi nije korelirala s prisutnošću pridruženih bolesti, kao niti s primarnom bolesti glomerula kao osnovnom bubrežnom bolesti. ADAMTS-4 nije pokazao karakteristike trenda ekspresije uremijskog toksina. U skupini s transplantiranim bubregom ADAMTS-4 utvrđen je u plazmi u samo 10% ispitanika, dok u mokraći nije bio prisutan. Potencijalni uzrok mogao bi biti primjena IS terapije i drugi metodološki razlozi, no ne može se otkloniti niti mogućnost da se radi o specifičnom ponašanju ADAMTS-4 proteinaze u bolesnika nakon transplantacije bubrega. ADAMTS-4 detektiran je u mokraći ispitanika u različitim stadijima KBB, s varijabilnim kretanjem vrijednosti koncentracija tijekom progresije KBB. ADAMTS-4 protein nije zabilježen u mokraći ispitanika u stadiju KBB5, ispitanika na peritonejskoj dijalizi, kao ni u transplantiranih.
5. U imunohistokemijskoj analizi prisutnosti ADAMTS-4 molekule u tkivima bubrega utvrdili smo da je ADAMTS-4 prisutan u zdravom tkivu bubrega u području bubrežnih tubula, ali i djelomično glomerularnih kapilara te Bowmane čahure. Njegov izražaj se

pojavljuje u peritubularnim kapilarama i području intersticijske strome u početnim stupnjevima KBB, a povećava u razvijenoj KBB. Osim u presječnoj analizi bioptata bubrega, povezanost imunohistokemijske ekspresije sa stupnjem KBB utvrđena je i u analizi usporedbe parnih biopsija transplantiranih bubrega.

6. Utvrdili smo i da je imunohistokemijski izražaj proteina ADAMTS-4 značajno povezan sa stupnjem intersticijske fibroze i tubularne atrofije u nativnim i transplantiranim bubrezima, a da je njegova ekspresija u bubrezima s prisutnom fibrozom povezana s upalom lokaliziranom u području fibroze (iIFTA) kao i ukupnim stupnjem upale (ti). Dodatnom subanalizom povezanosti izražaja ADAMTS-4 sa intersticijskom upalom i tubulitisom u bubrezima bez izražene fibroze, nije utvrđena povezanost između ekspresije ovog proteina i izolirane upale intersticija i tubula.

Sve navedeno govori u prilog da bi se ADAMTS-4 proteinaza mogla razmotriti kao novi biljeg KBB na sistemskoj i tkivnoj razini. Potrebna su daljnja prospektivna istraživanja na većem uzorku ispitanika, uz istovremenu klasifikaciju ispitivanih skupina prema osnovnoj bubrežnoj bolesti.



## 8. SAŽETAK

Provedeno je istraživanje pojavnosti ADAMTS-4 proteina u KBB u cilju utvrđivanja ove molekule kao novog biološkog biljega KBB.

Uključeno je 150 ispitanika podijeljenih u 9 skupina: 5 (stupnjevi KBB1-5), 1 hemodijaliza, 1 peritonejska dijaliza, 1 nakon transplantacije bubrega te 1 skupina zdravih ispitanika.

Metode su uključivale: (1) tekućinsku kromatografiju sa spektrometrijom masa za proteomsku analizu ekspresije proteina u združenim uzorcima plazme svake pojedine skupine te dodatnom analizom signalnih bioloških puteva obogaćivanjem gena; (2) ELISA analizu pojedinačnih uzoraka krvi i mokraće 79 ispitanika iz navedenih 9 skupina; (3) imunohistokemijsku analizu (IHK) ADAMTS-4 na biopsijskim tkivima 19 nativnih i 34 transplantirana bubrega s KBB te 8 bubrega bez KBB. Parna analiza je uključila 15 postransplantacijskih biopsija i njihovih parnih biopsija učinjenih tijekom postupka transplantacije.

Proteomska analiza pokazala je da se značajna promjena trenda ekspresije različitih skupina proteina događa u stupnju KBB2. ADAMTS-4 nije utvrđen proteomskom analizom, ali je njegova prisutnost potvrđena ELISA analizom. Njegova koncentracija nije korelirala s napredovanjem KBB. Najviše prosječne koncentracije u plazmi utvrđene su u stupnjevima KBB2 i KBB3. Frekvencija pojavljivanja IHK ekspresije ADAMTS-4 u području intersticija, peritubularnih i glomerularnih kapilara bila je viša u skupinama s KBB u odnosu na kontrole. Ekspresija proteina ADAMTS-4 u području peritubularnih kapilara bila je značajno češća u bubrezima s razvijenom (KBB3-5) u odnosu na početnu (KBB1-2) fazu bolesti. Viši stupanj intersticijske fibroze bio je povezan s ekspresijom ADAMTS-4 u području bubrežnog intersticija. U analizi parova ADAMTS-4 značajno je češće izražen u skupini s nižom glomerulskom filtracijom i višim stupnjem fibroze u odnosu na skupinu biopsija učinjenih tijekom postupka transplantacije.

Zaključno, ADAMTS-4 mogao bi biti novi biološki biljeg KBB, povezan sa stupnjem progresije bolesti i pokazateljima bubrežne fibroze te su potrebna daljnja istraživanja.

## 9. SUMMARY

### **Protein ADAMTS-4 as a novel biomarker in chronic kidney disease**

Ivana Kovačević Vojtušek, 2023

Aim of the study was to investigate ADAMTS-4 molecule as a novel biomarker of CKD.

ADAMTS-4 were determined in plasma and urine of 150 participants from 9 investigational groups: 5 (CKD stages 1-5), 1 haemodialysis, 1 peritoneal dialysis, 1 kidney transplant recipients and 1 healthy control. Methods included high-liquid performance chromatography accompanied by mass spectrometry of pooled group samples and ELISA of 79 individual samples. Gene enrichment analysis for significant biological pathways was performed afterwards. Immunohistochemistry (IHC) analysis included biopsy samples from 19 native and 34 transplanted kidneys with CKD and controls without CKD. Paired analysis included 15 posttransplant and their biopsy pairs, taken at transplantation.

Expression of considerable number of proteins changed their trend significantly in stage 2 of CKD. ADAMTS-4 was not detected by proteomic analysis, but confirmed by ELISA. The highest plasma concentrations were detected in stages CKD2 and CKD3 but correlated poorly with CKD progression. Biopsy samples with CKD expressed ADAMTS-4 significantly more frequent than controls. Frequencies of IHC staining were significantly higher in biopsies with higher stages of fibrosis. In paired analysis expression was significantly higher in group with lower eGFR and higher fibrosis score.

ADAMTS-4 could be a novel biomarker for chronic kidney disease but further validation is needed.

## 10. LITERATURA

1. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.* 2013;3(1):1-150. doi: 10.1038/kisup.2012.73.
2. Chen TK, Knicely DH, Grams ME. Chronic kidney disease diagnosis and management. *JAMA.* 2019;322(13):1294-304. doi: 10.1001/jama.2019.14745.3.
3. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, Feldman HI, i sur. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 2009;150(9):604-12. doi: 10.7326/0003-4819-150-9-200905050-00006.
4. GBD Chronic Kidney Disease Collaboration. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet.* 2020;395(10225):709-33. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30045-3.
5. Kovesdy CP. Epidemiology of chronic kidney disease: an update 2022. *Kidney Int Suppl.* 2022;12(1):7-11. doi: 10.1016/j.kisu.2021.11.003.
6. Kjeldsen SE. Hypertension and cardiovascular risk: general aspects. *Pharmacol Res.* 2018;129:95-9. doi: 10.1016/j.phrs.2017.11.003.
7. Galešić K. Bolesti glomerula: primarne i sekundarne. Zagreb: Medicinska naklada; 2014.
8. Ketteler M, Block GA, Evenpoel P, Fukagawa M, Herzog CA, McCann L, i sur. Executive summary of the 2017 KDIGO Chronic Kidney Disease–Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) guideline update: what’s changed and why it matters. *Kidney Int.* 2017;92(1):26–36. doi: 10.1016/j.kint.2017.04.006.
9. Torres IB, Moreso F, Sarro E, Meseguer A, Seron D. The Interplay between inflammation and fibrosis in kidney transplantation. *Biomed Res Int.* 2014;750602. doi: 10.1155/2014/750602.

10. Perkovic V, Jardine M, Neal B, Bompoint S, Heerspink HJL, Charytan DM, i sur. Canagliflozin and renal outcomes in type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med*. 2019;380(24):2295-306. doi: 10.1056/NEJMoa1811744.
11. Mackensen S, Grund KE, Sindjić M, Bohle A. Influence of the renal cortical interstitium on the serum creatinine concentration and serum creatinine clearance in different chronic sclerosing interstitial nephritides. *Nephron*. 1979;24(1):30–4. doi: 10.1159/000181679.
12. Zeisberg M, Zeisberg EM. Precision renal medicine: a roadmap towards targeted kidney fibrosis therapies. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2015;8:16. doi: 10.1186/s13069-015-0033-x.
13. Rayego-Mateos S, Marquez-Exposito L, Rodriguez-Diez R, Sanz A, Guiteras R, Dolade N, i sur. Molecular mechanisms of kidney injury and repair. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3):1542. doi: 10.3390/ijms23031542.
14. Nagata M. Podocyte injury and its consequences. *Kidney Int*. 2016;89(6):1221-30. doi: 10.1016/j.kint.2016.01.012.
15. Humphreys BD. Mechanisms of Renal Fibrosis. *Annu Rev Physiol*. 2018;80:309-26. doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034227.
16. Sethi S, Haas M, Markowitz GS, D'Agati VD, Rennke HG, Jennette JC, i sur. Mayo clinic/renal pathology society consensus report on pathologic classification, diagnosis, and reporting of GN. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(5):1278-87. doi: 10.1681/ASN.2015060612.
17. Roufosse C, Simmonds N, Clahsen-van Groningen M, Haas M, Henriksen KJ, Horsfield C, i sur. A 2018 reference guide to the Banff classification of renal allograft pathology. *Transplantation*. 2018;102(11):1795-814. doi: 10.1097/TP.0000000000002366.
18. Zeisberg M, Kalluri R. Physiology of the renal interstitium. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(10):1831-40. doi: 10.2215/CJN.00640114.

19. Moeller MJ, Kramann R, Lammers T, Hoppe B, Eiche L, Portugall IL, i sur. New aspects of kidney fibrosis - from mechanisms of injury to modulators of disease. *Front Med (Lausanne)*. 2022;8:814497. doi: 10.3389/fmed.2021.814497.
20. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest*. 2002;110(3):341-50. doi: 10.1172/JCI15518.
21. Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(12):2282-7. doi: 10.1681/ASN.2008050513.
22. Meng XM, Nikolić-Paterson DJ, Lan HY. TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12(6):325-38. doi: 10.1038/nrneph.2016.48.
23. Liang X, Schnaper HW, Matsusaka T, Pastan I, Ledbetter S, Hayashida T. Anti-TGF- $\beta$  antibody, 1d11, ameliorates glomerular fibrosis in mouse models after the onset of proteinuria. *PLoS One*. 2016;11(5):e0155534. doi: 10.1371/journal.pone.0155534.
24. Vincenti F, Fervenza FC, Campbell KN, Diaz M, Gesualdo L, Nelson P, i sur. A phase 2, double-blind, placebo-controlled, randomized study of fresolimumab in patients with steroid-resistant primary focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int Rep*. 2017;2(5):800–10. doi: 10.1016/j.ekir.2017.03.011.
25. Voelker J, Berg PH, Sheetz M, Duffin K, Shen T, Moser B, i sur. Anti-TGF- $\beta$ 1 antibody therapy in patients with diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(3):953-62. doi: 10.1681/ASN.2015111230.
26. Budi RH, Schaub JR, Decaris M, Turner S, Derynck R. TGF- $\beta$  as a driver of fibrosis: physiological roles and therapeutic opportunities. *J Pathol*. 2021;254(4):358–73. doi: 10.1002/path.5680.
27. Kraman R, Humphreys BD. Kidney pericytes: Roles in regeneration and fibrosis. *Seminars in Nephrology*. 2014;34(4):374-83. doi: 10.1016/j.semnephrol.2014.06.004.

28. Leaf IA, Duffield JS. What can target kidney fibrosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2017;32(Suppl 1):S89-97. doi: 10.1093/ndt/gfw388.
29. Duffield JS. Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis. *J Clin Invest*. 2014;124(6):2299-306. doi: 10.1172/JCI72267.
30. Bülow RD, Boor P. Extracellular Matrix in Kidney Fibrosis: More Than Just a Scaffold. *J Histochem Cytochem*. 2019;67(9):643–61. doi: 10.1369/0022155419849388.
31. Grgic I, Campanholle G, Bijol V, Wang C, Sabbiseti VS, Ichimura T, i sur. Targeted proximal tubule injury triggers interstitial fibrosis and glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 2012;82(2):172-83. doi: 10.1038/ki.2012.20.
32. Thorisson GA, Smith AV, Krishnan L, Stein LD. The international HapMap project web site. *Genome Res*. 2005;15(11):1592-3. doi: 10.1101/gr.4413105.
33. Ledo N, Ko YA, Park AS, Kang HM, Han SY, Choi P, i sur. Functional genomic annotation of genetic risk loci highlights inflammation and epithelial biology network in CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(3):692-714. doi: 10.1681/ASN.2014010028.
34. Trudu M, Janas S, Lanzani C, Debaix H, Schaeffer C, Ikehata M, i sur. Common noncoding UMOD gene variants induce salt-sensitive hypertension and kidney damage by increasing uromodulin expression. *Nat Med*. 2013;19(12):1655-60. doi: 10.1038/nm.3384.
35. Humphreys BD, Lin SL, Kobayashi A, Hudson TE, Nowlin BT, Bonventre JV, i sur. Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol*. 2010;176(1):85-97. doi: 10.2353/ajpath.2010.090517.
36. Sheng L, Zhuang S. New insight into the role and mechanism of partial epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. *Front Physiol*. 2020;11:569322. doi: 10.3389/fphys.2020.569322.
37. Sanz AB, Santamaria B, Ruiz-Ortega M, Egidio J, Ortiz A. Mechanisms of renal apoptosis in health and disease. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(9):1634-42. doi: 10.1681/ASN.2007121336.
38. Belavgeni A, Meyer C, Stumpf J, Hugo C, Linkermann A. Ferroptosis and necroptosis in the kidney. *Cell Chem Biol*. 2020;27(4):448-62. doi: 10.1016/j.chembiol.2020.03.016.

39. Lech M, Grubmayr R, Ryu M, Lorenz G, Hartter I, Mulay SR, i sur. Macrophage phenotype controls long-term AKI outcomes - kidney regeneration versus atrophy. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(2):292-304. doi: 10.1681/ASN.2013020152.
40. Leemans JC, Kors L, Anders HJ, Florquin S. Pattern recognition receptors and the inflammasome in kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2014;10(7):398-414. doi: 10.1038/nrneph.2014.91.
41. Zhou B, Wan Y, Zhang C, Li X, Meng F, Glaser S, i sur. The emerging role of cellular senescence in renal disease. *J Cell Mol Med*. 2020;24(3):2087-97. doi: 10.1111/jcmm.14952.
42. Mansour SG, Puthumana J, Coca SG, Gentry M and Parikh CR. Biomarkers for the detection of renal fibrosis and prediction of renal outcomes: a systematic review. *BMC Nephrol*. 2017;18(1):72. doi: 10.1186/s12882-017-0490-0.
43. Rayego-Mateos S, Morgado-Pascual JL, Lavoz C, Rodrigues-Diez RR, Marquez-Exposito L, Tejera-Munoz A, i sur. CCN2 binds to tubular epithelial cells in the kidney. *Biomolecules*. 2022;12(2):252. doi: 10.3390/biom12020252.
44. Dantzer WH. Regulation of renal proximal and distal tubule transport: sodium, chloride and organic anions. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2003;136(3):453-78. doi: 10.1016/s1095-6433(03)00135-1.
45. Simon N, Hertig A. Alteration of fatty acid oxidation in tubular epithelial cells from acute kidney injury to renal fibrogenesis. *Front Med (Lausanne)*. 2015;2:52. doi: 10.3389/fmed.2015.00052.
46. Che R, Yuan Y, Huang S, Zhang A. Mitochondrial dysfunction in the pathophysiology of renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014;306(4):367-8. doi: 10.1152/ajprenal.00571.2013.
47. Han SH, Malaga-Dieguez L, Chinga F, Kang HM, Tao J, Reidy K, i sur. Deletion of Lkb1 in renal tubular epithelial cells leads to CKD by altering metabolism. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(2):439-53. doi: 10.1681/ASN.2014121181.
48. Tampe B, Zeisberg M. Contribution of genetics and epigenetics to progression of kidney fibrosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29(Suppl 4):S72-9. doi: 10.1093/ndt/gft025.

49. Rousselle T, Bardhi E, Maluf DG, Mas VR. Epigenetic modifications and the development of kidney graft fibrosis. *Curr Opin Organ Transplant*. 2021;26(1):1-9. doi: 10.1097/MOT.0000000000000839.
50. Liu Z, Wang Y, Shu S. Noncoding RNAs in kidney injury and repair. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2019;317(2):177-88. doi: 10.1152/ajpcell.00048.2019.
51. Schauerte C, Hubner A, Rong S, Wang S, Shushakova N, Mengel M, i sur. Antagonism of profibrotic microRNA-21 improves outcome of murine chronic renal allograft dysfunction. *Kidney Int*. 2017;92(3):646-56. doi: 10.1016/j.kint.2017.02.012.
52. Grynberg K, Ma FY, Nikolic-Paterson DJ. The JNK signaling pathway in renal fibrosis. *Front Physiol*. 2017;8:829. doi: 10.3389/fphys.2017.00829.
53. Naito T, Masaki T, Nikolic-Paterson DJ, Tanji C, Yorioka N, Kohno N. Angiotenzin II induces thrombospondin-1 production in human mesangial cells via p58 MAPK and JNK, a mechanism for activation of latent TGF- $\beta$ . *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;286(2):278-87. doi: 10.1152/ajprenal.00139.2003.
54. Zhou D, Fu H, Zhang L, Zhang K, Min Y, Xiao L. Tubule-derived Wnts are required for fibroblast activation and kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(8):2322-36. doi: 10.1681/ASN.2016080902.
55. Maarouf OH, Aravamudhan A, Rangarajan D, Kusaba T, Zhang V, Welborn J. Paracrine Wnt1 drives interstitial fibrosis without inflammation by tubulointerstitial cross-talk. *J Am Soc Nephrol*. 2015;27(39):781-90. doi: 10.1681/ASN.2014121188.
56. Ding H, Zhou D, Hao S, Zhou L, He W, Nie J, i sur. Sonic hedgehog signaling mediates epithelial–mesenchymal communication and promotes renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2012; 23(5):801-13. doi: 10.1681/ASN.2011060614.
57. Kramann R, Schneider RK, DiRocco DP, Machado F, Fleig S, Bondzie PA, i sur. Perivascular Gli1+ progenitors are key contributors to injury induced organ fibrosis. *Cell Stem Cell*. 2015;16(1):51–66. doi: 10.1016/j.stem.2014.11.004.
58. Kramann R, Fleig SV, Schneider RK, Fabian SL, DiRocco DP, Maarouf O. Pharmacological GLI2 inhibition prevents miofibroblast cell-cycle progression and reduced kidney fibrosis. *J Clin Investig*. 2015;125(8):2935-51. doi: 10.1172/JCI74929.



59. Kramann R, Goettsch, Wongboonsin J, Iwata H, Schneider RK, Kuppe C, i sur. Adventitial MSC-like cells are progenitors of vascular smooth muscle cells and drive vascular calcification in chronic kidney disease. *Cell Stem Cell*. 2016;19(5):628-42. doi: 10.1016/j.stem.2016.08.001.
60. Bray SJ. NOTCH signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; 7(9):678–89. doi: 10.1038/nrm2009.
61. Grande MT, Sanchez-Laorden B, Lopez-Blau C, De Frutos CA, Boutet A, Arevalo M, i sur. Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. *Nat Med*. 2015;21(9):989-97. doi: 10.1038/nm.3901.
62. Brosius FC, HeCurr JC. JAK inhibition and progressive kidney disease. *Opin Nephrol Hypertens*;2015;24(1):88-95. doi: 10.1097/MNH.0000000000000079.
63. Pang M, Ma L, Gong R, Tolbert E, Mao H, Ponnusamy M, i sur. A novel STAT3 inhibitor, S3I-201, attenuates renal interstitial fibroblast activation and interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney Int*. 2010;78(3):257-68. doi: 10.1038/ki.2010.154.
64. Liu N, He S, Ma L, Ponnusamy M, Tang J, Tolbert E, i sur. Blocking the class I histone deacetylase ameliorates renal fibrosis and inhibits renal fibroblast activation via modulating TGF-beta and EGFR signaling. *PloS One*. 2013;8(1):e54001. doi: 10.1371/journal.pone.0054001.
65. Koike K, Ueda S, Yamagishi S, Yasukawa H, Kaida Y, Yokoro M, i sur. Protective role of JAK/STAT signaling against renal fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction. *Clin Immunol*. 2014;150(1):78–87. doi: 10.1016/j.clim.2013.11.003.
66. Ucer0 AC, Benito-Martin A, Fuentes-Calvo I, Santamaria B, Blanco J, Lopez-Novoa JM, i sur. TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) promotes kidney fibrosis and Ras-dependent proliferation of cultured renal fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(10):1744-55. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.05.032.
67. Gomez IG, Roach AM, Nakagawa N, Amatucci A, Johnson BG, Dunn K, i sur. TWEAK-Fn14 signaling activates myofibroblasts to drive progression of fibrotic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(12):3639-52. doi: 10.1681/ASN.2015111227.
68. Jin C, Wu P, Li L, Xu W. Exosomes: emerging therapy delivery tools and biomarkers for kidney diseases. *Stem Cells Int*. 2021;7844455. doi: 10.1155/2021/7844455.

69. Li X, Liao J, Su X, Li W, Bi Z, Wang J, i sur. Human urine-derived stem cells protect against renal ischemia/reperfusion injury in a rat model via exosomal miR-146a-5p which targets IRAK1. *Theranostics*. 2020;10(21): 9561-78. doi: 10.7150/thno.42153.
70. Guan H, Peng R, Mao L, Fang F, Xu B, Chen M. Injured tubular epithelial cells activate fibroblasts to promote kidney fibrosis through miR-150-containing exosomes. *Exp Cell Res*. 2020;392(2):112007. doi: 10.1016/j.yexcr.2020.112007.
71. Zheng Y, Pan D. The Hippo signaling pathway in development and disease. *Dev Cell*. 2019;50(3):264-82. doi: 10.1016/j.devcel.2019.06.003.
72. Moya IM, Halder G. Hippo-YAP/TAZ signaling in organ regeneration and regenerative medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(4):211-26. doi: 10.1038/s41580-018-0086-y.
73. Xu C, Wang L, Zhang Y, Li W, Li J, Wang Y, i sur. Tubule-specific Mst1/2 deficiency induces chronic kidney disease via YAP and non-YAP mechanisms. *J Am Soc Nephrol*. 2020;31(5):946-61. doi: 10.1681/ASN.2019101052.
74. Chang-Panesso M. Tubular MST1/2 deletion and renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2020;31(5):893-7. doi: 10.1681/ASN.2020030305.
75. Feng Y, Ren J, Gui Y, Wei W, Shu B, Lu Q, i sur. Wnt/ $\beta$ -catenin-promoted macrophage alternative activation contributes to kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(1):182-93. doi: 10.1681/ASN.2017040391.
76. Bábíčková J, Klinkhammer BM, Buhl EM, Djudjaj S, Hoss M, Heymann F, i sur. Regardless of etiology, progressive renal disease causes ultrastructural and functional alterations of peritubular capillaries. *Kidney Int*. 2017;91(1):70–85. doi: 10.1016/j.kint.2016.07.038.
77. Kramann R, Wongboonsin J, Chang-Panesso M, Machado FG, Humphreys BD. Gli1<sup>+</sup>pericyte loss induces capillary rarefaction and proximal tubular injury. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(3):776-84. doi: 10.1681/ASN.2016030297.
78. Chen YT, Chang FC, Wu CF, Chou YH, Hsu HL, Chiang WC, i sur. Platelet-derived growth factor receptor signaling acitivates pericyte-miofibroblast transition in obstructive and post-ischemic kidney fibrosis. *Kidney Int*. 2011;80(11):1170-81. doi: 10.1038/ki.2011.208.

79. Lin SL, Chang FC, Schrimpf C, Chen YT, Wu CF, Wu VC, i sur. Targeting endothelium-pericyte cross talk by inhibiting VEGF receptor signaling attenuates kidney microvascular rarefaction and fibrosis. *Am J Pathol.* 2011;178(2):911-23. doi: 10.1016/j.ajpath.2010.10.012.
80. Schrimpf C, Xin C, Campanholle G, Gill S, Stallcup W, Lin SL, i sur. Pericyte TIMP3 and ADAMTS1 modulate vascular stability after kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(5):868-83. doi: 10.1681/ASN.2011080851.
81. Kawakami T, Mimura I, Shoji K, Taraka T, Nangaku M. Hypoxia and fibrosis in chronic kidney disease: crossing at pericytes. *Kidney Int Suppl (2011).* 2014;4(1):107-112. doi: 10.1038/kisup.2014.20.
82. Semenza GL, Neufeldt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88(13):5680-4. doi: 10.1073/pnas.88.13.5680.
83. Maxwell P.H., Eckardt K.U. HIF prolyl hydroxylase inhibitors for the treatment of renal anemia and beyond. *Nat Rev Nephrol.* 2016;12(3):157-68. doi: 10.1038/nrneph.2015.193.
84. Pan SY, Tsai PZ, Chou YH, Chang YT, Chang FC, Chiu YL i sur. Kidney pericyte hypoxia-inducible factor regulates erythropoiesis but not kidney fibrosis. *Kidney Int.* 2021;99(6):1354-68. doi: 10.1016/j.kint.2021.01.017.
85. Kobayashi A, Mugford JW, Krautzberger AM, Naiman N, Liao J, Mc Mahon JP. Identification of a multipotent self-renewing stromal progenitor population during mammalian kidney organogenesis. *Stem Cell Rep.* 2014;3(4):650-62. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.08.008.
86. Duffield JS, Humphreys BD. Origin of new cells in the adult kidney: results from genetic labeling techniques. *Kidney Int.* 2011;79(5):494-501. doi: 10.1038/ki.2010.338.
87. Reich B, Schmidbauer K, Rodriguez Gomez M, Hermann FJ, Göbel N, Brühl H, i sur. Fibrocytes develop outside the kidney but contribute to renal fibrosis in a mouse model. *Kidney Int.* 2013;84(1):78-89. doi: 10.1038/ki.2013.84.
88. Nikolic-Paterson DJ, Wang S, Lan HY. Macrophages promote renal fibrosis through direct and indirect mechanisms. *Kidney Int Suppl.* 2014;4(1):34-8. doi: 10.1038/kisup.2014.7.

89. Wang YY, Jiang H, Pan J, Huang XR, Wang YC, Huang HF. Macrophage-to myofibroblast transition contributes to interstitial fibrosis in chronic renal allograft injury. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(7):2053-67. doi: 10.1681/ASN.2016050573.
90. Kuppe C, Ibrahim MM, Kranz J, Zhang X, Ziegler S, Perales-Paton J, et al. Decoding miofibroblast origins in human kidney fibrosis. *Nature.* 2021;589(7841):281-6. doi: 10.1038/s41586-020-2941-1.
91. Grgic I, Krautzberger AM, Hofmeister A, Lalli M, DiRocco DP, Fleig SV, et al. Translational profiles of medullary myofibroblast during kidney fibrosis. *Am Soc Nephrol.* 2014;25(9):1979-90. doi: 10.1681/ASN.2013101143.
92. Wyczanska M and Lange-Sperandio B. DAMPs in unilateral ureteral obstruction. *Front Immunol.* 2020;11:581300. doi: 10.3389/fimmu.2020.581300.
93. Cucchiari D, Podestà M, Aponticelli C. The critical role of innate immunity in kidney transplantation. *Nephron.* 2016;132(2):227-37. doi: 10.1159/000444267.
94. Tang PC, Zhang YY, Chan MK, Lam WW, Chung JY, Kang W, et al. The emerging role of innate immunity in chronic kidney diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(11):4018. doi: 10.3390/ijms21114018.
95. Ratliff BB, Rabadi MM, Vasko R, Yasuda K, Goligorsky MS. Messengers without borders: mediators of systemic inflammatory response in AKI. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(4):529-36. doi: 10.1681/ASN.2012060633.
96. Stewart BJ, Ferdinand JR, Young MD, Mitchell TJ, Loudon KW, Riding AM, et al. Spatiotemporal immune zonation of the human kidney. *Science.* 2019;365(6460):1461-6. doi: 10.1126/science.aat5031.
97. Engel JE, Chade AR. Macrophage polarization in chronic kidney disease: a balancing act between renal recovery and decline? *Am J Physiol Physiol.* 2019;317(6):1409-13. doi: 10.1152/ajprenal.00380.2019.
98. Lee H, Fessler MB, Qu P, Heymann J, Kopp JB. Macrophage polarization in innate immune responses contributing to pathogenesis of chronic kidney disease. *BCM Nephrology.* 2020;21(1):270. doi: 10.1186/s12882-020-01921-7.

99. Tang PMK, Nikolic-Paterson D, Lan HY. Macrophages: versatile players in renal inflammation and fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* 2019;15(3):144-58. doi: 10.1038/s41581-019-0110-2.
100. Basso PJ, Oliveira VA, Saraiva Camara NO. Targeting immune cell metabolism in kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2021;17(7):465-80. doi: 10.1038/s41581-021-00413-7.
101. Karamanos NK, Theocharis AD, Piperigkou Z, Manou D, Passi A, Skandalis SS, i sur. A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. *The FEBS J.* 2021;288(24):6850-912. doi: 10.1111/febs.15776.
102. Wight TN. Provisional matrix: A role for versican and hyaluronan. *Matrix Biol.* 2017;60-61:38-56. doi: 10.1016/j.matbio.2016.12.001.
103. Genovese F, Manresa AA, Leeming DJ, Karsdal MA, Boor P. The extracellular matrix in the kidney: a source of novel non-invasive biomarkers of kidney fibrosis? *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2014;7(1):4. doi: 10.1186/1755-1536-7-4.
104. Ebefors K, Granquist A, Ingelsten M, Molne J, Haraldsson B, Nystrom J. Role of glomerular proteoglycans in IgA nephropathy. *Plos One.* 2011;6(4):e18575. doi: 10.1371/journal.pone.0018575.
105. Hugo C, Shankland SJ, Pichler RH, Couser WG, Johnson RJ. Thrombospondin 1 precedes and predicts the development of tubulointerstitial fibrosis in glomerular disease in rat. *Kidney Int.* 1998;53(2):302-11. doi: 10.1046/j.1523-1755.1998.00774.x.
106. Schaefer L, Schaefer RM. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res.* 2010;339(1):237-46. doi: 10.1007/s00441-009-0821-y.
107. Bode-Lesniewska B, Dours-Zimmermann MT, Odermatt BF, Briner J, Heitz PU, Zimmermann DR. Distribution of the large aggregating proteoglycan versican in adult human tissues. *J Histochem Cytochem.* 1996;44(4):303-12. doi: 10.1177/44.4.8601689.
108. Wight TN, Kang I, Evanko SP, Harten IA, Chang MY, Pearce OMT, i sur. Versican-A critical extracellular matrix regulator of immunity and inflammation. *Front Immunol.* 2020;11:512. doi: 10.3389/fimmu.2020.00512.
109. Sandy JD, Westling J, Kenagy RD, Iruela-Arispe ML, Verscharen C, Rodriguez-Mazaneque JC, i sur. Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the glu441-

ala442 bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4. *J Biol Chem.* 2001;276(16):13372-8. doi: 10.1074/jbc.M009737200.

110. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechanoregulation of connective tissue remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(5):349-63. doi: 10.1038/nrm809.

111. Carthy JM, Meredith AJ, Boroomand S, Abraham T, Luo Z, Knight D, et al. Versican V1 overexpression induces a myofibroblast-like phenotype in cultured fibroblast. *PloS One* . 2015;10(7):e0133056. doi: 10.1371/journal.pone.0133056.

112. Rudnicki M, Perco P, Neuwirt H, Noppert SJ, Leierer J, Sunzenauer J, et al. Increased renal versican expression is associated with progression of chronic kidney disease. *PloS One.* 2012;7(9):e44891. doi: 10.1371/journal.pone.0044891.

113. Apte SS, Parks WC. Metalloproteinases: A parade of function in matrix biology and an outlook for the future. *Matrix Biol.* 2015;44-46:1-6. doi: 10.1016/j.matbio.2015.04.005.

114. Rawlings ND, Barrett AJ, Thomas PD, Huang X, Bateman A, Finn RD. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(29145643):624-32. doi: 10.1093/nar/gkx1134.

115. Zakiyanov O, Kalousova M, Zima T, Tesar V. Matrix metalloproteinases in renal disease: a critical appraisal. *Kidney Blood Press Res.* 2019;44(3):298-330. doi: 10.1159/000499876.

116. Abdel Aziz MA, Badary DM, Hussein MR. Renal damage following alloxan-induced diabetes is associated with generation of reactive oxygen species, alterations of p53, TGF- $\beta$ 1, and extracellular matrix metalloproteinases in rats. *Cell Biol Int.* 2017;41(5):525-33. doi: 10.1002/cbin.10752.

117. Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Ebihara I, Shimada N, Koide H. Elevation of serum levels of metalloproteinase-1, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and type IV collagen, and plasma levels of metalloproteinase-9 in polycystic kidney disease. *Am J Nephrol.* 2000;20(1):32-6. doi: 10.1159/000013552.

118. Lloris-Carsí JM, Barrios C, Prieto-Moure B, Lloris-Cejalvo JM, Cejalvo-Lapeña D. The effect of biological sealants and adhesive treatments on matrix metalloproteinase expression

during renal injury healing. *PloS One*. 2017;12(5):e0177665. doi: 10.1371/journal.pone.0177665.

119. Cheng Z, Limbu MH, Wang Z, Liu J, Liu L, Zhang X, i sur. MMP-2 and 9 in chronic kidney disease. *Int J Mol Sci*. 2017;18(4):776. doi: 10.3390/ijms18040776.

120. Rodríguez-Sánchez E, Navarro-García JA, Aceves-Ripoll J, Álvarez-Llamas G, Segura J, Barderas MG, i sur. Association between renal dysfunction and metalloproteinase (MMP)-9 activity in hypertensive patients. *Nefrología (Engl Ed)*. 2019;39(2):184-9. doi: 10.1016/j.nefro.2018.08.009.

121. Ke B, Fan C, Yang L, Fang X. Matrix metalloproteinases-7 and kidney fibrosis. *Front Physiol*. 2017;8:21. doi: 10.3389/fphys.2017.00021.

122. Surendran K, Simon TC, Liapis H, McGuire JK. Matrilysin (MMP-7) expression in renal tubular damage: association with Wnt4. *Kidney Int*. 2004;65(6):2212–22. doi: 10.1111/j.1523-1755.2004.00641.x.

123. Zhou D, Tian Y, Sun L, Zhou L, Xiao L, Tan RJ. Matrix metalloproteinase-7 is a urinary biomarker and pathogenic mediator of kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(2):598-611. doi: 10.1681/ASN.2016030354.

124. Romanic AM, Burns-Kurtis CL, Ao Z, Arleth AJ, Ohlstein EH. Upregulated expression of human membrane type-5 matrix metalloproteinase in kidneys from diabetic patients. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001;281(2):309-17. doi: 10.1152/ajprenal.2001.281.2.F309.

125. Rose KWJ, Taye N, Karoulias SZ, Hubmacher D. Regulation of ADAMTS proteases. *Front Mol Biosci*. 2021;8:701959. doi: 10.3389/fmolb.2021.701959.

126. Kelwick R, Desanlis I, Wheeler GN, Edwards DR. The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. *Genome Biol*. 2015;16(1):113. doi: 10.1186/s13059-015-0676-3.

127. Tortorella MD, Burn TC, Pratta MA, Abbaszada I, Hollis JM, Liu R, i sur. Purification and cloning of aggrecanase-1: A member of the ADAMTS family of proteins. *Science*. 1999;284 (5420):1664-6. doi: 10.1126/science.284.5420.1664.

128. Novak R, Hrkac S, Salai G, Bilandzic J, Mitar L, Grgurevic L. The role of ADAMTS-4 in atherosclerosis and vessel wall abnormalities. *J Vasc Res.* 2022;59(2):69-77. doi: 10.1159/000521498.
129. Tortorella M, Pratta MA, Liut RQ, Abbaszada I, Ross H, Burn T, i sur. The thrombospondin motif of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) is critical for aggrecan substrate recognition and cleavage. *J Biol Chem.* 2000;275(33):25791-7. doi: 10.1074/jbc.M001065200.
130. Westling J, Gottschall PE, Thompson VP, Cockburn A, Perides G, Zimmermann DR, i sur. ADAMTS 4 (aggrecanase-1) cleaves human brain versican V2 at Glu 405 –Gln 406 to generate glial hyaluronate binding protein. *Biochem J.* 2004;377(3):787-95. doi: 10.1042/BJ20030896.
131. Hisanaga A, Morishita S, Suzuki K, Sasaki K, Koie M, Kohno T, i sur. A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4 (ADAMTS-4) cleaves Reelin in an isoform-dependent manner. *FEBS Lett.* 2012;586(19):3349-53. doi: 10.1016/j.febslet.2012.07.017.
132. Verma P, Dalal K. ADAMTS-4 and ADAMTS-5: Key enzymes in osteoarthritis. *J Cell Biochem.* 2011;112(12):3507-14. doi: 10.1002/jcb.23298.
133. Koch CD, Lee CM, Apte SS. Aggrecan in cardiovascular development and disease. *J Histochem Cytochem.* 2020;68(11):777-95. doi: 10.1369/0022155420952902.
134. Wågsäter D, Björk H, Zhu C, Björkegren J, Valen G, Hamsten A, i sur. ADAMTS-4 and -8 are inflammatory regulated enzymes expressed in macrophage-rich areas of human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis.* 2008;196(2):514-22. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.05.018.
135. Salter RC, Ashlin TG, Kwan AP, Ramji DP. ADAMTS proteases: key roles in atherosclerosis? *J Mol Med (Berl).* 2010;88(12):1203-11. doi: 10.1007/s00109-010-0654-x.
136. Kenagy RD, Min SE, Clowers AW, Sandy JD. Cell death-associated ADAMTS4 and versican degradation in vascular tissue. *J Histochem Cytochem.* 2009;57(9):889-97. doi: 10.1369/jhc.2009.953901.
137. Kenagy R, Fisher J, Lara S, Sandy J, Clowes A, Wight T. Accumulation and loss of extracellular matrix during shear stress-mediated intimal growth and regression in baboon



vascular grafts. *J Histochem Cytochem.* 2005;53(1):131-40. doi: 10.1177/002215540505300115.

138. Dong H, Du T, Premaratne S, Zhao CX, Tian Q, Li Y, i sur. Relationship between ADAMTS4 and carotid atherosclerotic plaque vulnerability in humans. *J Vasc Surg.* 2018;67(4):1120-6. doi: 10.1016/j.jvs.2017.08.075.

139. Salter RC, Arnaoutakis K, Michael DR, Singh NN, Ashlin TG, Buckley ML, i sur. The expression of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4 in human macrophages is inhibited by the anti-atherogenic cytokine transforming growth factor- $\beta$  and requires Smads, p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011;43(5):805-11. doi: 10.1016/j.biocel.2011.02.005.

140. Chen L, Yang L, Zha Y, Cui L. Association of serum a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif 4 levels with the presence and severity of coronary artery disease. *Coron Artery Dis.* 2011;22(8):570–6. doi: 10.1097/MCA.0b013e32834c7565.

141. Zha Y, Chen Y, Xu F, Li T, Zhao C, Cui L. ADAMTS4 level in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes. *Biomed Pharmacother.* 2010;64(3):160-4. doi: 10.1016/j.biopha.2009.09.012.

142. Ren P, Zhang L, Xu G, Palmero LC, Albini PT, Coselli JS, i sur. ADAMTS-1 and ADAMTS-4 levels are elevated in thoracic aortic aneurysms and dissections. *Ann Thorac Surg.* 2013;95(2):570-7. doi: 10.1016/j.athoracsur.2012.10.084.

143. Li K, Wang ZW, Hu Z, Ren Z, Hu X, Li L, i sur. Assessing serum levels of ADAMTS1 and ADAMTS4 as new biomarkers for patients with type A acute aortic dissection. *Med Sci Monit.* 2017;23:3913-22. doi: 10.12659/msm.905092.

144. Boyd DF, Allen EK, Randolph AG, Guo X, Zhi J, Weng Y, i sur. Exuberant fibroblast activity compromises lung function via ADAMTS4. *Nature.* 2020;587(7834):466-71. doi: 10.1038/s41586-020-2877-5.

145. Ashlin TG, Kwan APL, Ramji DP. Regulation of ADAMTS-1, -4 and -5 expression in human macrophages: Differential regulation by key cytokines implicated in atherosclerosis and novel synergism between TL1A and IL-17. *Cytokine.* 2013;64(1):234-42. doi: 10.1016/j.cyto.2013.06.315.

146. Armutcu F, Demircan K, Yildirim U, Namuslu M, Yagmurca M, Celik HT. Hypoxia causes important changes of extracellular matrix biomarkers and ADAMTS proteinases in the adriamycin-induced renal fibrosis model. *Nephrology (Carlton)*. 2019;24(8):863-75. doi: 10.1111/nep.13572.
147. Boerboom D, Lafond JF, Zheng X, Lapointe E, Mittaz L, Boyer A, i sur. Partially redundant functions of Adamts1 and Adamts4 in the perinatal development of the renal medulla. *Dev Dyn*. 2011;240(7):1806-14. doi: 10.1002/dvdy.22662.
148. Grgurevic L, Vukicevic S, inventors. Genera istraživanja, assignee. ADAMTS4 as a blood biomarker and therapeutic target for chronic renal failure. United States Patent 8263072B2. 2012-9-11.
149. Wang S, Lu Y, Hong Q, Geng X, Wang X, Zheng W, i sur. Protein array-based detection of proteins in kidney tissues from patients with membranous nephropathy. *Biomed Res Int*. 2017: 7843584. doi: 10.1155/2017/7843584.
150. Tracz J, Luczak M. Applying proteomics and integrative "omics" strategies to decipher the chronic kidney disease-related atherosclerosis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(14):7492. doi: 10.3390/ijms22147492.
151. Schlage P, Keller U. Proteomic approaches to uncover MMP function. *Matrix Biol*. 2015;44-46:232-8. doi: 10.1016/j.matbio.2015.01.003.
152. Hwang IK, Park SM, Kim SY, Lee ST. A proteomic approach to identify substrates of matrix metalloproteinase-14 in human plasma. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1702(1):79-87. doi: 10.1016/j.bbapap.2004.08.001.
153. Yates JR. The revolution and evolution of shotgun proteomics for large-scale proteome analysis. *J Am Chem Soc*. 2013;135(5):1629-40. doi: 10.1021/ja3094313.
154. Glorieux G, Mullen W, Duranton F, Filip S, Gayraud N, Husi H, i sur. New insights in molecular mechanisms involved in chronic kidney disease using high-resolution plasma proteome analysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30(11):1842-52. doi: 10.1093/ndt/gfv254.
155. Romanova Y, Laikov A, Markelova M, Khadiullina R, Makseev A, Hasanova M, i sur. Proteomic analysis of human serum from patients with chronic kidney disease. *Biomolecules*. 2020;10(2):257. doi: 10.3390/biom10020257.

156. Higashisaka K, Takeya S, Kamada H, Obana M, Maeda M, Kabayama M, i sur. Identification of biomarkers of chronic kidney disease among kidney-derived proteins. *Clin Proteomics*. 2022;19(1):3. doi: 10.1186/s12014-021-09340-y.
157. Nyangoma S, Collins S, Altman D, Johnson P, Billingham LJ. Sample Size Calculations for Designing Clinical Proteomic Profiling Studies Using Mass Spectrometry. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2012;11(3):2. doi: 10.1515/1544-6115.1686.
158. Cairns DA, Barrett JH, Billingham LJ, Stanley AJ, Xinarianos G, Field JK, i sur. Sample size determination in clinical proteomic profiling experiments using mass spectrometry for class comparison. *Proteomics*. 2009;9(1):74-86. doi: 10.1002/pmic.200800417.
159. Walker PD. The renal biopsy. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(2):181-8. doi: 10.5858/133.2.181.
160. Fonseka P, Pathan M, Chitti SV, Kang T, Mathivanan S. FunRich enables enrichment analysis of OMICs datasets. *J Mol Biol*. 2021;433(11):166747. doi: 10.1016/j.jmb.2020.166747.
161. Galešić Ljubanović D. Osnovna načela patohistološke dijagnostike bubrežnih bolesti. U: Galešić K i sur. *Bolesti glomerula: primarne i sekundarne*. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. Str. 40-51.
162. Yuan C, Liu Z, Yu Q, Wang X, Bian M, Yu Z, i sur. Expression of PD-1/PD-L1 in primary breast tumours and metastatic axillary lymph nodes and its correlation with clinicopathological parameters. *Sci Rep*. 2019;9(1):14356. doi: 10.1038/s41598-019-50898-3.
163. Duranton F, Cohen G, De Smet R, Rodriguez M, Jankowski J, Vanholder R, i sur. On behalf of the European Uremic Toxins Work Group. Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(7):1258-70. doi: 10.1681/ASN.2011121175.
164. Zhang Y, Duan SW, Chen P, Yin Z, Wang Y, Cai GY, i sur. Relationship between serum C3/C4 ratio and prognosis of immunoglobulin A nephropathy based on propensity score matching. *Chin Med J (Engl)*. 2020;133(6):631-7. doi: 10.1097/CM9.0000000000000674.
165. Kiss MG, Binder CJ. The multifaceted impact of complement on atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2022;351:29-40. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2022.03.014.

166. Satomura A, Fujita T, Fuke Y, Yanai M, Kumasaka K, Takayama E, i sur. Relationship between oligomer and functional serum mannose-binding lectin in chronic renal failure. *Eur J Clin Invest.* 2010;40(10):865-73. doi: 10.1111/j.1365-2362.2010.02325.x.
167. Poppelaars F, Gaya da Costa M, Berger SP, Assa S, Meter-Arkema AH, Daha MR, i sur. Strong predictive value of mannose-binding lectin levels for cardiovascular risk of hemodialysis patients. *J Transl Med.* 2016;14(1):236. doi: 10.1186/s12967-016-0995-5.
168. Qin Y, Liu J, Liu J, Hu F. Collectins in urinary tract and kidney diseases. *Int Urol Nephrol.* 2018;50(4):695-703. doi: 10.1007/s11255-017-1728-2.
169. Vengen IT, Enger TB, Videm V, Garred P. Pentraxin 3, ficolin-2 and lectin pathway associated serine protease MASP-3 as early predictors of myocardial infarction - the HUNT2 study. *Sci Rep.* 2017;7:43045. doi: 10.1038/srep43045.
170. Elsheikh M, Elhefnawy KA, Emad G, Ismail M, Borai M. Zinc alpha 2 glycoprotein as an early biomarker of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Bras Nefrol.* 2019;41(4):509-17. doi: 10.1590/2175-8239-JBN-2018-0200.
171. Aragonès G, Auguet T, Guiu-Jurado E, Berlanga A, Curriu M, Martinez S, i sur. Proteomic profile of unstable atheroma plaque: increased neutrophil defensin 1, clusterin, and apolipoprotein e levels in carotid secretome. *J Proteome Res.* 2016;15(3):933-44. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00936.
172. Zechendorf E, Gombert A, Bülow T, Frank N, Beckers C, Peine A, i sur. The role of ribonuclease 1 and ribonuclease inhibitor 1 in acute kidney injury after open and endovascular thoracoabdominal aortic aneurysm repair. *J Clin Med.* 2020;9(10):3292. doi: 10.3390/jcm9103292.
173. Bedenbender K, Schmeck BT. Endothelial ribonuclease 1 in cardiovascular and systemic inflammation. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:576491. doi: 10.3389/fcell.2020.576491.
174. Kalantari S, Jafari A, Moradpoor R, Ghasemi E, Khalkhal E. Human urine proteomics: analytical techniques and clinical applications in renal diseases. *Int J Proteomics.* 2015;2015:782798. doi: 10.1155/2015/782798.
175. Bourebaba L, Marycz K. Pathophysiological implication of fetuin-a glycoprotein in the development of metabolic disorders. *J Clin Med.* 2019;8(12):2033. doi: 10.3390/jcm8122033.

176. Denburg MR, Bhan I. Vitamin D-binding protein in health and chronic kidney disease. *Semin Dial.* 2015;28(6):636-44. doi: 10.1111/sdi.12422.
177. Gasparri C, Curcio A, Torella D, Gaspari M, Celi V, Salituri F, et al. Proteomics reveals high levels of vitamin D binding protein in myocardial infarction. *Front Biosci.* 2010;2(3):796-804. doi: 10.2741/e140.
178. Liu D, Chen Y, Wang Y, Lei M, Chen L, Liang R, et al. Combination of serum amyloid a and c-reactive protein exhibit synergistic effect in angiogenesis by inducing inflammation and vascular network. *Front Oncol.* 2020;10:576207. doi: 10.3389/fonc.2020.576207.
179. Habuka M, Fagerberg L, Hallström BM, Kampf C, Edlund K, Sivertsson Å, et al. The kidney transcriptome and proteome defined by transcriptomics and antibody-based profiling. *PLoS One.* 2014;9(12):e116125. doi: 10.1371/journal.pone.0116125.
180. Weerackoon N, Gunawardhana KL, Mani A. Wnt signaling cascades and their role in coronary artery health and disease. *J Cell Signal.* 2021;2(1):52-62. doi: 10.33696/Signaling.2.035.
181. Bacci MR, Cavallari MR, de Rozier-Alves RM, Alves Bda C, Fonseca FL. The impact of lipocalin-type-prostaglandin-D-synthase as a predictor of kidney disease in patients with type 2 diabetes. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:3179-82. doi: 10.2147/DDDT.S82100.
182. Orenes-Piñero E, Manzano-Fernández S, López-Cuenca A, Marín F, Valdés M, Januzzi JL.  $\beta$ -Trace Protein: From GFR marker to cardiovascular risk predictor. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2013;8(5):873-81. doi: 10.2215/CJN.08870812.
183. Baricos WH, Shah SV. Proteolytic enzymes as mediators of glomerular injury. *Kidney Int.* 1991;40(2):161-73. doi: 10.1038/ki.1991.196.
184. Shi JY, Pan HY, Liu K, Pan M, Si GJ. Expression of ectopic trypsin in atherosclerotic plaques and the effects of aprotinin on plaque stability. *Arch Biochem Biophys.* 2020;690:108460. doi: 10.1016/j.abb.2020.108460.
185. Al-Kafaji G, Malik AN. Hyperglycemia induces elevated expression of thyroid hormone binding protein in vivo in kidney and heart and in vitro in mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;391(4):1585-91. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.12.061.

186. Singhal A, Chauhan A, Goyal P, Taneja A. Transthyretin - a novel biomarker for insulin resistance and atherosclerosis risk in prediabetics. *J Assoc Physicians India*. 2021;69(11):11-12.
187. Albert C, Zapf A, Haase M, Röver C, Pickering JW, Albert A, i sur. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin measured on clinical laboratory platforms for the prediction of acute kidney injury and the associated need for dialysis therapy: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis*. 2020;76(6): 826-841.e1. doi: 10.1053/j.ajkd.2020.05.015.
188. Lindberg S, Jensen J, Hoffmann S, Iversen A, Pedersen S, Biering-Sørensen T, i sur. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin reflects both inflammation and kidney function in patients with myocardial infarction. *Cardiorenal Med*. 2016;6(3):180-90. doi: 10.1159/000443846.
189. Liu F, Zhuang S. Role of receptor tyrosine kinase signaling in renal fibrosis. *Int J Mol Sci*. 2016;17(5):972. doi: 10.3390/ijms17060972.
190. Zhang Y, Wang Y, Ding J, Liu P. Efferocytosis in multisystem diseases. *Mol Med Rep*. 2022;25(1):13. doi: 10.3892/mmr.2021.12529.
191. Niu YY, Zhang YY, Zhu Z, Zhang XQ, Liu X, Zhu SY, i sur. Elevated intracellular copper contributes a unique role to kidney fibrosis by lysyl oxidase mediated matrix crosslinking. *Cell Death Dis*. 2020;11(3):211. doi: 10.1038/s41419-020-2404-5.
192. Rodríguez C, Martínez-González J, Raposo B, Alcludia JF, Guadall A, Badimon L, i sur. Regulation of lysyl oxidase in vascular cells: lysyl oxidase as a new player in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res*. 2008;79(1):7-13. doi: 10.1093/cvr/cvn102.
193. Mischak H, Delles C, Vlahou A, Vanholder R. Proteomic biomarkers in kidney disease: issues in development and implementation. *Nat Rev Nephrol*. 2015;11(4):221-32. doi: 10.1038/nrneph.2014.247.
194. Grgurevic L, Novak R, Salai G, Hrkac S, Mocibob M, Vojtusek IK, i sur. Stage II of Chronic Kidney Disease-A Tipping Point in Disease Progression? *Biomedicines*. 2022 ;10(7):1522. doi: 10.3390/biomedicines10071522.

195. Krochmal M, Fernandes M, Filip S, Pontillo C, Husi H, Zoidakis J, i sur. PeptiCKDdb—peptide- and protein-centric database for the investigation of genesis and progression of chronic kidney disease. *Database (Oxford)*. 2016;2016:baw128. doi: 10.1093/database/baw128.
196. Luczak M, Suszynska-Zajczyk J, Marczak L, Formanowicz D, Pawliczak E, Wanic-Kossowska M, i sur. Label-free quantitative proteomics reveals differences in molecular mechanism of atherosclerosis related and non-related to chronic kidney disease. *Int J Mol Sci*. 2016;17(5):631. doi: 10.3390/ijms17050631.
197. Inker LA, Eneanya ND, Coresh J, Tighiouart H, Wang D, Sang Y, i sur. New creatinine- and cystatin c-based equations to estimate GFR without race. *N Engl J Med*. 2021;385(19):1737-49. doi: 10.1056/NEJMoa2102953.
198. Vanholder R, Baurmeister U, Brunet P, Cohen G, Glorieux G, Jankowski J. A bench to bedside view of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(5):863-70. doi: 10.1681/ASN.2007121377.
199. Lameire N, Vanholder R, De Smet R. Uremic toxins and peritoneal dialysis. *Kidney Int Suppl*. 2001;78:292-7. doi: 10.1046/j.1523-1755.2001.59780292.x.
200. Kim DJ, Do JH, Huh W, Kim YG, Oh H-Y. Dissociation between clearances of small and middle molecules in incremental peritoneal dialysis. *Perit Dial Int*. 2001;21(5):462-6.
201. Rippe B. A three-pore model of peritoneal transport. *Perit Dial Int*. 1993;13(Suppl 2):S35-8.
202. Zweigart C, Boschetti-de-Fierro A, Hulko M, Nilsson LG, Beck W, Storr M, i sur. Medium cut-off membranes-closer to the natural kidney removal function. *Int J Artif Organs*. 2017;40(7):328-34. doi: 10.5301/ijao.5000603.
203. Zhang Y, Ou M, Lin H, Lai L, Chen H, Chen J, i sur. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in the serum of patients with acute renal allograft rejection using iTRAQ labelling technology. *Mol Med Rep*. 2020;22(3):2329-41. doi: 10.3892/mmr.2020.11299.
204. Watanabe H, Fujimura R, Hiramoto Y, Murata R, Nishida K, Bi J, i sur. An acute phase protein  $\alpha$ 1-acid glycoprotein mitigates AKI and its progression to CKD through its anti-inflammatory action. *Sci Rep*. 2021;11(1):7953. doi: 10.1038/s41598-021-87217-8.

205. Marczak L, Idkowiak J, Tracz J, Stobiecki M, Perek B, Kostka-Jeziorny K, i sur. Mass spectrometry-based lipidomics reveals differential changes in the accumulated lipid classes in chronic kidney disease. *Metabolites*. 2021;11(5):275. doi: 10.3390/metabo11050275.
206. Gara SK, Grumati P, Squarzoni S, Sabatelli P, Urciuolo A, Bonaldo P, i sur. Differential and restricted expression of novel collagen VI chains in mouse. *Matrix Biol*. 2011;30(4):248-57. doi: 10.1016/j.matbio.2011.03.006.
207. Sparding N, Genovese F, Rasmussen DGK, Karsdal MA, Naprasova M, Maixnerova D, i sur. Endotrophin, a collagen type VI-derived matrikine, reflects the degree of renal fibrosis in patients with IgA nephropathy and in patients with ANCA-associated vasculitis. *Nephrol Dial Transplant*. 2022;37(6):1099-108. doi: 10.1093/ndt/gfab163.
208. Yepes-Calderón M, Sotomayor CG, Rasmussen DGK, Hijmans RS, Te Velde-Keyzer CA, van Londen M, i sur. Biopsy-controlled non-invasive quantification of collagen type VI in kidney transplant recipients: a post-hoc analysis of the MECANO trial. *J Clin Med*. 2020;9(10):3216. doi: 10.3390/jcm9103216.
209. Pontén F, Schwenk JM, Asplund A, Edqvist PHD. The Human Protein Atlas as a proteomic resource for biomarker discovery. *J Intern Med*. 2011;270(5):428-46. doi: 10.1111/j.1365-2796.2011.02427.x.
210. Good DM, Zürbig P, Argilés A, Bauer HW, Behrens G, Coon JJ, i sur. Naturally occurring human urinary peptides for use in diagnosis of chronic kidney disease. *Mol Cell Proteomics*. 2010;9(11):2424-37. doi: 10.1074/mcp.M110.001917.
211. Kanbay M, Afsar B, Siriopol D, Unal HU, Karaman M, Saglam M, i sur. Endostatin in chronic kidney disease: Associations with inflammation, vascular abnormalities, cardiovascular events and survival. *Eur J Intern Med*. 2016;33:81-7. doi: 10.1016/j.ejim.2016.06.033.
212. Poveda J, Sanz AB, Fernandez-Fernandez B, Carrasco S, Ruiz-Ortega M, Cannata-Ortiz P, i sur. MXRA5 is a TGF- $\beta$ 1-regulated human protein with anti-inflammatory and anti-fibrotic properties. *J Cell Mol Med*. 2017;21(1):154-64. doi: 10.1111/jcmm.12953.
213. Feng S, Gao Y, Yin D, Lv L, Wen Y, Li Z, i sur. Identification of lumican and fibromodulin as hub genes associated with accumulation of extracellular matrix in diabetic nephropathy. *Kidney Blood Press Res*. 2021;46(3):275-85. doi: 10.1159/000514013.



214. Neiman M, Hedberg JJ, Dönnés PR, Schuppe-Koistinen I, Hanschke S, Schindler R, i sur. Plasma profiling reveals human fibulin-1 as candidate marker for renal impairment. *J Proteome Res.* 2011;10(11):4925-34. doi: 10.1021/pr200286c.
215. Yang Y, Luo R, Cheng Y, Liu T, Dai W, Li Y, i sur. Leucine-rich  $\alpha$ 2-glycoprotein-1 upregulation in plasma and kidney of patients with lupus nephritis. *BMC Nephrol.* 2020;21(1):122. doi: 10.1186/s12882-020-01782-0.
216. Lennon R, Byron A, Humphries JD, Randles MJ, Carisey A, Murphy S, i sur. Global analysis reveals the complexity of the human glomerular extracellular matrix. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(5):939-51. doi: 10.1681/ASN.2013030233.
217. Shao X, Taha IN, Clauser KR, Gao YT, Naba A. MatrisomeDB: the ECM-protein knowledge database. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(D1):1136-44. doi: 10.1093/nar/gkz849.
218. Höhne M, Frese CK, Grahammer F, Dafinger C, Ciarimboli G, Butt L, i sur. Single-nephron proteomes connect morphology and function in proteinuric kidney disease. *Kidney Int.* 2018; 93(6):1308-19. doi: 10.1016/j.kint.2017.12.012.
219. Setty S, Michael AA, Fish AJ, Mauer SM, Butkowski RJ, Virtanen I, i sur. Differential expression of laminin isoforms in diabetic nephropathy and other renal diseases. *Mod Pathol.* 2012;25(6):859-68. doi: 10.1038/modpathol.2011.216.
220. Sun BK, Li C, Lim SW, Jung JY, Lee SH, Kim IS, i sur. Expression of transforming growth factor-beta-inducible gene-h3 in normal and cyclosporine-treated rat kidney. *J Lab Clin Med.* 2004;143(3):175-83. doi: 10.1016/j.lab.2003.10.014.
221. Gilbert RE, Wilkinson-Berka JL, Johnson DW, Cox A, Soulis T, Wu LL, i sur. Renal expression of transforming growth factor-b inducible gene-h3 (big-h3) in normal and diabetic rats1. *Kidney Int.* 1998;54(4):1052-62. doi: 10.1046/j.1523-1755.1998.00081.x.
222. Wei FF, Drummen NE, Schutte AE, Thijs L, Jacobs L, Petit T, i sur. Vitamin K dependent protection of renal function in multi-ethnic population studies. *EBioMedicine.* 2016;4:162-9. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.01.011.
223. Mambetsariev N, Mirzapoiiazova T, Mambetsariev B, Sammani S, Lennon FE, Garcia JGN, i sur. Hyaluronic acid binding protein 2 is a novel regulator of vascular integrity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(3):483-90. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.200451.

224. Jia Y, Xu H, Yu Q, Tan L, Xiong Z. Identification and verification of vascular cell adhesion protein 1 as an immune-related hub gene associated with the tubulointerstitial injury in diabetic kidney disease. *Bioengineered*. 2021;12(1):6655-73. doi: 10.1080/21655979.2021.1976540.
225. Khamchun S, Thammakhan N, Lomthong P. Systematic evaluation of urinary vcam1 as novel biomarker for prognosis of lupus nephritis. *Clin Lab*. 2021;67(10). doi: 10.7754/Clin.Lab.2021.210120.
226. Ticala M, Rusu CC, Moldovan D, Potra AR, Tirinescu DC, Coman AL, i sur. Relationship between vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and functional hemodynamic parameters of arteriovenous fistula. *J Vasc Access*. 2022;23(1):67-74. doi: 10.1177/1129729820976264.
227. Yasumura S, Naito Y, Okuno K, Sawada H, Asakura M, Masuyama T, i sur. Effects of heterozygous tfr1 (transferrin receptor 1) deletion in pathogenesis of renal fibrosis in mice. *Hypertension*. 2020;75(2):413-21. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13670.
228. Mael-Ainin A, Abed A, Conway SJ, Dussaule JC, Chatziantoniou C. Inhibition of periostin expression protects against the development of renal inflammation and fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2014; 25(8):1724-36. doi: 10.1681/ASN.2013060664.
229. Rypdal KB, Erusappan PM, Melleby AO, Seifert DE, Palmero S, Strand ME, i sur. The extracellular matrix glycoprotein ADAMTSL2 is increased in heart failure and inhibits TGF $\beta$  signalling in cardiac fibroblasts. *Sci Rep*. 2021;11(1):19757. doi: 10.1038/s41598-021-99032-2.
230. Stabouli S, Kotsis V, Maliachova O, Printza N, Chainoglou A, Christoforidis A, i sur. Matrix metalloproteinase -2, -9 and arterial stiffness in children and adolescents: The role of chronic kidney disease, diabetes, and hypertension. *Int J Cardiol Hypertens*. 2020;4:100025. doi: 10.1016/j.ijchy.2020.100025.
231. Karamanos NK, Tortorella M, Arnert EC, Hills R, Easton A, Korte-Sarfaty J, i sur.  $\alpha_2$ -Macroglobulin is a novel substrate for ADAMTS 4 and ADAMTS-5 and represents an endogenous inhibitor of these enzymes. *J Biol Chem*. 2004;279(17):17554-61. doi: 10.1074/jbc.M313041200.
232. Kramann R, Humphreys BD. Kidney Pericytes: Roles in regeneration and fibrosis. *Semin Nephrol*. 2014;34(4):374-83. doi: 10.1016/j.semnephrol.2014.06.004.

233. Wnuk M, Anderegg MA, Graber WA, Buergy R, Fuster DG, Djonov V. Neuropilin1 regulates glomerular function and basement membrane composition through pericytes in the mouse kidney. *Kidney Int.* 2017;91(4):868-79. doi: 10.1016/j.kint.2016.10.010.
234. Vojtusek IK, Laganovic M, Burek Kamenaric M, Bulimbasic S, Hrkac S, Salai G, i sur. First characterization of ADAMTS-4 in kidney tissue and plasma of patients with chronic kidney disease-a potential novel diagnostic indicator. *Diagnostics.* 2022;12(3):648. doi: 10.3390/diagnostics12030648.
235. Grgurevic L, Macek B, Healy DR, Brault AL, Erjavec I, Cipicic A, i sur. Circulating bone morphogenetic protein 1-3 isoform increases renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(4):681–92. doi: 10.1681/ASN.2010070722.
236. Tang PM, Chen H, Tang Y, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. Immune landscape of kidney pathology. *Front Physiol.* 2022;12:827537. doi: 10.3389/fphys.2021.827537.
237. Zha Y, Chen Y, Xu F, Zhang J, Li T, Zhao C, i sur. Elevated level of ADAMTS4 in plasma and peripheral monocytes from patients with acute coronary syndrome. *Clin Res Cardiol.* 2010;99(12):781–6. doi: 10.1007/s00392-010-0183-1.

## 11. ŽIVOTOPIS

Ivana Kovačević Vojtušek rođena je u Zagrebu 1971. godine te diplomirala na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 1996. godine s prosjekom ocjena 4,64. Od 2004. godine specijalist je interne medicine, a od 2010. godine uži specijalist iz područja nefrologije. Od 1996. godine radila je u Kliničkoj bolnici Merkur, prvotno u Klinici za šećernu bolest i bolesti metabolizma Vuk Vrhovac, a potom od 2007. u Zavodu za nefrologiju i dijalizu te kao članica multidisciplinarnog transplantacijskog tima. Od 2014. godine zaposlena je u Zavodu za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i članica Tima za transplantaciju bubrega. Od 2019. godine stekla je titulu primarijus te europsku diplomu iz područja transplantacije bubrega (engl. *UEMS Fellow of European Board of Transplant Medicine*). Usavršavala se u zemlji i inozemstvu, od čega je za istaknuti edukaciju iz područja transplantacijske medicine 2009. godine u Mayo klinici, Rochester, SAD, pod mentorstvom profesora Fernanda Cosija. Aktivno je sudjelovala na kongresima u zemlji i inozemstvu, uključujući i usmene prezentacije na kongresima Europskog društva za transplantaciju organa 2018. i 2019. godine. Objavila je više od 15 znanstvenih radova, kao prvi ili autor suradnik, koji su indeksirani u službenim znanstvenim bazama dostupnim na internetu. Završila je poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo.