

# Utjecaj pretvorbenog čimbenika rasta beta i endotelina-1 na tijek primarnog glomerulonefritisa

---

Tišljar, Miroslav

Doctoral thesis / Disertacija

2016

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:112547>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-02**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Miroslav Tišljar**

**Utjecaj pretvorbenog čimbenika rasta  
beta i endotelina-1 na tijek primarnog  
glomerulonefritisa**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2016.**

Disertacija je izrađena na Zavodu za nefrologiju i hemodijalizu, te Zavodu za patologiju i citologiju Kliničke bolnice Dubrava u Zagrebu.

Voditelj rada: prof.dr.sc. Krešimir Galešić

Zahvaljujem mentoru prof.dr.sc. Krešimiru Galešiću, predstojniku Zavoda za nefrologiju i hemodijalizu KB Dubrava, na ukazanom povjerenju, korisnim savjetima, ustrajnom i predanom upućivanju u nefrološku znanost i struku.

Zahvaljum prof.dr.sc. Danici Galešić Ljubanović, predstojnici Odjela za elektronsku mikroskopiju i nefropatologiju KB Dubrava, na stručnim savjetima i pomoći u laboratorijskom radu na Zavodu za patologiju i citologiju Kliničke bolnice Dubrava.

Zahvaljujem dr.sc. Jasni Bacalji na pomoći u određivanju imunoekspresije u histološkim preparatima.

Zahvaljujem dipl.ing. biologije Animariji Bauer Šegvić i drugim djelatnicima Laboratorija za imunofluorescentnu i elektronsku mikroskopiju KB Dubrava na suradnji, strpljivosti, pomoći i učenju u imunohistokemijskoj obradi bubrežnih bioptata.

Zahvaljujem osoblju Zavoda za nefrologiju i dijalizu KB Dubrava na potpori, razumijevanju, suradnji i pomoći.

Zahvaljujem doc.dr.sc. Milanu Miloševiću na pomoći i savjetima u statističkoj analizi rezultata istraživanja.

Zahvaljujem na suradnji djelatnicima Zavoda za patologiju Klinike za ženske bolesti i porode KBC Zagreb.

Ovaj rad je izrađen u sklopu Projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH "Prognostički čimbenici progresije kronične bubrežne bolesti", broj projekta 198-000000-0179, nositelj Projekta, prof. dr. sc. Krešimir Galešić.

Ovaj rad posvećujem svojoj obitelji.

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Definicija i dijagnostički algoritam primarnog glomerulonefritisa.....	1
1.2. Epidemiološki kontekst primarnih glomerulonefritisa.....	2
1.3. Opći čimbenici razvoja kronične bubrežne bolesti i glomerulonefritisa.....	4
1.3.1. Osnovni patofiziološki mehanizmi razvoja primarnih glomerulonefritisa.....	5
1.3.2. Upalni citokini u glomerulonefritisu.....	6
1.3.3. Patogenetske faze razvoja glomerulonefritisa i bubrežne fibroze.....	6
1.3.4. Patogeneza glomerularne ozljede.....	7
1.3.5. Patogeneza tubularne ozljede.....	8
1.3.6. Patofiziološka uloga proteinurije na razvoj glomerulonefritisa.....	9
1.3.7. Uloga stanica sa sposobnošću proizvodnje izvanstaničnog matriksa (ECM).....	9
1.4. Osnovni fiziološki mehanizmi adaptacije nefrona na početno upalno oštećenje.....	10
1.4.1. Model plastičnosti bubrežnog tkiva i EMT (epitelno-mezenhimska transdiferencijacija).....	12
2. ULOGA PRETVORBENOG ČIMBENIKA RASTA BETA-1 (TGF- $\beta$ 1) U.....	13
PATOFIZIOLOGIJI GLOMERULONEFRITISA.....	13
2.1. TGF- $\beta$ superobilj.....	13
2.2. TGF- $\beta$ signalizacijski sustav.....	13
2.2.1. Sinteza biološki aktivnog TGF- $\beta$ .....	14
2.2.2. Građa i funkcija TGF- $\beta$ receptorskog kompleksa (TGF- $\beta$ R).....	15
2.2.3. Organizacija Smad sustava.....	16
2.2.4. Međudjelovanje i integracija TGF- $\beta$ /Smad s drugim signalizacijskim mehanizmima.....	18
2.3. TGF- $\beta$ 1 i patofiziologija glomerulonefritisa.....	19
2.3.1. Utjecaj TGF- $\beta$ 1 na glomerul.....	19

2.3.2. Tubulointersticij i TGF- $\beta$ 1 .....	21
2.4. Epitelno-mezenhimska pretvorba .....	22
2.4.1. Biološka sudbina EMT stanica .....	26
2.5. Uloga TGF- $\beta$ 1 u nefrosklerozi laboratorijskih životinja .....	27
2.6. Uloga TGF- $\beta$ 1 u kulturama bubrežnih stanica .....	28
2.7. Uloga TGF- $\beta$ 1 u glomerularnim bolestima u ljudi .....	28
2.8. Rezultati kliničkih istraživanja imunohistokemijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 u bubrežnim biopatima .....	31
2.8.1. Ekspresija TGF- $\beta$ 1 u IgA nefropatiji .....	31
2.8.2. Ekspresija TGF- $\beta$ 1 u membranskoj nefropatiji.....	33
2.8.3. Ekspresija TGF- $\beta$ 1 u fokalnoj segmentalnoj glomerulosklerozi .....	33
3. ULOGA ENDOTELINA-1 U PATOFIZIOLOGIJI GLOMERULONEFRITISA .....	35
3.1. Uvod- otkrivanje endotelina .....	35
3.2. Organizacija endotelinskog sustava.....	35
3.2.1. Sinteza i građa endotelina .....	35
3.2.2. Struktura i raspored endotelinskih receptora .....	38
3.2.3. Biološka aktivnost i katabolizam endotelina .....	40
3.2.4. Endotelinska signalizacija.....	41
3.2.5. Signalizacija na razini stanične membrane i citoplazme .....	41
3.2.6. Signalizacija u jezgri stanice.....	42
3.3. Fiziološki učinci endotelina u bubregu.....	43
3.3.1. Endotelin i bubrežna hemodinamika .....	43
3.3.2. Učinak endotelina na volumen tjelesnih tekućina- metabolizam Na i vode.....	44
3.4. Uloga ET-1 u patofiziologiji glomerularne bolesti.....	45
3.4.1. ET-1 i endotelna disfunkcija .....	45
3.4.2. ET-1 i glomerularna ozljeda .....	46
3.4.3. ET-1 i ozljeda tubulointersticija.....	48

3.5. Eksperimentalni dokazi patogenetske uloge ET-1 u animalnim modelima GN .....	49
3.6. Utjecaj ET-1 na razvoj glomerulonefritisa u ljudi.....	51
3.7. Rezultati kliničkih istraživanja imunohistokemijske ekspresije ET-1 u bubrežnim biopatima .....	52
3.7.1. Ekspresija ET-1 u IgA nefropatiji.....	52
3.7.2. Ekspresija ET-1 u membranskoj nefropatiji .....	53
3.7.3. Ekspresija ET-1 u fokalnoj segmentalnoj glomerulosklerozi.....	54
4. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	55
4.1. Hipoteza istraživanja .....	55
4.2. Primarni ciljevi: .....	55
4.3. Sekundarni ciljevi: .....	55
5. ISPITANICI I METODE .....	56
5.1. Dizajn studije.....	56
5.2. Ispitanici .....	56
5.2.1. Kriteriji uključenja ispitanika: .....	56
5.2.2. Kriteriji isključenja ispitanika:.....	56
5.3. Metode istraživanja.....	60
6. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA .....	69
7. REZULTATI.....	70
7.1. Demografska, klinička i laboratorijska (biokemijska) obilježja bolesnika .....	70
7.1.1. Demografska obilježja bolesnika.....	70
7.1.2. Klinička obilježja bolesnika.....	71
7.1.3. Laboratorijska (biokemijska) obilježja bolesnika.....	73
7.2. Patohistološke (morfološke) promjene na bubrežnom tkivu bolesnika.....	78
7.2.1. Bubrežna ekspresija TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s glomerulonefritsom i kontrolnoj skupini ispitanika.....	84
7.3. Povezanost numeričkih varijabli s glomerularnom i tubulointersticijskom ekspresijom TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s IGAN .....	88

7.4. Povezanost kategorijskih varijabli i ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u IGAN skupine bolesnika.....	91
7.5. Povezanost numeričkih varijabli s ekspresijom TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s FSGS..	97
7.6. Povezanost kategorijskih varijabli s ekspresijom TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s FSGS99	
7.7. Povezanost numeričkih varijabli s ekspresijom TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s MN...	101
7.8. Povezanost kategorijskih varijabli u skupini bolesnika s MN.....	106
7.9. Analiza povezanosti glomerularne i tubulointersticijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 po skupinama bolesnika.....	108
7.10. Povezanost intenziteta ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 na tijek glomerularne bolesti .....	112
8. RASPRAVA.....	117
8.1. IgA glomerulonefritis- opći dio .....	117
8.1.1. IgA glomerulonefritis i TGF- $\beta$ 1.....	120
8.1.2. IgA glomerulonefritis i ET-1 .....	123
8.2. Fokalna segmentalna glomeruloskleroza- opći dio .....	124
8.2.1. Fokalna segmentalna glomeruloskleroza i TGF- $\beta$ 1 .....	126
8.2.2. Fokalna segmentalna glomeruloskleroza i ET-1.....	128
8.3. Membranski glomerulonefritis- opći dio .....	128
8.3.1. Membranski glomerulonefritis i TGF- $\beta$ 1.....	129
8.3.2. Membranski glomerulonefritis i ET-1 .....	131
9. ZAKLJUČCI: .....	132
10. SAŽETAK.....	134
11. LITERATURA.....	136
12. ŽIVOTOPIS .....	162



## POKRATE

$\alpha$ SMC alfa actin smooth muscle cell (alfa aktin pozitivna glatkomišićna stanica)

ACE- angiotensin converting enzyme (angiotenzin konvertirajući enzim)

ANP atrijski natriuretski peptid

ATII angiotensin 2

ATIIR<sub>1</sub> tip 1 receptora za angiotenzin 2

bFGF- basic fibroblast growth factor (osnovni čimbenik rasta fibroblasta)

BMI body mass index (indeks tjelesne težine)

BMP-7 bone morphogenic protein-7 (koštani morfogogenetski protein 7)

BNP brain natriuretic peptide (moždani natriuretski peptid)

C polu celularni polumjesec

CTGF connective tissue growth factor (čimbenik rasta vezivnog tkiva)

ECE endothelin converting enzyme (endotelin konvertirajući enzim)

ECM extracellular matrix (izvanstanična tvar)

EGF epidermal growth factor (epidermalni čimbenik rasta)

eGFR estimated glomerular filtration rate (procijenjena stopa glomerularne filtracije)

EM: elektronska mikroskopija

EMT epitel to mesenchymal transdifferentiation (epitelno-mezenhimalni prijelaz/pretvorba)

ERK extracellular receptor linked kinase (izvanstaničnim receptorom vezana kinaza)

ESRD end stage of renal disease (završni stadij bubrežne bolesti)

ET-1 endotelin1

ETR<sub>A/B</sub> receptor endotelina

F polu fibrozni polumjesec

FC polu fibrocelularni polumjesec

FSGS fokalna segmentalna glomeruloskleroza

FSP fibrocyte specific protein (protein specifičan za fibrocite)

G glomerul

GBM glomerularna bazalna membrana

G-CSF granulocyte colony stimulating factor (čimbenik stimulacije rasta kolonija granulocita)

GF glomerular filtration (glomerularna filtracija)

GN glomerulonefritis

HA hijalinoza arteriola

HGF hepatocyte growth factor (čimbenik rasta hepatocita)

HIF-1 $\alpha$  Hypoxia inducible factor 1  $\alpha$  (čimbenik inducirane hipoksijom)

ICAM intercellular adhesion molecule (čimbenik međustaničnog prijanjanja)

IF imunofluorescenca

IFTA intersticijska fibroza i atrofija

IGAN IgA nefropatija

IgAS imunoglobulin A u serumu

IL interleukin

INF interferon

IS indeks ozljede eng. injury score

JGA jukstaglomerularni aparat

JNK c-jun N terminale kinase

KBB kronična bubrežna bolest

MAF macrophage attracting factor (čimbenik privlačenja makrofaga)

MAPK mitogen activated protein kinase (kinaza aktivirana mitogenom)

MCD: minimal change disease (bolest minimalnih promjena)

MCP monocyte chemoattractant protein (kemotaksijski čimbenik monocita)

M-CSF monocyte colony stimulatory factor (čimbenik stimulacije rasta kolonija monocita)

MDRD Modification in Diet of Renal Disease (formula procijenjene mjere glomerularne filtracije)

Membdep depoziti u glomerularnoj bazalnoj membrani

Mezdep depoziti u mezangiju

MIF macrophage migration inhibitory factor (čimbenik inhibicije migracije makrofaga)

MMP matrix metalloproteinase (matriks metaloproteinaza)

MN membranska nefropatija

MPGN membranoproliferativni glomerulonefritis

NO- dušični oksid

NSAR non steroid antiinflammatory drugs (nesteroidni protuupalni lijekovi)

PAI plasminogen acitvator inhibitor (inhibitor aktivatora plazminogena)

PDGF platelet derived growth factor (čimbenik rasta porijeklom iz trombocita)

PGI2 prostaglandin I2 - prostaciklin

RAAS – renin angiotenzin aldosteronski sustav

RANTES- Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted. citokin iz superobitelji interleukina 8

ROS reactive oxygen species (reaktivni kisikovi spojevi-radikali)

SD standardna devijacija

Smad (Sma+MAD; sma (geni) + mothers against decapentaplegic)

Subenddep subendotelni depoziti

Subepitdep subepitelni depoziti

TACE TNF $\alpha$  converting enzyme (TNF $\alpha$  konvertirajući enzim)

TBM tubularna bazalna membrana

TGF $\alpha$  transforming growth factor alfa (pretvorbeni čimbenik rasta alfa)

TGF- $\beta$ 1 transforming growth factor beta 1 (pretvorbeni čimbenik rasta beta 1)

TGF- $\beta$ 1LAP transforming growth factor beta 1 latency associated protein (protein latencije pretvorbenog čimbenika rasta beta 1)

TGF- $\beta$ 1R transforming growth factor beta 1 receptor (receptor pretvorbenog čimbenika rasta)

TI tubulointercij

TIMP tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (tkivni inhibitor matriksa metaloproteinaza)

TNF $\alpha$  tumor necrotising growth factor alpha (čimbenik nekroze tumora alfa)

Upalna inf TI upalna infiltracija tubulointercija

VCAM vascular cell adhesinon molecule (čimbenik prijanjanja krvožilnih stanica)

VEGF vascular endothelial growth factor (čimbenik rasta endotela)

# 1. UVOD

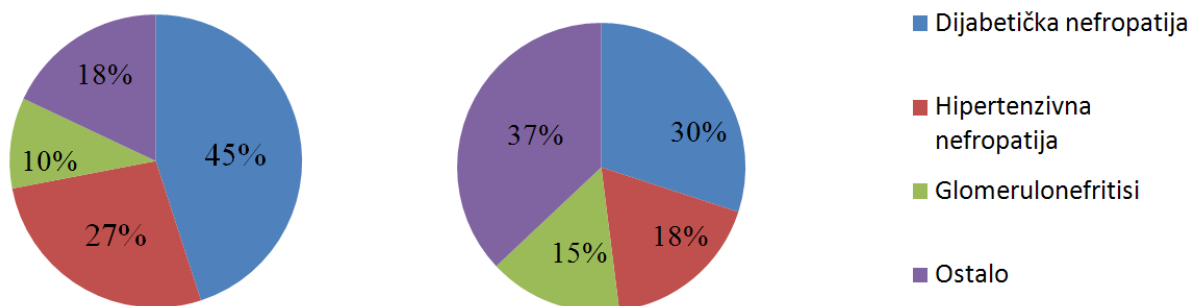
## 1.1. Definicija i dijagnostički algoritam primarnog glomerulonefritisa

Prema definiciji primarni glomerulonefritisi imunološke su bolesti glomerula koje mogu zahvatiti tubulointersticij i pripadajuću vaskularnu mrežu, nisu posljedica sistemskih bolesti i ne diseminiraju na druge organe. Dijagnoza glomerulonefritisa temelji se na detaljnoj anamnezi (uključujući obiteljsku i epidemiološku anamnezu), fizikalnom pregledu i analizi laboratorijskih (biokemijske, imunološke, mikrobiološke, citološke, serološke) pretraga krvi i mokraće. Slikovne dijagnostičke tehnike mogu prikazivati oblikom i veličinom uredne, uvećane (akutna bolest) ili smanjene (kronična bolest) bubrege, te u smislu preciznog definiranja glomerulonefritisa nemaju značajniju osjetljivost niti specifičnost. Zlatni standard dijagnostičke obrade glomerulonefritisa je biopsija bubrega. Optimalna histološka analiza podrazumijeva pregled bubrežnog tkiva svjetlosnom, imunofluorescentnom i elektronskom mikroskopijom, uzevši u obzir i dovoljan broj glomerula za pojedinu vrstu analize odnosno odgovarajuće bolesti glomerula (npr. 3 ili više glomerula za imunofluorescentnu mikroskopiju, odnosno barem 20 glomerula na svjetlosnoj mikroskopiji uz najmanje 1 glomerul za elektronsko-mikroskopsku analizu u sigurnom dokazivanju fokalne segmentalne glomeruloskleroze). U pogledu kliničko-patološke korelacije, valja uzeti u obzir konvergenciju histološke prezentacije, što znači da gotovo svaka histološka promjena, barem u određenoj fazi bolesti, može biti praćena širokim kliničkim spektrom, te obrnuto, govorimo o kliničkoj divergenciji koja ukazuje da jednom kliničkom fenotipu mogu odgovarati različite histološke promjene (neovisno o patofiziološkim posebnostima unutar svakog pojedinog entiteta) (1). Iako odgovarajući oblici glomerulonefritisa su klinički prepoznatljivi u sklopu određenog sindroma, načelno svi oblici glomerulonefritisa mogu se klinički prezentirati u sljedećim oblicima: nefrotski sindrom, nefritički sindrom, brzoprogresivni glomerulonefritis, izolirana proteinurija i/ili eritrociturija, akutna/kronična bubrežna insuficijencija. Ovisno o trajanju bolesti (kronološki uvid u anamnestičke podatke odnosno laboratorijsku dokumentaciju) kraćem ili duljem od 3 mjeseca, sve glomerulonefritise možemo podijeliti u akutne ili kronične. Kao zasebna podskupina po kriteriju trajanja bolesti i razvoju bubrežne insuficijencije tijekom nekoliko tjedana do 3 mjeseca izdvaja se brzoprogresivni glomerulonefritis. U definiranju primarnih glomerulonefritisa važno je poznavati sveukupan

komorbiditet pacijenta uz isključivanje mogućih sekundarnih uzroka poput autoimunih sistemskih i tumorskih bolesti, organskih strukturalnih anomalija, infektivnih i metaboličkih bolesti, kao i jatrogenih (toksično-alergijske reakcije) učinaka, koji mogu izazvati glomerularna oštećenja izgledom slična primarnim glomerulopatijama (pojam širi od glomerulonefritisa, jer prema nekim autorima glomerulonefritisi obuhvaćaju samo one bolesti glomerula u kojima nalazimo staničnu proliferaciju nativnih i infiltraciju/proliferaciju upalnih stanica). Osim od sekundarnih bolesti glomerula, primarne glomerulonefritise važno je razlikovati i od hereditarnih nefropatija poput Alportova sindroma i bolesti tankih membrana.

## 1.2. Epidemiološki kontekst primarnih glomerulonefritisa

Na prijelazu 20. u 21. stoljeće u razvijenim zemljama i zemljama u tranziciji najveći pobol i smrtnost vezuje se za kronične nezarazne (u koje se ubraja i kronična bubrežna bolest) bolesti osobito kardiovaskularne i tumorske bolesti. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije udio bolesnika s kroničnom bolešću bubrega (KBB) na globalnoj razini iznosi 10% što KBB čini jednim od vodećih javnozdravstvenih interesa današnjice (2). Od druge polovice 20. stoljeća bilježi se kontinuirani porast incidencije bubrežnih glomerularnih bolesti kao i njihov rastući udio u prevalenciji bolesnika s napredujućom kroničnom bubrežnom insuficijencijom, što naravno možemo sagledati u činjenici napretka nefrološke struke i dijagnostike (3). Uz galopirajući porast prevalencije šećerne bolesti i arterijske hipertenzije, glomerulonefritisi predstavljaju treći najvažniji uzrok završnog stadija kronične bubrežne bolesti i posljedične ovisnosti sve većeg broja bolesnika o nadomjesnom bubrežnom liječenju, što za sve zemlje pa tako i Hrvatsku predstavlja značajno socioekonomsko opterećenje (2,3, Slika 1).

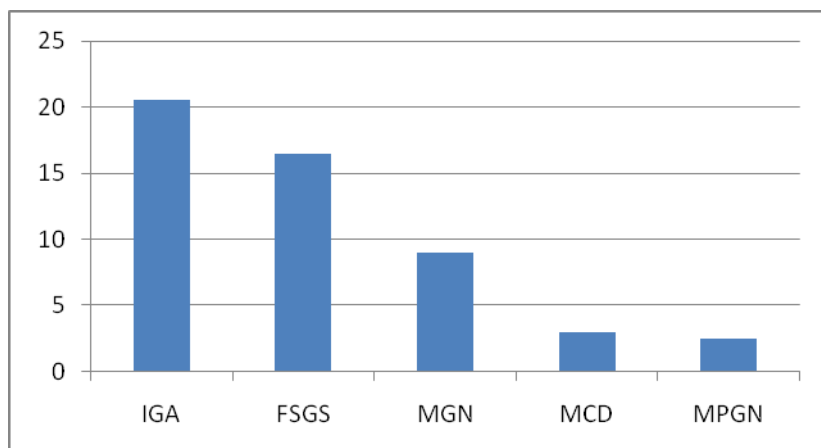


Slika 1. Prevalencija uzročnih dijagnoza završne faze KBB u SAD i Hrvatskoj ([www.hdndt.org/registar/](http://www.hdndt.org/registar/))

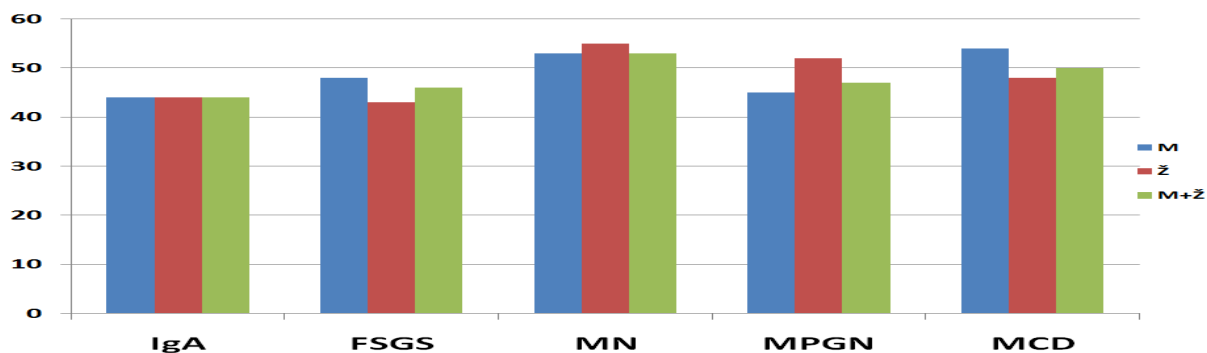
Literaturni podaci pokazuju da su u zapadnim zemljama među primarnim oblicima glomerulonefritisa odrasle populacije najčešći IgA nefropatija (IGAN), fokalna segmentalna glomeruloskleroza (FSGS) i membranska nefropatija (MN) (FSGS i MN ujedno i kao najčešće glomerularne bolesti s kliničkom slikom nefrotskog sindroma), a znatno rjeđi drugi oblici poput bolesti minimalnih promjena (MCD), membranoproliferativni glomerulonefritis (MPGN) i drugi proliferativni glomerulonefritisi (GN). Iako u Hrvatskoj još ne postoji nacionalni Registar bubrežnih biopsija, istovjetan redoslijed učestalosti primarnih glomerulonefritisa prisutan je i u Registru bubrežnih biopsija Zavoda za nefrologiju i dijalizu Kliničke bolnice Dubrava (KBD) u Zagrebu (4, Tablica 1, Slika 2-3).

Tablica 1. Prevalencija najčešćih oblika GN u 3 nacionalna Registra i Registru Kliničke bolnice Dubrava (KBD)

OBLIK GLOMERULONEFRITISA (%)	NACIONALNI REGISTAR			REGISTAR KB DUBRAVA
	ŠPANJOLSKA	ITALIJA	ČEŠKA	
IgA glomerulonefritis	17	21,5	24,2	20,5
FSGS	11	6,8	7,5	16,5
Membranska nefropatija	9,5	12,2	6,5	9



Slika 2. Učestalost najčešćih oblika GN (u %) unutar skupine primarnih GN u Registru bubrežnih biopsija KBD



Slika 3. Raspored najčešćih primarnih GN prema dobi (godine života na ordinati) i spolu, Registar bubrežnih biopsija KBD

Iako je u razvijenim zemljama populacija KBB u završnoj fazi dosegla svoj plato, prvenstveno zbog sve uspješnije skrbi pacijenata sa šećernom bolešću i arterijskom hipertenzijom (to isto pokazuju i zadnji podaci iz Hrvatskog Registra kroničnih bubrežnih bolesti Hrvatskog društva za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju), prevalencija KBB populacije još raste u zemljama u tranziciji, te pogotovo u zemljama u razvoju koje i čine najveći dio svjetskog stanovništva, pa se može očekivati još veći globalni porast prevalencije KBB. Prevalencija KBB bolesnika s primarnim glomerulonefritisom u SAD-u iznosi 15%, a incidencija 10% (2,3). U stopi navedene incidencije 7% odnosi se na primarne glomerulonefritise i to 2,3% FSGS, 0,8% IGAN i 0,4% MN. Bolesnici s GN i KBB su u prosjeku mlađi (MN 56 godina, FSGS 47 godina, IgA 45 godina) nego oni s dijabetičkom ili hipertenzivnom nefropatijom i KBB (prosječno 62 godine). Unutar sve 3 KBB populacije prevladava muški spol. Raspored najčešćih primarnih GN u KBD prikazan je na Slici 2. Skupina američkih nefrologa navodi zanimljivu procjenu prema kojoj na svakog bolesnika liječenog zbog glomerulonefritisa dolazi još najmanje petero bolesnika sa subkliničkim tijekom bolesti (neprepoznati i neliječeni pacijenti) (1).

### 1.3. Opći čimbenici razvoja kronične bubrežne bolesti i glomerulonefritisa

Mnogobrojna i dugotrajna istraživanja kao i kliničko iskustvo pokazali su brojne bolesti ili stanja povezana s nastankom ili progresijom parenhimske bolesti bubrega odnosno glomerulonefritisa. Tako, konceptualno gledajući možemo razlikovati međusobno povezane tzv. klasične i nove čimbenike rizika progresije glomerulonefritisa (Tablica 2).

Tablica 2. Opći čimbenici rizika razvoja kronične bubrežne bolesti

<b>KLASIČNI ČIMBENICI RAZVOJA KBB</b>	<b>NOVI ČIMBENICI RAZVOJA KBB</b>
Arterijska hipertenzija	Ateroskleroza/ krutost arterija/simpatikotonus
Glomerularna hipertenzija	Endotelna disfunkcija/eikosanoidi/čimbenici rasta
Hiperglikemija/ hiperlipidemija/hiperuricemija	Oksidativni stres/acidoza
Proteinurija/hipokalijemija/hiperkalcijemija	Ekspresija upalnih citokina i sustava komplementa

Do sada najdetaljnije proučeni čimbenik inicijacije i progresije kronične bubrežne bolesti je intraglomerularna hipertenzija koja razara strukturu glomerularne bazalne membrane što prethodi glomerulosklerozi (5-6). Povišeni intraglomerularni hidrostatski tlak povećava glomerularnu filtraciju, te rasteže sve funkcionalne slojeve glomerularne bazalne membrane što pridonosi slabljenju mehanizama koji se odupiru mehaničkom stresu i gubitku osnovne funkcije održavanja selektivnog permeabiliteta (7). Drugi važni patogenetski čimbenici (Tablica 2) doprinose razvoju glomerulonefritisa na specifičnim biokemijskim i molekularnim razinama (7-14).

### **1.3.1. Osnovni patofiziološki mehanizmi razvoja primarnih glomerulonefritisa**

S obzirom na imunopatogenezu primarnih glomerulonefritisa, osobita pažnja suvremene nefrologije usmjerena je sve više na proučavanje patofizioloških mehanizama imunološke upale glomerula, te razvoja i primjene novih imunosupresivnih lijekova (15). U tom smislu i na razini upalnog (patoimunog) oštećenja arhitekture glomerula, vrijedi klasična patofiziološka postavka prema kojoj na mikrorazini gubitak strukture predstavlja i gubitak funkcije.

Patofiziološki proces glomerularne ozljede posreduju rezidentne (glomerularne) i upalne stanice, te peptidni medijatori upale-citokini (16). U rezidentne stanice ubrajamo: parijetalne i visceralne glomerularne epitelne stanice (podociti), mezangijske stanice, tubularne epitelne stanice (osobitu važnost imaju tubulociti proksimalnog kanalića), fibroblaste intersticija te endotelne stanice glomerularnih i peritubularnih kapilara. Kao adaptivni odgovor na stresogene čimbenike, rezidentne stanice luče kemotaksijske čimbenike upalnih stanica



(monociti, neutrofil, limfociti, mastociti) i trombocita iz cirkulacije (17). U glomerulonefritisu, rezidentne, te regrutirane upalne stanice pojedinačno i u interakciji mogu proizvoditi upalne medijatore (18).

### 1.3.2. Upalni citokini u glomerulonefritisu

Upalno-proliferacijski milje u kojemu se održava patofiziološka komunikacija oštećenih rezidentnih s upalnim infiltriranim stanicama, posredovan je mrežom upalnih citokina i faktora rasta s višestrukom i složenom parakrinom i autokrinom aktivnošću (19, 20). Načelno citokine i faktore rasta u kontekstu razvoja imunološke upale možemo podijeliti na upalne i protuupalne, odnosno prema njihovoj sposobnosti započinjanja ili intenziviranja upalnih procesa (Tablica 3).

Tablica 3. Najvažniji proupalni i protuupalni citokini i endogeni proteini u glomerulonefritisu

<b>PROUPALNI CITOKINI/HORMONI</b>	<b>PROTUUPALNI CITOKINI/HORMONI</b>
IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, RANTES, MCP-1, MAF, MIF	TGF- $\beta$ , BMP-7
TNF-alfa, INF $\gamma$ , M-CSF, GM-CSF	HGF
Angiotenzin II, aldosteron, inzulin, rezistin	NO
bFGF1/2, CTGF, EGF, VEGF, PDGF	PGI <sub>2</sub>
ICAM-1, VCAM, osteopontin, angiopoetin	Interferon $\alpha$
Endotelini, eotaksin	Dekorin
Tromboksan, PAI-1, trombin	Relaksin, heparin

### 1.3.3. Patogenetske faze razvoja glomerulonefritisa i bubrežne fibroze

Detaljnim praćenjem patomorfološke dinamike u bubrežnom parenhimu, progresija oštećenja glomerula i tubulointersticija podijeljena je na tri razvojne faze (21):

- 1) indukcijska faza,
- 2) upalna faza,
- 3) faza fibrogeneze.

Indukcijska faza posljedica je strukturno-funkcionalnog oštećenja glomerularne filtracijske barijere (tlačne i/ili imunološke geneze) s posljedičnim patološkim propuštanjem bjelančevina. Imunološka ozljeda glomerula gotovo uvijek podrazumijeva interakciju stanične i humoralne imunosti, budući taloženje cirkulirajućih ili in situ formiranih imunih kompleksa u različitim slojevima glomerularne filtracijske barijere i mezangija, predstavlja temelj autoimunog odgovora. Toksičan učinak glomerularnog ultrafiltrata zasićenog bjelančevinama različitih bioloških osobina izražava se oštećenjem mezangijskih, glomerularnih i tubularnih epitelnih stanica. U drugoj, upalnoj fazi, javlja se masivna proizvodnja i otpuštanje proupalnih citokina („citokinska oluja“), a treća faza fibrogeneze (reakcija na upalu, pokušaj smirivanja upale) rezultira pojačanom proizvodnjom komponenti izvanstaničnog matriksa s posljedicom stvaranja vezivnih ožiljaka (21). Sve tri faze razvoja bubrežne bolesti zahvaćaju sve strukture nefrona i mogu u pojedinim nefronima postojati u različitom stupnju razvoja.

#### **1.3.4. Patogeneza glomerularne ozljede**

Osnovne komponente glomerularne lezije uključuju oštećenje glomerularnog kapilarnog endotela (upalnim stanicama i sustavom komplementa), zatim propadanje podocita (koje se može morfološki kvantificirati povlačenjem nožica podocita, te gubitkom podocita uz denudaciju GBM s podociturijom), te na posljeticu mezangioproliferaciju i mezangiosklerozu (22). Gubitak podocita (terminalno diferenciranih stanica) nenadoknadivo oštećuje homeostazu GBM što je patofiziološka osnova proteinurije i tzv. podocitopatija poput FSGS i MN. Proteini zarobljeni u mezangiju oštećuju podocyte i mezangijske stanice koji tada otpuštaju upalne citokine. Pod utjecajem upalnih medijatora endotel izražava adhezivne molekule za cirkulirajuće mononukleare uz posljedičnu infiltraciju upalom prijemčljivog mezangija. Upalne stanice protrahirano proizvode upalne citokine i na isto potiču (aktiviraju) rezidentne stanice čime se prolongira upalni odgovor (tzv. „citokinski pritisak“). Djelovanjem upalnog stresa na mezangijske stanice započinje proizvodnja izvanstaničnog matriksa (ECM, eng. extracellular matrix) odnosno glomeruloskleroza, koja uzrokuje gubitak funkcionalno vrlo važne interakcije mezangijskog matriksa i mezangijskih stanica, odnosno funkcionalan mezangij zamjenjuje fibrozni ožiljak (23). Posljedično, postupno dolazi do sužavanja i opstrukcije lumena kapilara i urinarnog interepitelnog prostora s ozljedom parijetalnih epitelnih stanica i transkapsularnim „bijegom“ upalnih citokina u intersticij gdje se nastavlja i širi upalna reakcija (23).

### 1.3.5. Patogeneza tubularne ozljede

Istovremeno mehaničko-upalnoj i fibrotskoj ozljedi glomerula, napreduje i oštećenje tubulointercicija, koje možemo pratiti na 3 funkcionalne razine: tubularnih epitelnih stanica, intersticija i peritubularne kapilarne mreže (21-23).

Kao što je gubitak podocita ključan događaj u progresiji glomerularne ozljede tj. glomeruloskleroze, tako je i gubitak tubularnih epitelnih stanica ključan događaj progresije tubulointercicijskog oštećenja odnosno fibroze intersticija i atrofije tubula. U podlozi tubularnog oštećenja prekomjerna je razgradnja bjelančevina (dospjelih glomerularnim ultrafiltratom nakon oštećenja podocita i GBM) u lizosomima tubularnog epitela koja dovodi do ruptore lizosoma (tzv. proteinurijski stres) i posljedičnog oslobađanja proteolitičkog sadržaja koji oštećuje tubularnu bazalnu membranu, djeluje proupalno i kemotaksijski (24). U patogenetskom kontekstu, važno je za naglasiti djelovanje upalnih citokina doplavljenih iz glomerula peritubularnim kapilarama, glomerularnim filtratom i u nekim slučajevima per continuitatem kroz oštećeni parijetalni epitel Bowmanove čahure.

Upalni citokini iz lediranih tubulocita ulaze u peritubularni intersticij koji postaje žarište upalnog međudjelovanja rezidentnih fibroblasta, cirkulirajući limfocita (uglavnom limfociti T CD4+), monocita i makrofaga. Uslijed upalne reakcije, tubulociti poprimaju obilježja imunološki aktivnih stanica, tj. razvijaju karakteristiku antigen prezentirajućih stanica uz površinsku ekspresiju MHC II klase molekula. U daljnjem tijeku upale, aktivirani T limfociti lučenjem IL-2 i IFN- $\gamma$  aktiviraju intersticijske makrofage koji per se proizvode komponente ECM, odnosno lučenjem IL-1, TNF $\alpha$ , TGF- $\beta$  i PDGF aktiviraju fibroblaste.

Povišeni hidraulički intraglomerularni tlak prenaša se i na postglomerularnu peritubularnu kapilarnu mrežu uz posljedicu endotelnog oštećenja i postupne obliteracije kapilara. Zatim nastupa smanjenje protoka krvi uz redukciju cirkulacijskog tlaka u peritubularnim kapilarama koji je nedovoljan da se suprotstavi povišenom osmotskom tlaku edematoznog intersticija. Zbog toga, energetski zahtjevni tubulociti (koji u uvjetima upalnog metabolizma pojačano troše kisik) postaju hipoksični, degeneriraju i atrofiraju (25). Hipoksija tubulocita rezultira pojačanim stvaranjem amonijaka koji aktivira sustav komplementa koji prodiranjem u intersticij aktivira makrofage. Još jedna posljedica ozljede tubulocita je stvaranje slobodnih kisikovih radikala koji dodatno djeluju kemotaktično i proupalno na razini intersticija.

Dakle, zajedničko obilježje svih glomerularnih bolesti je da u uznapredovalom završnom tijeku dijele isti patohistološki obrazac, glomerularnu sklerozu i fibrozu intersticija koja je prepoznata kao najvažniji nezavisni čimbenik progresije kronične bubrežne bolesti (26-28). Pored fibroze intersticija kao najvažnijeg histološkog prediktora tijekom KBB, najznačajniji prognostički biokemijski ekvivalent predstavlja veličina proteinurije (29,30).

### **1.3.6. Patofiziološka uloga proteinurije na razvoj glomerulonefritisa**

Uz važan doprinos količine proteina, obilje eksperimentalnih dokaza potvrdilo je značajnu patogenetsku ulogu vrste proteinurije na težinu oštećenja bubrežnog tkiva (npr. u bolesti minimalnih promjena unatoč često prisutnoj masivnoj proteinuriji ne dolazi do fibroze bubrega) (31-35).

Intrinzična nefrotoksičnost pojedinih vrsta proteina odgovara njihovoj bioaktivnosti (ovisna o građi i funkciji molekule): tako npr. masne kiseline iz albumina nakon endocitoze u tubulocitima djeluju kemotaksijski na upalne citokine; drugi primjer je  $Fe^{++}$  iz transferina koje vrši peroksidaciju odnosno akcelerira oksidativni stres s aktivacijom transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B, koji u jezgri stanice uzrokuje ekspresiju gena za upalne citokine i njihove receptore (36-38). Nadalje, komponente komplementa (doplavljene sistemskom cirkulacijom ali i lokalno sintetizirane u tubulocitima) imaju sposobnost oštećenja glomerularnih i tubularnih epitelnih stanica te sudjelovanja u kemotaksiji upalnih efektnih stanica (39). Među proteinima visoke molekularne mase nalaze se i hormoni, npr. inzulinu sličan hormon rasta, koji preko vlastitih receptora potenciraju proliferativno-fibrozirajući odgovor s učinkom kolapsa tubula (40).

### **1.3.7. Uloga stanica sa sposobnošću proizvodnje izvanstaničnog matriksa (ECM)**

Očuvana struktura mezangijskog i tubulointersticijskog izvanstaničnog matriksa, zajedno s intaktnom građom GBM i TBM, presudna je u održavanju uredne strukture i funkcije glomerula, odnosno tubulointersticija. Funkcija mezangijskog i tubulointersticijskog matriksa održava se uravnoteženom sintezom i razgradnjom njegovih komponenti, koje nisu samo strukturne formacije, nego složene makromolekule koje receptorski interagiraju sa staničnim

membranama posredujući izmjenu tvari (makromolekula koje u interakciji s pojedinim komponentama ECM mogu postati biološki aktivne- npr. enzimski aktivne) između stanica i intersticija, te stanica međusobno. Uz mezangijske stanice i tubulocite, u sintezi izvanstanične tvari sudjeluju i intersticijski fibroblasti. U patološkom upalnom mikrookolišu, stvara se i nova populacija fibroblasta s kontraktilnim, proliferativnim, migracijskim i sintetskim sposobnostima-miofibroblasti. U protrahiranoj upali, patofiziološka uloga mezangijskih stanica, fibroblasta te miofibroblasta i makrofaga, iskazuje se ekspanzijom izvanstaničnog matriksa kroz tri faze fibrogeneze (41):

- prekomjernim stvaranjem i odlaganjem komponenti izvanstaničnog matriksa (kolagen tipa I i III, fibronektin, laminin, trombospondin, osteopontin, elastin, tenascin te proteoglikana npr. heparan-sulfat, betaglikana, dekorina),
- smanjenoj proizvodnji matriks-proteaza (serin/tio/metaloproteinaze, aktivator plazminogena PA, stromelizin, kolagenaze, elastaze, gelatinaza),
- pojačanoj proizvodnji inhibitora matriks proteaza (inhibitor plazminogen aktivatora PAI-1, tkivni inhibitori metaloproteinaza TIMP) i staničnih receptora za intersticijski matriks (integrini).

Istraživanja su pokazala da je za akumulaciju izvanstaničnog matriksa važnija povećana proizvodnja od smanjene razgradnje strukturnih elemenata ECM. Za dinamiku razgradnje ECM važan je i tzv. stupanj stabilnosti tkiva kojeg određuje nekoliko čimbenika kao npr. stupanj umreženosti intersticijskih proteina i stupanj glikoziliranosti glikoproteina ECM.

#### **1.4. Osnovni fiziološki mehanizmi adaptacije nefrona na početno upalno oštećenje**

Istraživanja su pokazala da za progresiju oštećenja bubrežnog parenhima, bilo koja noksa mora djelovati duže vrijeme, budući je reparacijski kapacitet bubrežnog parenhima (tj. sposobnost adaptacije zdravih nefrona da preuzmu funkciju afunkcionalnih nefrona) veći od potencijala ozljede bilo kojeg pojedinačnog patogenog čimbenika (41, 42).

Glomerularna filtracija (GF) uslijed bubrežne bolesti održava se putem dva osnovna mehanizma: ekstrinzičnim (vanbubrežnim) i intrinzičnim (bubrežnim) adaptacijskim mehanizmima. Ekstrinzičnu razinu predstavlja autonomni živčani sustav odnosno simpatička

inervacija cjelokupne bubrežne vaskulature uključivši i aferentne i eferentne arteriole. Navedeni mehanizam je uglavnom kratkotrajan i predstavlja eferentni krak refleksnog odgovora aktiviranih karotidnih i kardiopulmonalnih baroreceptora. Drugi ekstrinzični adaptivni mehanizam obilježen je sintetskom aktivnošću srži nadbubrežne žlijezde (izlučivanje adrenalina, noradrenalina). Djelotvornost ekstrinzičnih mehanizama obilježena je kratkotrajnošću i veći značaj postiže tek u patološkim slučajevima naglog pada sistemskog tlaka odnosno cirkulacijskog volumena. Intrinzična razina regulacije GF obuhvaća prvobitno autoregulacijski mehanizam tubuloglomerularne povratne sprege. To podrazumijeva povećanu reapsorpciju NaCl u proksimalnim tubularnim segmentima uslijed smanjenja brzine protoka tubularnog ultrafiltrata (koji je pak posljedica oštećenja GBM). Zbog toga, do distalnog kanalića dolazi znatno manja količina NaCl što registrira macula densa odnosno jukstaglomerularni aparat koji na to odgovara dilatacijom aferentne arteriole (lokalno proizvedenim NO i prostaglandinima) i sekrecijom renina, čime se podržava proizvodnja ATII. ATII djeluje konstriktorski na eferentnu arteriolu, a rezultat takvog slijeda događaja jest smanjenje otjecanja krvi iz glomerula što povisuje hidrostatski glomerularni tlak i dakle povećava GF. U intrinzične mehanizme pripada i miogena autoregulacija GF i bubrežnog protoka krvi. Naime pojačanim protokom krvi dolazi do mehaničkog rastezanja stijenki žila (osobito arteriola) čime se pojačava ulazak  $Ca^{++}$  iona iz cirkulacije u glatke mišićne stanice i posljedične vazokonstrukcije odnosno smanjenja protoka krvi. Treća linija regulacije na intrinzičnoj razini temelji se na glomerulotubularnoj ravnoteži, koju karakterizira povećana sposobnost uglavnom proksimalnog tubula da apsorbira veće količine glomerularnog filtrata. Opisanim mehanizmom smanjuje se opterećenje distalnog tubula prekomjernim količinama glomerularnog filtrata i posredno osigurava uredan metabolizam elektrolita i vode. Za razliku od ekstrinzičnih, intrinzični mehanizmi autoregulacije GF jesu dugotrajniji.

Oštećenjem (afunkcijom) određenog broja nefrona, prema Brickerovoj hipotezi preostali funkcionalni nefroni preuzimaju kompenzatornu ulogu filtracije (42, 43). U početku, rastezanje GBM preko mehanoreceptora na podocitima dovodi do pojačane sinteze proteina filtracijske membrane što zaustavlja proteinurijski efekt, no uz neprekidnu progresivnu intraglomerularnu hipertenziju, a pogotovo uz istovremenu upalu, dolazi do gubitka ovog obrambenog mehanizma. Kao posljedica javlja se skleroza preostalih nefrona te se značajniji gubitak bubrežne funkcije manifestira nakon 70%-nog gubitka funkcionalne mase bubrega.

#### **1.4.1. Model plastičnosti bubrežnog tkiva i EMT (epitelno-mezenhimska transdiferencijacija)**

Model plastičnosti nefrona temelji se na eksperimentalnim dokazima prema kojima nefron nije statična već biodinamična struktura (44). Navedena biodinamičnost (plastičnost) definirana je i u morfološkom i u funkcionalnom smislu. Prvobitno se taj pojam odnosio samo na embrionalni razvoj nefrona, a potom sekundarno, i na razvoj bubrega u djetinjstvu odnosno promjene u odrasloj dobi (starenje, različite bubrežne bolesti s akumulativnim stresnim učinkom). U kontekstu glomerulonefritisa, navedeni model možemo promatrati na histološkoj razini prateći promjene koje usred upalnog miljea odgovaraju proliferaciji, hipertrofiji, migraciji, kontrakciji, apoptozi, nekrozi i epitelno-mezenhimske tranziciji konstitutivnih bubrežnih stanica (45). Sve navedene reakcije posljedica su adaptacije strukture i funkcije nefrona na novonastale uvjete posredovane hemodinamskim i imunološkim patomehanizmima pojedinih oblika glomerulonefritisa.

U nedavnim eksperimentalnih istraživanjima pokazano je da fibrogeneza per se nije dovoljna da uzrokuje gubitak funkcionalnog tkiva, već su za tu morfološko-funkcionalnu degradaciju potrebni i uključeni dodatni patofiziološki mehanizmi koji se temelje na gubitku populacija visoko specijaliziranih stanica. Na razini glomerularne skleroze, zamijećeno je da u većini slučajeva najprije dolazi do segmentalnih sinehija i adhezija kapilarnog klupka za Bowmanovu čahuru. Navedeno opažanje pripisano je odvajanju (eng. detachment) i gubitku podocita prvenstveno mehanizmom apoptoze (kao paralelni pojam u literaturi se koristi denudacija GBM) (46). Jednako tako, inicijalna ozljeda na razini tubula prepoznata je kao atrofija i dilatacija tubula zbog apoptoze tubulocita (47). Osim apoptoze epitelnih stanica, recentni radovi prikazuju izravne dokaze i za apoptozu endotelnih stanica glomerularnih i peritubularnih kapilara (48). Gubitak endotelnih stanica, osim upalnim procesima, dodatno je potaknut manjkom čimbenika rasta endotela (VEGF) koji je posljedica smanjenja broja epitelnih stanica u kojima se spomenuti angiopoetski čimbenik konstitutivno proizvodi (49).

Središnji dio modela plastičnosti nefrona predstavlja epitelno-mezenhimska tranzicija ili transdiferencijacija (EMT) obilježena konverzijom epitelnog fenotipa podocita i tubulocita u stanice s fenotipom i funkcijama miofibroblasta. Kao ključan citokin koji organizira EMT i sudjeluje u provođenju svih navedenih promjena u sklopu tzv. modela plastičnosti nefrona ističe se TGF- $\beta$ .

## **2. ULOGA PRETVORBENOG ČIMBENIKA RASTA BETA-1 (TGF- $\beta$ 1) U PATOFIZIOLOGIJI GLOMERULONEFRITISA**

### **2.1. TGF- $\beta$ superobitelj**

Pretvorbeni čimbenik rasta beta (TGF- $\beta$ ) pleotropni je multifunkcionalni citokin s temeljnim imunomodulacijskim (dominantno protuupalnim), antiproliferacijskim i profibrotskim učinkom. TGF- $\beta$  pripada TGF- $\beta$  superobitelji polipeptidnih faktora rasta odnosno diferencijacije (50). TGF- $\beta$  superobitelj prvotno je identificirana u kulturama stanica virusom induciranih sarkoma mišjih fibroblasta. Polipeptidi superobitelji TGF- $\beta$  pronađeni u brojnim organizmima od kolutičavaca, kukaca do kralješnjaka uključujući čovjeka s ubikvitarnim izražajem u svim tkivima i organima što podrazumijeva visok stupanj evolucijske konzerviranosti i značajan utjecaj u embrionalnom razvoju. Do sada je otkriveno 35 polipeptida TGF- $\beta$  superobitelji. S obzirom na strukturne osobitosti definirane su 4 obitelji proteina unutar TGF- $\beta$  superobitelji: MIF (prema eng. Mullerian Inhibitory Factor)- čimbenik inhibicije Mullerovih cijevi, aktivin/inhibin, TGF- $\beta$  i BMP (eng. bone morphogenic proteins). Polipeptidi TGF- $\beta$  sudjeluju u mnogobrojnim fundamentalnim biološkim procesima poput dijeljenja i diferencijacije stanica, razvoju tkiva i organa u prenatalnom i postnatalnom razdoblju (51). U kralješnjaka je do sada pronađeno 5 različitih izoformi TGF- $\beta$  obitelji od kojih u sisavaca njih tri: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 i TGF- $\beta$ 3. Svaku izoformu sintetiziraju različiti geni uz različite oblike posttranskripcijske modifikacije. Mjesta najveće proizvodnje TGF- $\beta$  u organizmu su pluća, kosti i bubrezi. Temeljno djelovanje TGF- $\beta$  očituje se u reakcijama akutne i kronične upale, imunološkim zbivanjima i u regulaciji staničnog ciklusa (52). Osobita uloga TGF- $\beta$  ostvaruje se u mehanizmima cijeljenja odnosno odgovora na ozljedu tkiva. U pogledu patogeneze glomerulonefritisa, čini se da najznačajniju ulogu ima TGF- $\beta$ 1 izooblik.

### **2.2. TGF- $\beta$ signalizacijski sustav**

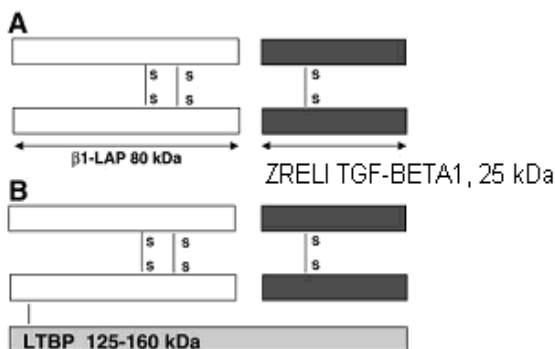
Za razumijevanje patofizioloških procesa u kojima sudjeluje pretvorbeni čimbenik rasta beta, valja uzeti u obzir cjelokupni patobiološki put od sinteze i aktivacije proteina, preko



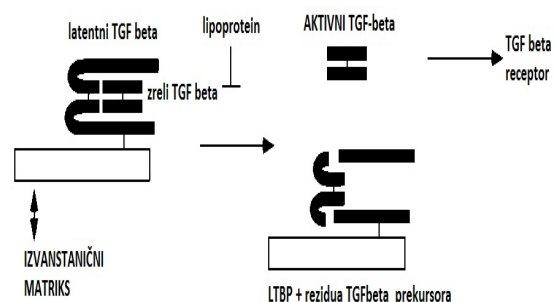
aktivacije membranskog receptora odnosno unutarstaničnih sustava drugih glasnika s učinkom transkripcije ciljnih gena, te sinteze proteina koji posreduju kemijske, morfološke i funkcionalne promjene. Dinamika vezanja TGF- $\beta$  za membranski receptor ovisi o koncentraciji slobodnih TGF- $\beta$  molekula, gustoći raspoloživih receptora odnosno djelovanju prirodnih modulatora (stimulatora/inhibitora) vezanja TGF- $\beta$  za TGF- $\beta$  receptor (TGF- $\beta$ R).

### 2.2.1. Sinteza biološki aktivnog TGF- $\beta$

Nativni prekursorski polipeptid TGF- $\beta$  građen je od 390 aminokiselina i sastoji se od 3 aminokiselinska djela: signalnog peptida, zatim amino-terminalne sekvence- peptid održavanja latencije LAP (latency associated peptide) i aktivnog peptida TGF- $\beta$  (sastoji se od 129 aminokiselina) (53). Razgradnjom prekursorškog polipeptida furinskim konvertazama u Golgijevom aparatu dolazi do odvajanja signalnog peptida, a preostala dva peptida, aktivan TGF- $\beta$  molekularne mase 25 kDa i LAP molekularne mase 80 kDa, ostaju zajedno nekovalentno vezani u obliku peptidnog homodimera nazvanog mali latentni kompleks (TGF- $\beta$  LAP kompleks) (54). Mali latentni kompleks se u Golgijevom aparatu kovalentno veže za LTBP (latent TGF- $\beta$  -binding protein) signalni peptid veličine 125 kDa (postoji u 4 izooblika LTBP1-4), te tako nastaje inaktivni trodijelni veliki latentni kompleks (heterotrimer) koji se izlučuje iz stanice (Slika 4). U stvaranju funkcionalnog TGF- $\beta$  polipeptida dodatno doprinose posttranskripcijske i posttranslacijske modifikacije usljed metilacije i nitrozilacije.



Slika 4. Struktura aktivnog TGF- $\beta$ 1, malog i velikog latentnog kompleksa (prilagođeno prema ref. 55)

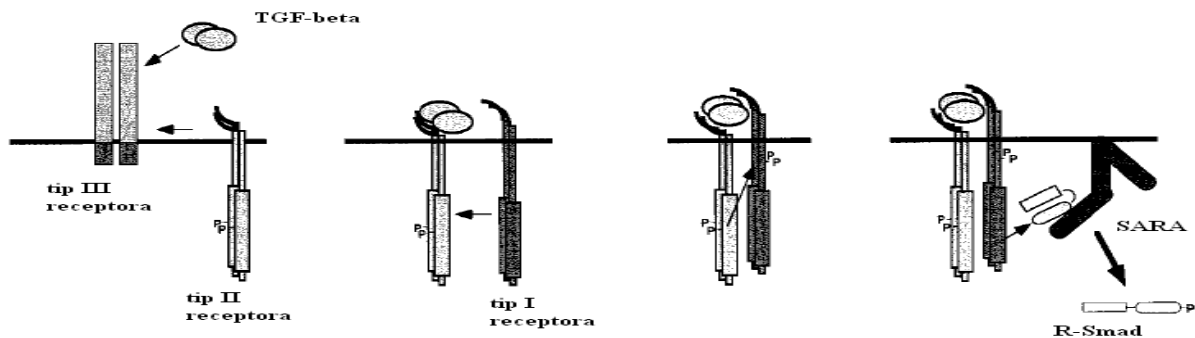


Slika 5. Shematski prikaz oslobađanja aktivne TGF- $\beta$ 1 molekule u izvanstaničnom matriksu (prilagođeno prema ref. 55)

LTBP usmjeruje i pohranjuje veliki latentni kompleks u izvanstanični matriks ili ga veže na staničnoj membrani za integrinski receptor (56, Slika 4). Da bi došlo do oslobađanja funkcionalno aktivnog TGF- $\beta$  ( $t_{1/2}$  3 min), moraju se razgraditi veliki odnosno mali latentni kompleks ( $t_{1/2}$  100 min). Odvajanje LAP od molekule TGF- $\beta$  posreduju proteaze poput matriks-metalo proteaza MMP2/9, katepsina i plazmina, čemu pridonosi deglikozilacija LAP, kiseli pH, oksidativni stres, povišena toplina i trombospondin-1 (57-59, Slika 5). Nakon disocijacije iz molekule malog latentnog kompleksa, oslobođeni LAP veže se na manoza-fosfatni receptor, dok se oslobođeni TGF- $\beta$  može vezati na membranske receptore ili za izvanstanične proteoglikane poput dekorina, endoglina, biglikana (60, 61), te za kolagen IV i fibronektin (62, 63). Cirkulirajući TGF- $\beta$  u krvi veže se za  $\beta_2$  makroglobulin (64).

### **2.2.2. Građa i funkcija TGF- $\beta$ receptorskog kompleksa (TGF- $\beta$ R)**

Specifično obilježje TGF- $\beta$  receptorskog kompleksa (TGF- $\beta$ R) jest njegova građa u obliku heterodimera s treonin/serin kinaznom aktivnošću (65). Za razliku od TGF- $\beta$ R, drugi transmembranski receptori za čimbenike rasta imaju karakterističnu tirozin-kinaznu aktivnost. Prema nekim shvaćanjima, TGF- $\beta$ R je u evolucijskom razvoju stanice postao svojevrsni intermedijar između tirozin-kinaznih (ligandi su peptidi) i nuklearnih receptora steroidnih hormona. TGF- $\beta$ R sastoji se od 2 podjedinice, TGF- $\beta$ R tipa 1 i tipa 2 (TGF- $\beta$ R1, TGF- $\beta$ R2) molekularnih masa 53k Da odnosno 80kDa. Opisan je i tzv. akcesorni TGF- $\beta$ 1 receptor tipa 3 odnosno membranski betaglikan koji pospješuje vezanje TGF- $\beta$  na TGF- $\beta$ R2. U sisavaca je opisano 7 podvrsta TGF- $\beta$ R1 (tzv. ALK actin like kinases) i 5 TGF- $\beta$ R2 uz njihove međusobne tetramerske varijante koje mogu biti brojne i unutar bubrežnog tkiva. Obje receptorske jedinice građene su od 3 domene: visokoglikozilirane izvanstanične, kratke transmembranske i enzimski aktivne unutarstanične (serin/treonin kinaza). Enzimska aktivnost receptorskog kompleksa nastaje kroz 2 koraka, prvi je vezanje aktivnog liganda (TGF- $\beta$ ) za TGF- $\beta$ R2, a drugi je posljedična asocijacija (transfosforilacija) TGF- $\beta$ R1 s TGF- $\beta$ R2 (66, Slika 6).

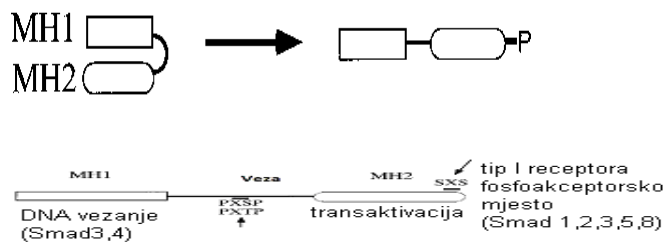


Slika 6. Postupak vezanja TGF-β za receptorski kompleks (prilagođeno prema ref. 55)

### 2.2.3. Organizacija Smad sustava

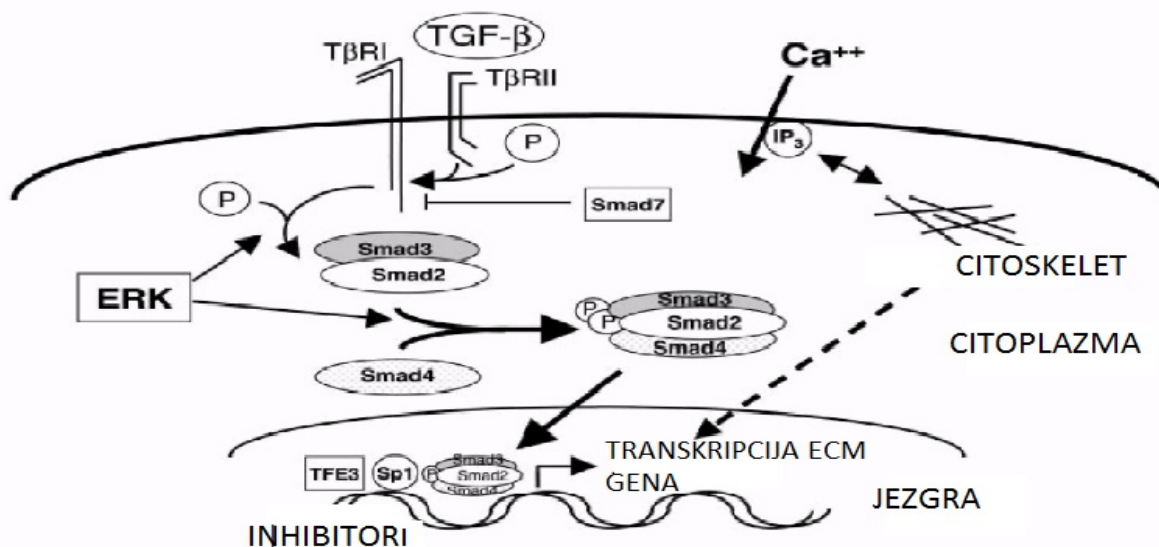
Smad proteini predstavljaju supstrat unutarstanične domene TGF-βR1 ali ga mogu koristiti i drugi receptorski kompleksi. Radi se o obitelji citoplazmatskih signalizacijskih proteina koji posreduju prijenos signala aktiviranog TGF-βR i potiču transkripcijske mehanizme u jezgri stanice. Otkriveni su u brojnim organizmima uključujući kolutičavce, kralješnjake, sisavce (67). Prvobitan opis navedenih proteina proizašao je iz proučavanja BMP-u homolognih tzv. MAD sekvencija (prema eng. MAD- Mothers against decapentaplegic) u razvoju mušica *Drosophila mellanogaster*, te gena u razvoju crva *Caenorhabditis elegans* (68, 69). Geni za navedene proteine crva nazvani su Sma geni (Sma-2, Sma-3, Sma-4) a njihov proizvod Smad proteini (akronim od sma+MAD). U stanici, Smad proteini raspoređeni su u 3 skupine: R-Smad (receptorom aktiviran Smad), co-Smad (prema eng. common pathway Smad ili cooperative Smad) ili Smad zajedničkog puta, te I-Smad (inhibitorni Smad). U podobitelj R-Smad proteina pripadaju Smad2/3 (fosforilira ih TGF-βR ali i receptor aktivina), te Smad1/5/8 koje aktivira BMP receptor (70,71). Smad4 je co-Smad oblik, dočim Smad6 i Smad7 pripadaju skupini I-Smad (ili anti-Smad).

Struktura Smad-a izgrađena je od N-terminalne NH1 domene (prema eng. N- terminal mad homology) te C-terminalne NH2 domene čija uloga je usmjeravanje Smad-a prema jezgri. Navedene funkcionalne domene prostorno su konformirane (združene) u obliku ukosnice. SSXS sekvenca C-terminalne regije R-Smad bogata je serinom i treoninom te predstavlja potencijalno fosfoakceptorsko mjesto za aktiviranu TGF-βR1 podjedinicu koja dakle fosforilacijom aktivira R-Smad (mijenja prostornu konformaciju čime nastupa interakcija s Co-Smad) (72, Slika 7).



Slika 7. Mehanizam aktivacije R-Smad molekule (prilagođeno prema ref. 73)

Co-Smad se ne veže za TGF- $\beta$ R1 (ne posjeduje SSXS regiju) već se preko NH2 domene veže za R-Smad i tako čini heteromultimerski kompleks koji odlazi u jezgru (72, Slika 8).



Slika 8. TGF- $\beta$ /Smad signalni put (prilagođeno prema ref. 73)

R-Smad/Co-Smad kompleks u jezgri predstavlja protranskripcijsku funkcionalnu jedinicu. MH2 domena nuklearnog kompleksa ima transaktivatorsku sposobnost, odnosno privlači druge transkripcijske čimbenike (AP-1, Fast-1, Fast-2, TFE3, Sp1) dok se intrinzična aktivnost NH1 domene Smad3 očituje u izravnom vezanju na DNA (74-79, Slika 8).

Inhibicijska uloga I-Smad ostvaruje se na nekoliko načina. Kao i Smad2/3, I-Smad veže se za aktiviranu receptorsku jedinicu ali ne posjeduje fosfoakceptorsko mjesto (nema MH2 domenu), nego zauzima mjesto vezanja i aktivaciju R-Smad-a (80). Nadalje, I-Smad ometa povezivanje R-Smad-a s Co-Smad-om. Treći mehanizam inhibicije posredovan je Smurf proteinima koji privlače ubikvitin-ligazu Smurf1/2 i akardina koji posreduju proteasomsku

degradaciju kompleksa TGF- $\beta$ R i R-Smad (81). Smad7 dakle djeluje renoprotektivno, budući atenuira i fibrogenezu i upalu potičući sintezu I $\kappa$ -B $\alpha$  inhibitora NF- $\kappa$ B, te je manjak celularne koncentracije Smad7 jedno od molekularnih obilježja kronične bubrežne bolesti, progresivne bubrežne upale i fibroze (82). S druge strane, Smad6 nema značajnije djelovanje na podocyte, a u mezangiju može čak podržavati upalni odgovor (83).

U regulaciji unutarstanične signalizacije i transkripcijskog odgovora kompleksa TGF- $\beta$ 1–TGF- $\beta$ R, važnu ulogu ima endocitoza samog kompleksa, koja se može događati na 2 načina, putem klatrinom obloženih pora ili kolesterolom bogatih mikrodomena stanične membrane (84). Endocitoza klatrinom obloženim mjehurićima usmjeruje kompleks u tzv. rane endosome koji oslobađaju internalizirane receptore od liganda i usmjeruju ih na staničnu membranu kako bi vezali nove ligande. S druge strane, endocitoza u lipidima bogatim mjehurićima usmjeruje kompleks u tzv. kasne endosome i lizosome gdje oni bivaju razgrađeni.

#### **2.2.4. Međudjelovanje i integracija TGF- $\beta$ /Smad s drugim signalizacijskim mehanizmima**

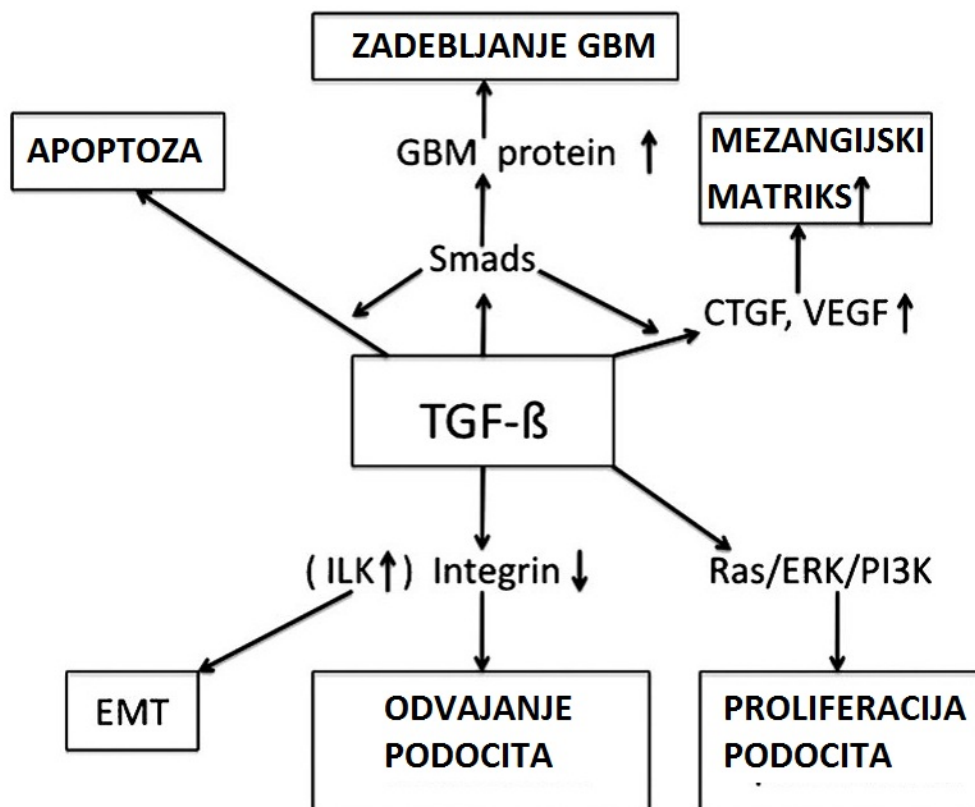
Za TGF- $\beta$ /Smad osovину dokazana je značajna interakcija s drugim kaskadnim signalizacijskim putovima što osigurava i raznolikost djelovanja ovog sustava. TGF- $\beta$ R može intereagirati s neSmad unutarstaničnim proteinima, a jednako tako neSmad proteini mogu djelovati na unutarstaničnu Smad kaskadu. Na taj način moguća je kompleksna suradnja unutarstaničnih kaskadnih signalizacijskih putova koji potječu od različitih membranskih receptora (G-udruženi receptori, tirozin-kinaze i serin-treonin kinaze, te receptora citokina). Ta pojava se osobito odnosi na 2 signalizacijska sustava: ERK (prema eng. extracellular receptor–linked kinase) i MAPK (prema eng. mitogen activated protein kinase) kojem pripadaju p38 odnosno JNK (prema eng. c-Jun N terminale kinase) (85-87). Važnost takvih interakcija ostvaruje se na razini pojačavanja odnosno slabljenja provodnog impulsa TGF- $\beta$ /Smad kontinuiteta odnosno krajnjeg odgovora u obliku proliferacije (ERK sustavom) ili apoptoze (MAPK sustavom) pojedinih vrsta stanica (88).

## 2.3. TGF- $\beta$ 1 i patofiziologija glomerulonefritisa

### 2.3.1. Utjecaj TGF- $\beta$ 1 na glomerul

Dokazano je da intraglomerularna hipertenzija uzrokuje rastezanje cijelog mezangija uključujući kontraktilne mezangijske stanice. Uz hipertenzivni (biomehanički stres) i „upalni stres“ (odgovor na upalu) uzrokuje u mezangijskim stanicama sintezu i lučenje TGF- $\beta$ 1, te aktivator plazminogena koji oslobađa aktivnu (slobodnu) molekulu TGF- $\beta$ 1 iz inaktivnog latentnog kompleksa (89). Pored mezangijskih stanica kao glavnog izvora, TGF- $\beta$ 1 izlučuju i lokalno infiltrirani makrofagi. TGF- $\beta$ 1 snažno potiče sintetsku aktivnost mezangijskih stanica koje luče komponente ECM i inhibitore njegove razgradnje, a smanjuje koncentraciju proteolitičkih enzima (iznimka je MMP-2, gelatinaza A- kolagenaza IV) (89-91). Organizacija (arhitektura) izvanstaničnog matriksa uređena je pojačanom sintezom receptorskih molekula-integrina, preko kojih se odvija dinamična i funkcionalna interakcija izvanstanični matriks-mezangijske stanice (92). Sastav mezangijskog matriksa djeluje na diferencijaciju, mitogenezu i migraciju mezangijskih stanica (93). U laboratorijskim uvjetima dokazan je povećan ulazak  $Ca^{++}$  u mezangijske stanice izložene TGF- $\beta$ 1. Navedeni mehanizam moguće je inhibirati blokatorom receptora za inozitol-3-fosfat (IP3), pa se pretpostavlja da je upravo taj receptor u određenoj interakciji s TGF- $\beta$ 1 (Slika 9). Osim sintezom ECM mezangija, TGF- $\beta$ 1 dodatno štiti glomerul od tlačnog prenaprezanja i oštećenja, izravnim poticanjem proizvodnje ET-1 koji parakrinim djelovanjem posreduje kontrakciju aferentne arteriole i tako pridonosi smanjenju intraglomerularne hipertenzije (94). Obzirom na kratki poluživot, molekula TGF- $\beta$ 1 veliki učinak ostvaruje poticanjem sinteze čimbenika rasta s parakrinom aktivnošću. Na razini glomerula, interesantno je zapažanje da autokrinim djelovanjem TGF- $\beta$ 1 u podocitima potiče sintezu CTGF (prema eng. connective tissue growth factor, čimbenik rasta veziva) i VEGF koji mogu kontra struje glomerularnog filtrata doploviti do receptora na endotelu i podocitima (95) (Slika 9). Osim angiopoetskog učinka, VEGF može djelovati i na pojačanu sintezu izvanstaničnog matriksa u mezangiju. Uz navedene, TGF- $\beta$ 1 pokazuje i brojne protuupalne učinke. Imunomodulira i imunosuprimira humoralne i stanične imunoreakcije: inhibira adheziju leukocita na glomerularni endotel, te posljedičnu aktivaciju leukocita i endotela, inhibira sintezu IL-8 u endotelu koji djeluje kemotaktično na imunološke stanice, nadalje inhibira proliferaciju B-limfocita i sintezu imunoglobulina, inhibira mitogenezu T limfocita i stanica prirodnih ubojica (96-100).

Imunološku upalu u glomerulu i intersticiju, TGF- $\beta$ 1 kontrolira mehanizmom „funkcionalne deaktivacije“ makrofaga (101). Naime, TGF- $\beta$ 1 sprječava lučenje kemotaktičnih molekula, inhibira adhezivnost i retenciju makrofaga u mezangiju (intrinzična sposobnost makrofaga za zadržavanjem u upalnom miljeu), sprječava sazrijevanje monocita u makrofage, inhibira lučenje proupalnih citokina i slobodnih kisikovih radikala iz makrofaga i neutralizira već izlučene citokine. TGF- $\beta$ 1 oslabljuje odgovor mezangijskih stanica na upalne i mitogene citokine poput IL-1 i IL-6, te djeluje antiproliferativno i proapoptotski na mezangijske stanice. Fiziološku ulogu TGF- $\beta$ 1 dakle, obilježava profibrotsko i protuupalno djelovanje. Čimbenici (egzogeni, endogeni) koji utječu na biološko ponašanje TGF- $\beta$ 1 (ovisno o intenzitetu i dužini njihova djelovanja) svaku ozljedu ili stres u glomerulu mogu usmjeriti u protrahirani upalni proces (ukoliko inhibiraju aktivnost TGF- $\beta$ 1) s jedne ili pak u globalnu glomeruloskleroze (ukoliko aktiviraju TGF- $\beta$ 1) s druge strane (102). TGF- $\beta$ 1 inhibira proliferaciju mezangijskih, endotelnih i tubularnih epitelnih stanica. Mehanizam inhibicije ostvaruje se djelovanjem na ciklin-ciklin zavisni kompleks kinaza koji kontrolira tranziciju staničnog ciklusa iz G1 u S fazu (104-107).



Slika 9. Patofiziološki mehanizam djelovanja TGF- $\beta$ 1 u glomerulosklerozi (prilagođeno prema ref. 103)

### 2.3.2. Tubulointersticij i TGF- $\beta$ 1

Zajednički morfološki obrazac završnog stadija svih kroničnih bubrežnih bolesti je tubulointersticijska fibroza, koja je u većini glomerularnih bolesti ujedno predstavlja i jedan od glavnih prediktora progresije kronične bubrežne insuficijencije (108). Upala je per se glavni začetnik i propagator fibroze intersticija (drugim riječima upala prethodi fibrozi). Intersticijska fibroza kao dinamičan interaktivni proces karakterizirana je sljedećim obilježjima: hipertrofijom i proliferacijom matriks sintetizirajućih stanica, akumulacijom izvanstaničnog matriksa, infiltracijom upalnih stanica, ramifikacijom mikrocirkulacije i gubitkom tubulocita (109). Intersticijska fibroza ovisi o količini i sastavu novonastalog izvanstaničnog matriksa kao i o broju umnoženih fibroblasta. Sastav intersticijskog matriksa u fibrozi razlikuje se od onoga u fiziološkim uvjetima, a čine ga kolageni tip I i III, fragmenti kolagena tip IV, fibronektin. Slaganje i raspoređivanje fibrilarnih struktura posreduju tzv. kolageni nukleatori i fibrilini poput LAP-TGF- $\beta$ , kolagena tip V, integrina i SPARC (secreted proteins acidic and rich in cystein) (110). Ove molekule nazivamo još interaktivnim regulatorima s obzirom na njihove dodatne funkcije u slaganju intersticijskog matriksa, pa tako npr. fibronektin pomaže vezanju kolagena za integrinske receptore na fibroblastima, kolagen V pomaže vezivanje kolagena tip I, a SPARC stimulira sintezu MMP i PAI-1, te EMT. Uobičajeno je da fibrogenaza započinje u fokalnim izoliranim upalnim nišama, te difuzno progredira ako postoji kontinuirana profibrogena stimulacija. Migracija ili difuzija fibroblasta između formiranih kolagenih vlakana ovisna je o lokalnom kemotaktičnom gradijentu upalnih citokina unutar upalnih niša (111). Razgradnja intersticijskog matriksa ovisna je o djelovanju (ravnoteži) sustava lokalnih proteaza odnosno njihovih inhibitora. Plazmin može npr. razgraditi fibronektin, laminin, entaktin i perlecan (112). Uz sustav plazminogen-plazmin (urokinazni i tkivni tip plazminogen aktivatora-uPA i tPA, zatim PAI-1), matriks metaloproteinaze i njihovi tkivni inhibitori (MMP i TIMP), u razgradnji intersticijskog matriksa važnu ulogu imaju katepsini (cisteinom bogate kisele lizosomalne proteaze).

U nastanku fibroze intersticija sudjeluju i upalne stanice: dendritične stanice (prezentiraju antigen), limfociti (T i B) koji uvijek prethode infiltraciji makrofaga i mastociti koji ovisno o vrsti citokinske stimulacije mogu djelovati upalno i protuupalno (tj. profibrogeno, budući su u njihovoj citoplazmi dokazane granule ispunjene s bFGF- bazičnim čimbenikom rasta



fibroblasta). Makrofage dijelimo na klasičnim putem aktivirane (tip M1) koji iskazuju proupalna svojstva, te alternativnim putem aktivirane (tip M2) koji djeluju protuupalno (113). Populacija fibroblasta također je heterogena, pa tako razlikujemo  $\alpha$ SMA (alfa smooth muscle actin)+ i  $\alpha$ SMA- fibroblaste, te FSP (fibrocyte specific protein)+ i FSP- fibroblaste. Proliferaciju sintetski aktivnih fibroblasta snažno podržava upravo TGF- $\beta$ 1. Sudbina tubulocita u fibrogenezi intersticija je različita. Upalom aktivirani tubulociti mogu proliferirati, mogu krenuti putem programirane stanične smrti ili u EMT (vidi iduće poglavlje). Kao što smo ranije istaknuli da glomerularni hidrostatski stres rasteže GBM i potiče lučenje TGF- $\beta$ 1 u mezangiju, slično rasteže i tubularnu bazalnu membranu (TBM), te posljedično u tubulocitima aktivira NF- $\kappa$ B i sintezu TGF- $\beta$ 1 (114). Posljedično razvoju fibroze nastupa funkcionalno i anatomske odvajanje tubula i glomerula u glomerularnom vratu čime nastaju afunkcionalni tzv. aglomerularni tubuli. Oporavak odnosno regeneracija tubula mogući su djelovanjem progenitorskih stanica parijetalnog epitela vaskularnog pola glomerula (CD24+CD133+ stanice) ili iz matičnih stanica glomerulotubularnog prijelaza (115, 116). U području fibroze intersticija nastupa vazokonstrikcija, apoptoza endotela, mikrotromboziranje kapilara te potom ishemija i hipoksija (117). Revaskularizacija, kao jedan od preduvjeta zaustavljanja progresije fibroze, moguća je također nadoknadom izgubljenih endotelnih stanica cirkulirajućim i lokalnim matičnim stanicama.

#### **2.4. Epitelno-mezenhimska pretvorba**

Epitelno-mezenhimska transdiferencijacija/tranzicija (prema eng. epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) biološki je fenomen obilježen pretvorbom epitelnog u mezenhimalni stanični fenotip. Prvotno, EMT je opisan u modelima embriogeneze i kancerogeneze. Brojna istraživanja pokazala su, da se EMT događa u tubularnim stanicama razvijenim iz metanefronskog mezenhima (ali ne i u sabirnim tubulima, koji su porijeklom iz epitela ureteralnog pupoljka) embriološkim mehanizmima mezenhimno-epitelne transdiferencijacije-MET (118). EMT predstavlja suprotan smjer reakcija MET odnosno predstavlja model tzv. „reverzne embriogeneze“, koja nastaje isključivo u uvjetima kronične izloženosti imunološkoj upali, ali i u kancerogenezi (119). Suvremena istraživanja promatraju EMT kao moguće ključan mehanizam fibrogeneze bubrežnog tkiva. Preliminarni opis uloge EMT-a u razvoju bubrežne fibroze opisao je 1995.g. Strutz sa suradnicima, kada je u epitelnim tubularnim

stanicama miševa s anti-TBM (tubularna bazalna membrana) bolesti dokazao fibroblast specifični protein (Fsp1, kalcij vezujući protein staničnog citoskeleta neepitelnih stanica) (45). U međuvremenu prikazani su rezultati brojnih *in vivo* i *in vitro* ispitivanja (modeli opstruktivne uropatije, subtotalne nefrektomije, tPA-/- glodavaca) koji su potvrdili da tubularne epitelne stanice mogu poprimiti karakteristična obilježja miofibroblasta, ključnih efektor a odlaganja izvanstaničnog matriksa (120-122).

U eksperimentalnom modelu opstruktivne nefropatije istraživ a n je vremenski slijed odnosno dinamika stvaranja intersticijskih miofibroblasta (intermedijarni tip stanica između fibroblasta i glatkih mišićnih stanica). Istraživanja su pokazala da populacija miofibroblasta nastaje u 2 uzastopne faze. U ranoj fazi (3 dana nakon kirurški izazvane opstrukcije) miofibroblasti nastaju aktivacijom lokalnih (rezidentnih) intersticijskih fibroblasta, dok u kasnoj fazi (7 dana poslije operacije) glavninu miofibroblasta čine transformirane tubularne epitelne stanice, a u tzv. tranzitornoj fazi (pre-EMT faza), mogu se naći prijelazne stanice s dvostrukim, epitelnim i mezenhimalnim fenotipskim obilježjima (123). Štoviše, Iwano i suradnici pokazali su da u populaciji miofibroblasta najmanje 1/3 čine EMT epitelne stanice proksimalnog tubula (124). Manji udio miofibroblasta (oko 15%) potječe iz monocita i makrofaga koji iz koštane srži i cirkulacijskih bazena infiltriraju tubulointersticij (privučeni kemotaksijskim svojstvima TGF- $\beta$ 1), te iz perivaskularnih fibroblasta (periciti venula). U zadnje vrijeme dokazano je da i endotel peritubularnih kapilara također sudjeluje u EMTu što je nazvano endotelno-mezenhimalna transdiferencijacija (EndoMT), te i EMT podocita (125, 126). Postupnost gubitka podocita odnosno oblik njihove ozljede ovisan je o intenzitetu i trajanju stresogenog induktora (hipertenzija, upala) (Slika 10). Početne promjene obilježene su hipertrofijom podocita, ukoliko se upala nastavi nastupa EMT podocita (127-130).

Nadasdy i sur. prvi su u humanim bubrežnim biopstatima u bolesnika s završnom fazom kronične bubrežne bolesti dokazali imunohistokemijske markere EMT u području fibroze intersticija (131), a slično je opisano i u kasnijim studijama na humanim biopstatima različitih primarnih i sekundarnih oblika glomerulonefritisa (132-134). Rastaldi i suradnici dodatnu pažnju upućuju i na mikroskopski „zdrave“ tubulocite kao i one oko kojih se nalazi tek početna intersticijska fibroza, a u obje skupine su našli epitel s pozitivnim mezenhimalnim antigenima, što je vjerojatno upućivalo na vrlo ranu patogenetsku fazu bolesti, odnosno mogućnost da tubulociti direktno i bez ruptur e TBM i migracije u intersticij izlučuju kolagen (134).



Slika 10. Mehanizam transdiferencijacije podocita s molekularnim biljezima mezenhimske neofenotipizacije (prilagođeno prema ref. 129)

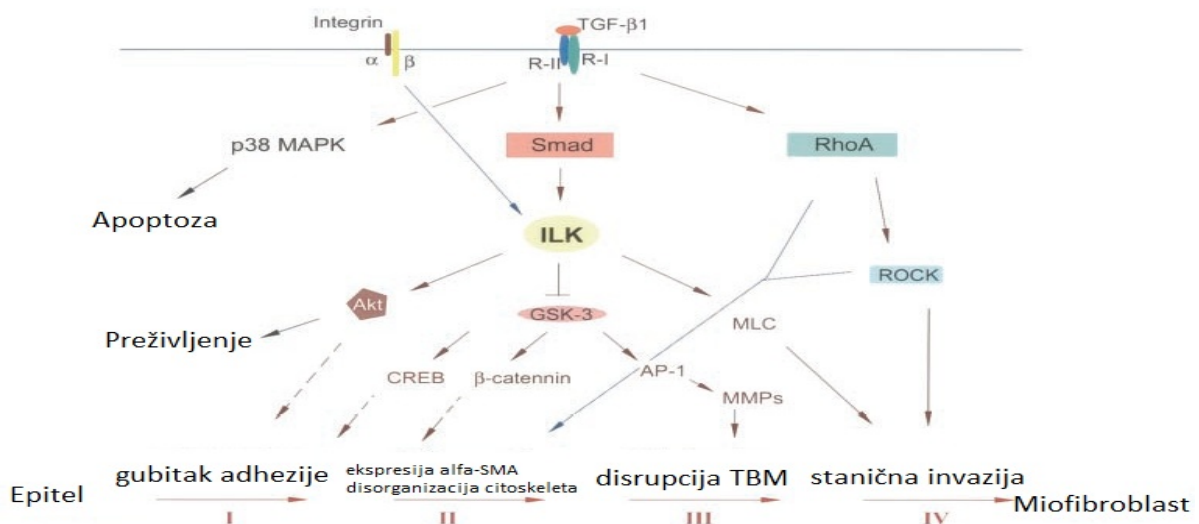
EMT posređuju brojni citokini i faktori rasta. Za razliku od drugih citokina začetnika EMT-a, TGF- $\beta$ 1 posređuje cjelokupni tijek EMT-a (135). S druge strane, postoje inhibitori EMT-a, među kojima su najvažniji HGF (eng. hepatocyte growth factor), te BMP-7 (bone morphogenic protein 7) (123, 136, 137, Tablica 4).

Tablica 4. Čimbenici promocije i supresije EMT-a (prilagođeno i modificirano prema ref. 137)

<b>Čimbenici indukcije i promocije EMT</b>	TGF- $\beta$ , ATII, TNF $\alpha$ , EGF, FGF2, CTGF, IL1/6, AGE kolagen I, MMP-2, plazmin, tPA, ROS, INF $\gamma$ , HIF1 $\alpha$
<b>Čimbenici supresije EMT</b>	HGF, BMP-7, relaksin, RAAS blokatori, statini, rapamicin, receptor vit. D, heparan-sulfat, kolagen IV

EMT razvija se u 4 osnovne vremenski povezane faze koju na molekularnoj razini manifestira ekspresija nekoliko stotina do tisuća gena uslijed vezanja TGF- $\beta$ 1 za prekomjerno izražene TGF- $\beta$ R na tubulocitima (44,45, 138-140, Slika 11):

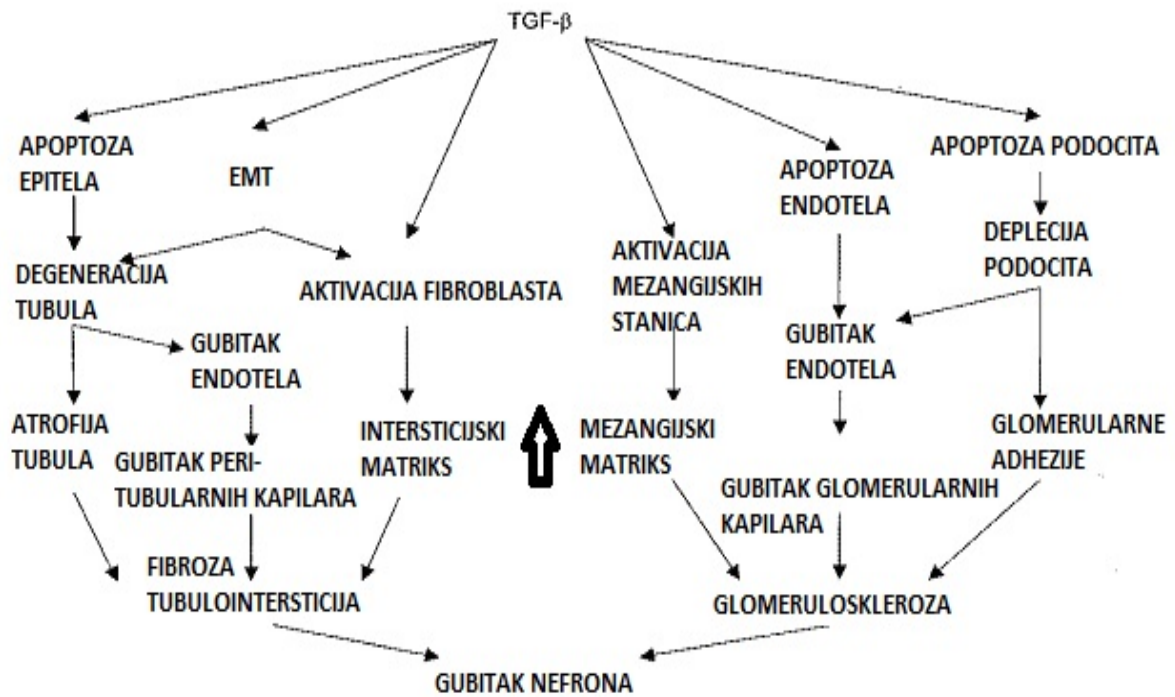
- gubitak adhezije među epitelnim stanicama,
- de novo ekspresije glatkomišićnog  $\alpha$ -aktina ( $\alpha$ -SMA) i reorganizacija staničnog citoskeleta,
- disrupcije stanične membrane,
- migracije i invazije EMT stanica.



Slika 11. Unutarstanični signalizacijski mehanizmi regulacije EMT-a (prilagođeno prema ref. 137)

Prvu fazu EMT-a karakterizira odvajanje i gubitak polariteta epitelnih stanica zbog smanjene ekspresije adhezivne receptorske molekule E-kadherina (adherence junction spoja) i proteina ZO1 (zonula occludens, integrativni protein u strukturi tight junction spoja). Isto tako dolazi do smanjene ekspresije katenina, unutarstaničnog proteinskog posrednika između adhezivnog receptorskog sustava i staničnog citoskeleta. Gubitkom stanične adhezije nestaje apikalno-bazalni polaritet epitelnih stanica (podjednako bitan za strukturu i funkciju stanica), te dolazi do njihovog izduljenja i odvajanja od TBM. Istovremeno u stanici dolazi do reorganizacije citoskeletne arhitekture zamjenom aktina s  $\alpha$ SMA, te intermedijarnih filamenata citokeratina s vimentinom. Integritet TBM je presudan u razdvajanju dvaju odjeljaka bubrežnog tkiva, tubula i intersticija. Diskontinuitet TBM posredovan je pojačanim stvaranjem matriks-metaloproteinaza osobito tipa 2 i 9 koje razgrađuju osnovne strukturne elemente TBM, kolagen tipa IV i laminin (90). Prekidom TBM omogućena je interakcija kolagena tipa I iz intersticija s tubularnim stanicama (koja potiče EMT) i migracija transformiranih tubulocita u peritubularni intersticij (91).

Sveobuhvatan utjecaj TGF-β1 na gubitak nefrona prikazan je shematski na Slici 12.



Slika 12. Pleotropni učinci TGF- $\beta$  u glomerulosklerozi i fibrozi tubulointersticija (prilagođeno prema ref. 141)

### 2.4.1. Biološka sudbina EMT stanica

Biološki put EMT stanica može biti višesmjernan. Epitelne stanice u fenotipskoj tranziciji posebno su osjetljive, te u određenim okolnostima postaju sklone apoptozi (tzv. two-hit theory, najprije TGF- $\beta$ 1 preko sustava p38MAPK-prokaspaza 9/3 tubulocite učini strukturno nestabilnima, a zatim ih upalna ili druga noxa usmjeri preko Fas puta u apoptozu) (142). Za razliku od EMT tubulocita, EMT podociti ne invadiraju u mezangij ili intersticij, nego se odvajaju od GBM, nakon čega dolazi do njihove: apoptoze (posredovana sa Smad7), formacije polumjeseca ili otplavlivanja urinom. Važno je naglasiti da EMT nije nužno ireverzibilan proces pogotovo u ranoj fazi. Interesantna i praktično bitna činjenica mogućnost je rediferencijacije EMT-om nastalih miofibroblasta u stanice epitelnog fenotipa. Reverzan proces mezenhimno-epitelne transdiferencijacije, omogućuju induktori MET-a od kojih su eksperimentalno verificirani HGF i BMP-7.

## 2.5. Uloga TGF- $\beta$ 1 u nefrosklerozi laboratorijskih životinja

Veliki broj bazičnih radova opisuje animalne modele skleroze glomerula i fibroze tubulointercicija (modeli subtotalne nefrektomije, streptozotocinom inducirane dijabetičke nefropatije, unilateralne potpune stenozе uretera, puromicin-adriamicin inducirane glomeruloskleroze, imunološki aktiviranog ekstrakapilarnog glomerulonefritisa) izazvane djelovanjem TGF- $\beta$ 1 na mezangijske stanice i tubulocite. Drugi dokazi patogenetske uloge TGF- $\beta$ 1 u animalnim modelima bubrežne fibroze, temelje se na istraživanjima antifibrotskog djelovanja blokatora TGF- $\beta$ 1 sustava.

U miševa injekcija ATS (anti-timocitnog seruma) uzrokuje mezangiolizu i susljednu mezangioproliferaciju (animalni model akutnog mezangioproliferativnog glomerulonefritisa) uz visoke cirkulacijske i tkivne vrijednosti TGF- $\beta$ 1 i ekspanziju ECM (osobito mRNA i proteina kolagena tip I/II, fibronektina, te tkivnih inhibitora matriks-proteaza) u području mezangija (143). Primjenom proteoglikana dekorina, prirodnog inhibitora TGF- $\beta$ 1, te TGF- $\beta$ 1 antisense oligonukleotida spriječena je glomeruloskleroza (144, 145).

U modelu proliferativnog GN, primjena inhibitora TGF- $\beta$ RI i antisense oligonukleotida za TGF- $\beta$ 1, spriječava glomerulosklerozu, odnosno suprimira ekspanziju mezangijskog izvanstaničnog matriksa (146, 147).

Pored dokaza za patofiziološko sudjelovanje TGF- $\beta$ 1 u akutnim glomerulonefritisima, podastrijeti su podaci i za ireverzibilno profibrogeno djelovanje TGF- $\beta$ 1 u modelima kronične bolesti (upale). Primjer za to je studija na transgeničnim miševima s pojačanom ekspresijom gena za TGF- $\beta$ 1 u hepatocitima, što uzrokuje cirozu jetre i globalnu glomerulosklerozu (148). Transfekcija gena za TGF- $\beta$ 1 u mezangij pokusnih glodavaca uzrokovala je glomerulosklerozu, koja je nađena i u animalnim modelima fokalne segmentalne glomeruloskleroze izazvane adriamicinom, te u modelima glomeruloskleroze posredovane prekomjernom ekspresijom TGF- $\beta$ 1 (47, 149-150). U animalnim modelima reducirane bubrežne mase, dokazano je pojačano lučenje TGF- $\beta$ 1 u podocitima (151). Osim glomeruloskleroze, u animalnim modelima dokazana je i ozljeda tubulocita kao posljedica djelovanja TGF- $\beta$ 1 (152).

## **2.6. Uloga TGF- $\beta$ 1 u kulturama bubrežnih stanica**

U kulturama mezangijskih stanica, tubulocita i bubrežnih intersticijskih fibroblasta TGF- $\beta$ 1 može inducirati sintezu drugih čimbenika formiranja vezivnog tkiva, među kojima su najznačajniji bFGF i CTGF (153, 154). Navedeni peptidi u kulturama mezangijskih i tubularnih stanica glodavaca, uzrokuju značajnu staničnu proliferaciju i ekspanziju izvanstaničnog matriksa usporedivu s nalazima bubrežnih bioptata animalnih modela glomerulonefritisa. Važnost Smad signalizacijskog puta pokazana je u modelu s mutiranjem Smad3 molekulom bez fosfoakceptorskog mjesta, tzv. Smad3A. U mezangijskim stanicama izloženima TGF- $\beta$ 1 koje su sintetizirale Smad3A nije zabilježena pojačana sinteza kolagena (155). U staničnim kulturama animalnih podocita izloženih mediju TGF- $\beta$ 1, pokazano je pojačano lučenje kolagena IV i fibronektina (156). Isto tako je u kulturama humanih i animalnih podocita dokazano da TGF- $\beta$ 1 inhibira ekspresiju tumor supresorskog gena WT-1 (Wilmsov tumor) što doprinosi proliferaciji podocita (157).

## **2.7. Uloga TGF- $\beta$ 1 u glomerularnim bolestima u ljudi**

Koncentracija ili ekspresija komponenti TGF- $\beta$ 1 sustava (prekursorske molekule, serumski nosači, stanični receptori, unutarstanični prijenosnici) ispitivana je u krvi, mokraći i biopstatima bubrega bolesnika s različitim oblicima glomerularne bolesti različitim laboratorijskim metodama poput PCR, in situ hibridizacije, Western i Southern-blot, indirektna imunofluorescencije, imunohistokemije, ELISA. Iako se u većini istraživanja zaključuje da u glomerularnim bolestima postoji prominentna aktivnost TGF- $\beta$ 1 sustava ovisno o korištenim metodološkim pristupima i tipu glomerularne bolesti, rezultati nisu jednoznačni.

Ovdje ćemo ukratko prikazati značaj nekoliko važnih studija genetskog istraživanja, te istraživanja TGF- $\beta$ 1 u krvi i mokraći.

Skupina švedskih autora našla je u istraživanjima polimorfizma gena za TGF- $\beta$ 1 moguće genotipove predisponirajuće za razvoj ali ne i progresiju IgA nefropatije (158).

U nekoliko istraživanja dokazano je da aktivirani receptori za polimerne IgA imune komplekse u mezangiju potiču proizvodnju TGF- $\beta$ 1 u mezangijskim stanicama.

Djelovanje IgA preko receptora na mezangijskim stanicama štoviše oslobađa lučenje proupalnih citokina, te čimbenika rasta i fibrogeneze poput TGF- $\beta$ 1 koji potom lokalnom difuzijom dolaze do podocita i tubulocita te ih aktiviraju (159, 160, 162, 163). Lučenje TGF- $\beta$ 1 iz mezangijskih stanica moguće je spriječiti primjenom RAAS blokatora (160-163).

Dijagnostička i prognostička vrijednost TGF- $\beta$ 1 u urinu ispitivana je u različitim oblicima GN.

Grčka skupina istraživača, pokazala je u bolesnika s IGAN da je koncentracija TGF- $\beta$ 1 u urinu u korelaciji s histološkim promjenama mezangioproliferacijom, proširenjem matriksa i prisutnosti polumjeseca (164). Povezanost koncentracije TGF- $\beta$ 1 u urinu s histološkim nalazom polumjeseca pronađena je u još jednoj studiji (165). U bolesnika s MN koncentracija TGF- $\beta$ 1 u urinu bila je povezana sa stupnjem albuminurije i upalnom infiltracijom intersticija i indeksom skleroze, te je značajno padala u bolesnika u remisiji (164).

Povećana koncentracija TGF- $\beta$ 1 u urinu u bolesnika s FSGS i MN u odnosu na zdrave ispitanike nađena je u još 3 istraživanja (166-168), a u dva od njih nađena je i pozitivna povezanost TGF- $\beta$ 1 u urinu s vrijednostima serumskog kreatinina (167, 168) i u jednom s veličinom proteinurije (168).

Drugačije rezultate prikazale su dvije studije, prva talijanskih autora u kojoj u bolesnika s MN nije pronađena razlika koncentracije TGF- $\beta$ 1 u urinu u odnosu na zdrave ispitanike (169), kao niti u jednoj finskoj studiji (165). U istraživanju japanskih autora, značajno veća koncentracija TGF- $\beta$ 1 u urinu bila je jedino u bolesnika s FSGS, dok je u IGAN bolesnika bila jednaka, a u MN bolesnika čak i manja prema kontrolnoj skupini (170).

Korelacija plazmatske koncentracije TGF- $\beta$ 1 sa koncentracijom serumskog kreatinina ispitivana je u 46 bolesnika s IGAN, 26 s MN, 7 s FSGS te u krvi 50 kontrolnih ispitanika (zdrave osobe). U svih skupina bolesnika s glomerularnom bolesti plazmatska koncentracija TGF- $\beta$ 1 bila je manja ili jednaka onoj u zdravih ispitanika i nije korelirala s vrijednostima serumskog kreatinina (171), a slični zaključci dobiveni su u još dvije studije (165, 172). Suprotni nalaz opisali su Shin i sur. (173).



Slijedi tablični prikaz najvažnijih istraživanja ekspresije mRNA TGF- $\beta$ 1 i TGF- $\beta$ 1 PCRom, in situ hibridizacijom te imunoflorescentnom metodom u bolesnika s IGAN, FSGS i MN.

Tablica 5. Prikaz referenci radova koji govore u prilog i protiv povećane ekspresije mRNA TGF- $\beta$ 1 u bolesnika s IGAN, FSGS i MN

	<b>EKSPRESIJA VEĆA PREMA KONTROLNOJ SKUPINI</b>	<b>EKSPRESIJA JEDNAKA KONTROLNOJ SKUPINI</b>
<b>IGAN</b>	Am J Kidney Dis. 2000;36(5):894-902. (173) Kidney Int 1996;49:461-9. (174) Clin Nephrol 2006;65:385-92. (175) Clin Exp Immunol 1994;97:309-314. (176) J Nephrol 2008;21:53-63. (177) Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi 2002;31(4):314-7. (178) Korean J Intern Med 2005;20:40-7. (179) Nephrol Dial Transplant 2011;26:573-579. (180) J Am Soc Nephrol 2003;14:899-907. (183) Kidney Int 1997;63:182-4. (185) Translational Research 2014;163:8-18. (186) PLoS ONE 2011;6(4): e18575. (187) Nephrol Dial Transplant 1998;13:279-84. (188) Scand J Urol Nephrol 1999;4:243-7. (189) Clin Exp Nephrol 2006;10:253-26. (190) Nephrology 2002;7:131-139. (191)	Nephron 1997;77:290-7. (181) Nephrol Dial Transplant 1994;9(11):1545-52. (182) Journal of Int Med Res 1997;25:71-80. (184)
<b>FSGS</b>	J Am Soc Nephrol 1998; 9:2253-2261. (192) J Am Soc Nephrol 2003;14:899-907. (183) Nephrol Dial Transplant 2002; 17:2145-2152. (172) Nephron 2001; 87:240-248. (193) Kidney Int 2003;64:1715-1721. (195)	Clin Exp Immunol 1994;97:309-314. (176) Journal of Int Med Res 1997;25:71-80. (184) Nephrol Dial Transplant 1998;13:279-84. (188)
<b>MN</b>	Kidney Int 2000;57:147-158. (20) J Am Soc Nephrol 1998;9:2253-2261. (192) Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi 2002;31(4):314-7. (177) Nephron 1997;77:290-7. (181) J Pathol 1999;189(3):425-30. (194) Nephrol Dial Transplant 2002;17:2145-2152. (172) Nephron 2001;87:240-248. (193)	Clin Exp Immunol 1994;97:309-314. (176) Kidney Int 1997;63:182-4. (185)

U zaključku studije Ebeforsa i sur. navodi se važnost mikrodisekcije nefrona na glomerule i tubulointersticij u istraživanjima koja određuju količinu mRNA TGF- $\beta$ 1 PCRom, budući da 90% ekspresije gena TGF- $\beta$ 1 pripada tubulointersticiju (187).

## **2.8. Rezultati kliničkih istraživanja imunohistokemijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 u bubrežnim biopstatima**

U pregledu literature koja istražuje tkivnu ekspresiju TGF- $\beta$ 1 u bubrežnim biopstatima nalazimo značajnu heterogenost metodoloških pristupa i rezultata. U prvome redu, neke studije ispitivale su ekspresiju gena, druge ekspresiju TGF- $\beta$ 1-LAP, te ekspresiju TGF- $\beta$ R. Studije koje su mjerile ekspresiju TGF- $\beta$ 1 koristile su imunofluorescentnu tehniku ili imunohistokemiju s poliklonalnim ili kao što je slučaj u našem radu monoklonalnim mišjim anti-TGF- $\beta$ 1 protutijelima. Manji broj studija opisivao je korelaciju tkivne ekspresije TGF- $\beta$ 1 s biokemijskim pokazateljima bubrežne funkcije (klirens kreatinina, proteinurija), vrlo mali broj studija dizajniran je kao retrospektivno praćenje većih ili manjih kohorta bolesnika, a u tek nekoliko studija provedeno je prospektivno praćenje bolesnika.

### **2.8.1. Ekspresija TGF- $\beta$ 1 u IgA nefropatiji**

U studiji Matti i sur. tkivna glomerularna i tubularna ekspresija TGF- $\beta$ 1 bila je veća u bolesnika s IGAN u odnosu na ekspresiju u zdravih kontrola, te u pozitivnoj korelaciji s glomerularnom ekspresijom fibronektina (196), dok su Endo i sur. našli razliku samo glomerularne ekspresije (190). Grupa iz Leidena je u bubrežnim biopsijama bolesnika s različitim glomerulonefritisima, među njima i IGAN i FSGS, pronašla proporcionalan odnos ekspresije TGF- $\beta$ 1 i intersticijske fibroze (osim u bolesnika s MCD koji nisu imali jače razvijenu intersticijsku fibrozu) (197).

Skupina talijanskih autora, prezentirala je zanimljiv rad u kojem je ispitivana ekspresija TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u 65 bolesnika s IgA glomerulonefritisom raspoređenih u 3 skupine: u prvoj skupini nađena je mezangioproliferacija bez polumjeseca i bez glomeruloskleroze i intersticijske fibroze (prosječna koncentracija serumskog kreatinina bila je 88  $\mu$ mol/L i količina 24-satne proteinurije 0,6 gr), u drugoj skupini bolesnici s polumjesecima bez kroničnih promjena (prosječna koncentracija serumskog kreatinina 150  $\mu$ mol/L i količina 24-satne proteinurije 1,8 gr), te u trećoj skupini bolesnici s glomerulosklerozom i tubulointersticijskom fibrozom bez

aktivnih lezija i polumjeseca (prosječna koncentracija serumskog kreatinina bila je 229  $\mu\text{mol/L}$  i količina 24h proteinurije 2,4 gr) (198). U kontrolnoj skupini i u prvoj IGAN skupini ekspresija TGF- $\beta$ 1 bila je podjednako slaba u glomerulima i negativna u tubulointersticiju. U drugoj skupini glomerularna ekspresija TGF- $\beta$ 1 bila je intenzivna u polumjesecima, te fokalno u proksimalnim i distalnim tubulocitima. U trećoj skupini TGF- $\beta$ 1 nije bio izražen u skleroziranim glomerulima već u ostalim glomerulima i u tubulointersticiju.

U multicentričnom prospektivnom istraživanju Brabcove i suradnika 24 mjeseca praćeno je 50 bolesnika s IgA nefropatijom (180). U tkivu bubrega određivana je ekspresija mRNA TGF- $\beta$ 1 RT-PCR tehnikom i imunohistokemijski tkivna ekspresija TGF- $\beta$ 1. Nađeno je univarijatnom ( $p=0,01$ ) i multivarijatnom analizom ( $p=0,007$ ) za ekspresiju gena TGF- $\beta$ 1 statistički značajana povezanost s porastom serumskog kreatinina.

U nekoliko idućih studija dobiveni su drugačiji rezultati, odnosno nije nađena razlika intenziteta tkivne imunoekspresije TGF- $\beta$ 1 između IGAN bolesnika i kontrolnih skupina.

Ito i sur. nisu našli razliku u glomerularnoj ekspresiji između TGF- $\beta$ 1 bolesnika s IgA nefropatijom i kontrolne skupine. Nešto veća ekspresija nađena je u tubulointersticiju ali bez statističke značajnosti (199). Kim je u 42 bolesnika našao razliku u imunoekspresiji TGF- $\beta$ 1 jedino u podocitima fokalno segmentalno skleroziranih glomerula (191).

Neimir i sur. su u 30 bolesnika s IGAN ispitivali ekspresiju gena i proteina TGF- $\beta$ 1-LAP i TGF- $\beta$ 1 (200). Bolesnike su podijelili u 4 kategorije: s minimalnim histološkim promjenama, s blagom fibrozom u tubulointersticiju, zatim one sa sklerozom ili polumjesecima u glomerulu i one s uznapredovanom glomerulosklerozom i fibrozom tubulointersticija. Našli su nekoliko zaključaka: mRNA TGF- $\beta$ 1 bila je značajno više eksprimirana u glomerulima nego TGF- $\beta$ 1. Ekspresija TGF- $\beta$ 1 bila je prisutna u intersticiju ali ne i u tubulima. Ekspresija TGF- $\beta$ 1 u glomerulu bila je povećana u samo u onih bolesnika sa značajnom mezangijskom proliferacijom, a manja (jednaka kontrolnoj skupini) u skleroziranim glomerulima.

Brazilska skupina autora, prikazala je retrospektivnu studiju 62 bolesnika s IgA nefropatijom (s 24h proteinurijom većom od 1 gram) praćenih prosječno 6 godina, u kojoj je nađena tubulointersticijska ekspresija TGF- $\beta$ 1 u malog broja bolesnika, a glomerularna ekspresija gotovo da i nije zabilježena (201). Tubularna ekspresija TGF- $\beta$ 1 bila je u pozitivnoj korelaciji s proteinurijom i serumskim kreatininom na kraju praćenja, dok nije nađena povezanost s

inicijalnim vrijednostima proteinurije, serumskog kreatinina, tubulointersticijske fibroze i ishoda bolesti.

### **2.8.2. Ekspresija TGF- $\beta$ 1 u membranskoj nefropatiji**

U radu Kima i suradnika, u 12 bolesnika s MN najprije je elektronskomikroskopski (imunogold metodom) u šiljcima GBM nađena povećana gustoća kolagena tipa IV, laminina i fibronektina. Autori su predložili patogenetski model prema kojem subepitelni depoziti (imunokompleksi i komplement) u MN potiču podocyte na stvaranje TGF- $\beta$ 1 koji potom aktivira podocyte na pojačano lučenje komponenti izvanstaničnog matriksa i posljedično zadebljanje GBM (194). In situ hibridizacijom unutar GBM pronađena je povećana količina mRNA TGF- $\beta$ 1,  $\alpha$ 1 lanca kolagena tip IV, laminina i fibronektina.

U 17 MN bolesnika, Endo i sur. našli su značajno veću ekspresiju TGF- $\beta$ 1 u glomerularnim kapilarama u odnosu na kontrolnu skupinu i to jače izraženu u bolesnika s II stupnjem morfoloških promjena prema Ehrenreich-Churgu nego onima s I stupnjem (190).

Goumenos i sur. proučavali su ekspresiju mRNA TGF- $\beta$ 1 i ekspresiju TGF- $\beta$ 1 u glomerulu i tubulointersticiju, te koncentraciju TGF- $\beta$ 1 u serumu i urinu 25 bolesnika s različitim oblicima primarnih i sekundarnih glomerulonefritisa (od toga u 5 bolesnika s FSGS i 11 s MN) (172). U daljnjem tekstu prikazati ćemo rezultate za FSGS i MN skupinu. Intenzivna ekspresija TGF- $\beta$ 1 nađena je u tubulointersticiju u skupini FSGS i MN koja je odgovarala 24h proteinuriji. Nađena je pozitivna korelacija tubularne ekspresije TGF- $\beta$ 1 sa stupnjem upalne infiltracije intersticija. Isti autori našli su u svojoj drugoj studiji značajnu povezanost glomeruloskleroze s glomerularnom ekspresijom TGF- $\beta$ 1, te intersticijske fibroze s tubulointersticijskom ekspresijom TGF- $\beta$ 1, koja je korelirala i sa serumskom koncentracijom kreatinina (193).

### **2.8.3. Ekspresija TGF- $\beta$ 1 u fokalnoj segmentalnoj glomerulosklerozi**

U istraživanju Ita i suradnika, u 5 bolesnika s FSGS glomerularna ekspresija TGF- $\beta$ 1 odgovarala je ekspresiji u kontrolnih ispitanika, dok je u tubulointersticiju bila statistički

značajno veća (199). Slično je našla nizozemska skupina autora, uz to da su dodatno pokazali da je tubulointersticijska ekspresija TGF- $\beta$ 1 korelirala težini tubulointersticijske fibroze (197).

Danilewicz je sa suradnicima proveo komparativnu imunohistokemijsko-morfometrijsku analizu u 35 bolesnika s FSGS (202). Od toga 19 bolesnika je shvaćeno kao sekundarna FSGS, a njih 16 kao idiopatska FSGS. U obje podskupine bolesnika nalaz glomerularne ekspresije TGF- $\beta$ 1 bio je negativan, dok je suprotno tome u obje skupine bio fokalno pozitivan u tubulointersticiju i to više u bolesnika s primarnom FSGS.

Kim i suradnici mjerili su imunoekspresiju TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ RII, trombospondina-1, fosforiliranih Smad2/Smad3 u glomerulima 15 bolesnika s FSGS (195). U histološkom nalazu glomerule su promatrali kroz 3 histološke podskupine: uredni glomeruli, glomeruli sa segmentalnom sklerozom i glomeruli s globalnom sklerozom. Jedino u glomerulima sa segmentalnom sklerozom našli su blago do umjereno pozitivnu ekspresiju TGF- $\beta$ 1.

U jednom magistarskom radu, imunohistokemijski određivana je ekspresija TGF- $\beta$ 1 u 51 bolesnika s FSGS (nisu razlučivani primarni i sekundarni oblik) (203). Nađen je značajan intenzitet ekspresije u zdravim segmentima fokalno skleroziranih glomerula, ali ne i u područjima skleroze glomerula i intersticijske fibroze. Također je nađena pozitivna korelacija između glomerularne ekspresije TGF- $\beta$ 1 i stupnja glomeruloskleroze i tubulointersticijske fibroze. Nije zabilježena statistički značajna povezanost stupnja ekspresije TGF- $\beta$ 1 s vrijednostima 24 satne proteinurije niti serumskog kreatinina.

Goumenos i sur. u petero bolesnika s FSGS dokazali su povišenu ekspresiju TGF- $\beta$ 1 u tubulointersticiju bolesnika s FSGS, koja je korelirala veličini 24h proteinurije, te stupnju upalne infiltracije intersticija (172).

Grčka skupina autora predvođena Alexopoulosom prikazala je retrospektivno istraživanje koje je uključilo 33 bolesnika s primarnim oblikom FSGS. Bolesnici su podijeljeni u skupine klinički prezentirane nefrotskim sindromom i ne-nefrotskom proteinurijom, odnosno u skupinu koja je odgovorila na liječenje (simptomatsko, uz prednison i imunosupresiju ovisno o indikaciji) i koja je bila na liječenje rezistentna. Medijan praćenja bolesnika iznosio je 55 mjeseci. Glomerularna ekspresija TGF- $\beta$ 1 bila je višestruko veća u obje skupine bolesnika prema kontrolnoj skupini. Intersticijska ekspresija TGF- $\beta$ 1 odgovarala je razini serumskog kreatinina prilikom biopsije, te je bila izraženija u bolesnika koji nisu odgovorili na liječenje, ali bez statistički značajnog utjecaja na tijek bolesti (204).

### **3. ULOGA ENDOTELINA-1 U PATOFIZIOLOGIJI GLOMERULONEFRITISA**

#### **3.1. Uvod- otkrivanje endotelina**

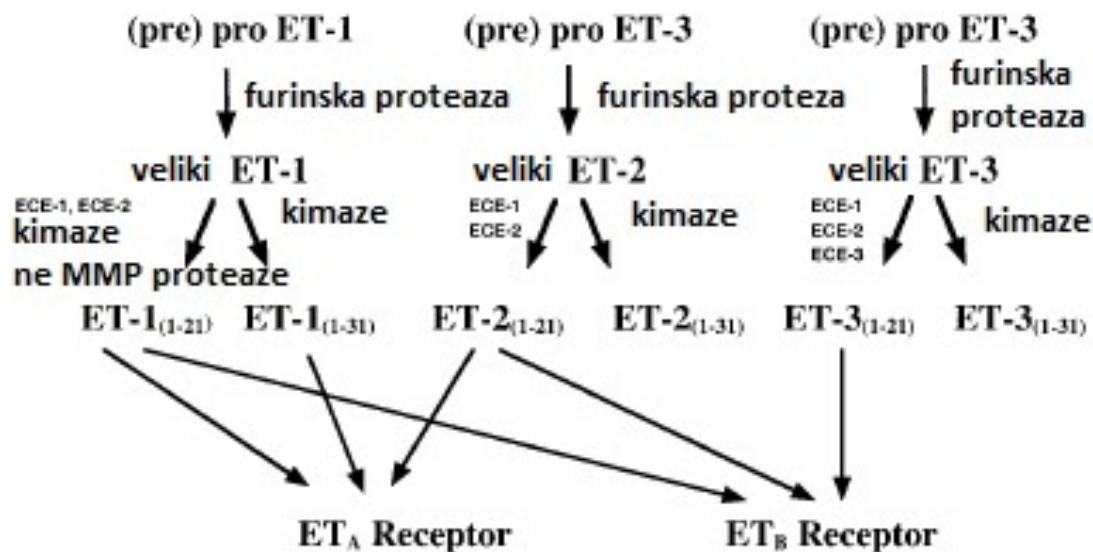
Kompleksne fiziološke uloge bubrežnog parenhima regulirane su djelovanjem brojnih cirkulirajućih (angiotenzin II, arginin vazopresin, atrijski natriuretski peptid), te lokalno sintetiziranih peptida (endotelin– ET, bradikinin) i drugih molekula (npr. eikosanoida) s parakrinom i autokrinom aktivnošću (205). Gledajući kronološki, navedeni peptidi istražuju se već nekoliko desetljeća dok je endotelin otkriven krajem 80-ih godina prošlog stoljeća. Nakon pronalaska i definiranja dušičnog oksida (NO) kao pretpostavljenog čimbenika relaksacije krvnih žila porijeklom iz endotela (endotel relaxing factor), Hickey i suradnici 1985.g., postavili su hipotezu postojanja oponirajućeg, dakle vazokonstriktornog čimbenika, koji bi djelovao suprotno NO-u u svrhu uravnoteženog reguliranja vazotonusa. Otkriće endotelina uslijedilo je nakon ekstrakcijskih pokusa dvojnomo kromatografijom supernatanta endotela aorte i plućne arterije u svinja (206). U navedenim istraživanjima prednjačili su Yanagisawa, Masaki i sur. koji 1987.g. izoliraju i opisuju peptid izrazitog vazokonstriktornog učinka koji se pojačano izlučuje hipoksijom, istežanjem ili pritiskom krvožilne stjenke (207). Kasnija istraživanja dokazala su postojanje endotelinskih izopeptida u brojnih sisavaca i kralješnjaka, a otkriveno je da ET građom nalikuje sarafotoksinu, peptidnom neurotoksinu iz slinovnica zmija otrovnica roda *Atractaspsis engaddensis*, što ukazuje na zajedničko evolucijsko porijeklo i visok stupanj strukturne konzerviranosti vazokonstriktornih efektoru (208). Značajna uloga ET kao faktora rasta pronađena je i u organogenezi fetalnog tkiva.

#### **3.2. Organizacija endotelinskog sustava**

##### **3.2.1. Sinteza i građa endotelina**

Endotelini su polipeptidni citokini s visoko potentnim vazoaktivnim (pretežito vazokonstriktornim) djelovanjem. Iako je primarno mjesto sinteze endotelina endotel krvnih žila, sinteza ET dokazana je i u drugim vrstama stanica (npr. glatke mišićne stanice vaskulature, leukociti, makrofagi, kardiomiociti, mezangijske stanice) u mnogim tkivima i organima što ukazuje na njegovu ubikvitarnu prisutnost odnosno značajnu ulogu u homeostazi organizma. Sinteza endotelina složen je proces reguliran na 3 funkcionalne razine: transkripcije, translacije (održavanje stabilnosti mRNA-ET), te posttranslacije (degradacija

peptidnih prethodnika funkcijski zrelog ET) (209). Prva i druga razina kontrolirane su nizom pro/anti transkripcijskih čimbenika od kojih mnogi djeluju tkivno specifično i o dozi ovisno (Tablica 6). U trećoj posttranslacijskoj fazi sinteze ET ključnu ulogu imaju 2 sustava enzima: furin-endopeptidaze i endotelin konvertirajući enzimi ECE (prema eng. endothelin converting enzyme, vrsta metaloproteinaza) (210). Endotelinsku polipeptidnu obitelj čine 3 izoforme: endotelin 1 (ET-1), endotelin 2 (ET-2) i endotelin 3 (ET-3). Gen za ET-1 nalazi se na 6. kromosomu (dok su geni za ET-2 i ET-3 na 1. odnosno 20. kromosomu) i kodira veliki peptid preproET (sastoji se od 203 amino kiseline), kojeg u Golgijevom aparatu cijepaju furinske endopeptidaze i tako nastaje prekursorski proET (tzv. Big-ET od 38 a.k.) i terminalna NH-/COOH- sekvenca (210, Slika 13). ECE (postoji u 7 izoformi: ECE1a ECE1b, ECE1c, ECE2, ECE3, ECE4) cijepa proET na razini Trp<sup>21</sup>-Val<sup>22</sup> čime nastaje zreli aktivni oblik molekule ET<sub>1-21</sub> (210). Kinetika navedenih enzima određuje dinamiku sinteze ET odnosno količinu njegove raspoloživosti pripadajućim receptorima, te time i jačinu njegovog biološkog djelovanja.



Slika 13. Shematski prikaz sinteze endotelina (prilagođeno prema ref. 211)

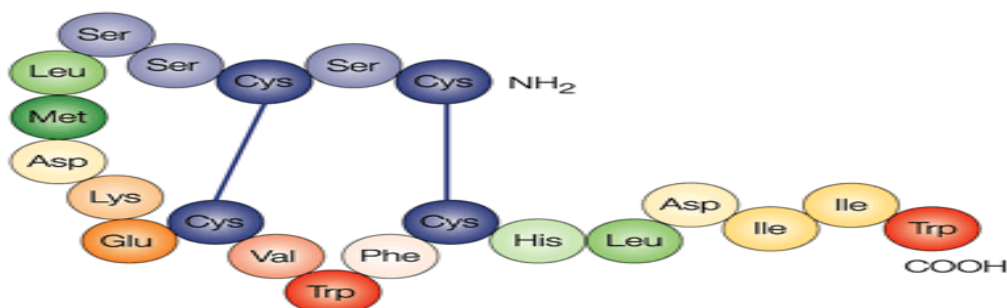
Uz ECE (koja ne djeluje specifično na ET prekursorima već npr. i u razgradnji inzulina i bradikininu), cijepanje proET mogu provoditi i kimaze, te razne nemetaloproteinaze čime nastaje veći izooblik ET<sub>1-31</sub>, manje potentnog ali prolongiranog vazotoničkog djelovanja (211). ECE zaslužne su za nastanak oko 1/3 ukupno sintetiziranog ET, dok u stvaranju preostale 2/3 sudjeluju drugi gore navedeni enzimski sustavi. ECE-1 nalazi se na membrani glatkih mišićnih stanica i djeluje u neutralnom pH, dok ECE-2 djeluje u citoplazmi endotela u

kiselom mediju. Pored opisanog konstitutivnog oblika sinteze ET (karakterističnog za sintezu ET u endotelu, glatkim mišićnim stanicama, polimorfonuklearima), eksperimentalno je dokazan i tzv. regulacijski oblik proizvodnje endotelina, za kojeg je specifično otpuštanje pohranjenog endotelina u sekretornim vezikulama neurohipofize i to u zavisnosti o osmolalnosti plazme (212). Otpuštanje ET-1 iz neurohipofize može djelovati na inhibiciju ili stimulaciju pojedinih hormona adenohipofize (212). Na složenost nastanka i organizacije ET sustava ukazuje činjenica da prostimulacijski čimbenici proizvodnje ET-1 ne moraju nužno stimulirati i proizvodnju ET-2 i ET-3, kao niti proizvodnju samog ET-1 u različitim tkivnim odjeljcima.

Tablica 6. Najvažniji induktori i inhibitori sinteze endotelina (prilagodeno ref. 211)

Induktori sinteze ET	Inhibitori sinteze ET
ATII, katekolamini, vazopresin, bradikinin	prostaciklin, NO, ANP, BNP, BMP7, cAMP/GMP
inzulin, kortizol, endotoksin, trombin, lipotoksin	Estrogen, heparin, adrenomedulin, endotelin
IL-1, TGF- $\beta$ , oxLDL, hipoksija, mehan. stres	RAAS blokatori

Endotelin-1, ET-1, je peptid (molekularne mase oko 2.5 kDa) građen od 21 aminokiseline (212). Molekula je na 2 cisteinska mjesta (Cis<sup>1</sup>-Cis<sup>15</sup> i Cis<sup>3</sup>-Cis<sup>11</sup>) povezana disulfidnim vezama koje su odgovorne za 3D strukturu u obliku  $\alpha$  uzvojnice (212). Dio molekularne strukture od 6.-10. aminokiselinske rezidue zavnut je u petlju, dok dio od 16.-21. rezidue predstavlja -COOH terminalni hidrofobni dio koji sadrži aminoindolski prsten (213, Slika 14).



Slika 14. Struktura molekule endotelina-1-shematski prikaz.

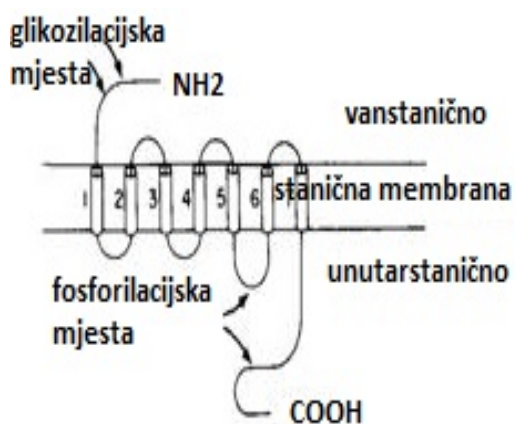


Čini se da je upravo  $-COOH$  terminalni dio molekule ključan u održavanju biološke aktivnosti jer se njegovim kemijskim oštećenjem u potpunosti gubi biološka funkcija ET. Od ET-1, ET-2 razlikuje se u dvije amino kiseline, a ET-3 u 6 aminokiselina (214). ET-1 pokazuje fiziološku ulogu u većini parenhimskih organa dok se ET-2 nalazi pretežito u bubregu i crijevima, te ET-3 najviše u središnjem živčanom sustavu. Najjače i najvažnije djelovanje na razini bubrega pokazuje ET-1.

ET-1 stvara se u korteksu i u meduli bubrega. Koncentracija ET-1 u meduli bubrega 2 puta je veća od one u korteksu (štoviše dokazano je da je bubrežna medula mjesto najveće koncentracije endotelina u cijelom organizmu). U korteksu, u fiziološkim uvjetima ET-1 luče endotelne stanice arkuatnih arterija i vena, aferentne i eferentne arteriole, glomerularne kapilare i u manjoj mjeri epitelne i mezangijske stanice (215, 216). Predominantno mjesto stvaranja ET-1 u meduli jesu tubulociti sabirnih cijevi i endotel vasa recta. Endotelin je izmjeren u višim koncentracijama u djece u odnosu na odrasle, te u crnaca u odnosu na bjelačku populaciju.

### 3.2.2. Struktura i raspored endotelinskih receptora

Endotelinski receptori pripadaju obitelji G-proteina (heterotrimer s izotipovima  $G_s, G_i, G_q, G_{\alpha 12/13}$ ) združenih receptora (217). ET receptor (ETR) kodiran je genom na 4. kromosomu, ima molekularnu težinu 40-75 kDa, strukturiran je od 7 transmembranskih domena (218, Slika 15).

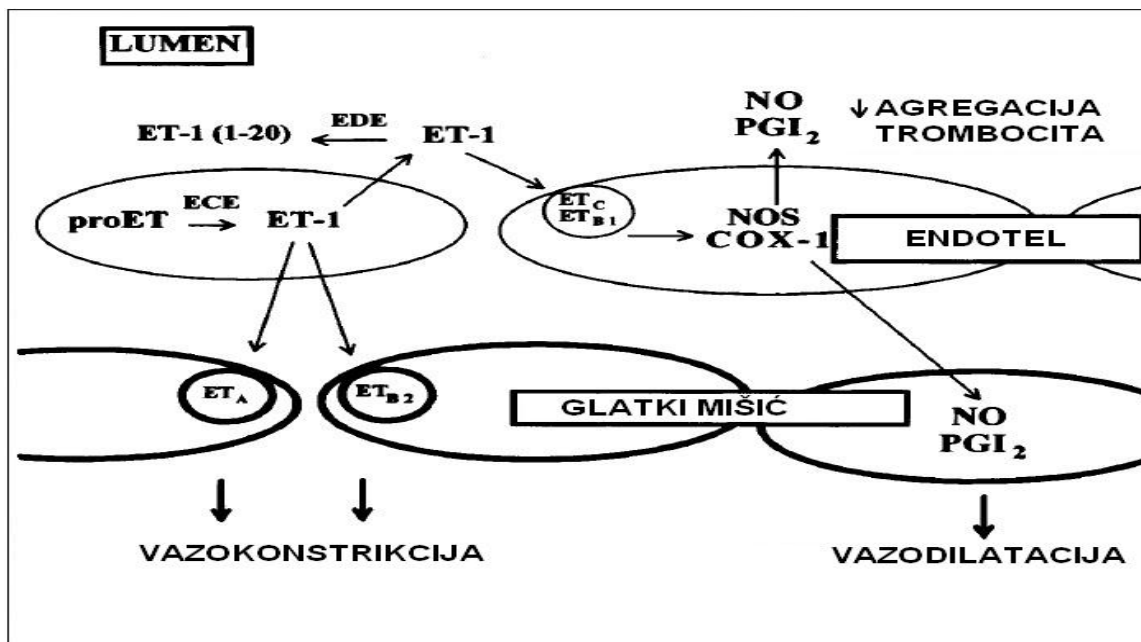


Slika 15. Struktura ET receptora (prilagođeno ref. 215)

Eksperimentalno su dokazana 3 podtipa ETR: ETR A ( $ET_A$ ), ETR B ( $ET_{RB}$ ) i ETR C ( $ET_C$ ) ili nonA/nonB čija uloga je do sada najmanje poznata (218-220). ET receptori tip A i B pokazuju veliku strukturnu sličnost uz 63%-tnu sekvencijsku homologiju. Izvanstanični NH-dio ETR mjesto je ekstenzivne glikozilacije dok je unutarstanični COOH- kraj mjesto izloženo serin-treoninskim kinazama (215).

Endotelinski receptori izraženi su dominantno na endotelu i glatkim mišićima krvnih žila u mnogim parenhimskim organima (221). Raspodjela podtipova ETR je tkivno specifična.  $ET_A$  pretežito nalazi se u srcu, plućima i mozgu te u manjoj mjeri u drugim organima, dok je  $ET_{RB}$  najviše zastupljen u mozgu, plućima i bubregu (222). Veliki broj induktora sinteze ET ujedno potencira i sintezu ETR.

Raspored ETR na stijenci krvne žile je karakterističan (Slika 16). Na glatkim mišićnim stanicama dominira prisutnost  $ET_A$  s uglavnom parakrinom aktivnošću (223).  $ET_{RB}$  (kod kojeg je naglašena autokrina aktivnost) nalazi se na endotelnim stanicama te mehanizmom otpuštanja prostaciklina i dušičnog-oksida (NO) posreduje povećano stvaranje cGMP-a u podležecim glatkim mišićnim stanicama i time vazodilataciju (224). S druge strane,  $ET_A$  inhibira iNOS što doprinosi konstrikcijском učinku. Podvrsta  $ET_{RB}$  (tzv.  $ET_{RB2}$ ) nalazi se na glatkim mišićnim stanicama krvnih žila te djeluje sinergistički s  $ET_A$  (225, Slika 16).



Slika 16. Raspored ET receptora u stijenci krvne žile (prilagođeno ref. 223)

ETR široko su rasprostranjeni u svim anatomskim slojevima bubrežnog parenhima (215, 226, 227). U kori su pretežito izraženi na mezangijskim stanicama, endotelu periglomerularnih arteriola i arkuatnih arterija, u vanjskoj meduli na epitelu proksimalnih kanalića te u unutarnjoj meduli na endotelu vasa recta (većinom  $ET_A$ ). Na intersticijskim stanicama, te u unutarnjoj meduli na razini sabirnih kanalića i dijelovima Henleove petlje dominira ekspresija  $ETR_B$ .

### 3.2.3. Biološka aktivnost i katabolizam endotelina

Biološka aktivnost ET određena je serumskom koncentracijom, lokalnom tkivnom koncentracijom ET i gustoćom pojedinih podtipova ETR. U tom smislu važno je naglasiti da ET nije pohranjen u obliku unutarstaničnih vezikula (iznimka u neurohipofizi), te da nije poznato veže li se ET-1 za plazmatske proteine. PreproET-1 ne pokazuje biološku aktivnost iako ima visoko konzerviranu biološki aktivnu sekvenciju, dok Big-ET-1 pokazuje 10% biološke aktivnosti ET-1 (215). Vezanje ET-1 za receptor je dugotrajno, do 48h (215). Afinitet  $ET_A$  prema ET-1 i ET-2 je značajniji nego prema ET-3, dok je afinitet  $ETR_B$  podjednak prema sve 3 izoforme (215). Osim u patofiziološkim uvjetima, cirkulirajući ET, uključujući periferno razgrađen Big-ET-1, ne pokazuje aktivan biološki učinak u tkivima.

Uz navedeno, postoji još nekoliko razina dokaza u prilog parakrinom djelovanju ET-1:

- u zdravih osoba koncentracija ET-1 u urinu je 6 puta viša u odnosu na serumsku koncentraciju koja nije dovoljna da izazove vazokonstrikciju per se,
- 75% ukupno sintetiziranog ET-1 usmjeruje se u stanici bazolateralno tj. kontraluminalno
- visoka konstanta disocijacije ETR ( $K_d$  100 pM) uz nisku prosječnu serumsku koncentraciju ET-1 (cca 1-2 pM),
- visoke serumske koncentracije ET-1 potrebne za aktivaciju ETR,
- intercelularna/intersticijska koncentracija ET odgovara serumskoj koncentraciji,
- kratko vrijeme poluživota ET-1,  $t_{1/2} \approx 1$  minuta,
- autoindukcija sinteze ET-1 preko  $ETR_B$  u mezangijskim stanicama (228, 229).

Razgradnja ET-1 regulirana je na 3 razine: hidrolitičkim djelovanjem neutralne endopeptidaze (tzv. EDE: endotelin degrading enzyme) na membrani endotelinih stanica i razgradnje u lizosomima (230). Nedavno je dokazano da mehanizam internalizacije kompleksa ET-1 i ETR<sub>B</sub> (koji se najvećim djelom događa u plućnoj, splanhičnoj i bubrežnoj cirkulaciji) predstavlja najvažniji način eliminacije cirkulirajućeg ET-1 (231). U tom kontekstu, bitna je i činjenica da je inhibicija ECE-1 posredovana upravo putem ETR<sub>B</sub>.

#### **3.2.4. Endotelinska signalizacija**

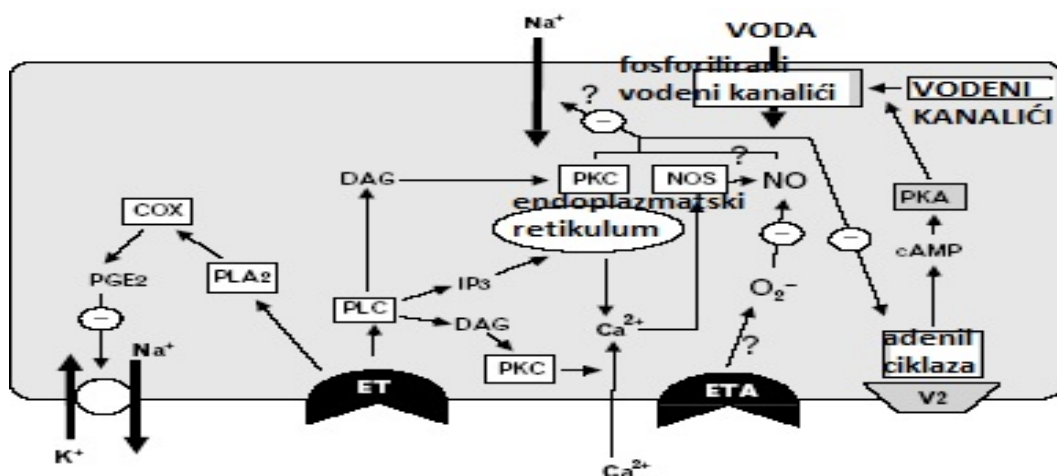
Učinke ET možemo podijeliti na kratkoročne i dugoročne. Kratkoročni učinci (regulacija vazotonusa) posredovani su putem interakcije brojnih enzimatskih kaskadnih sustava u citoplazmi stanice, dok su dugoročni (mitogeni, proliferativni, proupalni, fibrogenetski) regulirani prijenosom signala u staničnu jezgru odnosno aktivacijom transkripcijskih čimbenika. Izgleda da su dugotrajni učinci ET-1 posredovani dominantno aktivacijom ET<sub>A</sub>.

#### **3.2.5. Signalizacija na razini stanične membrane i citoplazme**

Osnova kratkoročnog djelovanja ET sustava uvjetovana je regulacijom unutarstanične koncentracije kalcija, koja ovisi o količini oslobođenog kalcija iz unutarstaničnih rezervi, te o veličini utoka izvanstaničnog kalcija. Niže koncentracije ET pospješuju ulazak izvanstaničnog kalcija u stanicu, a veće koncentracije promoviraju oslobađanje kalcija iz unutarstaničnih vezikula (232). Ulazak kalcija u stanicu događa se na membranskim kalcijevim kanalima što je naponom (voltažni kanali) odnosno receptorski regulirano.

Unutarstanično signaliziranje ET sustava odvija se putem mreže G-protein aktiviranih efektor (sekundarnih glasnika) od kojih su najvažniji fosfolipaza C, fosfolipaza D, fosfolipaza A<sub>2</sub> (Slika 17). Fosfolipaza C aktivira inozitol-1,4,5-trifosfat (IP3) koji zaposjedanjem receptora endoplazmatskog retikuluma i kalciosoma posreduje otpuštanje unutarstanično pohranjenog kalcija (233, Slika17). Aktivacija diacil-glicerola (DAG) polarizira plazmatsku membranu što pogoduje otvaranju voltažnih kalcijevih kanala (234). Zavisno o izopeptidnom subtipu ET, vrsti ETR i kombinaciji aktiviranih podtipova G proteina, ostvaruje se učinak vazokonstrikcije koji može biti farmakološki inhibiran djelovanjem blokatora kalcijevih kanala u ovisnosti o tipu dominantno aktiviranog kalcijevog kanala (232). Aktivacija protein kinaze C inhibira naveden slijed događaja inaktivacijom fosfolipaze C, te

posreduje i u realizaciji dugoročnih promitogenih učinaka, koji su rezultat aktiviranih MAPK, ERK1/2, JNK/SAPK i Src (235, 236). Aktivacijom adenilat-ciklaze u staničnoj membrani pojačava se djelovanje beta-adrenergičkog sustava i na taj način oponira vazokonstriktornom učinku. Uz aktivaciju fosfolipaze C, pokazano je, da je važna paralelna aktivacija drugih enzimatskih sustava poput fosfolipaze D i fosfolipaze A<sub>2</sub>. Aktivacijom fosfolipaze A<sub>2</sub> dolazi do razgradnje arahidonske kiseline do razine prostaglandina i tromboksana koji mogu utjecati na lokalnu hemodinamiku (237). Dodatni mehanizam uključen u unutarstanični metabolizam kalcija određen je djelovanjem endotelina na Na/K i Na/H membranske izmjenjivače (Slika 17).



Slika 17. Unutarstanična signalizacija endotelinskog sustava (prilagođeno prema ref. 238).

### 3.2.6. Signalizacija u jezgri stanice

Dosadašnja istraživanja pokazala su da ET signalizacijski sustav posreduje aktivaciju c-fos, c-jun i c-myc gena koji kodiraju odgovarajuće proteine uključene u AP-1 nuklearni transkripcijski kompleks (239). Opisan mehanizam ključan je za ET-1 posredovanu staničnu proliferaciju i proizvodnju proupalnih citokina. Ovaj proliferativni odgovor, može biti moduliran djelovanjem ATII, ADH, ANP-a i drugih hormona (240). Vrijedi i obratno, djelovanje ET-1 može pospješiti biološki učinak drugih čimbenika rasta (npr. povećanjem membranske ekspresije receptora za epidermalni čimbenik rasta- EGF).

### 3.3. Fiziološki učinci endotelina u bubregu

#### 3.3.1. Endotelin i bubrežna hemodinamika

Znanstvena istraživanja utjecaja ET-1 na lokalnu renalnu i intrarenalnu hemodinamiku, koriste dva eksperimentalna modela: model s agonistima, u kojem se lokalni bubrežni učinak ET-1 proučava iv. primjenom ezgogenog endotelina, te model temeljen na blokadi ETR. Blokatore ETR dijelimo općenito na selektivne i neselektivne, s obzirom na afinitet pojedine antagonističke supstance prema pojedinom ETR podtipu. Selektivni blokatori označuju afinitet blokatora prema  $ET_A$   $1000x > ETR_B$ , a neselektivni  $ET_A$   $10-100x > ETR_B$ , što znači da ne postoji tzv. apsolutna ili supraselektivnost. Primjer neselektivnog ETR antagonista je bosentan,  $ET_A$  selektivnog antagonista BQ123 i  $ETRB$  selektivnog antagonista BQ788. S obzirom na dominantno auto/parakrinu aktivnost bubrežnog endotelinskog sustava, ispitivanja uloge ET-1 u bubrežnoj fiziologiji i patofiziologiji s antagonistima ETR smatraju se primjerenijima u odnosu na studije s agonistima izvanstaničnog ET-1.

Endotelin je najjači vazokonstriktorni peptid, 30 puta potentniji u odnosu na ATII i 50 puta u usporedbi s noradrenalinom (241). U cjelokupnom cirkulacijskom sustavu, bubrežna vaskulatura pokazuje najveću senzitivnost i reaktibilnost za ET-1, dok je unutarnji dio bubrežne srži (medula) mjesto najveće koncentracije ET-1 u cijelom organizmu (242, 243). Iako postoje mnoge sličnosti u odgovoru sistemske cirkulacije na ET-1, lokalno bubrežno djelovanje ET-1 ima svoje osobitosti, koje uvelike ovisi o rasporedu ETR duž nefrona i učincima aktivacije pojedinih podtipova ETR (244, Tablica 7 i 8).

Tablica 7. Sinteza ET-1 i raspored ETR u pojedinim dijelovima bubrežne medule (prilagođeno prema ref. 238).

TIP STANICE	SINTEZA ET-1	PRISUTNOST ETR	PODTIP
SABIRNI TUBUL	++++	++++	B>>A
ZADEBLJANI UZLAZNI KANALIĆ	++	++	B
ENDOTEL	++	++	B
GLATKI MIŠIĆ	-	++	A
SILAZNI TANKI KANALIĆ	-	+	?
UZLAZNI TANKI KANALIĆ	-	-	-
MEDULARNI INTERSTICIJ	-	++	A i B

Tablica 8. Fiziološke i patofiziološke funkcije aktiviranih endotelinskih receptora u bubregu (prilagođeno prema ref. 244)

ET <sub>A</sub>	ET <sub>B</sub>
Bubrežna kortikalna vazokonstrikcija	Bubrežna medularna vazodilatacija
Konstrikcija aferentne arteriole	Konstrikcija aferentne arteriole
Dilatacija eferentne arteriole	Dilatacija eferentne arteriole
Kontrakcija i proliferacija MS	Natriureza
Akumulacija izvanstaničnog matriksa	Kontrakcija mezangijskih stanica
Fibroza intersticija	Oslobađanje NO i PGE2

ET-1 uzrokuje porast bubrežne vaskularne rezistencije i smanjuje bubrežni protok krvi odnosno glomerularnu filtraciju (Tablica 8) što je posredovano uglavnom ET<sub>A</sub>, dok se istovremeno povećava medularna cirkulacija posredovana ETR<sub>B</sub>. Ovaj opći učinak ostvaruje se kortikalnom renalnom vazokonstrikcijom i kontrakcijom mezangijskih stanica, odnosno dilatacijom medularne vaskulature. Dakle, načelno vazokonstrikcija jača je u kortikalnoj cirkulaciji (interlobularna, arkuatna, glomerularna) i to jače u eferentnoj nego u aferentnoj glomerularnoj arterioli (245). Pretpostavlja se da na pojačan protok krvi osjetljivi endotelni receptori vlačnog stresa još nejasnim mehanizmima potiču pojačanu ekspresiju gena za endotelin (246). Uz to, opisuje se i tubuloglomerularni povratni mehanizam, prema kojem, povećan dotok NaCl u maculu densu izaziva pojačano lučenje endotelina koji parakrino smanjuje jukstaglomerularnu sintezu renina, a time i angiotenzina II te aldosterona, zbog čega se smanjuje tubularna reapsorpcija Na, odnosno povećava njegova ekskrecija. Dominantan hemodinamski učinak ET-1 u području bubrežne medule je vazodilatacijski uz pojačani protok krvi i smanjenje sistemnog krvnog tlaka (247).

### 3.3.2. Učinak endotelina na volumen tjelesnih tekućina- metabolizam Na i vode

Regulacija Na i vode ET-om je višestruka, složena i prvenstveno ovisi o količini ET, te rasporedu ETR u području medule (Tablica 7). Ukupno gledajući, ETR<sub>B</sub> je 2 puta više prisutan u bubrežnom parenhimu u odnosu na ET<sub>A</sub> i to pogotovo u meduli bubrega.

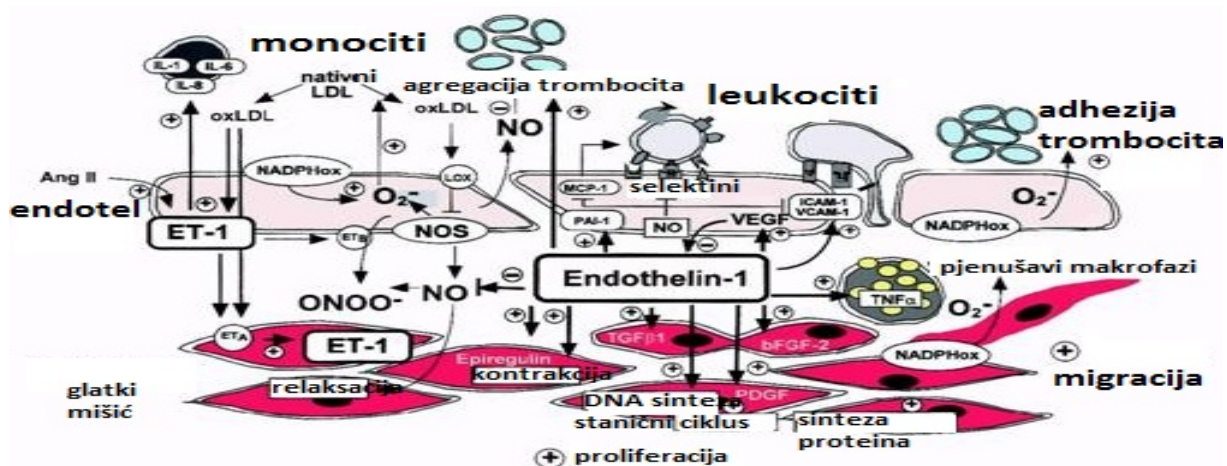
U fiziološkim (pikomolarnim) koncentracijama ET-1 djeluje natriuretski i diuretski prvenstveno inhibicijom receptora za ADH (u dilucijskom segmentu nefrona tj. još preciznije u sabirnim kanalićima) ali također i inhibicijom Cl kanala u debelom uzlaznom kraku Henleove petlje, te Na kanala (Na/K ATPaza) u medularnom djelu distalnog kanalića i sabirnoj cijevi (ovaj učinak posredovan je prostaglandinima i oponiran učinkom NSAR) (248, Slika 17). Navedeni učinci ostvaruju se putem  $ET_{RB}$  (Tablica 8). Poticaj povećanoj medularnoj sintezi ET-1 jesu povećani osmolalitet medularnog područja, odnosno povišen tubularni protok glomerularnog ultrafiltrata i protok krvi u vasa recta (248). Dodatni mehanizam natriuretskog učinka endotelina je njegova izravna stimulacija ANP-a u miocitima srčanih pretkomora. U patološkim stanjima, vrlo visoke (nanomolarne) cirkulirajuće koncentracije ET-1 pospješuju obrnuto djelovanje, što znači da izravnim povećanjem reapsorpcije NaCl u proksimalnim kanalićima, kao i poticanjem lučenja angiotenzina II i aldosterona zadržavaju Na i vodu u organizmu. Zaključno, povećano opterećenje bubrega vodom i soli povećava sintezu ET-1 koji pospješuje njihovu ekskreciju iz organizma, dok suprotno, stanje dehidracije inhibira izlučivanje ET-1 što indirektno potiče zadržavanje soli i vode u organizmu (248).

### **3.4. Uloga ET-1 u patofiziologiji glomerularne bolesti**

#### **3.4.1. ET-1 i endotelna disfunkcija**

Važan patološki učinak ET-1 očituje se propagacijom endotelne disfunkcije koja predstavlja patofiziološku podlogu razvoja ateroskleroze odnosno krutosti arterija i povećane periferne vaskularne rezistencije (211, Slika 18). Glavno obilježje endotelne disfunkcije je oksidativni stres sa slobodnim kisikovim radikalima (osobito vodikov peroksid) kao glavnim posrednicima, formiranim posredstvom obrnuto proporcionalnih koncentracija ET-1 i NO (211, 249). Istraživanja su dokazala da selektivni blokatori  $ET_A$  povećavaju proizvodnju NO i na taj način smanjuju upalu i aterosklerozu (211).





Slika 18. Uloga endotelina u patofiziologiji endotelne disfunkcije (prilagođeno prema ref. 211)

### 3.4.2. ET-1 i glomerularna ozljeda

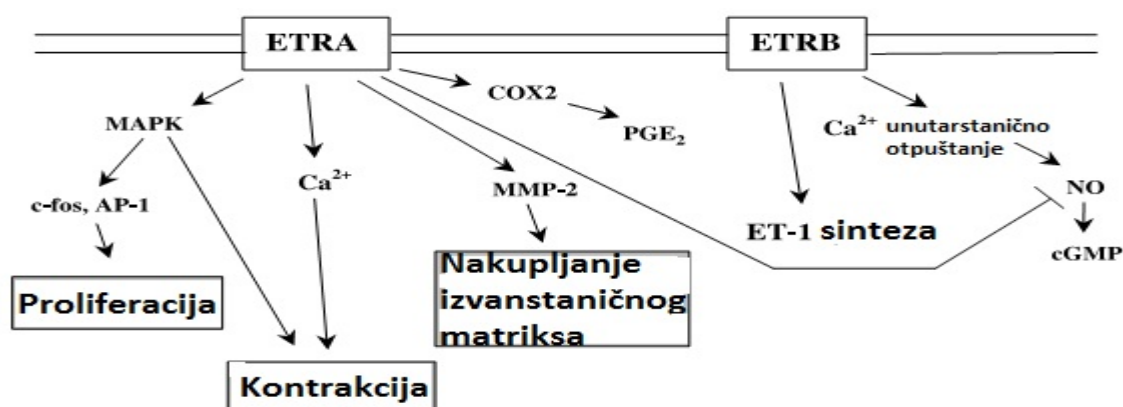
Patofiziološki učinak ET-1 u bubregu može biti posredovan tlačnim i netlačnim (imunomodulatornim) učincima na glomerul i tubulointersticij.

Na razini glomerularnih kapilara, ET-1 putem  $ET_A$  povećava hidrostatski tlak (vazokonstrikcija eferentne>aferentne arteriole) i mijenja permeabilnost GBM, što rezultira povišenom filtracijskom frakcijom proteina (250). Pored vazokonstrikcije, ET-1 povećava ultrafiltracijski tlak učinkom (kontrakcija/prolifracija) na mezangijske stanice (251, 252).

Za ET-1 pokazano je u brojnim animalnim i humanim studijama da izravnim (preko svojih receptora uglavnom  $ET_A$ ) i neizravnim djelovanjem (poticanjem sinteze drugih proupalnih/mitogenih čimbenika i njihovih receptora u mezangijskim stanicama) potiče kontrakciju, proliferaciju, aktivaciju mezangijskih stanica (253-259, Tablica 9, Slika 19). Povišena lokalna razina ET-1 također povećava mezangijsku proizvodnju upalnih citokina poput TNF (aktivacijom NF- $\kappa$ B), te kemotaksijskih posrednika ICAM-1 i VCAM-1 čime se značajno perpetuira započeta upala i proliferacija u glomerulu (256, 257). Preko TNF (koji djeluje na COX-2), ET-1 može inhibirati apoptozu mezangijskih stanica što rezultira njihovom hiperplazijom (260, 261).

Tablica 9. Djelovanje ET-1 na otpuštanje solubilnih čimbenika iz mezangijskih stanica (prilagođeno ref. 250)

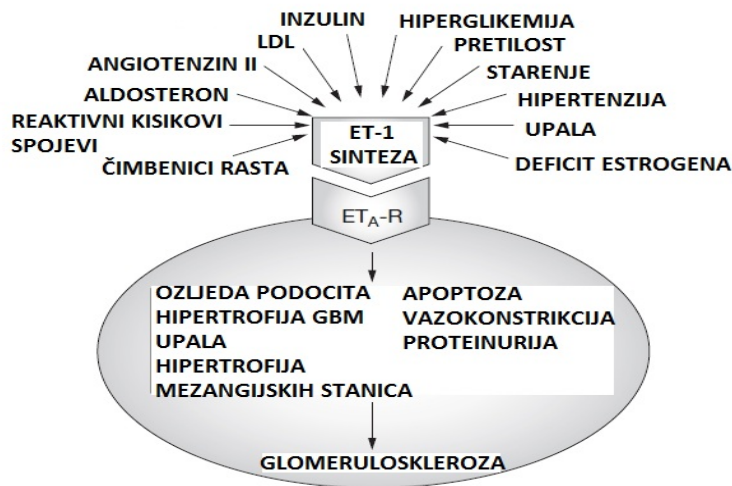
POTIČE OTPUŠTANJE	INHIBIRA OTPUŠTANJE
ET-1	MATRIKS METALOPROTEINAZA 2 (MMP-2)
ČIMBENIK NEKROZE TUMOTA (TNF)	DUŠIČNI OKSID NO
ČIMBENIK PORIJEKLA IZ TROMBOCITA (PDGF)	
TROMBOKSAN E2	
PROSTAGLANDINI	
INHIBITOR AKTIVATORA PLAZMINOGENA (PAI)	
FIBRONEKTIN	
TIP IV KOLAGENA	
TIP I KOLAGENA	
NO	
OSTEOPONTIN	



Slika 19. Patofiziološki učinci stimulacije ETR<sub>A</sub> na mezangijskim stanicama (prilagođeno prema ref. 250)

Ekspanzija glomerularnog i tubulointersticijskog izvanstaničnog matriksa posredovana je dvostrukim mehanizmom. Prvi podrazumijeva pojačanu sintezu komponenti izvanstaničnog matriksa (fibronektin, laminin, kolagen tip I i IV, proteoglikani), a drugi zakočenom razgradnjom istih komponenti (pojačanom sintezom PAI-1 i TIMP-2) (258, 262). U izvanstaničnom matriksu ET-1 pojačava ekspresiju integrina (receptor na mezangijskim stanicama za kolagen i laminin- $\alpha_1\beta_1$ ) važnih za akumulaciju i remodeliranje kolagenih vlakana u čvorove vezivnog tkiva koji su molekularni ekvivalent glomeruloskleroze (263).

Sljedeći involvirani mehanizam u razvoju glomerularne ozljede oštećenje je GBM. Prema Kallauriu, ET-1 stvoren i otpušten iz hipertenzivno i upalno oštećenog endotela glomerularnih kapilara djeluje na ETR (uglavnom ETR<sub>A</sub>) na podocitima (264). Uslijed saturacije podocita s ET-1 nastupa disrupcija aktinskog citoskeleta, a zatim i oštećenje pukotinaste membrane gubitkom nefrina (aktivacijom Rho i IP3 kinaza), što zajedno dovodi do gubitka filtracijske barijere i izlaganja podocita velikoj količini filtriranih proteina (265). Opterećenje podocita proteinima, aktivira njihov metabolizam uz sintezu izvanstaničnog matriksa s rezultatom zadebljanja GBM i razvoja glomeruloskleroze (266-268, Slika 20). Nasuprot patološkim učincima aktivacije ETR<sub>A</sub>, aktivacija ETR<sub>B</sub> može djelovati protektivno poništavanjem učinaka aktivacije ETR<sub>A</sub> (269).



Slika 20. Patofiziološki razvoj glomeruloskleroze posredovan spregom ET-1 s ET<sub>A</sub> (prilagođeno prema ref. 265)

### 3.4.3. ET-1 i ozljeda tubulointersticija

Eksperimentalno je u bubrežnim mikrodisekatima i kulturama tubularnih epitelnih stanica dokazana povećana proizvodnja ET-1 u epitelu proksimalnih kanalića izloženih značajnim količinama proteina (270, 271). Kontraluminalno lučenje ET-1 u intersticij uzrokuje umnožavanje i sintetsku aktivnost fibroblasta (proizvodnja izvanstaničnog matriksa koja značajno doprinosi fibrozi tubulointersticija) uz sekreciju kemotaksijskih citokina i privlačenje upalnih stanica (osobito monocita) (272). Doplavljeni ET-1 iz glomerularne mikrocirkulacije uzrokuje konstrikciju serijski spojenih peritubularnih kapilara (koje su

pojačano propusne preegzistentnom upalnom ozljedom), sa posljedičnom hipoperfuzijom i hipoksijom energetske zahtjevnih tubulocita. Hipoksijom (jedan od najjačih induktora sinteze ET-1) potaknuta proizvodnja ET-1 u tubulocitima nastavlja proupalni "circulus vitiosus". I u ovom odjeljku nefrona, glavna patogenetskih događaja izvršava se putem ET<sub>A</sub>, no postoje radovi koji upućuju na moguće proupalno sudjelovanje i ETR<sub>B</sub> (273).

Kao i u životinjskim eksperimentalnim modelima, ekstenzivno lučenje ET-1 i TGF-β1 pokazano je na izolatima humanih proksimalnih tubulocita izloženih mediju hipersaturiranom albuminima, transferinom i imunoglobulinima (274). Retencija apsorbiranih proteina u tubulocitima oštećuje prekapacitirane lizosome, uz posljedični nastanak slobodnih kisikovih radikala (unutarstaničnih drugih glasnika u kaskadi aktivacije nuklearnih promotora proupalnih citokina) posredovan aktivacijom ETR (275, 276).

### **3.5. Eksperimentalni dokazi patogenetske uloge ET-1 u animalnim modelima GN**

Rezultati predkliničkih istraživanja, na animalnim modelima in vivo te mikrodisekatima nefrona i homogenatima bubrežnog tkiva, pokazali su pojačanu ekspresiju ET-1 i ETR u modelima puromicin inducirane glomeruloskleroze, Heymanova nefritisa i drugim induciranim glomerulopatijama (277-279).

Osobito važne i nove spoznaje dobivene su u pokusima s transgeničnim životinjama, te tzv. studijama isključenja (knock-out) pojedinih gena.

Hoher i sur. pokazali su da transgenični miševi s humanim genom za ET-1 razvijaju glomerulosklozu i tubulointersticijsku fibrozu uz insuficijenciju bubrežne funkcije (280). Istovjetan patohistološki ishod potvrđen je još jednom studijom s transgeničnim miševima koju su izveli Schwarz i sur. U njoj se obrazlaže kako se u miševa s humanim genom za ET-1, nije razvila samo pojačana sinteza točno određenih komponenti izvanstaničnog matriksa, npr. laminina i kolagena tip I, nego je s druge strane čak i smanjena proizvodnja drugih komponenti kao što je kolagen tip III (281). Ovakvi rezultati upućivali su na zaključak da u nastajanju intersticijske fibroze nije bitna samo količina nego i izmijenjeni sastav pojedinih komponenti međustanične tvari.

U „renal-mass reduction“ modelu (morfološki odgovara histologiji hipertenzivne nefropatije u ljudi), pokazan je prostorno-vremenski slijed ekspresije gena za ET-1 gdje je ekspresija ET-1 najprije zabilježena na razini tubula (14. dan od operacije), a tek nakon 28 dana ekspresija ET-1 bila je nađena i u glomerulima ali uz još uvijek slabiji intenzitet u odnosu na tubule (282).

Patogenetska uloga ET-1 u brojnim oblicima glomerulonefritisa, dokazana je primjenom ACE/ECE inhibitora i selektivnih/neselektivnih blokatora ETR s učinkom smanjenja ekspresije mRNA ET-1, koncentracije ET-1 u krvi i mokraći, kao i inhibicije glomeruloskleroze i fibroze intersticija, te smanjenja serumskog kreatinina i proteinurije u eksperimentalnih životinja (283- 289).

Studija Benignia među prvima 1993. godine ukazala je da se primjenom ET<sub>A</sub> antagonista može postići smanjenje hipertenzije, proteinurije, te zaustavljanje fibroze i razine imunoekspresije ET-1 u glomerulima životinja s eksperimentalno izazvanom glomerulosklerozom (290).

S obzirom na oštećenje podocita kao glavni patogenetski događaj u podocitopatijama, u literaturi je zanimljivo opisan mehanizma prilagodbe podocita na hidrostatski, upalni, metabolički i toksični stres. Radi se o mehanizmu autofagije, dokazanom u mišjim animalnim modelima upalne ozljede glomerula, prema kojemu oštećeni proteini i organele unutar stanice bivaju razgrađeni u lizosomima i zamijenjeni novim funkcionalnim molekulama (291). Djelovanjem ET-1 dolazi do poremećaja autofagije, čime nastupa apoptoza podocita. Primjena selektivnog blokatora ET<sub>A</sub> darusentana promovirala je repopulaciju podocita (hipotetski iz regrutiranih lokalnih parijetalnih epitelnih stanica kao intrinzičnih progenitorskih stanica) i endotela sklerotičnih glomerula (predmnijevani mehanizam je neoangiogeneza posredovana s VEGF i NO) (265), te posljedično involucija mezangijskog matriksa, normalizacija debljine hipertrofične GBM, nestanak vakuola u podocitima, te pad proteinurije (292).

### 3.6. Utjecaj ET-1 na razvoj glomerulonefritisa u ljudi

Utjecaj ET-1 proučavan je u različitim oblicima primarnih i sekundarnih GN u ljudi, kvantificiranjem razine ET-1 u krvi i urinu (uglavnom radioimunoesejima, ELISA), te određivanjem tkivne ekspresije u bubrežnom parenhimu (imunohistokemijski, indirektnom imunofluorescencijom, in situ hibridizacijom). Kao što je poznato  $t_{1/2}$  ET-1 je vrlo kratak i iznosi svega 60 sekundi, a serumska koncentracija ET-1 ovisna je o dobi i fizičkoj aktivnosti, što utječe na nekonzistentnost rezultata studija koje proučavaju utjecaj serumske vrijednosti ET-1 na tijek GN. Prednost imunohistokemijskog određivanja tkivne ekspresije ET-1 prema određivanju koncentracije ET-1 u tekućim medijima seruma i mokraće, svakako je uvid u raspored i intenzitet ekspresije ET-1 u mezangiju, kapilarama, tubulointerciciju.

Istraživanja čeških autora na 122 bolesnika s IgA nefropatijom pokazala su da je polimorfizam gena za ET-1 (promjena na pojedinačnom nukleotidu GG4A) povezan sa učestalošću IgA nefropatije (293).

Nakamura i sur. ispitivali su ekspresiju mRNA ET-1 u monocitima izoliranim iz cirkulacije 40 bolesnika s IGAN, još 40 bolesnika s drugim oblicima GN, 10 bolesnika s primarnom hipertenzijom, te u 30 zdravih kontrolnih ispitanika. Jedino u skupini s IGAN nađena je povišena ekspresija mRNA ET-1, koja je ujedno odgovarala količini proteinurije i težini histoloških promjena (294), a slično je pokazala još jedna studija brazilskih autora (295).

Rocattello i suradnici iz Instituta za nefrologiju u Torinu ispitivali su koncentraciju ET-1 u urinu 58 bolesnika s različitim oblicima primarnog GN, od toga u 36 bolesnika s IGAN, te 10 bolesnika s MN. Našli su da je urinarna koncentracija ET-1 bila povećana u bolesnika s IgA nefropatijom bez obzira na urednu ili oslabljenu bubrežnu funkciju, dok je u bolesnika s MN značajno veća količina ET-1 u urinu nađena samo kod onih bolesnika s visokim stupnjem meznagijske proliferacije (296).

Slične rezultate, gore navedenima, tj. povišene koncentracije ET-1 u mokraći bolesnika s različitim oblicima GN prikazani su u još nekoliko studija (297-300).

U jednom prospektivnom istraživanju, u 24 bolesnika s nefrotskim sindromom i urednom bubrežnom ekskretornom funkcijom, ispitivana je koncentraciju ET-1 u urinu bolesnika nakon postizanja remisije ili uz perzistiranje proteinurije nakon provedene 6-mjesečne imunosupresivne terapije s glukokortikosteroidima i ciklosporinom A.

Koncentracija ET-1u urinu prije liječenja bila je povišena u bolesnika s nefrotskim sindromom u odnosu na kontrolnu skupinu, štoviše, u bolesnika s perzistirajućom proteinurijom koncentracija ET-1 ostala je povišena i nakon liječenja, dok je u bolesnika u remisiji bila usporediva onoj u kontrolnoj skupini (301). Vrlo slične zaključke imali su Drakopoulos i suradnici u studiji s 37 bolesnika s različitim oblicima GN, u kojoj je nađena povećana koncentracija ET-1 u urinu u odnosu na kontrolnu skupinu, te pozitivna korelacija 24h proteinurije i količine ET-1 u urinu (302).

Horvatić je u svom magistarskom radu, u 60 bolesnika s različitim oblicima glomerulopatija (uključujući IGAN, FSGS i MN), proučavao koncentraciju ET-1 u porcijama urina i krvi, te njihovu korelaciju s biokemijskim pokazateljima bubrežne funkcije. U navedenom radu, nije pronašao značajne razlike između koncentracije ET-1 u urinu bolesnika s GN i koncentracije ET-1 u urinu kontrolnih zdravih ispitanika. Također nije nađena povezanost koncentracije ET-1 u urinu s vrijednostima arterijskog tlaka, kreatinina, klirensa kreatinina i proteinurije (303). Chu i Wolf u svojim istraživanjima također nisu našli značajne razlike koncentracije ET-1 u urinu bolesnika s različitim oblicima glomerulonefritisa i u urinu ispitanika kontrolne skupine (304, 305).

### **3.7. Rezultati kliničkih istraživanja imunohistokemijske ekspresije ET-1 u bubrežnim biopsijama**

#### **3.7.1. Ekspresija ET-1 u IgA nefropatiji**

U studiji Zanatte i sur. ispitivana je tkivna ekspresija ET-1 i ETR<sub>A</sub> u 13 bolesnika s dijabetičkom nefropatijom, te u 10 bolesnika s IGAN i u 10 kontrola dobivenih nefrektomijom zdravih segmenata bubrežnih tumora. Za ekspresije oba proteina pokazali su značajan pozitivitet u glomerularnom i peritubularnom endotelu, a u tubularnom epitelu samo za ETR<sub>A</sub>, u odnosu na ekspresiju u tkivu kontrolnih ispitanika. Stupanj ekspresije odgovarao je količini proteinurije, ali ne i procijenjenoj glomerularnoj filtraciji (306).

U talijanskoj studiji Rastaldia i sur., u kontrolnoj i skupini s histološki blagim oblikom IGAN (histološki definirana s nalazom bez polumjeseca, glomeruloskleroze i tubulointersticijske fibroze) ekspresija ET-1 bila je tek naznačena u endotelu kapilara, a negativna i u

glomerulima i u tubulointerciciju. U skupini IGAN s polumjesecima, a bez kroničnih promjena, ET-1 bio je gotovo negativan u glomerulima, a tek blago pozitivan u tubulima. U skupini s razvijenim kroničnim promjenama bez polumjeseca, ET-1 u glomerulima je bio blago pozitivan, a umjereno do jako u tubulointerciciju (198).

Lehrke i sur. ispitali su bubrežnu imunoekspresiju ET-1 i ETR<sub>B</sub> u 16 bolesnika s IGAN (307). Imunoekspresija ET-1 bila je u bolesnika veća nego u kontrolnih ispitanika i to više u tubulima nego u glomerulima, a među bolesnicima bila je viša kod bolesnika s većom proteinurijom, štoviše veličina proteinurije i stupanj tubularne ekspresije ET-1 bili su statistički značajno povezani.

U pretraživanju PubMed baze podataka nisu nađena prospektivna istraživanja utjecaja ekspresije ET-1 na tijek primarne IgA nefropatije.

### **3.7.2. Ekspresija ET-1 u membranskoj nefropatiji**

Pregledom literature nađen je mali broj radova s opisom imunohistokemijske ekspresije ET-1 u primarnoj membranskoj nefropatiji, a također nedostaju podaci retrospektivnih i prospektivnih studija uloge ekspresije ET-1 na tijek bolesti.

Lerhke je u 4 bolesnika s MN pokazao da je ekspresija ET-1 u tubularnim epitelnim stanicama veća u onih s 24h proteinurijom > 2gr u odnosu na bolesnike s manjom proteinurijom. Bolesnici s ACE blokatorima imali su manju ekspresiju u odnosu na bolesnike bez navedene RAAS blokade (307).

Vrlo interesantan rad prikazala je grčka skupina autora predvođena Vlachoannisom (301). Oni su proveli prospektivno istraživanje u 24 bolesnika s nefrotskim sindromom i urednom bubrežnom ekskretornom funkcijom, opisujući tkivnu ekspresiju ET-1 u bubrežnim biopstatima nakon postizanja remisije ili uz perzistiranje proteinurije nakon provedene 6-mjesečne imunosupresivne terapije s glukokortikosteroidima i ciklosporinom A. ET-1 u tkivu bubrega bio je nađen u citoplazmi glomerularnog endotela u bolesnika s nefrotskim sindromom i u kontrolnoj skupini (nefrektomirani zbog hidronefroma), a u citoplazmi tubulocita samo u bolesnika s nefrotskim sindromom.



### **3.7.3. Ekspresija ET-1 u fokalnoj segmentalnoj glomerulosklerozi**

Japanska grupa autora ispitala je imunoekspresiju ET-1 u bubrežnim biopatima trudnica s preeklampsijom poslije poroda, te u 10 bolesnica s nefrotskim sindromom (s bolesti minimalnih promjena, IGAN, FSGS, MN) i kontrolne grupe (zdravi segmenti nefrektomiranih bubrega). Autori su našli blagi pozitivitet duž glomerularnog klupka u kontrolnoj skupini, negativan nalaz u žena s anamnezom preeklampsije (neke od njih imale su poznatu glomerularnu bolest prije trudnoće). U nalazu skupine s nefrotskim sindromom, našli ju jaku ekspresiju ET-1 u glomerulima, te arterijama i arteriolama, a samo diskretnu ekspresiju u tubulima koja se nije razlikovala od one u kontrolnoj skupini (308).

U pretraživanju literature nisu nađene retrospektivne niti prospektivne studije s praćenjem bubrežne ekspresije ET-1 na tijek FSGS.

## **4. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

### **4.1. Hipoteza istraživanja**

Stupanj tkivne ekspresije pretvorbenog čimbenika rasta beta-1 (TGF- $\beta$ 1) i endotelina-1 (ET-1) u bubrežnim biopatima prediktor je progresije primarnih glomerulonefritisa.

### **4.2. Primarni ciljevi:**

- određivanje stupnja tkivne ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bubrežnom parenhimu bolesnika s dokazanim sljedećim oblicima primarnog glomerulonefritisa: IgA glomerulonefritis (IGAN), fokalna segmentalna glomeruloskleroza (FSGS), membranska nefropatija (MN),
- ispitivanje razlike u stupnju ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 između IGAN, FSGS, MN i svake pojedine skupine u odnosu na kontrolnu skupinu,
- ispitivanje povezanosti stupnja ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bubrežnom biopatu prilikom postavljanja dijagnoze s inicijalnim i kontrolnim (nakon godine dana praćenja) vrijednostima procijenjene glomerularne filtracije (određene MDRD formulom), te 24h proteinurije (određene Biuret testom).

### **4.3. Sekundarni ciljevi:**

- uspoređivanje razine imunoreaktivnosti TGF- $\beta$ 1 i ET-1 s demografskim i kliničkim obilježjima bolesnika (spol i dob), indeksom tjelesne mase (BMI kg/m<sup>2</sup>), visinom krvnoga tlaka, lipidogramom, hematurijom, razinom serumskih albumina i serumskog IgA (za bolesnike s IGAN)
- uspoređivanje razine imunoreaktivnosti TGF- $\beta$ 1 i ET-1 s nalazom:
  - a) svjetlosne mikroskopije,
  - b) imunofluorescentne mikroskopije,
  - c) elektronske mikroskopije.

## **5. ISPITANICI I METODE**

### **5.1. Dizajn studije**

Provedeno je prospektivno otvoreno kliničko istraživanje koje je uključilo 91 bolesnika muškog i ženskog spola u dobi od 18 do 80 godina starosti. Struktura kohorte uključivala je 3 skupine bolesnika, bolesnici s IgA nefropatijom, s FSGS-om i membranskom nefropatijom, od kojih svaka obuhvaća oko jedne trećine od ukupnog broja ispitanika.

Klinički dio istraživanja izveden je na Zavodu za nefrologiju i dijalizu, ultrazvuk bubrega i biopsija bubrega u Laboratoriju za nefrološki ultrazvuk, dok je histološka i imunohistokemijska analiza bubrežnih bioptata učinjena u Laboratoriju za imunofluorescentnu i elektronsku mikroskopiju Zavoda za patologiju i citologiju KB Dubrava.

### **5.2. Ispitanici**

#### **5.2.1. Kriteriji uključanja ispitanika:**

- dobrovoljno potpisivanje obrasca za informirani pristanak,
- osobe starije od 18 i mlađe od 80 godina,
- količina bjelančevina u 24h urinu (Biuret test) >1000 mg,
- vrijednosti procijenjene glomerularne filtracije > 30 mL/min (prema MDRD formuli).

#### **5.2.2. Kriteriji isključenja ispitanika:**

- UZV, laboratorijski, klinički, te patohistološki potvrđene sljedeće dijagnoze bubrežne bolesti: akutni i kronični tubulointersticijski nefritis, kongenitalne i stečene malformacije bubrega, hidronefroza, veziko-ureteralni refluks, maligne bolesti bubrega, kronični pijelonefritis, tuberkuloza bubrega, opstruktivna uropatija, nefropatija u trudnoći, bolesti bubrežnog presatka, bolesnici u preterminalnoj i terminalnoj fazi kroničnog bubrežnog zatajenja (uključujući male fibrozno promijenjene bubrege- stupanj fibroze intersticija veći od 75%), bubrežna kalkuloza ili apsces, tromboza ili embolija bubrežne arterije i vene;

- kliničko-patološkom korelacijom postavljena sumnja na sekundarne oblike IgA nefropatije (Tablica 10), membranske nefropatije (Tablica 11), fokalne segmentalne glomeruloskleroze (Tablica 12),
- trudnice, dojilje,
- opće loše stanje bolesnika,
- srčano zatajenje NYHA II-IV,
- pretilost (BMI > 30 kg/m<sup>2</sup>),
- šećerna bolest,
- moždani inzult sa smetnjama ponašanja ili težim organskim smetnjama, srčani infarkt s posljedičnom malignom aritmijom ili kongestivnim zatajenjem srca,
- KOPB,
- ciroza jetre, virusni hepatitis,
- refraktorne psihijatrijske bolesti, alkoholizam, konzumiranje droga,
- malignomi, provedena radioterapija i kemoterapija,
- sistemske upalne bolesti vezivnog tkiva,
- traumatska ili operativna ozljeda bubrega,
- razvoj neglomerularne bubrežne bolesti tijekom razdoblja praćenja,
- odustajanje ispitanika,
- nedostupnost, nedolazak ispitanika na kontrole,
- smrt ispitanika.

Tablica 10. Podjela IgA nefropatije (prilagođeno prema ref. 309)

<b>Primarna IGAN</b>
IgA nefropatija, Schönlein–Henoch purpura;
<b>SEKUNDARNA IGAN</b>
<b>Bolesti jetre:</b> ciroza: alkoholna, primarna bilijarna, kriptogena, virusna (hepatitis B, C); kronična šistosomijaza,
<b>Crijevne bolesti:</b> celijakija, kronični ulcerozni kolitis, Mb Crohn;
<b>Kožne bolesti:</b> dermatitis herpetiformis, psorijaza;
<b>Bolesti pluća i bronha:</b> sarkoidoza, idiopatska plućna hemosideroza, cistična fibroza, bronchiolitis obliterans;
<b>Neoplazme:</b> karcinomi: pluća, larinksa, gušterače, mycosis fungoides;
<b>Infekcije:</b> AIDS, lepra;
<b>Druge sistemske i imunološke bolesti:</b> lupus, reumatoidni artritis, krioglobulinemija, psorijatični artritis, ankilozirajući spondilitis, Mb Sjögren, Mb Behçet's; Sy Reiter, obiteljska imuna trombocitopenija, Sy Goodpasture
<b>Bolesti koje se rijetko javljaju zajedno s IGAN:</b> ANCA vaskulitis, dijabetička nefropatija, membranska nefropatija.

Tablica 11. Uzroci sekundarne membranske nefropatije (prilagođeno prema ref. 310)

<b>SUSTAVNE BOLESTI VEZIVNOG TKIVA</b>		
Sistemiški eritematozni lupus	Ankilozirajući spondilitis	Bulozni pemfigoid
Reumatoidni artritis	Sistemska skleroza	Mijastenija gravis
Miješana bolest vezivnog tkiva	Dermatomiozitis	Hashimoto tireoiditis
Sjogrenov sindrom	Temporalni arteritis	
<b>INFEKTIVNE BOLESTI</b>		
Hepatitis B,C, Filarijaza, Sifilis	Malarija	Šistosomijaza
	Lepra	Hidatioza
<b>TUMORSKE BOLESTI</b>		
<b>Karcinomi</b>	<b>Hematološke neoplazme</b>	<b>Drugi tumori</b>
Pluća, dojka, kolorektalni, jednjak, želudac	Hodgkinova bolest	Sarkomi, Mezoteliom
m. mjehur, grlić maternice, bubreg, jajnik,	NeHodgkinovi limfomi	Švanom,
prostata, ždrijelo	Kronična limfatična	Feokromocitom,
	leukemija	Neuroblastom
<b>LIJEKOVI I KEMIJSKE TVARI</b>		
Živa (organska, anorganska, elementarna)	Probenecid, Penicilamin,	Fenoprofen, Ketoprofen,
Soli zlata, Bucilamin, Kaptopril, Litij	Trimetadion, Diklofenak	Sulindak, Formaldehid
<b>OSTALO</b>		
Dermatitis herpetiformis, Crohnova bolest	Primarna bilijarna ciroza	Šećerna bolest
Multipla skleroza, Guillian-Barreov sindrom	Sarkoidoza	Srpasta anemija

Tablica 12. Najčešći uzroci, klinička slika i histološke značajke sekundarne FSGS

<b>PRIMARNO REDUCIRANA BUBREŽNA MASA</b>	<b>UREDNA BUBREŽNA MASA</b>	<b>KLINIČKA SLIKA</b>	<b>PATOHISTOLOŠKA OBILJEŽJA</b>	
oligomeganefronija unilateralna renalna ageneza renalna displazija refluksna nefropatija kirurška ablacija uznapredovala bubrežna bolest s redukcijom funkcionalnih nefrona kronična nefropatija alografta	dijabetes mellitus	proteinurija nefrotskog ili subnefrotskog ranga	glomerulomegalija	
	hipertenzija	nefrotski sindrom nije u cijelosti izražen, obično bez hipoalbuminemije, hiperkolesterolemije i edema	opsežna globalna glomeruloskleroza uz intersticijsku fibrozu i tubularnu atrofiju	
	u sklopu drugih primarnih nefropatija npr. membranske i IgA nefropatije			
	adipozitet	bubrežna insuficijencija u anamnezi	diskretni segmentalni ožiljci, najčešće perihilarno	
	Urođene srčane anomalije s cijanozom			u sklopu hipertenzivne nefroskleroze: naglašena arterioloskleroza, hijalinoza arteriola, češće subkapsularno uz formiranje ožiljaka
	anemija srpastih stanica			fokalni gubitak nožica podocita
	hipertrofija i hiperplazija podocita rjeđe nego u primarnoj FSGS			

### 5.3. Metode istraživanja

Kako bismo prepoznali i razdvojili primarne od sekundarnih oblika bolesti, koristili smo se usporedbom anamnestičkih, laboratorijskih i patohistoloških podataka.

U svih bolesnika primijenjena je sljedeća metodologija:

- detaljna anamneza i fizikalni pregled (u sklopu kojeg je određena visina arterijskog tlaka mjerenjem živinim sfingomanometrom u mirovanju u ležećem položaju bolesnika (140-160 mmHg sistolički i/ili 80-90 mmHg dijastolički I stupanj hipertenzije, 160-180 mmHg sistolički i/ili 90-100 mmHg dijastolički II stupanj, >180 mmHg sistolički i/ili >100 mmHg dijastolički III stupanj), indeks tjelesne mase kao omjer kilograma tjelesne mase i kvadrata tjelesne visine izražene u metrima),

- EKG i slikovne pretrage: RTG srca i pluća, UZV trbuha i bubrega, po potrebi CT snimanje;

- laboratorijske pretrage:

- a) biokemijske: KKS, SE, CRP, koagulogram, GUK, ureja, kreatinin, procjena glomerularne filtracije prema MDRD formuli (Modified Diet in Renal Disorders) ukupni proteini u plazmi, lipidogram (ukupni kolesterol, LDL kolesterol, HDL kolesterol), jetrene transaminaze, elektroforeza serumskih bjelančevina, TSH i hormoni štitnjače, koncentracije elektrolita u krvi i urinu, sediment urina, 24-satna proteinurija Biuret metodom, urinokultura;
- b) imunološke: pANCA, cANCA, komponente komplementa C3 i C4, anti-dsDNA, ANF, RF latex, Waaler-Rose, krioglobulini, ASO titar, markeri virusnog hepatitisa B i C;

Svi bolesnici bili su praćeni 12 mjeseci nakon biopsije bubrega. Na kontrolama praćen je tijek bolesti uz fizikalni pregled i bilježenje krvnog tlaka, serumskog kreatinina, procijenjene glomerularne filtracije, 24-satne proteinurije, te sediment urina i urinokulture.

Svim bolesnicima uključenim u studiju učinjena je perkutana iglena (Bard<sup>®</sup> Magnum<sup>®</sup> 16x16 mm, Bard Peripheral Vascular Inc., USA) biopsija bubrega pod kontrolom ultrazvuka (ALOKA ProSound SSD-3500). Rutinski uzeta su dva cilindra bubrežnog tkiva. Biopati bubrega pregledani su svjetlosnom (bojanja hemalaun eozinom, PAS, Masson Tricrom, srebrom po Jonesu), imunofluorescentnom (protutijela na IgA, IgG, IgM, C3, C4, C1q,  $\kappa$  i  $\lambda$  lake lance, fibrinogen) i elektronskom mikroskopijom, a kao vjerodostojni uzorci uzeti su u obzir oni s >6 glomerula po prerezu, za FSGS > 10 glomerula po prerezu.

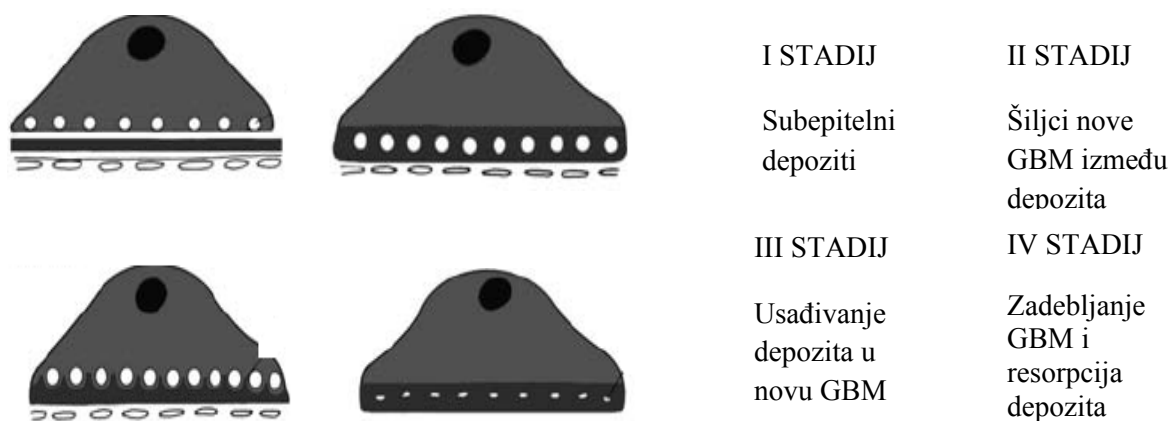
Svjetlosnom mikroskopijom definirani su: proširenost mezangija (DA/NE), indeks ozljede (izračunat omjerom zbroja segmentalno skleroziranih i globalno skleroziranih glomerula s ukupnim brojem glomerula, te zbrojem navedenog razlomka s udjelom tubulointersticijske fibroze prikazane kao cijeli broj), prisutnost upalne infiltracije kortikalnog intersticija



(DA/NE), postotni udio tubulointersticijske fibroze i atrofije tubula; stupanj hijalinoze arteriola i fibrointimalnog zadebljanja arterija (bez promjena 0, 1-25% 1, 26-50% 2, >50% 3). Za bolesnike s IGAN određivan je MEST skor prema Oxfordskoj klasifikaciji IgA nefropatije (Tablica 13), te prisutnost nekroze, polumjeseca s udjelom celularnih, fibrocelularnih i fibroznih polumjeseca; dok smo skupinu FSGS raspodijelili u podskupine prema Columbia University klasifikaciji (Tablica 14). Imunofluorescentnom mikroskopijom semikvantitativno određena je glomerularna ekspresija (0-3+) pojedinih razreda imunoglobulina, IgA, IgG, IgM i komponente komplementa C3. Elektronskom mikroskopijom definirana je prisutnost i raspored imunih depozita, a u skupini bolesnika s MN raspodijela prema Ehrenreich-Churgovoj klasifikaciji (Slika 21).

Tablica 13. Oxfordska klasifikacija IgA nefropatije (prilagođeno prema ref. 311.)

Mezangijska hipercelularnost	
<50% glomerula	MO
>50% glomerula	M1
Segmentalna glomeruloskleroza	
prisutna	S0
odsutna	S1
Endokapilarna hipercelularnost	
prisutna	E0
odsutna	E1
Tubularna atrofija/intersticijska fibroza	
0-25% korteksa	T0
26-50% korteksa	T1
>50% korteksa	T2



Slika 21. Klasifikacija membranske nefropatije po Ehrenreich-Churgu.

Tablica 14. Columbia University klasifikacija FSGS (prilagođeno prema ref. 312)

OBLIK FSGS	OBILJEŽJA BOLESTI	PROGNOZA
<b>KLASIČNA-OŽILJNA FSGS</b>	najmanje 1 glomerul sa segmentalnim povećanjem matriksa koji obliterira kapilaru	dobra
<b>PERIHILARNA FSGS</b>	perihilarna skleroza i hijalinoza >50% glomerula	često sekundarna rezistentna na liječenje
<b>TIP FSGS</b>	segmentalna lezija uz proksimalni tubul	dobra
<b>CELULARNA FSGS</b>	hipercelularnost koja okludira lumen kapilara	loša prognoza
<b>KOLAPSNA FSGS</b>	najmanje 1 glomerul sa segmentalnim ili globalnim kolapsom	loša prognoza

Imunohistokemijska analiza bubrežnog tkiva izvedena je s mišjim monoklonalnim protutijelima na TGF- $\beta$ 1 (Novocastra<sup>TM</sup> Leica Biosystems Newcastle Ltd, United Kingdom) i ET-1 (abcam IHC Paragffin protocol Cambridge Science Park, Cambridge, United Kingdom) u glomerulu, tubulointersticiju (u području bubrežne kore) i krvnim žilama bubrega.

Za imunohistokemijsku analizu parafinski preparati bubrega narezani su na debljinu 3-4  $\mu$ m te su podvrgnuti sljedećem redoslijedu obrade:

1. Ksilol 10 min,
  2. Ksilol 10 min,
  3. 100% etanol 3 min,
  4. 96% etanol 2 min,
  5. destilirana voda nekoliko minuta,
  6. 3 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ 100 ml metanola kroz 20 min držano u mraku, zatim isprano destiliranom vodom,
  7. stakalca stavljena u posudu s Target retrieval otopinom i destiliranom vodom u omjeru 25ml/250ml te grijana u mikrovalnoj pećnici na 600W 3x5min,
  8. stakalca izvađena iz mikrovalne pećnice (uz provjeru isparenosti vode) uz postupno hlađenje tijekom pola sata na 25-26 °C,
  9. stavljanje primarnog protutijela anti-TGF-β1 u omjeru s puferom (PBS) 1:10, endotelina 1 u omjeru s puferom 1:100, a negativna kontrola samo pufer, tijekom 1h na 37 °C u mraku,
  10. ispiranje puferom (PBS) uz držanje 10 min u mraku,
  11. stavljanje sekundarnog protutijela (150 μL) na koje je vezan BIOTIN i držanje 30 min u mraku,
  12. ispiranje puferom (PBS) te držanje kroz 10 min u mraku,
  13. stavljanje kompleksa STREPTOVIDIN-PEROKSIDAZA (150 μL) kroz 30 min u mraku,
  14. ispiranje u puferu (PBS) te držanje kroz 10 min u mraku,
  15. stavljanje DAB (diaminobenzidin) kromogena (pozitivna reakcija daje smeđu boju) 1kap/1ml (DAB pufer) uz držanje 5 min u mraku,
  16. ispiranje vodovodnom vodom,
  17. bojanje Hemalaun bojom tijekom 50 s,
  18. ispiranje tijekom 1min običnom vodovodnom vodom,
  19. provlačenje kroz redom 96%, 100% etanol i ksilol,
  20. pokrivanje pokrovnim stakalcem, kao medij za pokrivanje korišten Co-mount.
- Sastojak korištenog PBS pufera ( koristi se u imunohistokemiji i za IF mikroskopiju),  
u 5L destilirane vode: 33,99 g NaCl/ 9,258 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>2H<sub>2</sub>O/ pH pufera iznosi: 7,2.

Stupanj ekspresije ispitivanih upalnih citokina u bubrežnom bioptatu određen je semikvantitativno na sljedeći način:

Za glomerul:

0- bez ekspresije,

1+ slaba i mjestimična ekspresija,

2+ umjerena segmentalna ekspresija,

3+ umjerena difuzna ili jaka segmentalna ekspresija,

4+ jaka difuzna ekspresija.

Za tubulointercij:

0- bez ekspresije,

1+ ekspresija do 10% korteksa,

2+ ekspresija od 10 do 30%,

3+ ekspresija od 30 do 50%,

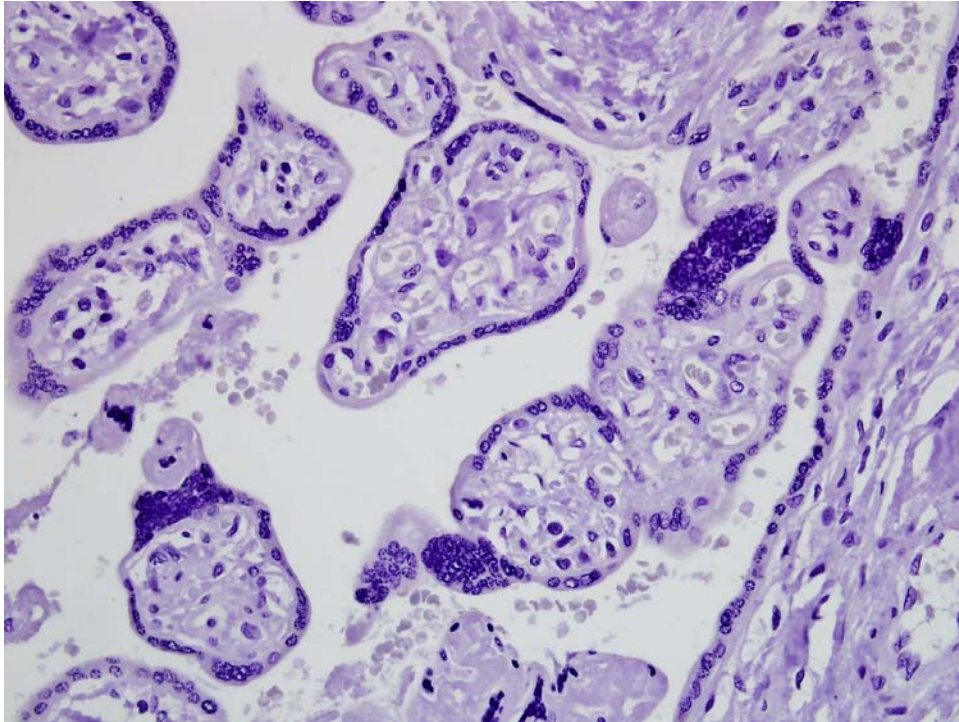
4+ ekspresija >50%.

Za imunohistokemijsku analizu u glomerulu korišten je svjetlosni mikroskop uz povećanje od 400 puta, a za analizu tubulointercija povećanje od 200 puta.

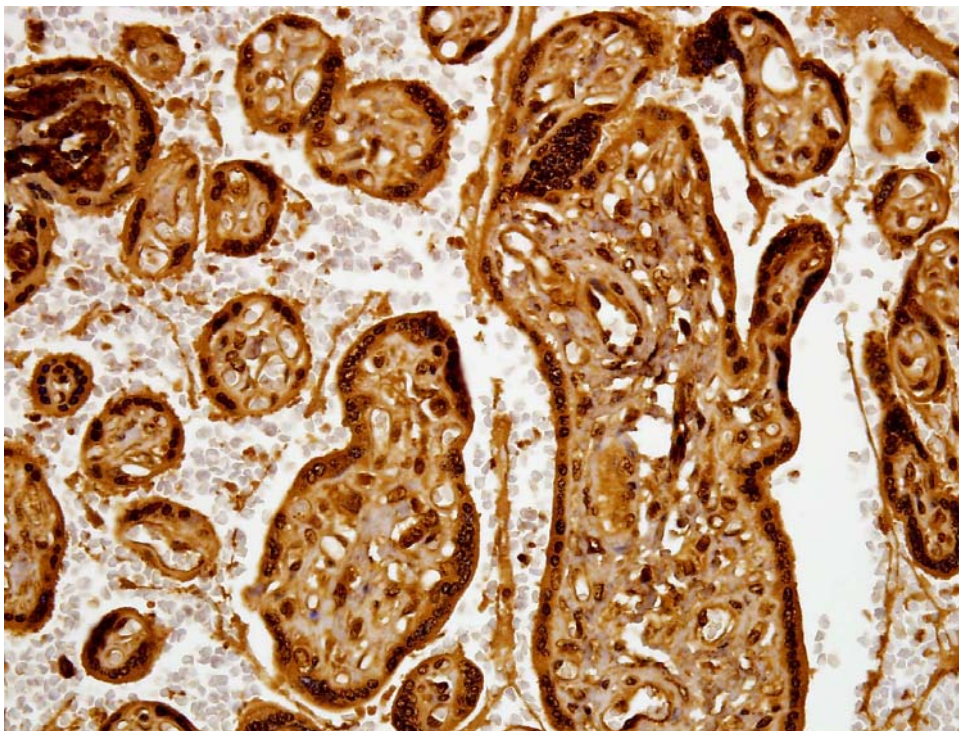
U kontrolnoj skupini koristili smo uzorke bubrežnih bioptata 18 ispitanika (koji su bioptirani zbog prolazne blage eritrociturije ili proteinurije) s urednim parenhimom na svjetlosnoj, imunofluorescentnoj i elektronskoj mikroskopiji. U literaturi se kao kontrola u većini radova koristi bubrežno tkivo nefrektomiranih bubrega (makroskopski i mikroskopski slobodni segmenti tumorskog tkiva bubrega), nadalje bubrežni parenhim transplantiranog donorskog zdravog bubrega, ili pak biopsije bubrega s dokazanim dijagnozama poput bolesti minimalnih promjena ili tankih membrana, u kojima je višekratno dokazano da su uvijek diskretne ili negativne ekspresije TGF- $\beta$ 1 (174).

U zdravom bubrežnom tkivu uobičajeno se ne vidi glomerularna ekspresija TGF- $\beta$ 1, te je kao i u tubulu moguće vidjeti samo diskretnu do blagu ekspresiju (313). Endotelin-1 je u zdravih ljudi eksprimiran u niskom stupnju u vaskulaturi i u glomerulima, dok je negativan ili tek diskretno pozitivan u tubulointerciju (314, 315).

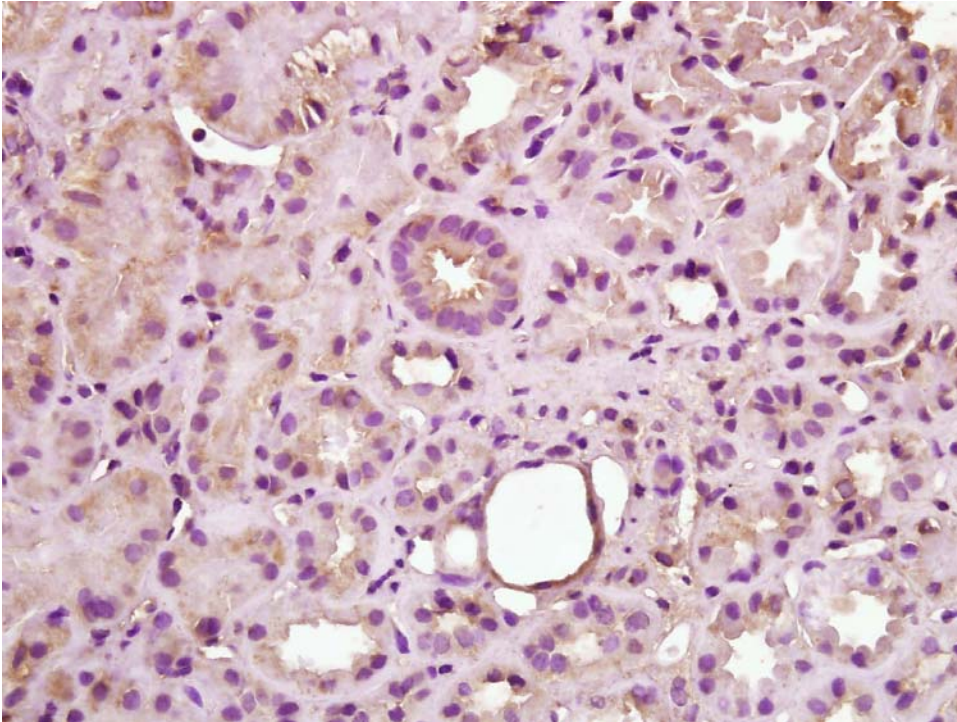
Kao pozitivnu i negativnu kontrolu u postupku imunohistokemije, koristili smo uzorke tkiva posteljice (Slika 22 i 23) dobivene iz Zavoda za patologiju Klinike za ženske bolesti i porodništvo KBC-a „Zagreb“, te slučajno odabran bubrežni bioptat (Slika 24). Tkivo posteljice koristili smo kao kontrolu jer je prema literaturi uvijek imunohistokemijski pozitivno na TGF- $\beta$  i ET-1 (316, 317, Slika 22). Slikovni primjeri izražaja TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bubrežnom parenhimu bolesnika s glomerulonefritisom prikazani su Slikama 25 i 26.



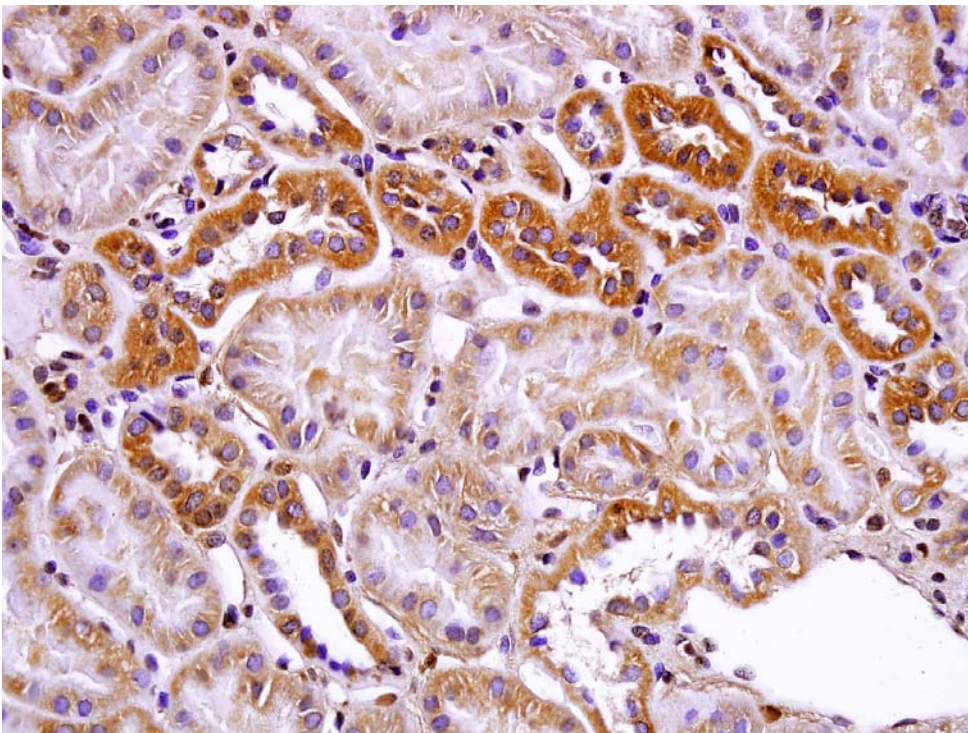
Slika 22. Tkivo posteljice bez primjene monoklalnog protutijela (negativna kontrola). Svjetlosni mikroskop, uvećanje 400x



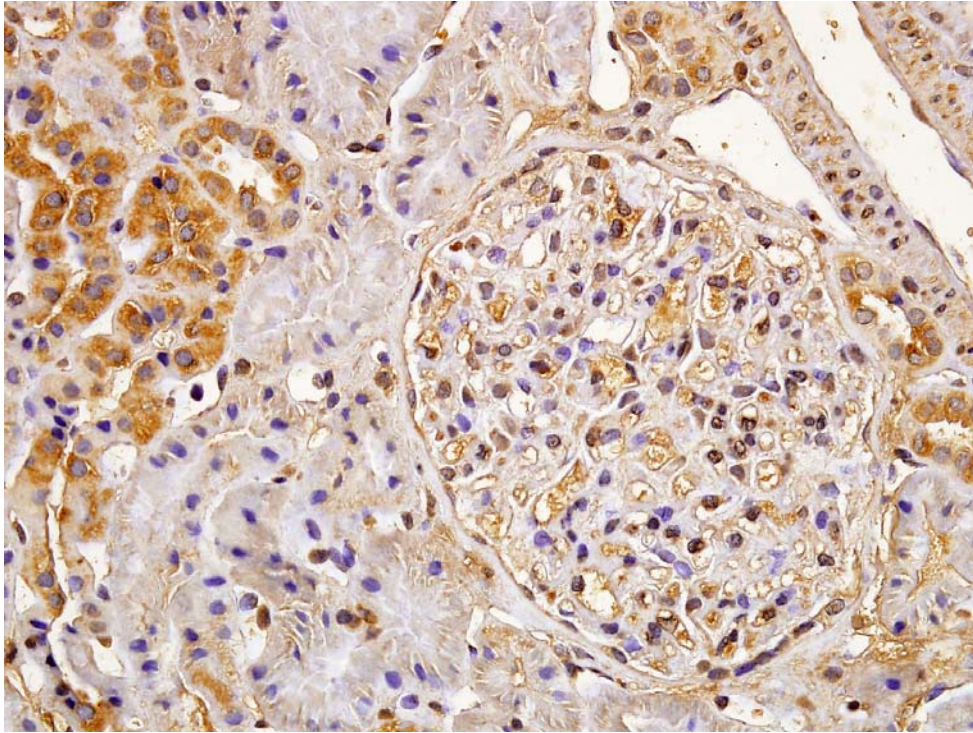
Slika 23. Tkivo posteljice nakon primjene monoklalnog anti-ET-1 protutijela (pozitivna kontrola). Svjetlosni mikroskop, uvećanje 400x



Slika 24. Bubrežno tkivo slučajno izabranog bolesnika, pozitivna kontrola. Svjetlosni mikroskop, uvećanje 400x



Slika 25. Ekspresija TGF- $\beta$ 1 u tubulointersticiju, svjetlosni mikroskop uvećanje 400x



Slika 26. Ekspresija ET-1 u glomerularnim i peritubularnim kapilarama, svjetlosni mikroskop uvećanje 400x

## 6. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA

Podaci su prikazani tablično i grafički. Normalnost raspodjele je analizirana Smirnov-Kolmogorovljevim testom te su se shodno dobivenim rezultatima u daljnjoj analizi koristili neparametrijski testovi i načini prikaza podataka. Razlike u kategorijskim vrijednostima između ispitivanih skupina analizirane su hi kvadrat testom, dok su se razlike u kvantitativnim vrijednostima utvrdile Kruskal-Wallis testom s odgovarajućom post-hoc analizom (Mann-Whitney U test). Povezanost pojedinih izmjerenih vrijednosti u svakoj ispitivanoj skupini (IgA, FSGS i MN) prikazane su kroz Spearmanov koeficijent korelacije. Razina značajnosti definirana je na razini od 5%. U analizi se koristila programska podrška MedCalc for Windows, verzija 11.6 ([www.medcalc.be](http://www.medcalc.be)) te IBM SPSS Statistics for Windows, verzija 19.0.0.1 ([www.spss.com](http://www.spss.com)).



## 7. REZULTATI

### 7.1. Demografska, klinička i laboratorijska (biokemijska) obilježja bolesnika

#### 7.1.1. Demografska obilježja bolesnika

U istraživanje je uključen 91 bolesnik: od toga 57 muškaraca (62,6%) i 35 žena (37,4%). Dobna i spolna raspodjela bolesnika unutar pojedinih ispitivanih skupina bolesnika (IGAN, FSGS i MN) i kontrolnoj skupini prikazani su u Tablici 15 i 16.

Tablica 15. Spol bolesnika u pojedinim skupinama bolesnika i kontrolnoj skupini

		Spol			
		Muški		Ženski	
		N	%	N	%
Skupina	Kontrola	18	44,4%	10	55,6%
	IgA	26	74,3%	9	25,7%
	FSGS	14	58,3%	10	41,7%
	MN	17	53,1%	15	46,9%

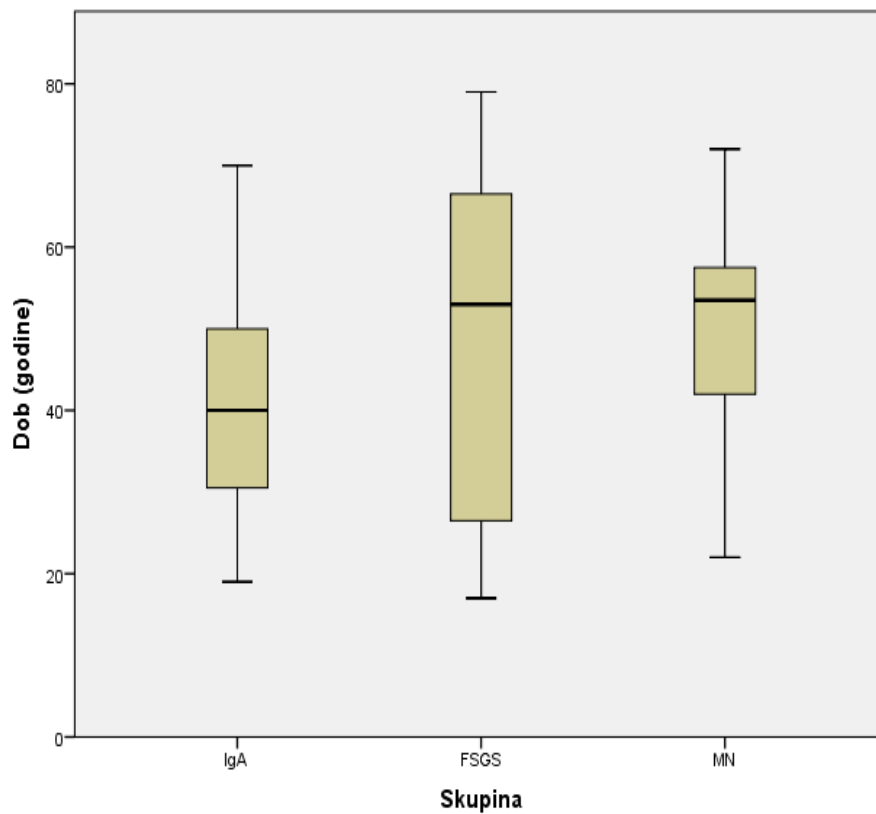
Tablica 16. Dob bolesnika u pojedinim ispitivanim skupinama

Skupina		N	Min	Max	Percentile		
					25.	50. (Medijan)	75.
Dob (godine)	Kontrola	18	18,00	55,00	27,50	43,00	49,50
	IgA	35	19,00	70,00	30,00	40,00	51,00
	FSGS	24	18,00	79,00	26,25	53,00	67,25
	MN	32	22,00	72,00	41,50	53,50	57,75

Određivanjem Pearson Chi-Square koeficijenta hi-kvadrat testom nije nađena razlika u spolnoj zastupljenosti među skupinama bolesnika i u kontrolnoj skupini ispitanika (Tablica 17). Za varijablu dob Kruskal Wallis testom pokazana je razlika ( $p=0,027$ ), bolesnici u FSGS i MN skupini s medijanom dobi 53 godine bili su stariji od bolesnika s IGAN (medijan dobi 40 godina) i ispitanika kontrolne skupine s medijanom dobi 43 godine (Tablica 17, Slika 27).

Tablica 17. Ispitivanje značajnosti razlike varijabli dobi i spola među skupinama

Varijabla	hi-kvadrat	df	P
Dob (godine)	7,245	2	0,027
Spol	3,456	2	0,178



Slika 27. Razlike u dobi između ispitivanih skupina IgAN, FSGS i MN u dobi: Box i Whiskerov plot

### 7.1.2. Klinička obilježja bolesnika

U Tablici 18 prikazana je učestalost povišenog krvnog tlaka (u tri stadija prema ESC-ESH smjernicama) i prisutnost hematurije među skupinama ispitanika, a u Tablici 19 indeks tjelesne mase.

Tablica 18. Učestalost povišenog krvnog tlaka i hematurije u skupinama bolesnika i u kontrolnoj skupini

		Skupina							
		IGAN		FSGS		MN		Kontrola	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Hipertenzija	Normotenzija	20	57,1%	11	45,8%	19	59,4%	4	22,2%
	I stupanj	8	22,9%	8	33,3%	12	37,5%	10	55,6%
	II stupanj	4	11,4%	3	12,5%	1	3,1%	4	22,2%
	III stupanj	3	8,6%	2	8,3%	0	0,0%	0	0,0%
Hematurija	Da	30	85,7%	17	70,8%	26	81,3%	10	55,6%
	Ne	5	14,3%	7	29,2%	6	18,8%	8	44,4%
Makrohematurija	Da	15	42,9%					2	20,0%
	Ne	20	57,1%					8	80,0%

Tablica 19. Indeks tjelesne mase u skupinama bolesnika

	Skupina	N	Srednja vrijednost	SD	Min	Max	Percentile		
							25.	50. (Medijan)	75.
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	IGAN	35	26,76	4,86	19,00	36,50	22,90	26,50	31,00
	FSGS	24	27,22	4,31	16,00	35,00	24,20	26,90	30,80
	MN	27	28,97	4,59	21,20	37,50	25,00	28,50	31,50

Za varijable hipertenzija i hematurija između bolesnika i kontrolne skupine ispitanika nije pronađena značajna razlika (Pearson Chi-Square koeficijent hi-kvadrat test, Tablica 20) niti je nađena razlika u veličini indeksa tjelesne mase (Kruskal Wallis, Tablica 20).

Tablica 20. Ispitivanje razlike u hipertenziji, hematuriji i BMI među skupinama

Varijabla	hi-kvadrat	df	P
Hipertenzija	6,277	6	0,393
Hematurija	3,869	4	0,364
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	3,182	2	0,204

### 7.1.3. Laboratorijska (biokemijska) obilježja bolesnika

U Tablici 21 prikazane su srednje vrijednosti serumske koncentracije lipida i albumina.

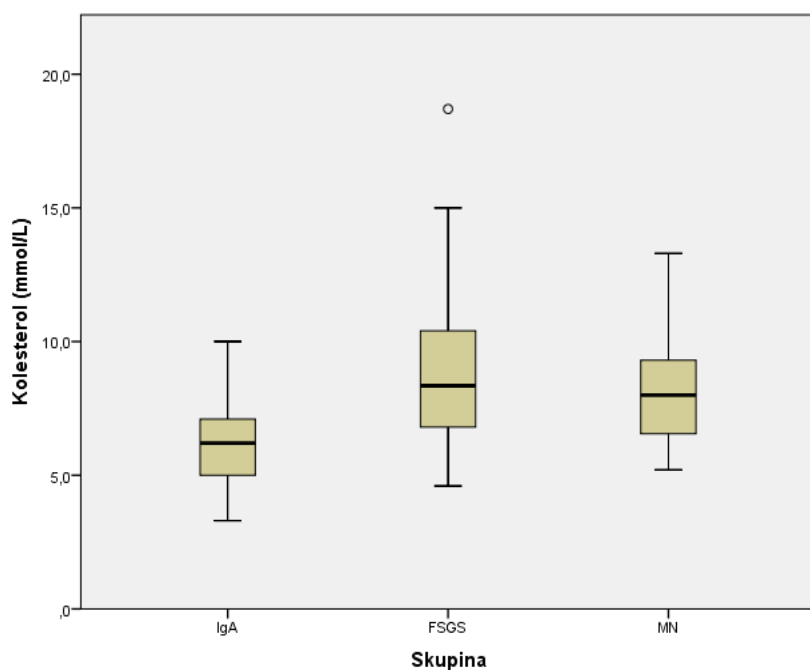
Tablica 21. Serumska razina lipida i albumina u skupinama bolesnika

	Skupina	N	Srednja vrijednost	SD	Min	Max	Percentile		
							25.	50. (Medijan)	75.
Kolesterol (mmol/L)	IGAN	35	6,18	1,68	3,30	10,00	5,00	6,20	7,10
	FSGS	24	8,96	3,26	4,60	18,70	6,70	8,35	10,55
	MN	32	8,04	1,89	5,20	13,30	6,53	8,00	9,40
LDL (mmol/L)	IGAN	27	3,61	1,30	1,30	6,00	2,80	3,40	4,50
	FSGS	18	5,07	2,23	1,60	11,00	3,28	5,15	6,48
	MN	25	5,30	1,63	3,20	10,00	4,00	5,00	6,05
HDL (mmol/L)	IGAN	34	1,35	0,54	0,80	3,80	1,00	1,25	1,60
	FSGS	24	2,08	2,37	1,00	12,90	1,20	1,50	2,13
	MN	32	1,51	0,40	1,00	2,40	1,20	1,45	1,80
Albumini (g/L)	IGAN	35	35,23	6,04	23,00	48,00	32,00	35,00	39,00
	FSGS	24	23,38	10,54	10,00	52,00	15,25	21,00	32,25
	MN	32	26,19	6,80	14,00	43,00	21,25	27,00	29,75

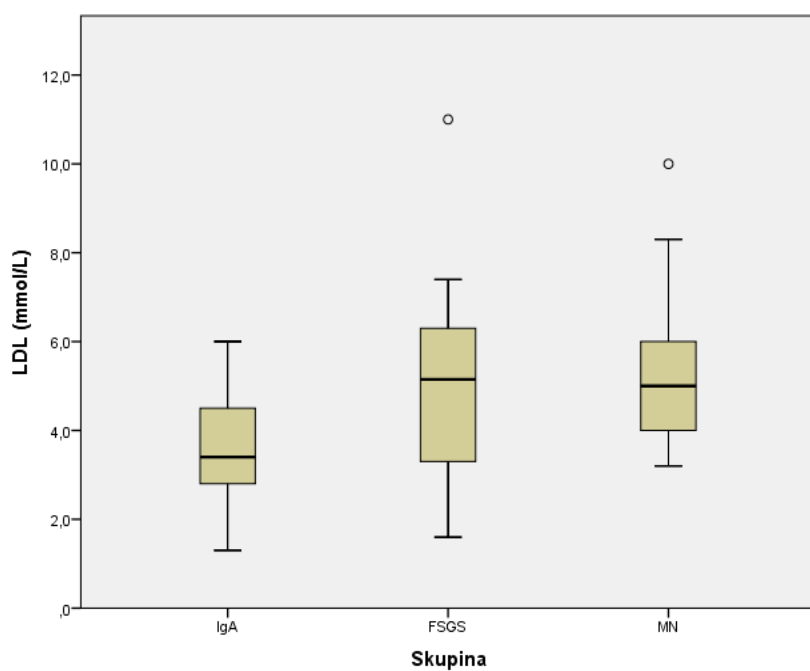
Za varijable biokemijskih serumskih nalaza pokazano je sljedeće: varijabla HDL pokazivala je tendenciju većih vrijednosti u skupini FSGS nego u skupinama MN i IGAN ( $p=0,06$ ), dok su se varijable ukupni kolesterol i LDL statistički značajno razlikovale među skupinama. U pogledu varijable LDL (medijan 5,15 mmol/L, IQ raspon 1,60-11 mmol/L) i ukupnog kolesterola (medijan 8,35 mmol/L, IQ raspon 4,60-18,70 mmol/L) bolesnici u skupini FSGS pokazali su značajno više vrijednosti u odnosu na one u IGAN skupini ( $p=0,001$  za LDL,  $p<0,001$  za ukupni kolesterol) i tek diskretno više od MN bolesnika (Tablica 22, Slika 28 i 29). Također je nađena statistički značajna razlika ( $p<0,001$ , Tablica 22, Slika 30) za vrijednosti serumskog albumina koje su bile manje u FSGS (medijan 21 gr/L, IQ raspon 15,25-32,25 gr/L) i MN (medijan 27 gr/L, IQ raspon 21,25-29,75 gr/L) skupini u odnosu na skupinu IGAN (medijan 35 gr/L, IQ raspon 32-39 gr/L).

Tablica 22. Ispitivanje razlike serumske koncentracije lipida i albumina među skupinama, Kruskal Wallis test

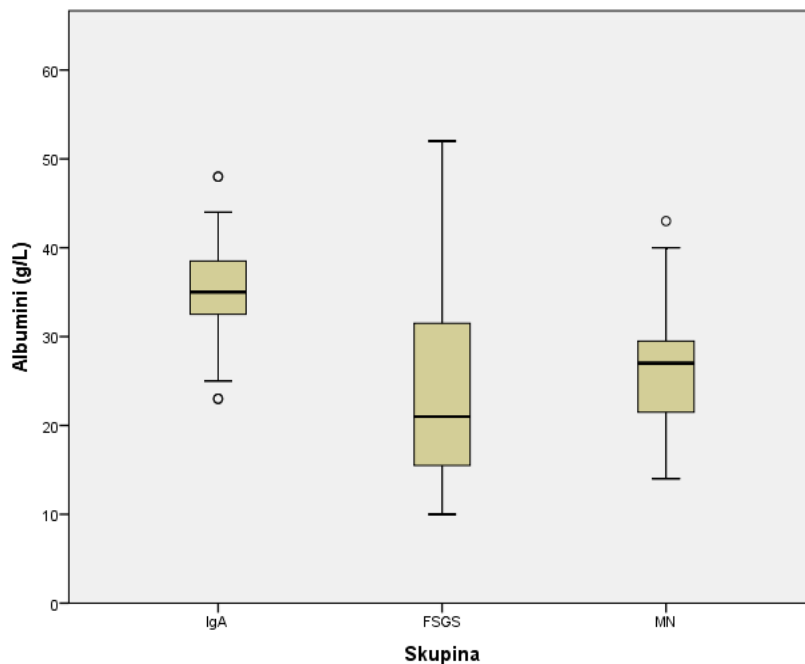
Varijabla	Chi-Square	df	P
Kolesterol (mmol/L)	19,305	2	<0,001
LDL (mmol/L)	13,303	2	0,001
HDL (mmol/L)	5,614	2	0,060
Albumini (g/L)	30,724	2	<0,001



Slika 28. Razlike u koncentraciji serumskeg kolesterola između ispitivanih skupina IgAN, FSGS i MN: Box i Whiskerov plot



Slika 29. Razlike u koncentraciji serumskeg LDLa između ispitivanih skupina IgAN, FSGS i MN u LDL-u: Box i Whiskerov plot



Slika 30. Razlike u serumskom albuminu između ispitivanih skupina IgAN, FSGS i MN u serumskom albuminu: Box i Whiskerov plot

U Tablici 23 prikazane su koncentracije serumskog kreatinina na početku praćenja bolesnika odnosno prije učinjene biopsije bubrega (kreatinin1), te serumске koncentracije kreatinina nakon jedne godine praćenja (kreatinin2). Procijenjena glomerularna filtracija (eGFR) određena je MDRD formulom, na početku praćenja (MDRD1) i kontrolna procjena glomerularne filtracije na kraju praćenja (MDRD2), te smo izračunali razliku procijenjene glomerularne filtracije između kraja i početka praćenja (MDRD2-MDRD1). Za kontrolnu skupinu prikazane su samo vrijednosti kreatinin1 i MDRD1.

Što se tiče serumskih vrijednosti kreatinin1 i kreatinin2, te procijenjene glomerulske filtracije MDRD1 i MDRD2, nije nađeno značajnih statističkih razlika među skupinama bolesnika, no izdvojena je tendencija ( $p=0,075$ ) porasta glomerularne filtracije (MDRD2-MDRD1) u IGAN skupini prema preostale dvije skupine FSGS i MN (Tablica 24).

Tablica 23. Laboratorijski parametri bubrežne ekskrecijske funkcije na početku i na kraju praćenja u skupinama bolesnika, te na početku praćenja u kontrolnoj skupini ispitanika

	Skupina	N	Min	Max	Percentile		
					25.	50. (Medijan)	75.
kreatinin1 ( $\mu\text{mol/L}$ )	IGAN	35	67,00	326,00	87,00	107,00	135,00
	FSGS	24	56,00	250,00	80,00	94,00	136,50
	MN	32	62,00	256,00	79,00	93,50	105,25
	Kontrola	18	62,00	123,00	72,50	80,00	100,50
kreatinin2 ( $\mu\text{mol/L}$ )	IGAN	34	52,00	295,00	72,50	98,00	110,25
	FSGS	24	56,00	176,00	76,25	93,50	129,00
	MN	30	55,00	188,00	75,50	92,00	110,00
MDRD1 ( $\text{mL/min/1,73 m}^2$ )	IGAN	35	20,00	108,00	52,00	69,00	82,00
	FSGS	24	23,70	120,80	44,68	67,85	95,50
	MN	32	17,90	117,00	54,53	75,40	86,65
	Kontrola	18	60,00	90,70	68,40	73,00	83,65
MDRD2 ( $\text{mL/min/1,73 m}^2$ )	IGAN	34	25,00	128,00	63,50	72,25	98,00
	FSGS	24	36,00	117,20	47,55	65,90	98,50
	MN	30	25,10	102,80	52,00	73,65	90,58
MDRD2-MDRD1 ( $\text{mL/min/1,73 m}^2$ )	IGAN	34	-19,00	56,00	-1,50	9,00	22,25
	FSGS	24	-71,60	29,90	-12,25	3,45	17,70
	MN	30	-30,40	27,90	-14,45	2,85	13,83

Tablica 24. Kruskal Wallis test, ispitivanje razlike kreatinina i glomerularne filtracije na početku i kraju praćenja među skupinama

Varijabla	Chi-Square	df	P
kreatinin1 ( $\mu\text{mol/L}$ )	3,637	2	0,162
kreatinin2 ( $\mu\text{mol/L}$ )	,428	2	0,808
MDRD1 ( $\text{mL/min/1.73 m}^2$ )	,692	2	0,708
MDRD2 ( $\text{mL/min/1.73 m}^2$ )	1,380	2	0,502
MDRD2-MDRD1 ( $\text{mL/min/1.73 m}^2$ )	5,190	2	0,075

U Tablici 25 prikazane su vrijednosti 24-satne proteinurije u skupinama bolesnika na početku (Biuret1) i na kraju jednogodišnjeg praćenja (Biuret2), te njihova razlika (Biuret2-Biuret1). Za kontrolnu skupinu ispitanika prikazana je vrijednost Biuret1.

Tablica 25. Vrijednosti 24-satne proteinurije na početku i na kraju praćenja, te njihova razlika među skupinama bolesnika

	Skupina	N	Min	Max	Percentile		
					25.	50. (Medijan)	75.
Biuret1 (g/24h)	IGAN	35	0,34	8,90	1,10	2,00	4,20
	FSGS	24	1,00	33,20	4,25	10,55	13,25
	MN	32	1,94	27,70	4,00	6,80	10,58
	Kontrola	18	0,08	0,60	0,11	0,17	0,37
Biuret2 (g/24h)	IGAN	34	0,06	3,90	0,21	0,55	1,05
	FSGS	23	0,00	7,50	0,20	0,80	2,10
	MN	30	0,00	13,50	0,22	0,43	0,74
Biuret2-Biuret1 (g/24h)	IGAN	34	-7,30	0,10	-3,55	-1,49	-0,65
	FSGS	23	-31,90	3,10	-13,00	-9,85	-2,66
	MN	30	-27,00	1,00	-8,90	-5,40	-2,96

Bolesnici s MN i FSGS imali su značajno veću ( $p < 0,001$ ) 24-satnu proteinuriju na početku praćenja (Biuret1) nego bolesnici s IGAN (Tablica 26).

Za razliku od početne vrijednosti 24-satne proteinurije (Biuret1), vrijednost 24-satne proteinurije na kraju praćenja (Biuret2) nije pokazala značajnu razliku među ispitivanim skupinama. Shodno tome, nađena je značajna razlika ( $p < 0,001$ , Tablica 26) između vrijednosti 24-satne proteinurije izmjerene na početku i na kraju praćenja (Biuret2-Biuret1), s time da je veća razlika nađena u skupini FSGS (medijan -9,85 gr/L, IQ raspon -13,0 do -2,66 gr/L) i skupini MN (medijan -5,40 gr/L, IQ raspon -8,90 do -2,96 gr/L) u odnosu na skupinu IGAN (medijan -1,49 gr/L, IQ raspon -3,55 do -0,65 gr/L).

Tablica 26. Kruskal Wallis test, ispitivanje značajnosti razlike 24 satne proteinurije među skupinama

Varijabla	hi-kvadrat	df	P
Biuret1 (g/24h)	29,544	2	<0,001
Biuret2 (g/24h)	1,404	2	0,495
Biuret2-Biuret1 (g/24h)	22,852	2	<0,001



## 7.2. Patohistološke (morfološke) promjene na bubrežnom tkivu bolesnika

Morfološke (histološke) varijable podijelili smo u dvije kategorije: one koje su zajedničke svim bolesnicima i one koje su tipične za pojedine oblike glomerulonefritisa odnosno skupine bolesnika. U prvu kategoriju (varijable zajedničke svim trima skupinama bolesnika, Tablice 27 i 28) uključene su sljedeće histološke varijable: promjene na krvnim žilama u vidu hijalinoze arteriola (HA, subklasificirana kao: blaga, umjerena, teška) i fibrointimalnog zadebljanja arterija (FIZA, subklasificirana kao blaga, umjerena, teška); ekspresija C3 komponente komplementa u glomerulu određene imunofluorescentnom mikroskopijom (veličina ekspresije označena od 0- bez ekspresije, odnosno 1-3: slaba-umjerena-jaka ekspresija); zatim promjene na tubulointerciciju, upalna infiltracija tubulointercicija (kratica: upalna inf TI: DA ili NE), stupanj intersticijske fibroze (IF, izražena u %), te indeks ozljede (prema eng. Injury score, kratica IS).

Tablica 27. Patohistološka obilježja u glomerulima, krvnim žilama i tubulointerciciju u sve tri skupine bolesnika

		Skupina					
		IGAN		FSGS		MN	
		N	%	N	%	N	%
Upalna inf TI	Da	14	40,0%	6	25,0%	5	15,6%
	Ne	21	60,0%	18	75,0%	27	84,4%
C3 IF	0	7	20,0%	22	91,7%	5	15,6%
	1	18	51,4%	2	8,3%	16	50,0%
	2	9	25,7%	0	0	6	18,8%
	3	1	2,9%	0	0	5	15,6%
FIZA	Bez	22	62,9%	17	70,8%	17	53,1%
	Blaga	6	17,1%	3	12,5%	9	28,1%
	Umjerena	4	11,4%	3	12,5%	4	12,5%
	Teška	3	8,6%	1	4,2%	2	6,3%
HA	Bez	12	34,3%	15	62,5%	13	40,6%
	Blaga	9	25,7%	3	12,5%	10	31,3%
	Umjerena	9	25,7%	4	16,7%	7	21,9%
	Teška	5	14,3%	2	8,3%	2	6,3%

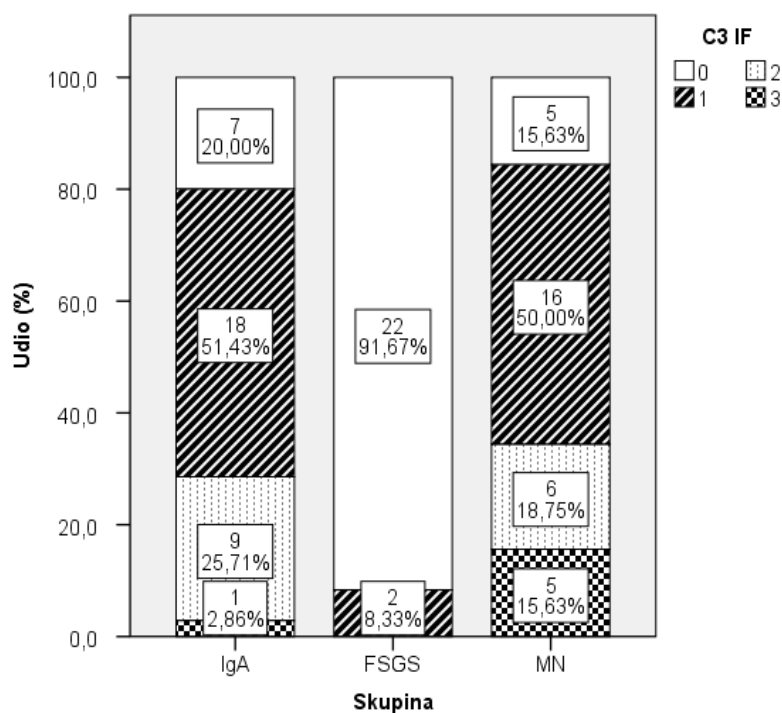
Tablica 28. Patohistološka obilježja u glomerulima i tubulointerciciju u sve tri skupine bolesnika

Skupina	N	Srednja vrijednost	SD	Min	Max	Percentile			
						25.	50. (Medijan)	75.	
IS	IGAN	35	0,56	0,42	0,00	1,50	0,18	0,47	0,80
	FSGS	24	0,34	0,26	0,04	1,08	0,15	0,27	0,42
	MN	32	0,21	0,20	0,00	0,71	0,06	0,15	0,30
IF %	IGAN	35	19,29	17,79	0,00	60,00	5,00	20,00	30,00
	FSGS	24	13,75	17,34	0,00	65,00	0,00	7,50	20,00
	MN	32	9,38	10,61	0,00	40,00	1,25	5,00	10,00

Histološke varijable koje su predstavljale promjene na krvnim žilama (FIZA i HA), nisu pokazale razlike u stupnju uznapredovalosti između skupina bolesnika. Za histološku varijablu upalna inf TI u IGAN skupini, pokazna je tendencija veće učestalosti u odnosu na FSGS i MN skupinu ( $p=0,079$ ). Za razliku od navedenih, histološka varijabla C3 IF bila je statistički značajno jače izražena ( $p<0,001$ , Tablica 29, Slika 31) u skupini IGAN (80%) i skupini MN (83,3%), nego u skupini FSGS (8,3%).

Tablica 29. hi-kvadrat test, ispitivanje razlika histoloških varijabli među skupinama bolesnika

Varijabla	Skupina	
Upalna inf TI	hi-kvadrat	13,711
	df	4
	P	0,079
C3 IF	hi-kvadrat	46,004
	df	6
	P	<0,001
FIZA	hi-kvadrat	3,056
	df	6
	P	0,802
HA	hi-kvadrat	6,455
	df	6
	P	0,374

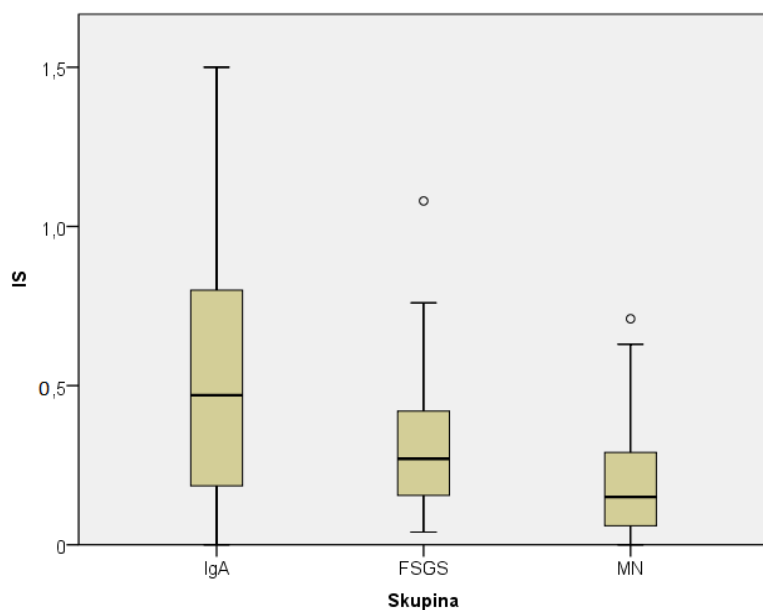


Slika 31. Razlike između ispitivanih skupina u stupnju ekspresije C3 IF

Za intersticijsku fibrozu u bolesnika s IGAN nađena je tendencija ( $p=0,090$ ) jače uznapređovalosti, dok je indeks skleroze bio statistički značajno veći ( $p<0,001$ , Tablica 30, Slika 32) u skupini IgAN (medijan 0,47, IQ raspon 0,18-0,80) nego u FSGS (medijan 0,27, IQ raspon 0,15-0,47) i MN (medijan 0,15, IQ raspon 0,06-0,30).

Tablica 30. Kruskal Wallis test, ispitivanje značajnosti razlike indeksa skleroze i stupnja intersticijske fibroze među skupinama

Varijabla	hi-kvadrat	df	P
IS	16,450	2	<0,001
IF%	4,820	2	0,090



Slika 32. Razlika u indeksu ozljede (IS) između ispitivanih skupina

U bolesnika s IgA nefropatijom od svjetlosnomikroskopskih obilježja izdvojeni su postotni udio pojedinih vrsta polumjeseca (C- celularni, FC fibrocelularni, F fibrozni polumjeseci, Tablica 31), postojanje nekroze i MEST skor prema Oxfordskoj klasifikaciji (Tablica 32). Imunofluorescentnom mikroskopijom semikvantitativno određen je stupanj ekspresije IgA protutijela (1-najmanji, 3 – najviši stupanj) u glomerulima (Tablica 32). Elektronskom mikroskopijom određena je unutarglomerularna lokalizacija imunih kompleksa (kratice: mez dep –depoziti u mezangiju, subepit dep- depoziti subepitelno, subend dep- depoziti subendotelno, mem dep- depoziti intramembranski, Tablica 32).

Tablica 31. Udio (%) pojedinih tipova polumjeseca u bolesnika s IGAN

Vrsta polumjeseca	N	Srednja vrijednost	SD	Min	Max	Percentile		
						25.	50. (Medijan)	75.
Celularni	35	4,34	5,95	0,00	20,00	0,00	0,00	7,00
Fibrocelularni	35	2,62	5,31	0,00	24,00	0,00	0,00	4,50
Fibrozni	35	3,41	7,50	0,00	40,00	0,00	0,00	8,30

Tablica 32. Dodatna morfološka obilježja bolesnika s IGAN

		IGAN	
		N	%
IgA IF	1	10	28,6%
	2	9	25,7%
	3	16	45,7%
M	0	16	45,7%
	1	19	54,3%
E	0	21	60,0%
	1	14	40,0%
S	0	8	22,9%
	1	27	77,1%
T	0	20	57,1%
	1	13	37,1%
	2	2	5,7%
Nekroza	Da	7	20,0%
	Ne	28	80,0%
Mez dep	Da	33	100,0%
	Ne	0	0,0%
Subepitdep	Da	5	15,2%
	Ne	28	84,8%
Subenddep	Da	16	48,5%
	Ne	17	51,5%
Membdep	Da	8	24,2%
	Ne	25	75,8%

U bolesnika s membranskom nefropatijom, osim do sada navedenih histoloških obilježja, prikazana je i proširenost mezangija na svjetlosno-mikroskopskom pregledu (deskriptor mezang matriks SM), stupanj imunofluorescentne ekspresije IgG protutijela u mezangiju (0- bez ekspresije, 1- blaga ekspresija, 2- umjerena i 3-jaka ekspresija), te elektronsko-mikroskopski definiran stupanj razvijenosti promjena u GBM (vidjeti poglavlje Ispitanici i metode) prema Ehrenreichu i Churgu (Tablica 33).

Tablica 33. Dodatna morfološka obilježja bolesnika s MN

		MN	
		N	%
IgG IF	0	2	6,3%
	1	6	18,8%
	2	11	34,4%
	3	13	40,6%
Uvećan mezang matriks SM	Da	10	31,3%
	Ne	22	68,8%
Ehrenreich Churg	1	3	9,4%
	2	17	53,1%
	3	12	37,5%

U bolesnika s fokalnom segmentalnom glomerulosklerozom dodatno je opisana jačina ekspresije IgM u glomerulima, te prevalencija bolesnika prema Columbia University klasifikaciji (1-perihilarni oblik, 2- klasični, 3- celularni, 4- tip varijanta, Tablica 34).

Tablica 34. Dodatna morfološka obilježja bolesnika s FSGS

		FSGS	
		N	%
IgM IF	0	14	58,3%
	1	10	41,7%
Columbia klasifikacija	1	1	4,2%
	2	10	41,7%
	3	3	12,5%
	4	10	41,7%

### 7.2.1. Bubrežna ekspresija TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s glomerulonefritisom i kontrolnoj skupini ispitanika

U Tablici 35 prikazana je ekspresija ET-1 i TGF- $\beta$ 1 u glomerulu i tubulointercijiju (ET1G, ET1-TI%, TGF- $\beta$ 1G, TGF- $\beta$ 1TI%) u pojedinim podskupinama bolesnika s glomerularnom bolesti (IGAN, FSGS, MN), a u Tablici 36 svih bolesnika s glomerulonefritisom i kontrolnoj skupini ispitanika.

Tablica 35. Ekspresija TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u glomerulu i tubulointercijiju u pojedinim skupinama bolesnika i kontrolnoj skupini ispitanika

	Skupina	N	Srednja vrijednost	SD	Min	Max	Percentile		
							25.	50. (Medijan)	75.
ET1G	IGAN	29	1,77	0,86	0,50	3,30	1,10	1,60	2,55
	FSGS	20	1,90	1,03	0,00	3,70	0,93	1,80	2,50
	MN	28	1,60	0,89	0,00	3,50	0,88	1,30	2,48
	Kontrola	14	0,28	0,34	0,00	1,15	0,00	0,20	0,50
ET-1 TI %	IGAN	29	42,45	23,73	7,00	91,00	20,50	43,00	58,50
	FSGS	20	48,78	27,34	2,50	91,00	23,00	52,00	71,75
	MN	28	41,26	28,93	0,20	93,00	18,00	28,00	68,88
	Kontrola	10	24,45	26,12	0,00	65,00	0,00	17,50	55,25
TGF- $\beta$ 1 G	IGAN	28	1,04	0,93	0,00	3,80	0,30	0,70	1,70
	FSGS	20	1,17	1,25	0,00	4,00	0,30	0,60	1,90
	MN	30	1,11	0,90	0,00	3,80	0,40	0,80	1,73
	Kontrola	11	0,62	0,49	0,00	1,80	0,40	0,60	0,80
TGF- $\beta$ 1 TI %	IGAN	28	30,86	20,75	0,00	75,00	12,75	26,50	45,75
	FSGS	20	39,60	28,67	4,50	95,00	15,50	36,50	63,00
	MN	30	32,20	22,07	3,00	89,00	15,75	27,00	44,50
	Kontrola	5	23,30	13,95	8,50	40,00	11,00	18,50	38,00

Tablica 36. Ekspresija TGF- $\beta$ 1 i ET1 u glomerulu i tubulointerciciju u svih bolesnika s glomerulonefritisom i u kontrolnoj skupini ispitanika

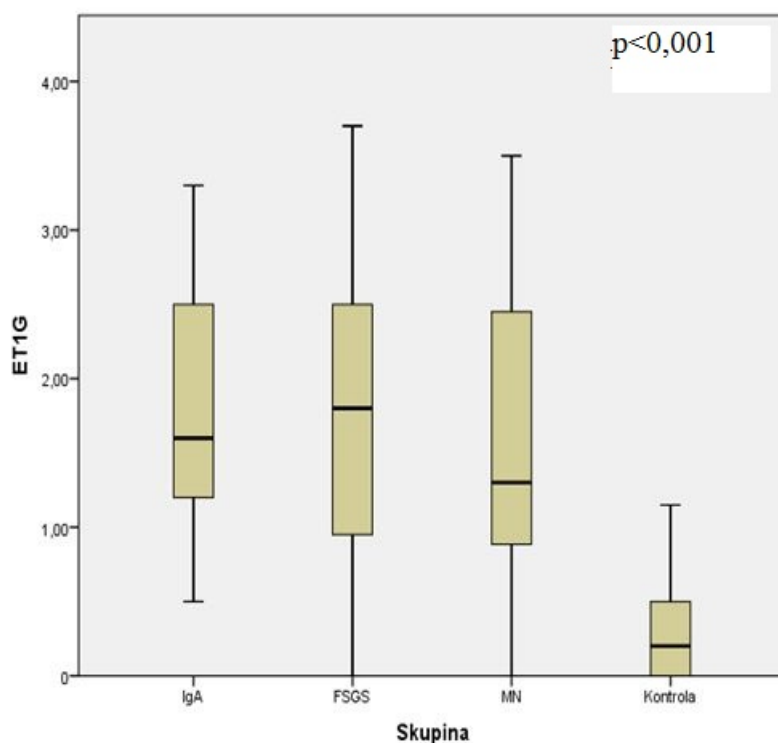
Skupina 2	N	Srednja vrijednost	SD	Min	Max	Percentile			
						25.	50. (Medijan)	75.	
ET1G	Bolesnici	77	1,74	0,91	0,00	3,70	0,95	1,60	2,50
	Kontrola	14	0,28	0,34	0,00	1,15	0,00	0,20	0,50
ET-1 TI %	Bolesnici	77	43,66	26,48	0,20	93,00	21,00	43,00	66,25
	Kontrola	10	24,45	26,12	0,00	65,00	0,00	17,50	55,25
TGF- $\beta$ G	Bolesnici	78	1,10	1,00	0,00	4,00	0,30	0,70	1,70
	Kontrola	11	0,62	0,49	0,00	1,80	0,40	0,60	0,80
TGF- $\beta$ TI %	Bolesnici	78	33,62	23,45	0,00	95,00	15,00	27,50	46,75
	Kontrola	5	23,30	13,95	8,50	40,00	11,00	18,50	38,00

Ispitivajući razliku intenziteta glomerularne i tubulointercicije ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 svake pojedine skupine bolesnika (IGAN, FSGS, MN) s kontrolnom skupinom Kruskal-Wallis testom (vidjeti Tablicu 35), za TGF- $\beta$ 1 nije pokazana statistički značajna razlika intenziteta imunoekspresije niti u glomerulima niti tubulointerciciju, dok je za ET-1 pokazana statistički značajna razlika ( $p < 0,001$ ) između glomerularne ekspresije svake pojedine skupine bolesnika i kontrolne skupine (Tablica 36, Slika 33).

Tablica 36. Kruskal-Wallis test, razlika glomerularne i tubulointercicije ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 svake pojedine skupine bolesnika (IGAN, FSGS, MN) s kontrolnom skupinom

	hi-kvadrat	df	P
ET1G	29,253	3	<0,001
ET-1 TI %	6,202	3	0,102
TGF- $\beta$ G	2,472	3	0,529
TGF- $\beta$ TI %	1,610	3	0,657



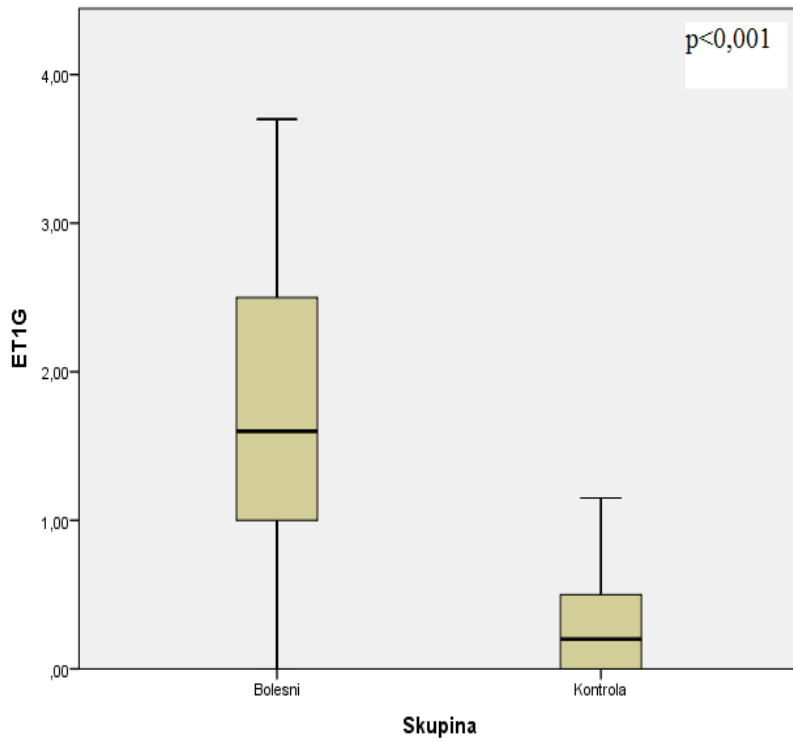


Slika 33. Intenzitet imunoreaktivnosti ET-1 u glomerulu bubrega u bolesnika s definiranim oblicima primarnog glomerulonefritisa i kontrolnoj skupini

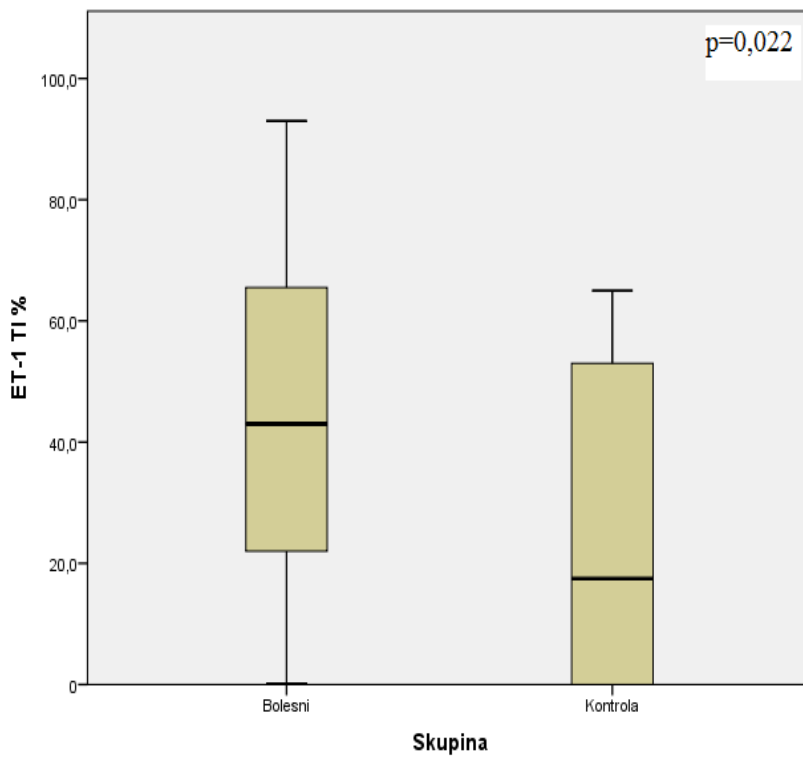
Ispitivajući intenzitet glomerularne i tubulointersticijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 sve tri skupine bolesnika kao jedne zajedničke skupine koju smo nazvali bolesnici i ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u kontrolnih ispitanika (Mann Whitney U testom) dobivena je statistički značajna razlika intenziteta ekspresije ET-1 u glomerulu i tubulointersticiju između bolesnika i kontrolne skupine ispitanika (Tablica 37, Slika 33 i 34), dok za TGF- $\beta$ 1 nije pokazana statistički značajna razlika intenziteta imunoekspresije niti u glomerulima niti tubulointersticiju.

Tablica 37. Mann Whitney test. Ispitivanje razlike intenziteta glomerularne i tubulointersticijske imunoekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 skupine bolesnici (IGAN+FSGS+MN) i kontrolne skupine

	Mann-Whitney U	Z	P
ET1G	56,000	-5,318	<0,001
ET-1 TI %	213,000	-2,289	0,022
TGF- $\beta$ G	328,500	-1,255	0,209
TGF- $\beta$ TI %	150,000	-,862	0,389



Slika 33. Intenzitet imunoreaktivnosti na ET-1 u glomerulu bubrega u bolesnika i kontrolnoj skupini



Slika 34. Intenzitet imunoreaktivnosti ET-1 u tubulointersticiju bubrega u bolesnika i kontrolnoj skupini

### 7.3. Povezanost numeričkih varijabli s glomerularnom i tubulointersticijskom ekspresijom TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s IGAN

Dob i BMI nisu značajno povezani s intenzitetom glomerularne i tubulointersticijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s IGAN (Tablica 38).

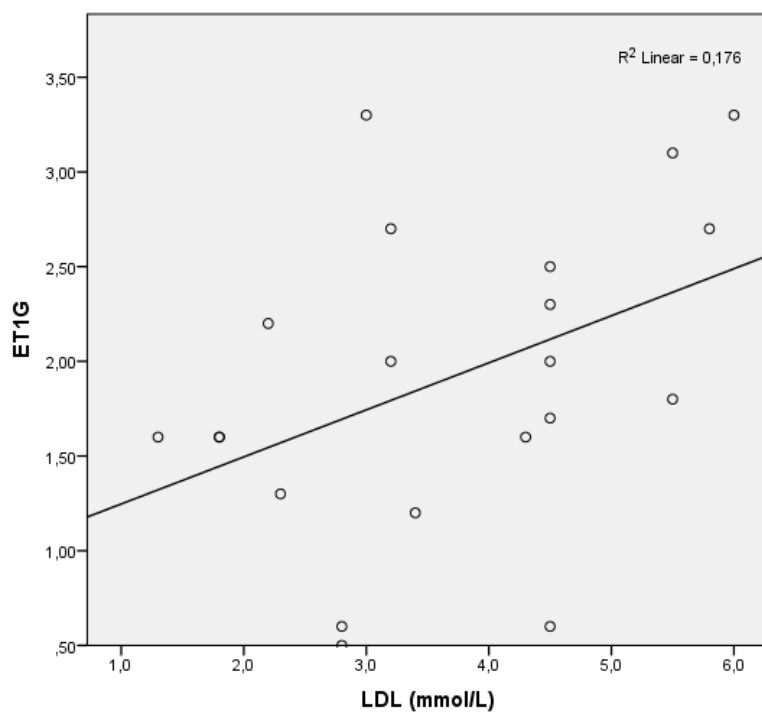
Tablica 38. Povezanost dobi i BMI s bubrežnom ekspresijom TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s IGAN

Spearmanova korelacija		IGAN			
		ET1G	ET-1 TI %	TGF- $\beta$ G	TGF- $\beta$ TI %
Dob (godine)	Koeficijent korelacije	0,257	-,189	0,064	-0,063
	P	0,178	0,327	0,746	0,750
	N	29	29	28	28
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Koeficijent korelacije	0,238	-0,264	-0,055	-0,084
	P	0,214	0,166	0,780	0,672
	N	29	29	28	28

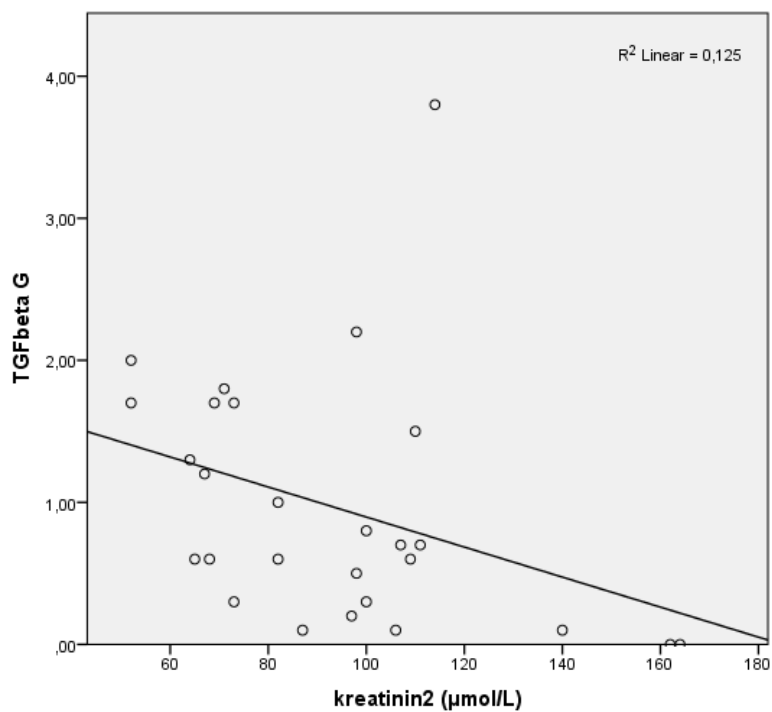
U Tablici 39 prikazane su korelacije varijabli biokemijskih nalaza s TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u glomerulu (G) i tubulointersticiju (TI). Za varijable HDL, albumini, kreatinin1, serumska koncentracija IgA (IgAS), MDRD1 i promjena MDRD nije nađeno statistički značajnih korelacija. Za neke varijable pronađene su pozitivne ili negativne tendencije bez statističke značajnosti, tako je za kolesterol nađena tendencija porasta s ekspresijom ET-1 u glomerulu ( $p=0,096$ ), za MDRD2 tendencija porasta s TGF- $\beta$ 1 u glomerulu ( $p=0,058$ ) i tendencija pada Biureta (Biuret2-Biuret1) s TGF- $\beta$ 1 u TI ( $p=0,087$ ). Za serumski LDL nađena je pozitivna statistički značajna korelacija ( $p=0,027$ ) s ET-1 u glomerulu (Slika 35). Varijabla kreatinin2 bila je u negativnoj statistički značajnoj korelaciji ( $p=0,043$ ) s TGF- $\beta$ 1 u glomerulu (Slika 36).

Tablica 39. Povezanost biokemijskih parametara s bubrežnom ekspresijom TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s IGAN

Spearmanova korelacija		IGAN			
		ET1G	ET-1 TI %	TGF- $\beta$ G	TGF- $\beta$ TI %
Kolesterol (mmol/L)	Koeficijent korelacije	0,315	-0,186	-0,092	0,095
	P	0,096	0,335	0,643	0,632
	N	29	29	28	28
LDL (mmol/L)	Koeficijent korelacije	,0482	-0,093	-0,053	0,251
	P	0,027	0,690	0,810	0,248
	N	21	21	23	23
HDL (mmol/L)	Koeficijent korelacije	0,207	0,231	0,314	0,080
	P	0,290	0,237	0,111	0,693
	N	28	28	27	27
Albumini (g/L)	Koeficijent korelacije	0,212	0,046	-0,071	-0,153
	P	0,270	0,813	0,720	0,438
	N	29	29	28	28
IgAS	Koeficijent korelacije	-0,107	-0,143	0,246	0,058
	P	0,589	0,469	0,216	0,775
	N	28	28	27	27
kreatinin1 ( $\mu$ mol/L)	Koeficijent korelacije	-0,022	-0,277	-0,208	-0,258
	P	0,909	0,145	0,289	0,184
	N	29	29	28	28
kreatinin2 ( $\mu$ mol/L)	Koeficijent korelacije	0,046	-0,173	-0,392	-0,306
	P	0,813	0,368	0,043	0,120
	N	29	29	27	27
MDRD1 (mL/min/1,73 m <sup>2</sup> )	Koeficijent korelacije	-0,016	0,266	0,107	0,199
	P	0,934	0,164	0,587	0,310
	N	29	29	28	28
MDRD2 (mL/min/1,73 m <sup>2</sup> )	Koeficijent korelacije	-0,111	0,215	0,369	0,265
	P	0,565	0,263	0,058	0,181
	N	29	29	27	27
MDRD2-MDRD1 (mL/min/1,73 m <sup>2</sup> )	Koeficijent korelacije	-,0218	-0,156	0,238	0,188
	P	0,256	0,418	0,231	0,347
	N	29	29	27	27
Biuret1 (g/24h)	Koeficijent korelacije	-0,071	-0,011	0,016	0,315
	P	0,713	0,956	0,934	0,102
	N	29	29	28	28
Biuret2 (g/24h)	Koeficijent korelacije	-0,061	0,058	-0,242	-0,110
	P	0,753	0,764	0,225	0,586
	N	29	29	27	27
Biuret2-Biuret1 (g/24h)	Koeficijent korelacije	0,023	-0,050	-0,123	-0,335
	P	0,904	0,798	0,543	0,087
	N	29	29	27	27



Slika 35. Spearmanova korelacija serumske koncentracije LDL i glomerularne ekspresije ET-1 u bolesnika s IGAN



Slika 36. Spearmanova korelacija koncentracije kreatinina na kraju praćenja (kreatinin2) i glomerularne ekspresije TGF- $\beta$ 1 u bolesnika s IGAN

Što se tiče korelacije numeričkih varijabli histoloških bubrežnih promjena (IS, IF%, Cpolu%, FCpolu%, Fpolu%) s ekspresijom TGF- $\beta$ 1 i ET-1 nije nađeno statistički značajnih korelacija, jedino pozitivna tendencija povezanosti udjela fibrocelularnih polumjeseca s ekspresijom ET-1 u TI ( $p=0,079$ ) i negativna tendencija ( $p=0,054$ ) udjela fibroznih polumjeseca s TGF- $\beta$ 1 u TI (Tablica 40).

Tablica 40. Povezanost histoloških varijabli s bubrežnom ekspresijom TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s IGAN

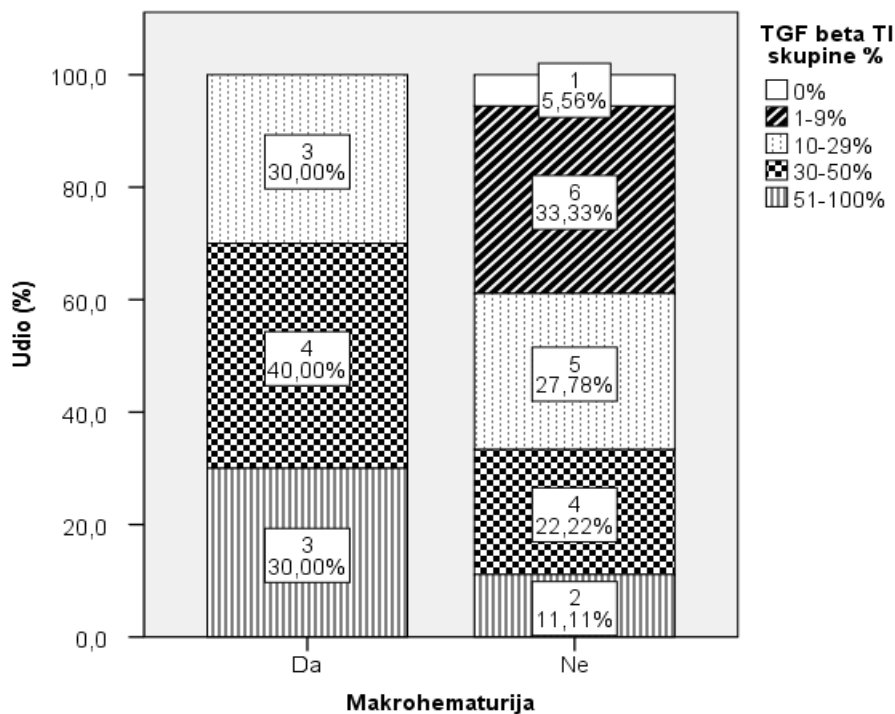
Spearmanova korelacija		IGAN			
		ET1G	ET-1 TI %	TGF- $\beta$ G	TGF- $\beta$ TI %
IS	Koeficijent korelacije	-0,184	-0,121	-0,137	-0,311
	P	0,338	0,531	0,485	0,107
	N	29	29	28	28
IF %	Koeficijent korelacije	-0,047	-0,135	-0,111	-0,196
	P	0,807	0,485	0,573	0,316
	N	29	29	28	28
C polu %	Koeficijent korelacije	-0,190	-0,074	-0,039	0,055
	P	0,322	0,704	0,846	0,780
	N	29	29	28	28
FC polu %	Koeficijent korelacije	0,201	0,332	-0,227	-0,171
	P	0,295	0,079	0,246	0,383
	N	29	29	28	28
F polu %	Koeficijent korelacije	-0,061	0,089	-0,207	-0,368
	P	0,753	0,645	0,289	0,054
	N	29	29	28	28

#### 7.4. Povezanost kategorijskih varijabli i ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u IGAN skupine bolesnika

Statistička analiza je pokazala da nema povezanosti spola, hipertenzije i hematurije s bubrežnom ekspresijom TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s IGAN (Tablica 41). Nasuprot tome, postoji negativna statistički značajna korelacija ( $p=0,035$ ) između makrohaturije i ekspresije TGF- $\beta$ 1 u tubulointersticiju (Tablica 41, Slika 37).

Tablica 41. Povezanost spola, hipertenzije i hematurije s intenzitetom glomerularne i tubulointerstijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s IGAN

Nominalna korelacija tau-b		IGAN			
		ET1G	ET-1 TI %	TGF- $\beta$ G	TGF- $\beta$ TI %
Spol	Koeficijent korelacije	-0,189	0,059	0,260	0,128
	P	0,235	0,706	0,110	0,426
	N	29	29	28	28
Hipertenzija	Koeficijent korelacije	-0,118	-0,053	-0,120	0,035
	P	0,432	0,718	0,438	0,820
	N	29	29	28	28
Hematurija	Koeficijent korelacije	-0,066	-0,105	-0,093	0,043
	P	0,680	0,506	0,568	0,787
	N	29	29	28	28
Makrohematurija	Koeficijent korelacije	,0184	0,220	-0,215	-0,339
	P	0,249	0,163	0,186	0,035
	N	29	29	28	28



Slika 37. Povezanost makrohematurije i intenziteta tubulointerstijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 u bolesnika s IGAN

Nema statistički značajne povezanosti histoloških karakteristika IGAN bolesnika (upalna inf TI, stupanj IgA IF i C3 IF, nekroza, mez dep, subepit dep, subend dep, mem dep, prisutnost polumjeseca) s glomerularnim i tubulointersticijskim intenzitetom ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 (Tablica 42 i 43). Za segmentalnu glomerulosklerozu pokazana je tendencija ( $p=0,067$ ) rjeđe učestalosti s jačinom glomerularne ekspresije ET-1 (Tablica 42), a za učestalost polumjeseca pozitivna tendencija ( $p=0,061$ ) s jačinom glomerularne ekspresije TGF- $\beta$ 1 (Tablica 44). Za endokapilarnu proliferaciju nađena je statistički značajna pozitivna korelacija sa stupnjem glomerularne ekspresije ET-1 ( $p=0,049$ ), dok je za tubularnu atrofiju i intersticijsku fibrozu pokazana statistički značajna negativna korelacija sa stupnjem glomerularne ekspresije TGF- $\beta$ 1 ( $p=0,023$ ), kao i značajna negativna korelacija ( $p=0,007$ ) između stupnja FIZA i TGF- $\beta$ 1 u tubulointersticiju (Tablica 42, Slike 38-40).



Tablica 42. Povezanost histoloških kategorijskih varijabli s intenzitetom glomerularne i tubulointersticijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s IGAN

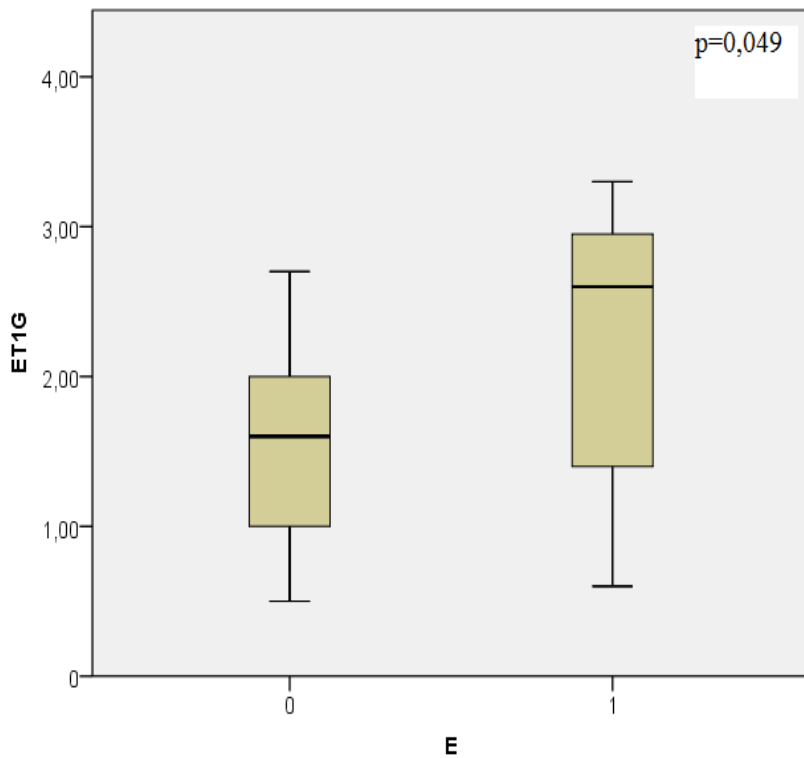
Nominalna korelacija tau-b		IGAN			
		ET1G	ET-1 TI %	TGF- $\beta$ G	TGF- $\beta$ TI %
Upalna inf TI	Koeficijent korelacije	0,079	0,063	0,096	0,151
	P	0,620	0,689	0,555	0,347
	N	29	29	28	28
IgA IF	Koeficijent korelacije	-0,055	0,012	-0,052	-0,061
	P	0,717	0,936	0,734	0,687
	N	29	29	28	28
C3 IF	Koeficijent korelacije	-0,171	0,204	-0,070	-0,127
	P	0,258	0,173	0,655	0,409
	N	29	29	28	28
FIZA	Koeficijent korelacije	-0,115	0,010	-0,018	-0,412
	P	0,446	0,947	0,909	0,007
	N	29	29	28	28
HA	Koeficijent korelacije	0,150	0,206	0,154	-0,137
	P	0,311	0,159	0,302	0,354
	N	29	29	28	28
M	Koeficijent korelacije	-0,223	-0,038	0,053	-0,144
	P	0,162	0,810	0,746	0,369
	N	29	29	28	28
E	Koeficijent korelacije	0,312	-0,053	0,070	0,181
	P	0,049	0,736	0,665	0,260
	N	29	29	28	28
S	Koeficijent korelacije	-0,292	-0,208	-0,069	-0,171
	P	0,067	0,188	0,670	0,288
	N	29	29	28	28
T	Koeficijent korelacije	-0,021	-0,105	-0,371	-0,261
	P	0,894	0,494	0,023	0,104
	N	29	29	28	28
Nekroza	Koeficijent korelacije	0,236	0,253	-0,186	-0,039
	P	0,139	0,108	0,253	0,810
	N	29	29	28	28
Mez dep	Koeficijent korelacije	.	.	.	.
	P	.	.	.	.
	N	27	27	27	27
Subepitdep	Koeficijent korelacije	0,083	-0,092	0,180	0,247
	P	0,617	0,574	0,279	0,132
	N	27	27	27	27
Subenddep	Koeficijent korelacije	0,032	0,108	0,144	0,045
	P	0,845	0,510	0,386	0,786
	N	27	27	27	27
Membdep	Koeficijent korelacije	0,055	0,100	-0,214	-0,100
	P	0,739	0,543	0,198	0,540
	N	27	27	27	27

Tablica 43. Povezanost glomerularne i tubulointersticijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 s nalazom polumjeseca

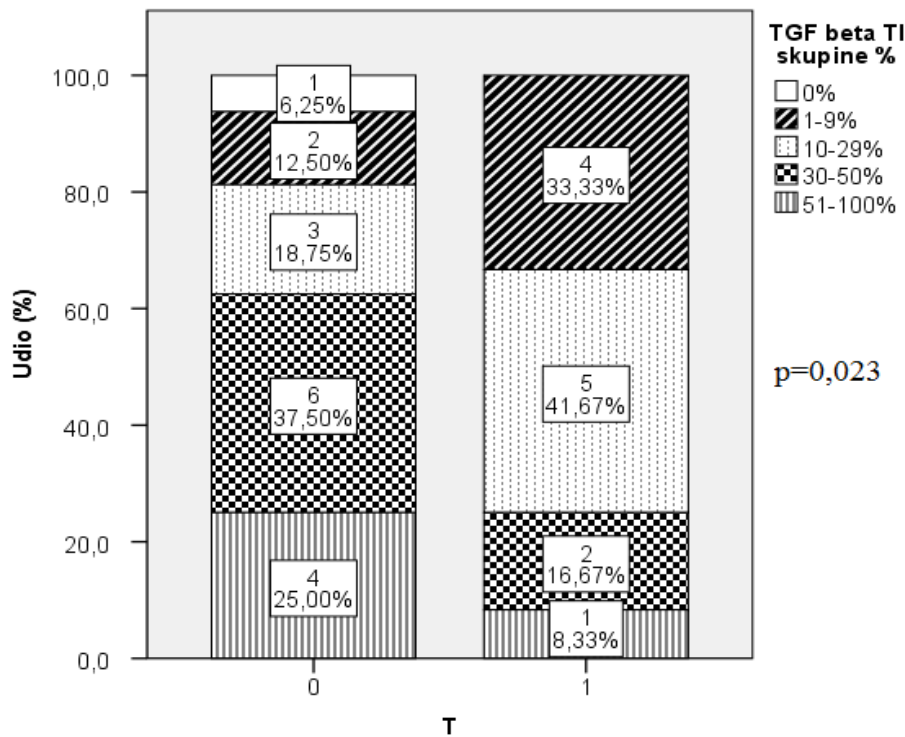
		Polumjeseci			
		Da		Ne	
		N	%	N	%
ET1G	1	7	63,6%	4	36,4%
	2	7	70,0%	3	30,0%
	3	6	75,0%	2	25,0%
ET1TI	1	2	66,7%	1	33,3%
	2	4	57,1%	3	42,9%
	3	3	60,0%	2	40,0%
	4	11	78,6%	3	21,4%
TGFbetaG	0	8	100,0%	0	,0%
	1	5	45,5%	6	54,5%
	2	5	71,4%	2	28,6%
	3	0	,0%	1	100,0%
	4	1	100,0%	0	,0%
TGFbetaTI	0	1	100,0%	0	,0%
	1	5	83,3%	1	16,7%
	2	5	62,5%	3	37,5%
	3	5	62,5%	3	37,5%
	4	3	60,0%	2	40,0%

Tablica 44. Ispitivanje značajnosti korelacije ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 i prisutnost polumjeseca (Pearson hi-kvadrat test)

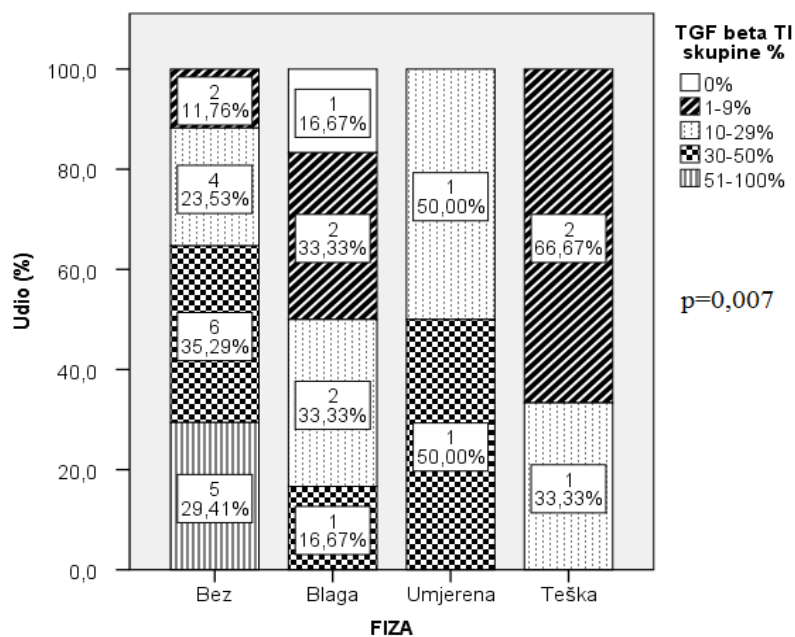
		Polumjeseci
ET1G	hi-kvadrat	0,28
	df	2
	P	0,866
ET1TI	hi-kvadrat	1,256
	df	3
	P	0,74
TGFbetaG	hi-kvadrat	8,946
	df	4
	P	0,062
TGFbetaTI	hi-kvadrat	1,485
	df	4
	P	0,829



Slika 38. Povezanost endokapilarne proliferacije i intenziteta glomerularne ekspresije ET-1 u bolesnika s IGAN



Slika 39. Povezanost stupnja tubularne atrofije/intersticijske fibroze i intenziteta tubulointersticijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 u bolesnika s IGAN



Slika 40. Povezanost varijable FIZA i intenziteta tubulointersticijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 u bolesnika s IGAN

### 7.5. Povezanost numeričkih varijabli s ekspresijom TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s FSGS

Rezultati statističke analize povezanosti dobi i BMI s glomerularnom i tubulointersticijskom ekspresijom TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s FSGS prikazani su u Tablici 45. Dob i indeks tjelesne mase nisu statistički značajno povezani s intenzitetom ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s FSGS (Tablica 45).

Tablica 45. Povezanost dobi i indeksa tjelesne mase s intenzitetom glomerularne i tubulointersticijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s FSGS

Spearmanova korelacija		FSGS			
		ET1G	ET-1 TI %	TGF- $\beta$ G	TGF- $\beta$ TI %
Dob (godine)	Koeficijent korelacije	0,256	0,140	0,146	0,429
	P	0,275	0,556	0,539	0,059
	N	20	20	20	20
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Koeficijent korelacije	0,018	0,037	0,232	0,359
	P	0,940	0,876	0,325	0,120
	N	20	20	20	20

Isto tako, nema povezanosti niti između ispitivanih parametara (kolesterol, LDL, HDL, albumin, kreatinin1, kreatinin2, MDRD1, MDRD2, MDRD2-MDRD1, Biuret1, Biuret2, Biuret2-Biuret1) i imunoekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 (Tablica 46).

Tablica 46. Povezanost biokemijskih parametara s intenzitetom glomerularne i tubulointersticijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s FSGS

Spearmanova korelacija		FSGS			
		ETIG	ET-1 TI	TGF- $\beta$ G	TGF- $\beta$ TI
Kolesterol (mmol/L)	Koeficijent korelacije	0,035	0,008	-0,044	0,169
	P	0,882	0,975	0,855	0,477
	N	20	20	20	20
LDL (mmol/L)	Koeficijent korelacije	-0,016	-0,194	-0,186	0,125
	P	0,954	0,489	0,506	0,657
	N	15	15	15	15
HDL (mmol/L)	Koeficijent korelacije	0,218	-0,152	-0,145	0,214
	P	0,355	0,522	0,541	0,364
	N	20	20	20	20
Albumini (g/L)	Koeficijent korelacije	0,168	-0,100	0,064	-0,014
	P	0,479	0,674	0,788	0,952
	N	20	20	20	20
kreatinin1 ( $\mu$ mol/L)	Koeficijent korelacije	-0,161	-0,105	-0,010	0,036
	P	0,497	0,661	0,967	0,880
	N	20	20	20	20
kreatinin2 ( $\mu$ mol/L)	Koeficijent korelacije	-0,255	-0,228	-0,018	0,140
	P	0,278	0,333	0,941	0,556
	N	20	20	20	20
MDRD1 (mL/min/1,73 m <sup>2</sup> )	Koeficijent korelacije	-0,074	0,005	-0,146	-0,226
	P	0,758	0,985	0,540	0,338
	N	20	20	20	20
MDRD2 (mL/min/1,73 m <sup>2</sup> )	Koeficijent korelacije	0,034	0,150	-0,057	-0,297
	P	0,887	0,529	0,813	,204
	N	20	20	20	20
MDRD2-MDRD1 (mL/min/1,73 m <sup>2</sup> )	Koeficijent korelacije	0,179	0,150	0,131	0,019
	P	0,451	0,527	0,581	0,937
	N	20	20	20	20
Biuret1 (g/24h)	Koeficijent korelacije	0,048	-0,251	-0,243	-0,089
	P	0,841	0,285	0,301	0,709
	N	20	20	20	20
Biuret2 (g/24h)	Koeficijent korelacije	-0,172	-0,275	-0,019	-0,027
	P	0,481	0,254	0,937	0,910
	N	19	19	20	20
Biuret2-Biuret1 (g/24h)	Koeficijent korelacije	-0,004	0,227	0,140	-0,017
	P	0,989	0,351	0,555	0,942
	N	19	19	20	20

Rezultati statističke analize povezanosti parametara indeksa ozljede (IS) i stupnja intersticijske fibroze (IF) i intenziteta glomerularne i tubulointersticijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 prikazani su u Tablici 47.

Tablica 47. Povezanost indeksa ozljede i stupnja intersticijske fibroze s intenzitetom glomerularne i tubulointersticijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s FSGS

Spearmanova korelacija		FSGS			
		ET1G	ET-1 TI %	TGF- $\beta$ G	TGF- $\beta$ TI %
IS	Koeficijent korelacije	0,078	0,100	0,059	0,157
	P	0,743	0,676	0,805	0,509
	N	20	20	20	20
IF %	Koeficijent korelacije	0,203	0,122	0,272	0,244
	P	0,391	0,608	0,246	0,300
	N	20	20	20	20

Niti stupanj ozljede niti stupanj intersticijske fibroze nisu statistički značajno povezani s intenzitetom glomerularne i tubulointersticijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s FSGS.

## 7.6. Povezanost kategorijskih varijabli s ekspresijom TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s FSGS

Kategorijske varijable spol, hipertenzija, hematurija, nisu statistički značajno povezane sa stupnjem glomerularne i tubulointersticijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s FSGS.

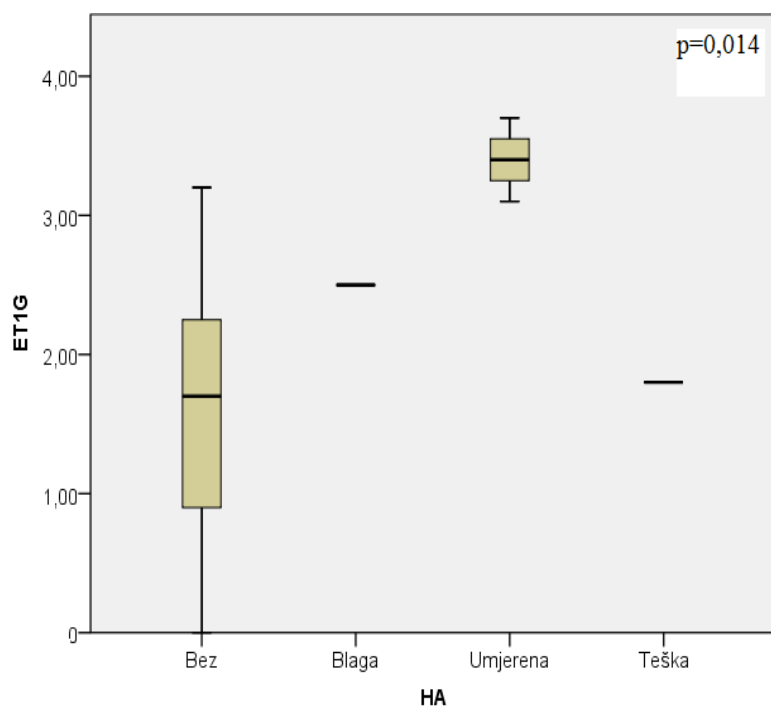
Tablica 48. Povezanost dobi, hipertenzije i hematurije s intenzitetom glomerularne i tubulointersticijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s FSGS

Nominalna korelacija tau-b		FSGS			
		ET1G	ET-1 TI	TGF- $\beta$ G	TGF- $\beta$ TI
Spol	Koeficijent korelacije	0,339	0,111	0,159	0,164
	P	0,082	0,563	0,416	0,395
	N	20	20	20	20
Hipertenzija	Koeficijent korelacije	0,013	0,212	0,089	0,187
	P	0,943	0,242	0,627	0,299
	N	20	20	20	20
Hematurija	Koeficijent korelacije	0,077	0,067	0,016	0,130
	P	0,694	0,727	0,937	0,500
	N	20	20	20	20

Među kategorijskim histološkim varijablama, jedina statistički značajna ( $p=0,014$ ) i to pozitivna povezanost nađena je između stupnja hijalinoze arteriola i intenziteta ET-1 u glomerulu (Slika 41), te pozitivna tendencija ( $p=0,075$ ) između stupnja hijalinoze arteriola i intenziteta ekspresije TGF- $\beta$ 1 u tubulointersticiju (Tablica 49).

Tablica 49. Povezanost histoloških varijabli i intenziteta glomerularne i tubulointersticijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s FSGS

Nominalna korelacija tau-b		FSGS			
		ET1G	ET-1 TI %	TGF- $\beta$ G	TGF- $\beta$ TI %
Upalna inf TI	Koeficijent korelacije	-0,286	-0,094	-0,235	-0,070
	P	0,125	0,610	0,230	0,707
	N	20	20	20	20
IgM IF	Koeficijent korelacije	-0,007	0,102	0,024	0,048
	P	0,970	0,595	0,901	0,804
	N	20	20	20	20
C3 IF	Koeficijent korelacije	-0,203	-0,184	-0,111	0
	P	0,297	0,340	0,569	1,000
	N	20	20	20	20
FIZA	Koeficijent korelacije	0,123	0,121	-0,086	0,213
	P	0,516	0,517	0,643	0,247
	N	20	20	20	20
HA	Koeficijent korelacije	0,464	0,249	-0,014	0,325
	P	0,014	0,181	0,941	0,075
	N	20	20	20	20
Columbia klasifikacija	Koeficijent korelacije	0,033	0,275	0,007	-0,103
	P	0,858	0,135	0,972	0,573
	N	20	20	20	20



Slika 41. Povezanost stupnja hijalinoze arteriola (HA) i intenziteta glomerularne ekspresije ET-1u bolesnika s FSGS

### 7.7. Povezanost numeričkih varijabli s ekspresijom TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s MN

U skupini bolesnika s MN nema statistički značajne korelacije između intenziteta glomerularne i tubulointersticijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 i dobi te indeksa tjelesne mase (Tablica 50).

Tablica 50. Povezanost dobi i indeksa tjelesne mase i intenziteta glomerularne i tubulointersticijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s MN

Spearmanova korelacija		MN			
		ET1G	ET-1 TI %	TGF- $\beta$ G	TGF- $\beta$ TI %
Dob (godine)	Koeficijent korelacije	0,074	-0,152	0,102	0,011
	P	0,709	0,439	0,590	0,952
	N	28	28	30	30
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Koeficijent korelacije	0,205	-0,204	-0,106	-0,225
	P	0,335	0,339	0,613	0,279
	N	24	24	25	25



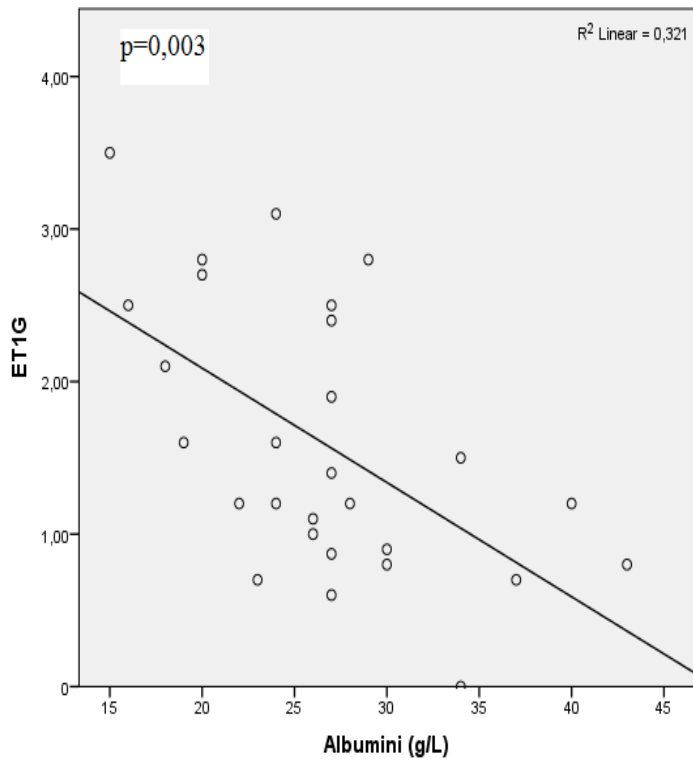
Rezultati statističke analize povezanosti ispitivanih biokemijskih parametara s glomerularnom i tubulointersticijskom ekspresijom TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s MN prikazani su u Tablici 51 i Slikama 42-45. Kao što rezultati pokazuju, nema statistički pouzdane korelacije između serumske koncentracije kolesterola, LDL, HDL te varijabli MDRD1 i Biuret2 i glomerularne i tubulointersticijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bubregu bolesnika (Tablica 51).

Nadalje, rezultati analize pokazuju moguću povezanost serumske koncentracije albumina s ekspresijom ET-1 u tubulointersticiju ( $p=0,089$ ), koncentracije kreatinina na kraju praćenja (kreatinin2) s intenzitetom glomerularne ekspresije TGF- $\beta$ 1 ( $p=0,055$ ), serumske koncentracije albumina i glomerularne ekspresije TGF- $\beta$ 1 ( $p=0,098$ ), serumske koncentracije kreatinina na početku praćenja (kreatinin1) i glomerularne ekspresije ET-1 ( $p=0,069$ ), te varijable promjena MDRD (MDRD2-MDRD1) s glomerularnom ( $p=0,085$ ) i tubulointersticijskom ( $p=0,096$ ) ekspresijom TGF- $\beta$ 1.

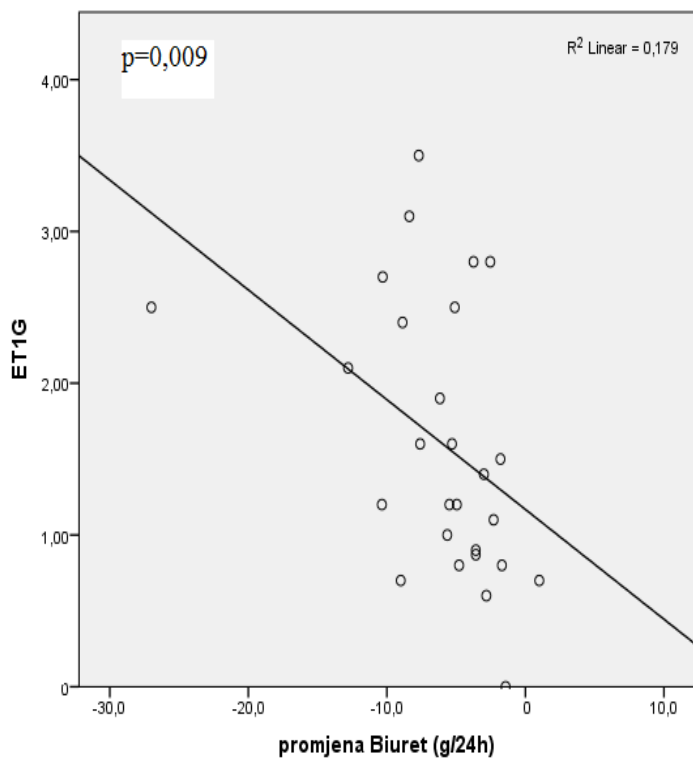
Nasuprot tome, statistički značajna negativna korelacija pokazana je između serumske koncentracije albumina i glomerularne ekspresije ET-1 ( $p=0,003$ ), te varijable promjena Biureta (Biuret2-Biuret1) i glomerularne ekspresije ET-1 ( $p=0,009$ , Tablica 51, Slika 42 i 43). Isto tako, statistički značajna korelacija ( $p=0,028$ ) pokazana je za varijablu MDRD2 i glomerularnu ekspresiju TGF- $\beta$ 1 ( $p=0,043$ ) kao i za varijablu Biuret1 i glomerularnu ekspresiju ET-1 (Tablica 51, Slika 44 i 45).

Tablica 51. Povezanost serumskih biokemijskih parametara i intenziteta glomerularne i tubulointersticijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s MN

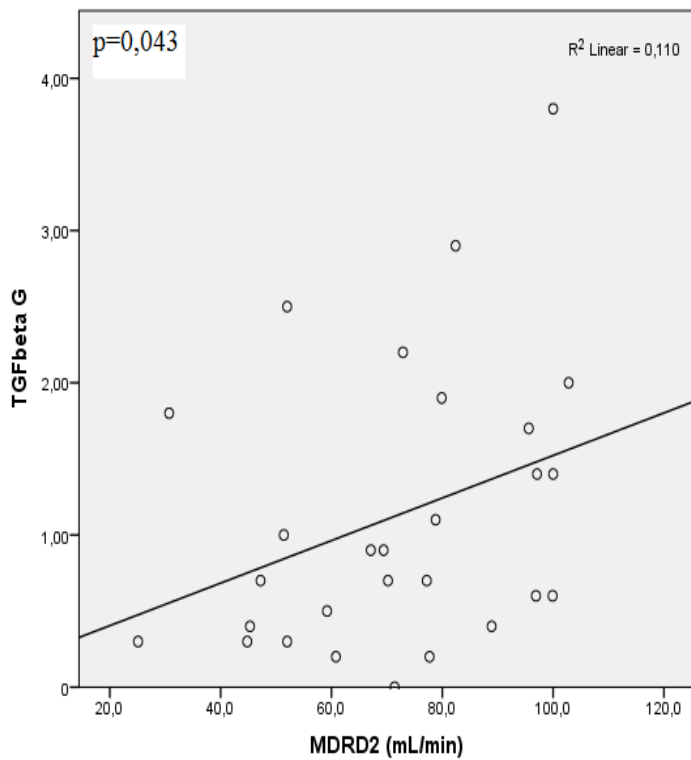
Spearmanova korelacija		MN			
		ET1G	ET-1 TI	TGF- $\beta$ G	TGF- $\beta$
Kolesterol (mmol/L)	Koeficijent korelacije	0,290	0,014	-0,215	0,130
	P	0,135	0,945	0,255	0,492
	N	28	28	30	30
LDL (mmol/L)	Koeficijent korelacije	0,162	-0,018	-0,072	-0,184
	P	0,484	0,940	0,739	0,389
	N	21	21	24	24
HDL (mmol/L)	Koeficijent korelacije	-0,025	-0,079	-0,180	0,084
	P	0,900	0,689	0,341	0,660
	N	28	28	30	30
Albumini (g/L)	Koeficijent korelacije	-0,537	-0,327	0,308	-0,021
	P	0,003	0,089	0,098	0,913
	N	28	28	30	30
kreatinin1 ( $\mu$ mol/L)	Koeficijent korelacije	0,348	0,131	-0,024	0,053
	P	0,069	0,505	0,898	0,780
	N	28	28	30	30
kreatinin2 ( $\mu$ mol/L)	Koeficijent korelacije	0,263	0,226	-0,366	-0,312
	P	0,186	0,257	0,055	0,106
	N	27	27	28	28
MDRD1 (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	Koeficijent korelacije	-0,239	-0,221	0,087	-0,063
	P	0,221	0,259	0,647	0,740
	N	28	28	30	30
MDRD2 (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	Koeficijent korelacije	-0,186	-0,258	0,384	0,286
	P	0,354	0,194	0,043	0,140
	N	27	27	28	28
MDRD2-MDRD1 (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	Koeficijent korelacije	0,109	-0,047	0,331	0,321
	P	0,589	0,815	0,085	0,096
	N	27	27	28	28
Biuret1 (g/24h)	Koeficijent korelacije	0,416	0,270	-0,208	0,147
	P	0,028	0,165	0,271	0,438
	N	28	28	30	30
Biuret2 (g/24h)	Koeficijent korelacije	0,309	0,009	0,082	0,111
	P	0,117	0,964	0,678	0,572
	N	27	27	28	28
Biuret2-Biuret1 (g/24h)	Koeficijent korelacije	-0,496	-0,286	.	0,015
	P	0,009	0,148	.	0,938
	N	27	27	0	28



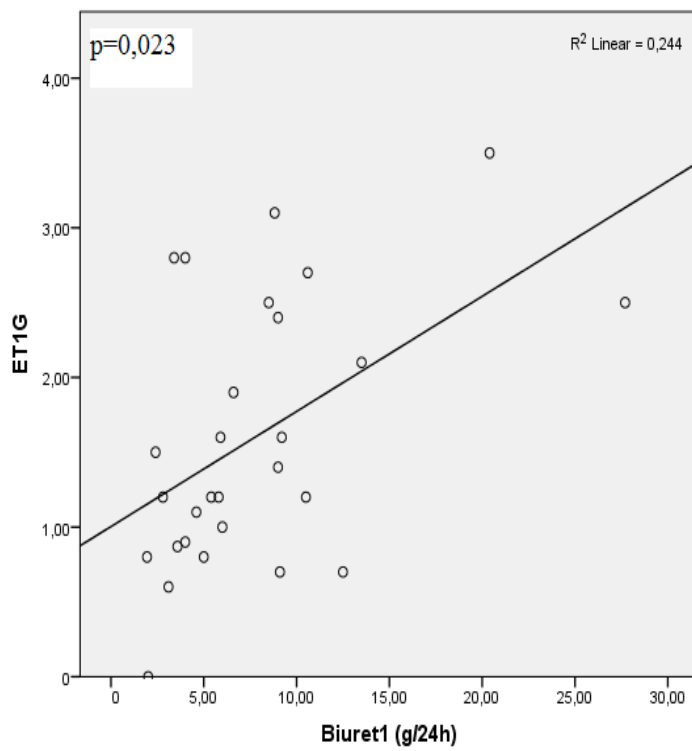
Slika 42. Spearmanova korelacija varijabli serumskih albumina i intenziteta glomerularne ekspresije ET-1 u bolesnika s MN



Slika 43. Spearmanova korelacija varijable promjena Biureta i intenziteta glomerularne ekspresije ET-1 u bolesnika s MN



Slika 44. Spearmanova korelacija varijable MDRD2 i glomerularne ekspresije TGF-β1 u bolesnika s MN



Slika 45. Spearmanova korelacija varijable Biuret1 i glomerularne ekspresije ET-1 u bolesnika s MN

Za ispitane histološke varijable indeksa ozljede i intersticijske fibroze nije nađena statistički značajna korelacija s intenzitetom glomerularne i tubulointersticijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 (Tablica 52).

Tablica 52. Povezanost indeksa ozljede i intersticijske fibroze s intenzitetom glomerularne i tubulointersticijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s MN

Spearmanova korelacija		MN			
		ET1G	ET-1 TI %	TGF- $\beta$ G	TGF- $\beta$ TI %
IS	Koeficijent korelacije	0,010	0,077	-0,131	-0,070
	P	0,961	0,698	0,490	0,713
	N	28	28	30	30
IF %	Koeficijent korelacije	-0,012	0,116	-0,155	-0,203
	P	0,952	0,558	0,414	0,282
	N	28	28	30	30

## 7.8. Povezanost kategorijskih varijabli u skupini bolesnika s MN

Kategorijske varijable spola i hipertenzije nisu u statistički značajnoj korelaciji s intenzitetom glomerularne i tubulointersticijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1, a za hematuriju nađena je pozitivna tendencija ( $p=0,065$ ) povezanosti s glomerularnom ekspresijom ET-1 (Tablica 53).

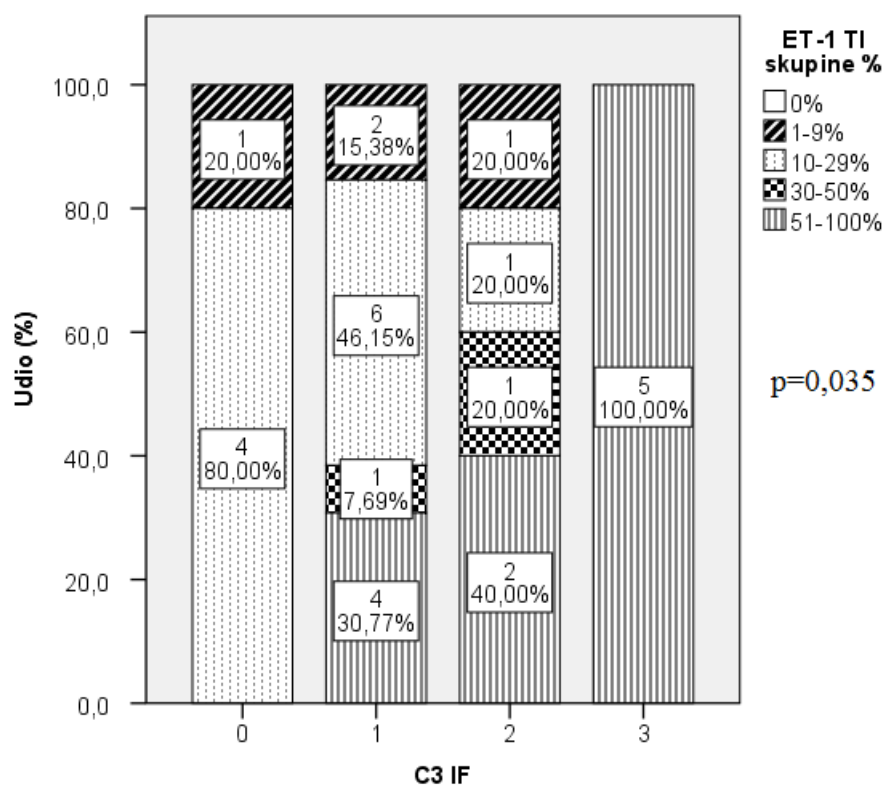
Tablica 53. Povezanost spola, hipertenzije, hematurije i intenziteta glomerularne i tubulointersticijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s MN

Nominalna korelacija tau-b		MN			
		ET1G	ET-1 TI %	TGF- $\beta$ G	TGF- $\beta$ TI %
Spol	Koeficijent korelacije	-0,215	-0,048	-0,062	0,100
	P	0,185	0,763	0,690	0,516
	N	28	28	30	30
Hipertenzija	Koeficijent korelacije	-0,113	-0,081	-0,013	-0,019
	P	0,486	0,615	0,934	0,901
	N	28	28	30	30
Hematurija	Koeficijent korelacije	-0,294	-0,088	0,020	0,045
	P	0,065	0,577	0,897	0,770
	N	28	28	30	30

Rezultati statističke analize povezanosti histoloških varijabli i intenziteta glomerularne i tubulointersticijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 prikazani su u Tablici 54. Niti jedna histološka varijabla nije statistički značajno povezana s glomerularnom i tubulointersticijskom ekspresijom TGF- $\beta$ 1 i ET-1, osim stupnja glomerularne ekspresije C3 komponente komplementa i tubulointersticijske ekspresije ET-1 ( $p=0,035$ , Slika 46).

Tablica 54. Povezanost histoloških varijabli i intenziteta glomerularne i tubulointersticijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 u bolesnika s MN

Nominalna korelacija tau-b		MN			
		ET1G	ET-1 TI %	TGF- $\beta$ G	TGF- $\beta$ TI %
Upalna inf TI	Koeficijent korelacije	-0,127	0,058	0,139	-0,073
	P	0,435	0,719	0,372	0,636
	N	28	28	30	30
IgG IF	Koeficijent korelacije	0,048	0,119	0,014	0,039
	P	0,753	0,426	0,924	0,789
	N	28	28	30	30
C3 IF	Koeficijent korelacije	0,108	0,313	0,022	0,096
	P	0,472	0,035	0,878	0,504
	N	28	28	30	30
FIZA	Koeficijent korelacije	-0,014	-0,097	-0,161	-0,045
	P	0,930	0,525	0,274	0,755
	N	28	28	30	30
HA	Koeficijent korelacije	-0,120	-0,078	-0,199	0,022
	P	0,427	0,602	0,172	0,880
	N	28	28	30	30
Uvećan mezangijski matriks (SM)	Koeficijent korelacije	-0,233	0,046	-0,114	0,119
	P	0,149	0,774	0,467	0,441
	N	28	28	30	30
Ehrenreich Churg	Koeficijent korelacije	-0,308	-0,280	0,261	0,165
	P	0,051	0,073	0,083	0,269
	N	28	28	30	30

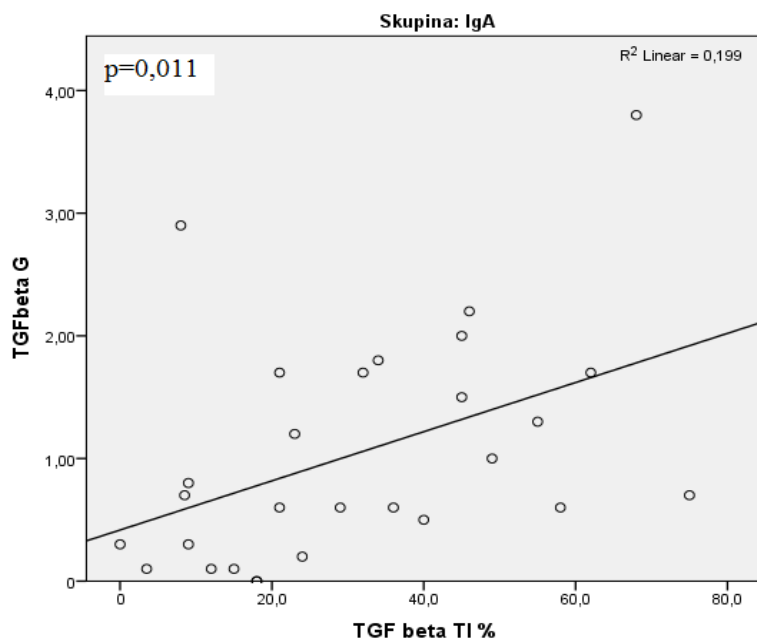


Slika 46. Povezanost glomerularne ekspresije C3 komponente komplementa i intenziteta ekspresije tubulointersticijskog ET-1 u bolesnika s MN

### 7.9. Analiza povezanosti glomerularne i tubulointersticijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1 po skupinama bolesnika

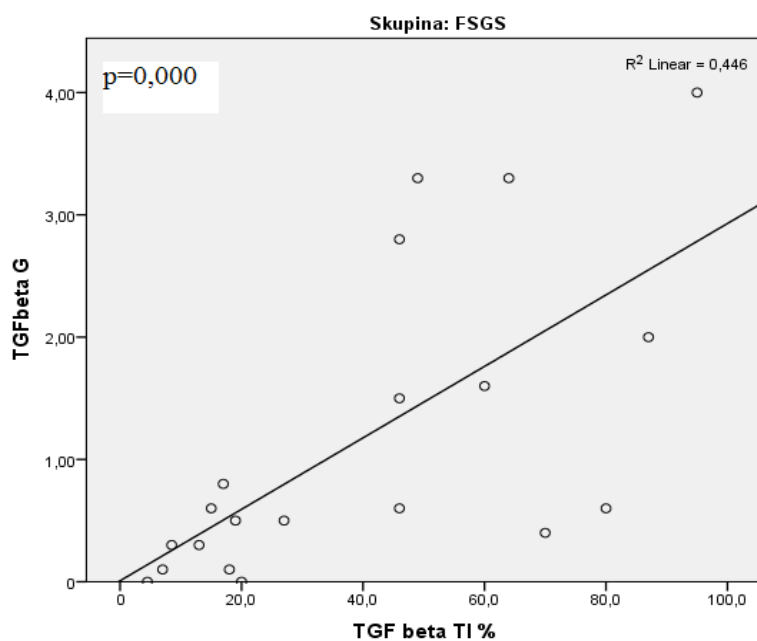
U svakoj skupini bolesnika, određivanjem Spearman rank koeficijenta (Spearman rho), ispitivali smo moguću povezanost između ekspresije TGF- $\beta$ 1 u glomerulu i TGF- $\beta$ 1 u tubulointersticiju, ET-1 u glomerulu i tubulointersticiju, te ekspresije između TGF $\beta$ 1 u glomerulu i tubulointersticiju s ET-1 u glomerulu i tubulointersticiju.

U skupini bolesnika s IGAN nađena je pozitivna korelacija ( $p=0,011$ ) između intenziteta glomerularne i tubulointersticijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 (Slika 47), dok nije nađena statistički značajna korelacija između glomerularne i tubulointersticijske ekspresije ET-1, odnosno između glomerularne i tubulointersticijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1.



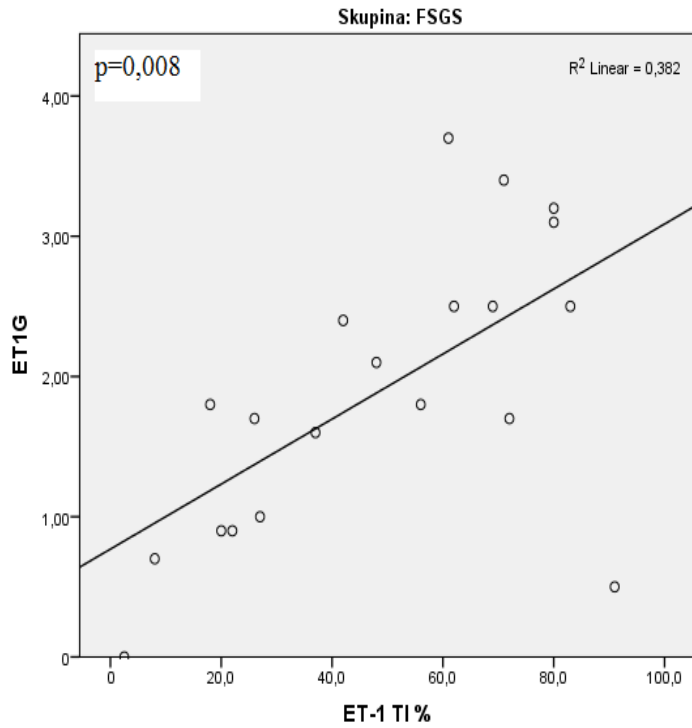
Slika 47. Korelacija glomerularne i tubulointersticijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 u bolesnika s IGA

U skupini bolesnika s FSGS, našli smo statistički značajnu povezanost ekspresije TGF- $\beta$ 1 u glomerulu i tubulointersticiju ( $p=0,000$ , Slika 48), zatim ET-1 u glomerulu i tubulointersticiju ( $p=0,008$ , Slika 49), te ET-1 u glomerulu s TGF- $\beta$ 1 u glomerulu ( $p=0,038$ , Slika 50) i tubulointersticiju ( $p=0,012$ , Slika 51).

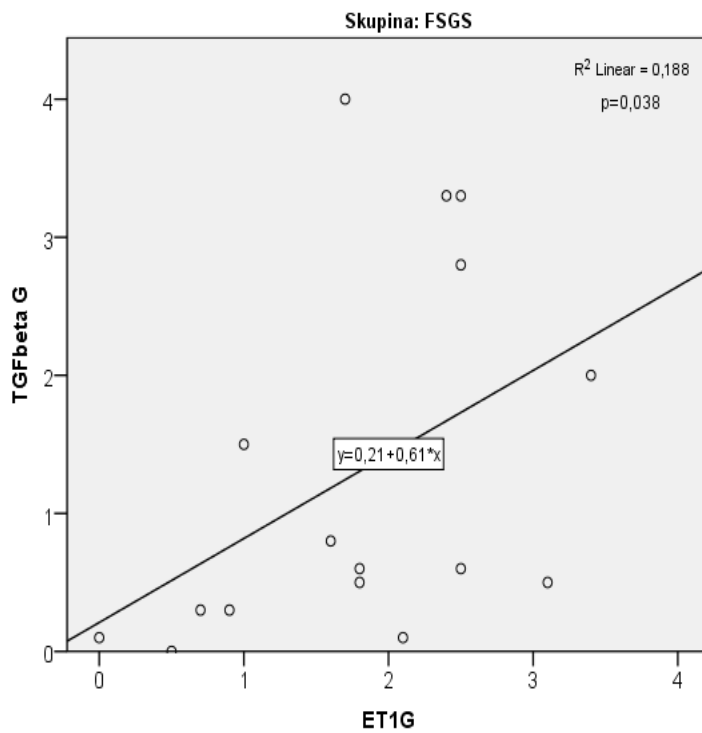


Slika 48. Korelacija ekspresije TGF- $\beta$ 1 u glomerulu i tubulointersticiju u bolesnika s FSGS

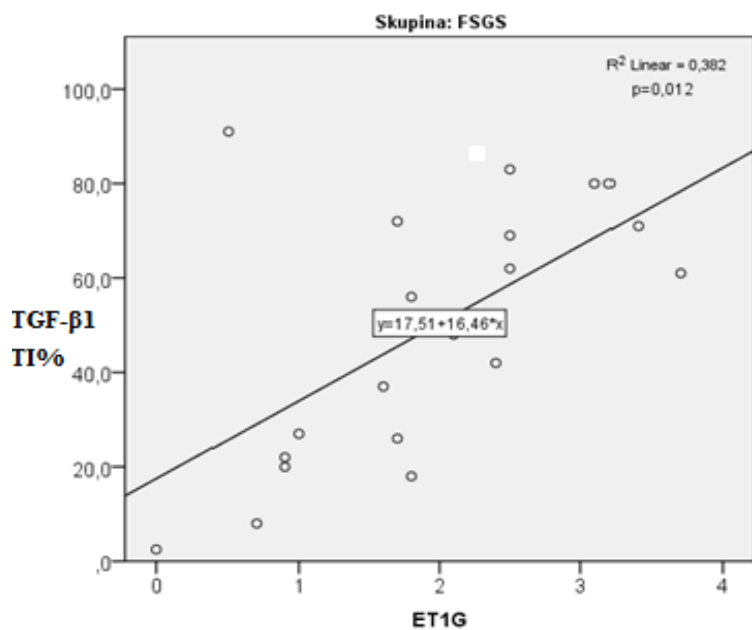




Slika 49. Korelacija između ekspresije ET-1 u glomerulu i tubulointerciju u bolesnika s FSGS

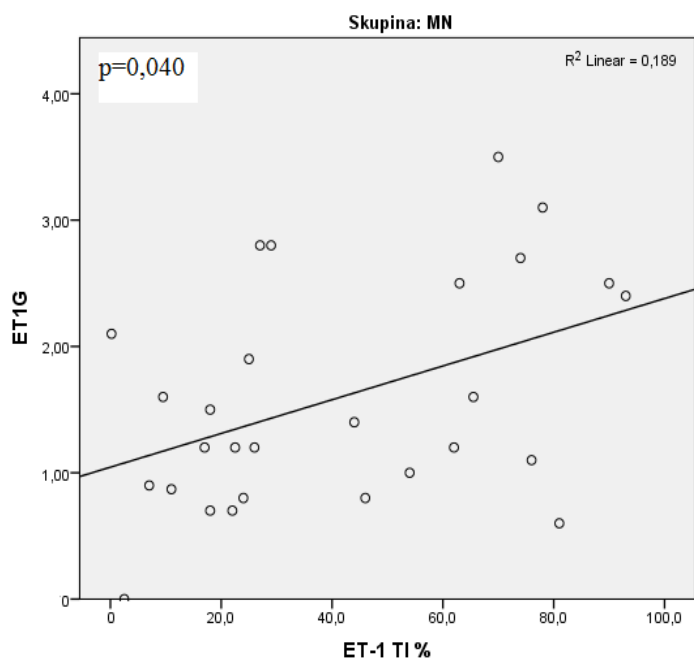


Slika 50. Korelacija između ekspresije ET-1 u glomerulu i TGF- $\beta$ 1u glomerulu u bolesnika s FSGS

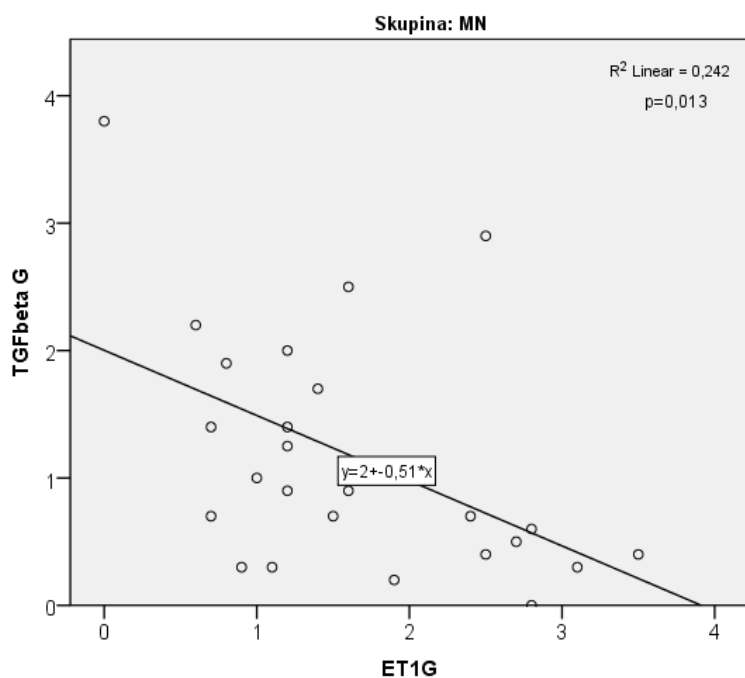


Slika 51. Korelacija između ekspresije ET-1 u glomerulu i TGF-β1u tubulointerciju u bolesnika s FSGS

U skupini bolesnika s MN nađena je statistička značajna korelacija ( $p=0,040$ ) između ekspresije ET-1 u glomerulu i tubulointerciju (Slika 52) i negativna korelacija ( $p=0,013$ ) između ekspresije ET-1 u glomerulu i TGF-β1 u glomerulu (Slika 53). Nasuprto tome, nema povezanosti između TGF-β1 u glomerulu i tubulointerciju.



Slika 52. Korelacija između ekspresije ET-1 u glomerulu i ET-1 u tubulointerciju u bolesnika s MN



Slika 53. Korelacija između ekspresije ET-1 u glomerulu i TGF-β1u glomerulu u bolesnika s MN

### 7.10. Povezanost intenziteta ekspresije TGF-β1 i ET-1 na tijek glomerularne bolesti

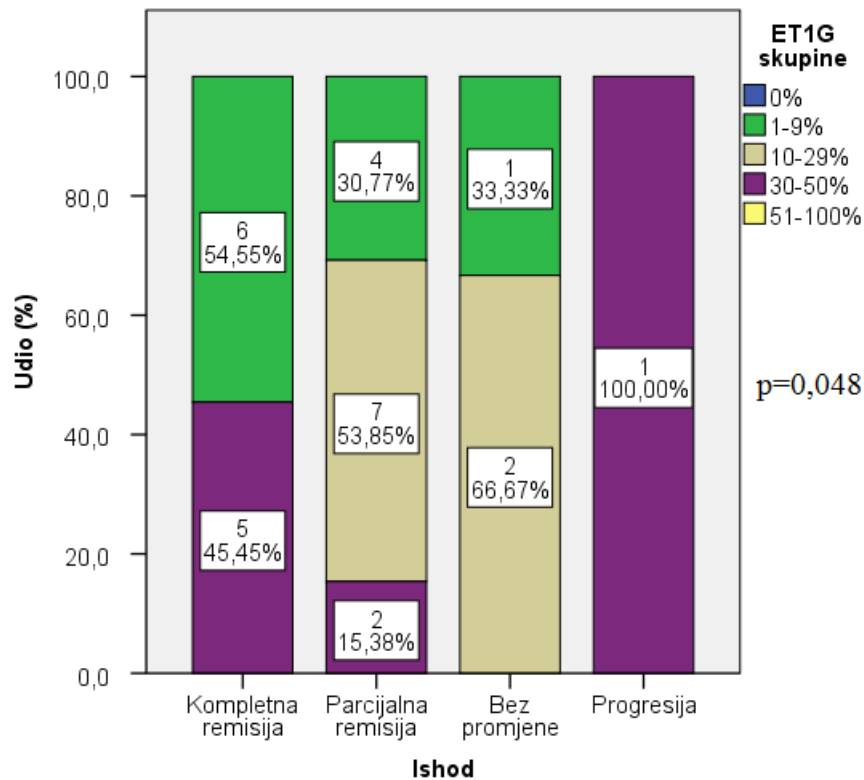
Povezanost ekspresije TGF-β1 i ET-1 i tijeka glomerularne bolesti ispitivali smo u bolesnika koje smo razvrstali u podskupine ishoda bolesti na temelju podataka o početnim vrijednostima 24h proteinurije i glomerularne filtracije (Biuret1 i MDRD1), te istim vrijednostima na kraju jednogodišnjeg praćenja (Biuret2 i MDRD2). Bolesnici u kompletnoj remisiji imali su 24h proteinuriju na kraju praćenja <0,3 grama, stabilne vrijednosti kontrolnog kreatinina ili porast procijenjene glomerularne filtracije (izračunate MDRD formulom). U bolesnika u parcijalnoj remisiji početna 24h proteinurija nefrotskog ranga je na kraju praćenja pala ispod 1 grama (ali ne ispod 0,3 grama) uz stabilnu glomerularnu filtraciju. Svi ostali bolesnici svrstani su u podskupine bez promjene ili progresija bolesti, ovisno o tome dali je 24h proteinurija ostala ista ili se povisila uz pad klirensa kreatinina na kraju praćenja. Glomerularna i tubulointersticijska ekspresija TGF-β1 nije bila povezana s tijekom bolesti u svim ispitivanim skupinama. Opažena je statistički značajno niža glomerularna ekspresije ET-1 u skupini IGAN bolesnika i u svih bolesnika koji su postigli remisiju (Tablice 55-57, Slika 54).

Tablica 55. Povezanost glomerularne ekspresije ET-1 u glomerulu na tijek bolesti u ispitivanim skupinama bolesnika

Skupina		ET1G skupine					Ukupno		
		0%	1-9%	10-29%	30-50%	51-100%			
IGAN	Kompletna remisija	N	0	6	0	5	0	11	
		%	0,0%	54,5%	0,0%	45,5%	0,0%	100,0%	
	Ishod	Parcijalna remisija	N	0	4	7	2	0	13
			%	0,0%	30,8%	53,8%	15,4%	0,0%	100,0%
		Bez promjene	N	0	1	2	0	0	3
			%	0,0%	33,3%	66,7%	0,0%	0,0%	100,0%
		Progresija	N	0	0	0	1	0	1
			%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%
Ukupno	N	0	11	9	8	0	28		
	%	0,0%	39,3%	32,1%	28,6%	0,0%	100,0%		
FSGS	Kompletna remisija	N	0	2	3	2	0	7	
		%	0,0%	28,6%	42,9%	28,6%	0,0%	100,0%	
	Ishod	Parcijalna remisija	N	1	2	3	2	0	8
			%	12,5%	25,0%	37,5%	25,0%	0,0%	100,0%
		Bez promjene	N	0	0	0	1	0	1
			%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%
		Progresija	N	0	1	1	1	0	3
			%	0,0%	33,3%	33,3%	33,3%	0,0%	100,0%
Ukupno	N	1	5	7	6	0	19		
	%	5,3%	26,3%	36,8%	31,6%	0,0%	100,0%		
MN	Kompletna remisija	N	0	9	2	3	0	14	
		%	0,0%	64,3%	14,3%	21,4%	0,0%	100,0%	
	Ishod	Parcijalna remisija	N	1	2	4	2	0	9
			%	11,1%	22,2%	44,4%	22,2%	0,0%	100,0%
		Bez promjene	N	0	2	0	0	1	3
			%	0,0%	66,7%	0,0%	0,0%	33,3%	100,0%
		Progresija	N	0	1	0	0	0	1
			%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%
Ukupno	N	1	14	6	5	1	27		
	%	3,7%	51,9%	22,2%	18,5%	3,7%	100,0%		
Ukupno	Kompletna remisija	N	0	17	5	10	0	32	
		%	0,0%	53,1%	15,6%	31,3%	0,0%	100,0%	
	Ishod	Parcijalna remisija	N	2	8	14	6	0	30
			%	6,7%	26,7%	46,7%	20,0%	0,0%	100,0%
		Bez promjene	N	0	3	2	1	1	7
			%	0,0%	42,9%	28,6%	14,3%	14,3%	100,0%
		Progresija	N	0	2	1	2	0	5
			%	0,0%	40,0%	20,0%	40,0%	0,0%	100,0%
Ukupno	N	2	30	22	19	1	74		
	%	2,7%	40,5%	29,7%	25,7%	1,4%	100,0%		

Tablica 56. Povezanost intenziteta glomerularne ekspresije ET-1 s tijekom glomerularne bolesti

Skupina		Vrijednost	df	P
IGAN	hi-kvadrat test	12,718	6	0,048
	Ukupni N	28		
FSGS	hi-kvadrat test	3,776	9	0,926
	Ukupni N	19		
MN	hi-kvadrat test	16,672	12	0,162
	Ukupni N	27		
Ukupno	hi-kvadrat test	21,904	12	0,039
	Ukupni N	74		



Slika 54. Povezanost glomerularne ekspresije ET-1 u bolesnika s IGAN s tijekom bolesti

Tubulointersticijska ekspresija ET-1 nije bila povezana s tijekom bolesti u pojedinim skupinama bolesnika već samo pozitivna tendencija ( $p=0,091$ ) u podskupini MN bolesnika (Tablica 57). Statistički značajna povezanost nađena je jedino u podskupini bolesnika koji nisu postigli remisiju (Tablica 58, Slika 55).

Tablica 57. Povezanost ekspresije ET-1 u tubulointersticiju i tjeka bolesti u ispitivanim skupinama bolesnika

Skupina		ET-1 TI skupine %				Ukupno	
		1-9%	10-29%	30-50%	51-100%		
IGAN	Ishod	Kompletna remisija	N 0	3	3	5	11
		% 0,0%	27,3%	27,3%	45,5%	100,0%	
		Parcijalna remisija	N 3	1	1	8	13
		% 23,1%	7,7%	7,7%	61,5%	100,0%	
	Bez promjene	N 0	2	1	0	3	
% 0,0%	66,7%	33,3%	0,0%	100,0%			
Progresija	N 0	1	0	0	1		
% 0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%			
Ukupno	N 3	7	5	13	28		
% 10,7%	25,0%	17,9%	46,4%	100,0%			
FSGS	Ishod	Kompletna remisija	N 0	2	1	4	7
		% 0,0%	28,6%	14,3%	57,1%	100,0%	
		Parcijalna remisija	N 2	1	2	3	8
		% 25,0%	12,5%	25,0%	37,5%	100,0%	
	Bez promjene	N 0	0	0	1	1	
% 0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	100,0%			
Progresija	N 0	2	0	1	3		
% 0,0%	66,7%	0,0%	33,3%	100,0%			
Ukupno	N 2	5	3	9	19		
% 10,5%	26,3%	15,8%	47,4%	100,0%			
MN	Ishod	Kompletna remisija	N 0	7	1	6	14
		% 0,0%	50,0%	7,1%	42,9%	100,0%	
		Parcijalna remisija	N 3	2	0	4	9
		% 33,3%	22,2%	0,0%	44,4%	100,0%	
	Bez promjene	N 0	1	1	1	3	
% 0,0%	33,3%	33,3%	33,3%	100,0%			
Progresija	N 1	0	0	0	1		
% 100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%			
Ukupno	N 4	10	2	11	27		
% 14,8%	37,0%	7,4%	40,7%	100,0%			
Ukupno	Ishod	Kompletna remisija	N 0	12	5	15	32
		% 0,0%	37,5%	15,6%	46,9%	100,0%	
		Parcijalna remisija	N 8	4	3	15	30
		% 26,7%	13,3%	10,0%	50,0%	100,0%	
	Bez promjene	N 0	3	2	2	7	
% 0,0%	42,9%	28,6%	28,6%	100,0%			
Progresija	N 1	3	0	1	5		
% 20,0%	60,0%	0,0%	20,0%	100,0%			
Ukupno	N 9	22	10	33	74		
% 12,2%	29,7%	13,5%	44,6%	100,0%			

Tablica 58. Povezanost intenziteta ekspresije ET-1 u tubulointersticiju i tijekom glomerularne bolesti.

<b>Skupina</b>		<b>Vrijednost</b>	<b>df</b>	<b>P</b>
IGAN	hi-kvadrat test	13,753	9	0,131
	Ukupni N	28		
FSGS	hi-kvadrat	7,55	9	0,580
	Ukupni N	19		
MN	hi-kvadrat	15,008	9	0,091
	Ukupni N	27		
Ukupno	hi-kvadrat	19,04	9	0,025
	Ukupni N	74		

## 8. RASPRAVA

### 8.1. IgA glomerulonefritis- opći dio

U radu je uključeno i praćeno tijekom godinu dana 35 bolesnika (26 muškaraca i 9 žena) s IgA nefropatijom dokazanom biopsijom bubrega. Iako je za postavljanje dijagnoze IgA nefropatije u većini slučajeva dovoljna histološka analiza bubrežnog tkiva svjetlosnim i imunofluorescentnim mikroskopom, bioptati svih bolesnika analizirani su i elektronskomikroskopski, kako bi se uz kliničku sliku i laboratorijske pretrage isključilo sekundarno porijeklo bolesti. Prosječna dob bolesnika (medijan) iznosila je 40 godina (IQ raspon od 19 do 70 godina) što je bilo očekivano statistički značajno manje ( $p=0,027$ ) u odnosu na dob druge dvije ispitivane skupine bolesnika (u obje skupine medijan 53 godine). Medijan indeksa tjelesne mase ( $26,9 \text{ kg/m}^2$ , IQ raspon  $16\text{-}35 \text{ kg/m}^2$ ) upućivao je da se radi pretežito o populaciji s povećanom tjelesnom težinom, ali ne u rangu pretilosti.

Ukupno 47% bolesnika imali su povišene vrijednosti krvnog tlaka, njih 8,6% III stupnja prema smjernicama Europskog društva za hipertenziju i kardiologiju. Hematurija, jedno od tipičnih kliničkih obilježja IgA nefropatije, zabilježena je u 86% bolesnika, a u njih 43% makrohematurija. Prosječne serumske vrijednosti kolesterola i LDL kolesterola bile su nešto iznad gornje referentne granice, a vrijednost serumskog HDL na donjoj referentnoj granici. Medijan serumske vrijednosti albumina bio je 35 gr/L (IQ raspon 6-48 gr/L) što je statistički značajno više ( $p<0,001$ ) nego u FSGS (medijan 21 gr/L, IQ raspon 10-52 gr/L) i MN skupini (27 gr/L, IQ raspon 14-53 gr/L), te u skladu s činjenicom da ipak manji postotak bolesnika s IGAN se prezentira kliničkom slikom nefrotskog sindroma (u našoj kohorti udio IGAN bolesnika s nefrotskim sindromom iznosio je 33%). Medijan 24-satne proteinurije na početku praćenja iznosio 2 gr/24h (IQ raspon 1,10-4,20 gr), odnosno na kraju praćenja 0,55 gr (IQ raspon 0,21-1,05 gr) uz medijan razlike Biuret2-Biuret1 -1.49 gr (IQ raspon -3,55 do -0,66 gr). U studiji nisu sudjelovali bolesnici s blažim oblikom bolesti uzevši u obzir kriterij veličine 24-satne proteinurije, tj. bolesnici s vrijednostima 24-satne proteinurije  $< 1 \text{ gr/24h}$ . Razlog tome je dizajn istraživanja prema kojemu smo pratili one bolesnike kod kojih je proteinurija predmnijevano u cijelosti ili većinom bila posljedica osnovne etiopatogenetske naravi bolesti (mezangioproliferacija i nakupljanje IgA imunih kompleksa), za razliku od onih bolesnika gdje je proteinurija moguće bila djelom ili čak većinom posljedica drugih posrednih



čimbenika (hipertenzija, tjelesna masa, tranzitorni neprepoznati febrilitet i uroinfekt koji je prethodio hospitalizaciji itd.) što je veća vjerojatnost u bolesnika s proteinurijom  $< 1\text{gr}/24\text{h}$  u odnosu na one s proteinurijom  $>1\text{gr}/24\text{h}$ . U skladu s navedenim, otvorilo se pitanje praćenja povezanosti ekspresije ispitivanih citokina s visinom proteinurije. Mogući odgovor na ovakvo pitanje nalazimo u činjenici da je gotovo svaki treći bolesnik imao 24h proteinuriju nefrotskog ranga, stoga je bilo moguće cijelu skupinu IGAN bolesnika razvrstati u manje podskupine tj. one s proteinurijom nenefrotskog i nefrotskog ranga, te među njima provjeriti eventualnu razliku u intenzitetu ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1.

Ekskrecijska bubrežna funkcija provjerena je na početku praćenja (medijan serumskog kreatinina iznosio je  $107\ \mu\text{mol}/\text{L}$ , IQ raspon  $67\text{-}326\ \mu\text{mol}/\text{L}$ ), te na kraju praćenja (medijan  $98\ \mu\text{mol}/\text{L}$ , IQ raspona  $72,50\text{-}110,25\ \mu\text{mol}/\text{L}$ ), uz određivanje procijenjene glomerularne filtracije na početku (medijan  $69\ \text{mL}/\text{min}/1,73\ \text{m}^2$ , IQ raspon  $52\text{-}82\ \text{mL}/\text{min}/1,73\ \text{m}^2$ ) i na kraju praćenja (medijan  $72,25\ \text{mL}/\text{min}/1,73\ \text{m}^2$ , IQ raspon  $52\text{-}98\ \text{mL}/\text{min}/1,73\ \text{m}^2$ ). Nađeno je da je serumska koncentracija kreatinina na početku praćenja bila nešto viša u IGAN bolesnika nego u FSGS (medijan  $94\ \mu\text{mol}/\text{L}$ , IQ raspon  $80\text{-}136,50\ \mu\text{mol}/\text{L}$ ) i MN skupini (medijan  $93,50\ \mu\text{mol}/\text{L}$ , IQ raspon  $79\text{-}105,25\ \mu\text{mol}/\text{L}$ ), no bez statističkog značaja. Medijan promjene procijenjene glomerularne filtracije (MDRD2-MDRD1) na kraju praćenja iznosio je  $9\ \text{mL}/\text{min}/1,73\ \text{m}^2$  što sugerira dobar oporavak bubrežne funkcije u praćenom periodu. Uvidom u navedene vrijednosti parametara bubrežne ekskrecijske funkcije, možemo reći da je u kohorti IGAN bilo malo bolesnika s uznapredovalim stadijem kronične bubrežne insuficijencije. Razlog tome je selekcija bolesnika na početku praćenja kada se isključilo bolesnike kod kojih je intersticijska fibroza bubrežnog bioptata iznosila preko 75% bubrežnog parenhima. Time se htjelo spriječiti nekoliko nepovoljnih mogućnosti na tijek istraživanja. Naime, poznato je da je ekspresija TGF- $\beta$ 1 u dijelovima bioptata s visokim stupnjem fibroze praktički nemjerljiva, a određeni dio tih bolesnika zbog razvoja završnog stadija kronične bubrežne insuficijencije odlazi u matične ustanove zbog planiranja nadomjesnog bubrežnog liječenja, te postaju nedostupni za daljnje adekvatno praćenje. S druge strane podskupina IGAN bolesnika s visokom serumskom koncentracijom kreatinina koja se prezentira brzoprogresivnim glomerulonefritisom (uz relativno mali udio fibroze u intersticiju) je epidemiološki relativno rijetka.

Što se tiče zabilježenih histoloških obilježja možemo ih podijeliti u svjetlosnomikroskopska, imunofluorescentna i elektronskomikroskopska. Uz to, u svakoj od skupina bolesnika,

opisana su zajednička histološka obilježja koja su prisutna u svim skupinama, te posebne histološke karakteristike specifične svakoj pojedinoj skupini bolesnika, odnosno obliku glomerularne bolesti. Od zajedničkih histoloških varijabli, promjene na krvnim žilama, hijalinoza arteriola bila je prisutna u gotovo 2/3 bolesnika s IGAN uglavnom blagog i umjerenog stupnja (u IGAN više od drugih skupina ali bez statističke značajnosti), dok je fibrointimalno zadebljanje arterija (većinom u blagom i srednjem stupnju) nađeno u približno 1/3 bolesnika (više od FSGS, manje od MN skupine). Varijabla prosječni udio intersticijske fibroze bila je također najviša u IGAN bolesnika (uz pozitivnu tendenciju bez statistički dosegnute značajnosti), dok je indeks ozljede tkiva bio statistički značajno veći ( $p < 0,001$ ) u IGAN skupini (medijan 0,47), zatim u FSGS (medijan 0,27), pa u MN (0,15). Upalna infiltracija intersticija nađena je u 40% bolesnika, što je bilo više nego u bolesnika s FSGS (25%) i MN (15,6%), ali bez statističke značajnosti. Imunofluorescentno bojanje za C3 komponentu komplementa (uglavnom verificiran 1. i 2. stupanj intenziteta) bilo je pozitivno u 80% IGAN bolesnika, što je bilo slično kao u MN skupini (85%), te značajno više ( $p < 0,001$ ) od FSGS skupine (8,3%).

Usporedba varijabli upalne infiltracije intersticija i udjela intersticijske fibroze koje obje pokazuju tendenciju veće vrijednosti u IGAN skupini, zapravo valja povezati s patofiziološkim obrascem prema kojem mjesto upale s vremenom razvija se u mjesto fibroze. Slično vrijedi u pogledu razmatranja varijable indeks ozljede (valja se podsjetiti kako ona ovisi o broju skleroziranih glomerula), a vidjeli smo da je glomerularna ekspresija C3 komplementa bila osobito izražena u IGAN bolesnika, što ukazuje na aktivnu imunološku upalu u neskleroziranim glomerulima i neskleroziranim segmentima skleroziranih glomerula.

Slijedi analiza nekoliko IGAN specifičnih histoloških varijabli. Glomerularna imunofluorescentna ekspresija IgA bila je semikvantitativno 3+ u 45% bolesnika. U 20% bolesnika nađena je nekroza uz prisutnost polumjeseca, u 4,3% bolesnika nađeni su celularni polumjeseci, u 3,4% fibrozni, u 2,6% fibrocelularni polumjeseci.

U pogledu Oxfordske klasifikacije, M- mezangijska proliferacija u preko 50% glomerula nađena je u 55% bolesnika, E-endokapilarna proliferacija u 40% bolesnika, S- skleroza mezangija u 60%, te T- tubularna atrofija i intersticijska fibroza u 43% bolesnika i to u njih 5% T2 (uznapredovala), a u 37% T1 (blaga do umjerena). Visoki udio bolesnika sa S1 i T1 odgovara malo prije spomenutom visokom indeksu ozljede, gdje se upravo udio intersticijske

fibroze nalazi u nazivniku jednadžbe za izračunavanje indeksa ozljede.

Gledajući elektronskomikroskopske karakteristike, raspored imunokompleksa u glomerulu, očekivano u 100% bolesnika nađeni su depoziti IgA u mezangiju, uz to još u 15% bolesnika subepitelno, u 50% subendotelno, te u još gotovo 24% intramembranski, što sve zajedno govori u prilog vrlo intenzivne imunološke upale.

### **8.1.1. IgA glomerulonefritis i TGF- $\beta$ 1**

Unutar IGAN skupine ekspresija TGF- $\beta$ 1 u glomerulima bila je statistički značajno povezana s tubulointersticijskom ekspresijom TGF- $\beta$ 1 ( $p=0,011$ ). U literaturi nalazimo jedan rad kineske skupine autora koji navedenu povezanost nisu pronašli (186).

U našem istraživanju, intenzitet imunoekspresije TGF- $\beta$ 1 u glomerulu i tubulointersticiju nije bio značajno veći od intenziteta ekspresije TGF- $\beta$ 1 u kontrolnoj skupini, a istovjetne rezultate našima nalazimo u nekolicini radova (191, 199, 201). Međutim, u literaturi nalazimo i radove u kojima je opisana povećana ekspresija TGF- $\beta$ 1 i to samo u glomerulima (190), odnosno i u glomerulima i tubulointersticiju (180). Za varijable dob, spol, indeks tjelesne mase, serumski kolesterol i albumini, te hipertenzija, nismo našli povezanost s ekspresijom TGF- $\beta$ 1, kao niti za varijablu hematurije, no interesantno je da je makrohematurija značajno rjeđe nađena u bolesnika s višim tubulointersticijskim stupnjem imunoekspresije TGF- $\beta$ 1, za što nismo našli slične podatke u literaturi. Što se tiče ekspresije TGF- $\beta$ 1 i serumske koncentracije IgA u našem radu nije nađena povezanost, kao niti u radu Han i sur. (179), dok je u jednom drugom radu nađena značajna pozitivna korelacija (186). U kontekstu analize histoloških parametara, samo neki među radovima, nalaze povezanost ekspresije TGF- $\beta$ 1 sa stupnjem glomeruloskleroze (189), te uznapredovalosti tubulointersticijske fibroze (187, 189, 197, 198), dok se u drugim radovima (uključujući i naše rezultate) ne nalazi takva povezanost (173, 200, 201). U prospektivnom prikazu Eikmansa i sur., suprotno rezultatima većine navedenih studija, glomeruloskleroza bila je manje izražena u bolesnika s većom tubulointersticijskom ekspresijom mRNA TGF- $\beta$ 1 (183). U ovom kontekstu, mi smo opisali gotovo statistički značajnu negativnu korelaciju udjela fibroznih polumjeseca s tubulointersticijskom ekspresijom TGF- $\beta$ 1. Nađena je pozitivna tendencija glomerularne ekspresije TGF- $\beta$ 1 i prisutnosti polumjeseca, bez značajnih razlika među pojedinim podvrstama polumjeseca. Drugi radovi ističu pojačanu ekspresiju TGF- $\beta$ 1 upravo u zdravim

segmentima skleroziranih glomerula, te u glomerulima s polumjesecima (191, 198), pri tome ne izdvajajući histološku podvrstu polumjeseca. U našem radu nismo našli povezanost ekspresije TGF- $\beta$ 1 sa prisutnošću nekroze kao niti sa stupanjem proliferacije mezangija (definiran u Oxfordskoj klasifikaciji), dok u literaturi u nekoliko radova ekspresija mRNA TGF- $\beta$ 1 (176, 178) i TGF- $\beta$ 1 (184, 200) bila je pojačana samo u glomerulima s višim stupnjem mezangioproliferacije. Statistički značajna negativna korelacija nađena je između glomerularne ekspresije TGF- $\beta$ 1 i stupnja tubulointersticijske fibroze, a tubulointersticijska ekspresija TGF- $\beta$ 1 bila je u negativnoj korelaciji s varijablom fibrointimalnog zadebljanja arteriola, a u jednoj studiji navedene korelacije nisu bile statistički značajne (180). Morfološke varijable stupanj ekspresije IgA i C3 u glomerulu (definirane imunofluorescentnom mikroskopijom), kao niti veličina tubulointersticijske infiltracije upalnim stanicama nisu bili u značajnoj korelaciji sa stupnjem ekspresije TGF- $\beta$ 1, a slično je nađeno i u jednoj korejskoj retrospektivnoj studiji (179). Također, niti za elektronskomikroskopski definiranu histološku varijablu raspodjele imunih kompleksa u glomerulu, nismo našli povezanost sa stupnjem ekspresije TGF- $\beta$ 1 niti smo u drugim radovima pronašli ispitivanje takvih korelacija. Razmatrajući povezanost ekspresije TGF- $\beta$ 1 s bubrežnim funkcionalnim parametrima dobili smo sljedeće rezultate. Serumaska koncentracija kreatinina na početku praćenja nije bila povezana s ekspresijom TGF- $\beta$ 1, no serumaska koncentracija kreatinina na kraju praćenja bila je u statistički značajnoj negativnoj korelaciji s glomerularnom ekspresijom TGF- $\beta$ 1 (uz tendenciju pozitivne korelacije s procijenjenom glomerularnom filtracijom na kraju praćenja). U dva istraživanja nije nađena povezanost ekspresije mRNA TGF- $\beta$ 1 s vrijednostima serumskog kreatinina (173, 181). Dvije retrospektivne studije opisale su povećanu ekspresiju mRNA TGF- $\beta$ 1 (179) i TGF- $\beta$ 1 (201) u tubulointersticiju s porastom serumskog kreatinina tijekom trajanja istraživanja, dok u trećem retrospektivnom istraživanju takva korelacija nije dokazana (187). Slično našim rezultatima, u prospektivnoj studiji Eikmansa i sur., nakon godine dana praćenja zabilježen je porast glomerularne filtracije u bolesnika s većom tubularnom ekspresijom mRNA TGF- $\beta$ 1 (183). U drugom prospektivnom radu s praćenjem 51 bolesnika tijekom 2 godine, Brabcova i sur. našli su multivarijatnom analizom statistički značajnu pozitivnu povezanost ekspresije TGF- $\beta$ 1 s porastom serumskog kreatinina (180).

Za razliku od naših rezultata koji ne upućuju na značajnu povezanost veličine proteinurije sa stupnjem ekspresije TGF- $\beta$ 1 (osim pozitivne tendencije jačine tubulointersticijske ekspresije

na smanjenje pada proteinurije), u nekoliko radova opisuje se pozitivna povezanost veličine tubularne ekspresije mRNA TGF- $\beta$ 1 i TGF- $\beta$ 1 s veličinom proteinurije (177), a među njima i u dvije retrospektivne studije na porast proteinurije (179, 201). Usporedivo pak našim rezultatima, u nekim istraživanjima nije nađena povezanost ekspresije mRNA TGF- $\beta$ 1 s veličinom proteinurije (173), kao niti za povezanost ekspresije TGF- $\beta$ 1 u jednoj retrospektivnoj studiji (187). Što se tiče prospektivnih studija, nije nađena povezanost ekspresije mRNA TGF- $\beta$ 1 na porast proteinurije (180). Štoviše, u ranije citiranoj prospektivnoj studiji Eikmansa i sur., nađena je negativna korelacija između pada proteinurije tijekom godine dana praćenja i tubularne ekspresije mRNA TGF- $\beta$ 1 (183).

Sažeto rečeno, rezultate u našem radu (ekspresiju TGF- $\beta$ 1 jednaku onoj u kontrolnoj skupini) djelomično možemo promatrati u svjetlu činjenice da je praktično 100% bolesnika u našem istraživanju prije biopsije bubrega bilo izloženo dužem ili kraćem djelovanju jednog ili više RAAS blokatora, a prema literaturi izloženost RAAS blokatorima uzrokuje značajan i brz pad ekspresije TGF- $\beta$ 1 u tkivu bubrega. Povezanost i međudjelovanje ATII (središnji efektor RAAS i ciljni supstrat RAAS blokatora) i TGF- $\beta$ 1 u bubregu je višestruko, ostvaruje se u svim intrinzičnim populacijama stanica, u krvnim žilama (319), mezangiju (320) i podocitima (321), te tubulocitima (322, 323). Dobro je poznato i eksperimentalno dokazano da RAAS blokatori intenzivno inhibiraju sintezu TGF- $\beta$ 1 u bubrezima (162, 173).

U literaturi u znatnom broju radova ne nalazimo podatak o udjelu bolesnika s predbioptičkim liječenjem RAAS blokatorima. U radovima u kojima se taj podatak ipak navodi, uzimanje RAAS blokatora u predbioptičkom periodu varira od 50% (187), preko 60 % (180, 196) i 80% (201), pa sve do 100% bolesnika (172). U radovima u kojima se navodi da svi ili većina bolesnika nisu uzimali RAAS blokatore, uglavnom se opisuje ekspresija TGF- $\beta$ 1 veća od one u kontrolnoj skupini, dok u radovima s visokim udjelom bolesnika na RAAS blokatorima češće nalazimo suprotne zaključke. Tako npr. u radu Shina i suradnika, proučavana je bubrežna ekspresija mRNA TGF- $\beta$ 1, te koncentracija TGF- $\beta$ 1 u serumu i urinu u 36 bolesnika s IgA nefropatijom (173). U 16 od 26 bolesnika nađeno je da su prosječno 80 dana prije biopsije bubrega uzimali ACE inhibitor ili ATIIR<sub>1</sub> antagonist. U bolesnika koji su uzimali RAAS blokatore prije biopsije bubrega, bubrežna ekspresija gena za TGF- $\beta$ 1 nije se razlikovala od ekspresije u kontrolnoj skupini, dok je u podskupini bolesnika koji nisu uzimali RAAS blokatore bila statistički značajno veća. Koncentracija TGF- $\beta$ 1 u krvi i mokraći nije se razlikovala među bolesnicima koji su uzimali i koji nisu uzimali RAAS

blokator. Sličan učinak antagonista AT<sub>1</sub>R, te spironolaktona u svojoj studiji s IGA bolesnicima pokazali su Ihm i suradnici (162).

### **8.1.2. IgA glomerulonefritis i ET-1**

Ekspresija ET-1 u glomerulima bila je statistički značajno povišena ( $p < 0,001$ ) u odnosu na glomerularnu ekspresiju u kontrolnoj skupini, dok tubulointersticijska ekspresija u pojedinim podskupinama bolesnika nije se razlikovala od one u kontrolnoj skupini. Valja međutim naglasiti da kada su uzete u obzir zajedno sve tri podskupine bolesnika s glomerulonefritisom, nađena je značajno veća ( $p = 0,022$ ) i tubulointersticijska ekspresija u odnosu na kontrolnu skupinu. Istovjetan nalaz našem našli su Zanatta i suradnici (306). U jednom drugom radu nađena je povećana ekspresija ET-1 samo u tkivu bolesnika s uznapredovalim fibrotskim promjenama i to jače u tubulointersticiju nego u glomerulima (198). U njemačkoj velikoj studiji Lehrke i suradnika, također je nađena povećana i glomerularna i tubulointersticijska ekspresija (307). Značajno je da u navedenoj studiji, ekspresija ET-1 bila je veća u bolesnika s 24-satnom proteinurijom većom od 2 grama i klirensom kreatinina manjim od 80 mL/min, te u onih bolesnika koji nisu uzimali ACE inhibitore (307). U istaknutoj studiji dodatno je navedeno kako je proteinurija korelirala samo s intenzitetom tubularne ekspresije ET-1 (ne i sa stupnjem glomerularne ekspresije ET-1). Zannata je pak našao povezanost tubularne ekspresije ET-1 s veličinom proteinurije, ali ne i s glomerularnom filtracijom (306). U našem istraživanju nije nađena značajna korelacija bubrežne ekspresije ET-1 niti s proteinurijom niti s procijenjenom glomerularnom filtracijom prilikom biopsije bubrega.

Nismo našli povezanost demografskih obilježja (spol, dob), te kliničkih (hipertenzija, hematurija, indeks tjelesne mase) s ekspresijom ET-1. U našem radu nađena je pozitivna tendencija intenziteta glomerularne ekspresije ET-1 i koncentracije serumskog kolesterola ( $p = 0,096$ ), dok je za varijablu serumski LDL nađena statistički značajna pozitivna korelacija s glomerularnom ekspresijom ET-1 ( $p = 0,027$ ). Vrijednosti HDL nisu pokazale značajnih korelacija s ekspresijom ET-1, dok razinu serumskih triglicerida nismo ispitivali, a u literaturi našli smo jedan rad koji je ukazivao na hipertrigliceridemiju kao rizični čimbenik razvoja IGA nefropatije (324). Osim navedenih nisu nađene druge značajne korelacije ispitivanih varijabli biokemijskih krvnih nalaza s bubrežnom ekspresijom ET-1.

Što se tiče numeričkih mikroskopskih (histoloških) varijabli, nađena je pozitivna tendencija porasta udjela fibrocelularnih polumjeseca s tubulointersticijskom ekspresijom ET-1 ( $p=0,079$ ). Slično tomu, Rastaldi, kod bolesnika s uznapredovalom glomerulosklerozom, zabilježio je umjereno povišeni intenzitet ekspresije ET-1 u tubulointersticiju (198). Ako gledamo varijable Oxfordske klasifikacije bolesti, nalazimo negativnu tendenciju između stupnja skleroze glomerula (S) i glomerularne ekspresije ET-1 ( $p=0,067$ ). S druge strane, nalazimo statistički pozitivnu korelaciju varijable endokapilarna proliferacija (E) kao znaka aktivnosti upale s glomerularnom ekspresijom ET-1. U glomerulima s nekrozom, nismo našli statistički značajno veću ekspresiju ET-1 u odnosu na glomerule bez nekroze. Rastaldi i suradnici nisu pak našli pojačanu ekspresiju ET-1 u polumjesecima (198).

Također u našem, kao i drugim radovima nije nađena povezanost ekspresije ET-1 s histološkim obilježjima imunofluorescentne niti elektronske mikroskopije.

U našem istraživanju bolesnici koji su nakon godine dana praćenja postigli kompletnu ili parcijalnu remisiju, imali su statistički značajno manju glomerularnu ekspresiju ET-1 ( $p=0,048$ ) u odnosu na one bez odgovora na liječenje ili s progresijom bolesti.

Zaključno, možemo reći da imunohistokemijskim određivanjem ekspresije ET-1 u bubrežnim biopstatima, u bolesnika s IGAN možemo predvidjeti one s većim rizikom od progresije bolesti. Dobiveni rezultati mogu biti razlogom razmatranja uvođenja imunosupresivne terapije u bolesnika s IGAN s dokazanom jakom imunoekspresijom ET-1 u bubrežnim biopstatima.

## **8.2. Fokalna segmentalna glomeruloskleroza- opći dio**

U radu je uključeno 24 bolesnika s FSGS, od toga 14 muškaraca i 10 žena, medijan dobi bio je 53 godine (IQ raspon 19-79 godina), što ukazuje da je populacija FSGS bolesnika bila nešto starije životne dobi od populacije bolesnika s IGAN, te istovjetne prosječne dobi populaciji bolesnika s MN. Medijan indeksa tjelesne mase iznosio je  $26,9 \text{ kg/m}^2$  (IQ raspon  $19-35 \text{ kg/m}^2$ ) što je bitno zbog poznate činjenice kako je u pretilih učestaliji oblik sekundarnog FSGS, dok smo u ovom radu upravo takve i druge sekundarne oblike FSGS isključili iz analize. Kod 55% bolesnika zabilježena je hipertenzija, uglavnom I stupnja. Visoki udio bolesnika od 70% imao je hematuriju (niti jedan makrohaturiju), što je nešto

više nego prema literaturi gdje se hematurija spominje u 20-40% bolesnika (325). U pogledu varijabli LDL (medijan 5,15 mmol/L, IQ raspon 1,60-11 mmol/L) i ukupnog kolesterola (medijan 8,35 mmol/L, IQ raspon 4,60-18,70 mmol/L) bolesnici u skupini FSGS pokazali su značajno više vrijednosti u odnosu na one u IGAN skupini ( $p=0,001$ ) i tek diskretno više od MN bolesnika, što je u skladu s tipičnom kliničkom prezentacijom nefrotskog sindroma u tih bolesnika. U skladu s kliničkom slikom, u bolesnika s FSGS nađene su najviše vrijednosti 24-satne proteinurije među sve tri skupine bolesnika (medijan 10,35 gr, IQ raspon 1-33,25 gr,  $p<0,001$ ), te najmanje vrijednosti serumskih albumina (medijan 21 gr, IQ raspon 15,25-32,25 gr,  $p<0,001$ ). Iznos 24h proteinurije na kraju praćenja, varijabla Biuret<sub>2</sub>, iznosila je 0,8 gr (medijan) uz IQ raspon (0-7,5 gr), što sugerira povoljan klinički tijek uz liječenje (RAAS blokator s glukokortikosteroidom s ili bez imunosupresiva). Medijan serumske koncentracije početnog kreatinina iznosio je 94  $\mu\text{mol/L}$  (IQ raspon 80-136,25  $\mu\text{mol/L}$ ), uz procijenjenu glomerularnu filtraciju 67,85  $\mu\text{mol/L}/1,73\text{m}^2$  (medijan) i IQ raspon 23,70-120,80  $\mu\text{mol/L}/1,73\text{m}^2$ . Na kraju praćenja, vrijednost serumskog kreatinina iznosila je 93,50  $\mu\text{mol/L}$  (medijan) uz IQ raspon 56-176  $\mu\text{mol/L}$ , a procijenjena glomerularna filtracija 65,90  $\mu\text{mol/L}/1,73\text{m}^2$  (medijan) uz IQ raspon (36-117,20  $\mu\text{mol/L}/1,73\text{m}^2$ ). Iz navedenih varijabli bubrežne ekskrecijske funkcije, možemo zaključiti da u većine bolesnika nije došlo do progresije bubrežne insuficijencije.

Što se tiče histoloških varijabli, FIZA je nađena u 30% bolesnika, a HA u 40%, u oba slučaja većinom blagog stupnja. U 25% bolesnika nađena je upalna infiltracija intersticija što je manje u odnosu na IGAN (40%), a nešto više prema MN skupini (15%) (bez statističke značajnosti). Varijabla IS imala je medijan 0,47 (IQ raspon 0,15-0,42), što je bilo statistički značajno manje od IS u IGAN i nešto veći od MN skupine. Varijabla IF imala je medijan 7,50% (IQ raspon 0-20%), što je histološka potvrda da su bolesnici bioptirani u ranijem stadiju bolesti. C3 komponenta komplementa nađena je pozitivna samo u 8% bolesnika što je statistički značajno manje nego u IGAN bolesnika (80%) i MN bolesnika (85%), za razliku od IgM imunokompleksa koji su nađeni u 42% bolesnika s FSGS. Ultrastrukturno gledajući, raspodjela bolesnika prema važećoj Columbia klasifikaciji bila je sljedeća: perihilarna FSGS 4%, klasični oblik i tip varijanta po 42%, te celularni 12%. Većina radova, osim u njih dva (202, 203, 204), nije izdvojila jesu li tijekom ispitivanja razdvojili podskupine primarne i sekundarne fokalne segmentalne glomeruloskleroze, niti su pokazali raspored odnosno udio bolesnika prema Columbia klasifikacijskim kriterijima, osim u jednom radu (202).



### 8.2.1. Fokalna segmentalna glomeruloskleroza i TGF- $\beta$ 1

U FSGS bolesnika, nađena je pozitivna statistički značajna korelacija između TGF- $\beta$ 1 u glomerulu i TGF- $\beta$ 1 u tubulointercijiju ( $p=0,000$ ), te između TGF- $\beta$ 1 u tubulointercijiju i ET-1 u glomerulu ( $p=0,012$ ). Pregledom literature nismo našli na ovakav način ispitivane korelacije. Navedeni rezultat može sugerirati da pojačana ekspresija ET-1 u glomerulu potiče distalnu ekspresiju TGF- $\beta$ 1.

Intenzitet imunoekspresije TGF- $\beta$ 1 u glomerulu i tubulointercijiju nije bio značajno veći od intenziteta ekspresije TGF- $\beta$ 1 u nalazu biopsata kontrolne skupine. Slično kao i za rezultate ispitivanja ekspresije TGF- $\beta$ 1 u IGAN bolesnika, ovakav nalaz najvjerojatnije barem djelomično odgovara činjenici da su gotovo svi ispitanici u našem istraživanju prije biopsije bubrega kraće ili duže vrijeme uzimali RAAS blokatore, dok u nekim studijama bolesnici prije biopsije bubrega nisu uzimali RAAS blokatore (172). U pregledu literature nalazimo radove koji su našli značajnu ekspresiju TGF- $\beta$ 1 u glomerulu (174, 184, 195, 203) i tubulointercijiju (172, 174, 184, 197, 199, 202, 203, 204), no postoje i radovi koji sukladno našim rezultatima nisu našli statistički značajnu ekspresiju u glomerulu (187, 197, 199, 202). U radu Danilewicza i suradnika, tubulointercijijska ekspresija TGF- $\beta$ 1 bila je intenzivnija u bolesnika s primarnom nego u bolesnika sa sekundarnom FSGS (202).

Već smo ranije rekli da je prosječna životna dob bolesnika s FSGS bila značajno veća u odnosu na bolesnike s IGAN. Uz to, u bolesnika s FSGS, ekspresija TGF- $\beta$ 1 u tubulointercijiju imala je tendenciju porasta blizu statističke značajnosti s porastom dobi ( $p=0,059$ ). U radu Alexopoulos i sur. je naglašeno kako je dob bila jedna od statistički značajnih pozitivnih prediktora bubrežnog preživljenja u bolesnika s FSGS, no autori nisu našli statistički značajne povezanosti varijable dob i ekspresije TGF- $\beta$ 1 (204). Naime, poznato je da s porastom dobi napreduje proces starenja svih organa tako i bubrega, u kojima se za svaku dekadu života u prosjeku smanjuje klirens kreatinina za 10 ml/min, a prema nekim izvještajima i broj nefrona (za otprilike 5000 nefrona po bubregu za svaku godinu), što prema Brickerovoj teoriji adaptacije na stres, podrazumijeva progresivno smanjivanje bubrežne funkcionalne rezerve osobito u uvjetima dodatnog opterećenja i ozljeda u bubregu, u što ubrajamo i proteinuriju nefrotskog ranga u FSGS bolesnika (42). Za druge numeričke varijable, indeks tjelesne mase, koncentracija lipida u krvi, kreatinin na početku i kraju praćenja, procijenjena glomerularna filtracija na početku i kraju praćenja, 24-satna

proteinurija na početku i kraju praćenja, serumska vrijednost albumina, nije pokazano statistički značajne povezanosti s bubrežnom ekspresijom TGF- $\beta$ 1, kao niti za kategorijske varijable spol, hipertenzija, hematurija, stupanj glomerularne ekspresije C3 i IgM. Za razliku od naših rezultata, neki radovi nalaze pozitivnu korelaciju između veličine proteinurije i ekspresije TGF- $\beta$ 1 u tubulointerciciju (172). S druge strane retrospektivna studija Alexopoulos i sur. pokazala je pozitivnu povezanost tubulointercicijske (ali ne i glomerularne) ekspresije TGF- $\beta$ 1 i kreatinina prilikom biopsije bubrega, te nakon 55 mjeseci praćenja, no bez utvrđene nezavisne prediktivne vrijednosti (204). Drugi radovi, poput našeg, ne nalaze značajne korelacije ekspresije TGF- $\beta$ 1 niti s proteinurijom niti sa serumskim kreatininom (203). U jednoj prospektivnoj studiji, ekspresija mRNA TGF- $\beta$ 1 bila je nakon godine dana praćenja u negativnoj povezanosti s proteinurijom, a intenzitet ekspresije TGF- $\beta$ 1 u tubulointerciciju prilikom biopsije bubrega u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji s glomerularnom filtracijom (183).

(183). U pogledu korelacija varijabli morfoloških promjena i tkivne ekspresije TGF- $\beta$ 1, jedina pozitivna tendencija, ali bez statističke značajnosti, nađena je između stupnja hijalinoze arteriola i intersticijske ekspresije TGF- $\beta$ 1. U drugim radovima ne opisuje se povezanost između promjena na bubrežnim krvnim žilama i bubrežne ekspresije TGF- $\beta$ 1. U nekoliko radova spominje se statistički značajna povezanost između glomerularne ekspresije TGF- $\beta$ 1 i glomerularne skleroze (203) odnosno tubulointercicijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i fibroze intersticija (197, 203). Već navedena prospektivna studija Eikmansa i suradnika, pokazala je negativnu povezanost tubulointercicijske ekspresije mRNA TGF- $\beta$ 1 sa stupnjem glomeruloskleroze (183). U našem radu nije nađena povezanost ekspresije TGF- $\beta$ 1 i glomeruloskleroze odnosno intersticijske fibroze. U radu Danilewicza i suradnika tubulointercicijska ekspresija TGF- $\beta$ 1 korelirala je obrnuto proporcionalno sa stupnjem upalne infiltracije (202), dok je suprotno pokazala jedna grčka skupina autora (172). U našem radu nismo našli značajne povezanosti upalne infiltracije intersticija i ekspresije TGF- $\beta$ 1. Najveće razlike među radovima u literaturi jesu upravo oko glomerularne ekspresije TGF- $\beta$ 1, gdje neki ističu intenzivnu ekspresiju upravo u skleroziranim glomerulima (195) ili u zdravim segmentima skleroziranih glomerula (203), dok drugi (kao i naše istraživanje) ne nalaze istaknute korelacije (187, 197, 199, 202). Za razliku od drugih radova, mi smo bolesnike razvrstali u podskupine prema Columbia klasifikaciji, no nije nađena značajna razlika među pojedinim podskupinama u odnosu na tkivnu ekspresiju TGF- $\beta$ 1.

### **8.2.2. Fokalna segmentalna glomeruloskleroza i ET-1**

Ekspresija ET-1 u glomerulima bila je u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji s ekspresijom ET-1 u tubulointercijiju ( $p=0,008$ ), te s ekspresijom TGF- $\beta$ 1 u glomerulima ( $p=0,038$ ) i TGF- $\beta$ 1 u tubulointercijiju ( $p=0,012$ ). U literaturi ne nalazimo ispitivanje navedenih korelacija.

Intenzitet imunoekspresije ET-1 u glomerulu (medijan 1,6, IQ raspon 1,2-2,5) bio je statistički značajno veći od intenziteta ekspresije ET-1 u glomerulu kontrolne skupine (medijan 0,2, IQ raspon 0,0-0,5). Za ekspresiju ET-1 u tubulointercijiju nije nađena statistički značajna razlika. Kao i u našem istraživanju, Nagai i suradnici našli su statistički značajnu ekspresiju u glomerulima, ali i u krvnim žilama u odnosu na kontrolnu skupinu (308). Murer i suradnici našli su pozitivnu ekspresiju ET-1 i u glomerulu i tubulocitima, no moramo naglasiti da je u istraživanje bila uključena pedijatrijska populacija (326).

Niti jedna od ispitivanih numeričkih kliničkih, biokemijskih niti histoloških varijabli nije nađena u značajnoj korelaciji s glomerularnom ili tubulointercijijskom ekspresijom ET-1.

Što se tiče kategorijskih varijabli, muški spol imao je tendenciju jače ekspresije ET-1 u glomerulu (medijan 1,7, IQ raspon 1,3-2,6) u odnosu na ženski spol (medijan 1,1, IQ raspon 0,7-2,2), ali bez statističke značajnosti. Od histoloških kategorijskih varijabli, veličina hijalinoze arteriola bila je u statistički značajnoj pozitivnoj povezanosti s jačinom glomerularne ekspresije ET-1 ( $p=0,014$ ). Isto je nađeno u radu Nagaia i suradnika (308). S obzirom da smo također u iste skupine bolesnika našli gotovo statistički značajnu pozitivnu korelaciju varijable HA sa stupnjem tubulointercijijske ekspresije TGF- $\beta$ 1, moguće je da interakcija ova dva citokina utječe na promjenu morfologije malih krvnih žila u bubregu bolesnika s FSGS. Među klasifikacijskim podskupinama bolesnika (određenima Columbia klasifikacijom) nije nađena razlika u jačini bubrežne ekspresije ET-1, dok u drugim radovima nismo našli sličnih ispitivanja.

### **8.3. Membranski glomerulonefritis- opći dio**

U istraživanju je sudjelovalo 17 muškaraca (53,1%) i 15 žena (46,9%) s medijanom dobi 53,50 godina (IQ raspon 41,50-57,50). Medijan indeksa tjelesne mase iznosio je 28,50 kg/m<sup>2</sup> (IQ raspon 25-31,50), što je nešto više, ali bez statističke razlike u odnosu na skupinu IGAN i

FSGS. Oko 40% bolesnika imalo je hipertenziju, većinom 1. stupnja. Hematurija zabilježena je u 80% bolesnika, što je više nego u literaturi gdje se kreće između 30-50%, ali niti jedan bolesnik nije imao makrohaturiju, dok prema literaturi je ona prisutna u do 5% bolesnika s MN (310). Navedene razlike moguće su posljedica različito postavljenih kriterija hematurije (broj eritorcita u vidnom polju sedimenta urina) u različitim radovima. Procijenjena glomerularna filtracija iznosila je 75,40 mL/min/1,73m<sup>2</sup> (medijan) uz IQ raspon 54,53-86,85 mL/min/1,73m<sup>2</sup>, a na kraju praćenja 73,65 mL/min/1,73m<sup>2</sup> (medijan) uz IQ raspon 52-90,58 mL/min/1,73m<sup>2</sup>. Prosječna promjena glomerularne filtracije (MDRD2-MDRD1) na kraju praćenja iznosila je 2,85 mL/min/1,73m<sup>2</sup> (medijan) uz IQ raspon -14,45-13,83 mL/min/1,73m<sup>2</sup>, što ukazuje na dobar oporavak velike većine bolesnika. Proteinurija u 24h uzorku urina u MN skupini na početku praćenja bila je 6,80 gr (medijan, IQ raspon 4-10,58 gr), a na kraju praćenja 0,43 gr (medijan, IQ raspon 0,22-0,74 gr). Što se tiče histoloških varijabli, indeks ozljede iznosio je 0,15 (medijan) uz IQ raspon 0,06-0,30, što je bilo statistički značajno manje u odnosu na IGAN skupinu, a stupanj intersticijske fibroze iznosio je 5% (medijan) što govori u prilog da većina bolesnika je imala tek početne intersticijske promjene bubrežnog parenhima. U skladu s time te ranije spomenutim udjelom hipertenzivnih bolesnika, promjena na žilama FIZA, bila je prisutna u 50% bolesnika i to većinom blažeg stupnja, te HA u oko 60% bolesnika, također blažeg stupnja. Upalna infiltracija intersticija nađena je u 15% MN bolesnika, a glomerularni pozitivitet IgM imalo je 94% bolesnika među njima 75% visokog stupnja. U 30% bolesnika nađeno je proširenje mezangijskog matriksa. Po pitanju morfološkog elektronskomikroskopskog statusa GBM i usađenosti imunih kompleksa (prema Ehrenreich-Churgu), promjene I stupnja nađene su u oko 10% bolesnika, II stupnja u 53% i III stupnja u oko 37% bolesnika.

### **8.3.1. Membranski glomerulonefritis i TGF-β1**

Kao što smo ranije pokazali za IGAN i FSGS bolesnike, također nije nađena značajno veća ekspresija TGF-β1 u glomerulu i tubulointersticiju MN skupine prema kontrolnoj skupini. Istovjetno prethodnim primjerima, ovakav nalaz može se tumačiti primjenom RAAS blokatora prije uključivanja u istraživanje (prije određivanja imunoekspresije TGF-β1 i ET-1).

U literaturi postoje radovi koji slično poput našega nisu našli značajnu glomerularnu ekspresiju TGF- $\beta$ 1 (20, 172), ali u nekoliko radova veća glomerularna ekspresija TGF- $\beta$ 1 (178, 190, 193) i mRNA TGF- $\beta$ 1 (194) u bolesnika s MN bila je dokazana.

Za numeričke varijable dob, lipidi u krvi, kreatinin1, MDRD1, indeks ozljede, intersticijska fibroza, Biuret1, Biuret2 i promjena Biureta, nisu nađene značajne korelacije s ekspresijom TGF- $\beta$ 1. Pozitivna tendencija bez statističkog značaja nađena je između varijable albumina u krvi i glomerularne ekspresije TGF- $\beta$ 1 ( $p=0,098$ ). U studiji Yanga i suradnika, glomerularna ekspresija mRNA TGF- $\beta$ 1 nije bila povezana s veličinom proteinurije (181). Za razliku od navedene studije, u radu Goumenosa i suradnika, pronađena je pozitivna korelacija tubularne ekspresije TGF- $\beta$ 1 i veličine proteinurije uz naglasak da bolesnici prethodno nisu uzimali RAAS blokatore (172).

Također pozitivna tendencija nađena je i između glomerularne i tubulointersticijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i varijable promjena MDRD. Statistički značajna pozitivna korelacija zabilježena je između varijable MDRD2 i glomerularne ekspresije TGF- $\beta$ 1, drugim riječima veća glomerularna filtracija na kraju praćenja nađena je u bolesnika s većim intenzitetom glomerularne ekspresije TGF- $\beta$ 1 prilikom biopsije bubrega. Suprotno našim rezultatima, u dvije studije nađena je značajna pozitivna korelacija tubularne ekspresije TGF- $\beta$ 1 s razinom serumskog kreatinina (20, 193), dok u jednoj studiji nije nađena značajna korelacija glomerularne ekspresije mRNA TGF- $\beta$ 1 s razinom kreatinina u krvi (181).

Za kategorijske varijable spol, hipertenzija, hematurija, upalna infiltracija intersticija, promjene na krvnim žilama FIZA i HA, uvećanje mezangija, te stupanj ekspresije C3 i IgG nije bilo značajnih korelacija. Pozitivna tendencija nađena je između histološke varijable raspodjele imunokompleksa u GBM prema Ehrenreich i Churgu i glomerularne ekspresije TGF- $\beta$ 1, što bi moglo sugerirati da težinu oštećenja GBM u MN prati veća ekspresija TGF- $\beta$ 1. Slično su pokazali Endo i suradnici, koji su našli značajnije jači intenzitet ekspresije mRNA TGF- $\beta$ 1 u endotelu glomerularnih kapilara u bolesnika s MN II stupnja (prema Ehrenreich i Churgu), nego onih s I stupnjem promjena GBM (178). Također, Kim je opisao pojačani intenzitet glomerularne ekspresije mRNA TGF- $\beta$ 1 s debljinom GBM (194). U tri rada opisuje se korelacija povećane glomerularne ekspresije TGF- $\beta$ 1 (178, 193) i mRNA TGF- $\beta$ 1 (181) s jačinom glomeruloskleroze, odnosno tubularne ekspresije TGF- $\beta$ 1 s veličinom intersticijske fibroze (193) i intersticijske upalne infiltracije (172).

### 8.3.2. Membranski glomerulonefritis i ET-1

Glomerularna ekspresija ET-1 korelirala je s tubulointersticijskom ekspresijom ET-1 i glomerularnom ekspresijom TGF- $\beta$ 1. Navedene korelacije nisu istraživane u dostupnoj literaturi. Ovaj rezultat upućuje na moguću važnost interakcije ova dva citokina u zadebljanju GBM odnosno umnožavanju vezivnog međustaničnog matriksa oko formiranih imunih kompleksa.

Za glomerularnu ekspresiju ET-1 pokazana je veća ekspresija prema onoj u kontrolnoj skupini, što nije vrijedilo i za tubulointersticijsku ekspresiju ET-1. Nije nađeno značajnih korelacija između bubrežne ekspresije ET-1 i glomerularne te tubulointersticijske fibroze. Glomerularna ekspresija ET-1 statistički je značajno pozitivno korelirala s visinom 24h proteinurije prilikom biopsije bubrega, te je bila negativno povezana s koncentracijom serumskih albumina i padom 24h proteinurije na kraju praćenja. U radu Lerhkea i sur., ekspresija ET-1 u tubularnim epitelnim stanicama bila je veća u onih s 24h proteinurijom > 2 gr u odnosu na bolesnike s manjom proteinurijom (307). Vlachojannis i sur., slično rezultatima Lerhkeove studije, našli su pak pozitivnu ekspresiju ET-1 u tubulima u bolesnika s nefrotskim sindromom (301). U našem radu, nadalje, nađena je pozitivna tendencija između intenziteta glomerularne ekspresije ET-1 i razine serumskog kreatinina prilikom biopsije bubrega. Tubulointersticijska ekspresija ET-1 bila je statistički značajno pozitivno povezana sa stupnjem ekspresije C3 komponente komplementa u mezangiju. Uz to, nađena je negativna tendencija i glomerularne i tubulointersticijske ekspresije ET-1 sa stupnjem uznapređovalosti GBM promjena (u smislu Ehrenreich-Churgove klasifikacije). Za navedene korelacije, u literaturi nismo našli usporedivih studija i rezultata. U MN bolesnika s postignutom remisijom zamijećena je tendencija nižoj ekspresiji ET-1 u tubulointersticiju ali bez statističke značajnosti.

## 9. ZAKLJUČCI:

### U bolesnika s IGAN:

- glomerularna ekspresija ET-1 statistički je značajno veća od glomerularne ekspresije ET-1 u kontrolnoj skupini
- glomerularna ekspresija ET-1 statistički je značajno pozitivno povezana s LDL i endokapilarnom proliferacijom
- glomerularna ekspresija ET-1 statistički značajno je niža u bolesnika s postignutom parcijalnom ili potpunom remisijom na kraju jednogodišnjeg praćenja
- glomerularna ekspresija TGF- $\beta$ 1 značajno je manja u bolesnika sa povećanjem serumskog kreatinina na kraju praćenja
- glomerularna ekspresija TGF- $\beta$ 1 značajno je veća u bolesnika s manjom tubularnom atrofijom i intersticijskom fibrozom
- tubulointersticijska ekspresija TGF- $\beta$ 1 bila je značajno manja u bolesnika s makrohaturijom i u bolesnika s većim stupnjem fibrointimalnog zadebljanja arteriola

### U bolesnika s FSGS:

- glomerularna ekspresija ET-1 statistički je značajno veća od glomerularne ekspresije ET-1 u kontrolnoj skupini
- glomerularna ekspresija ET-1 statistički je pozitivno povezana sa stupnjem hijalinoze arteriola

### U bolesnika s MN:

- glomerularna ekspresija ET-1 statistički je značajno veća od glomerularne ekspresije ET-1 u kontrolnoj skupini
- glomerularna ekspresija ET-1 bila je statistički značajno veća u bolesnika s nižim koncentracijama serumskih albumina i manjim padom 24h proteinurije tijekom jednogodišnjeg praćenja
- glomerularna ekspresija ET-1 statistički je značajno pozitivno povezana s količinom 24h proteinurije na početku praćenja

- tubulointersticijska ekspresija ET-1 statistički je značajno pozitivno povezana sa stupnjem ekspresije C3 komplementa u mezangiju
- glomerularna ekspresija TGF- $\beta$ 1 statistički je značajno pozitivno povezana s procijenjenom glomerularnom filtracijom na kraju praćenja.

### **Općenito:**

- bolesnici s FSGS i MN bili su starije životne dobi od bolesnika s IGAN i ispitanika kontrolne skupine
- bolesnici s FSGS i MN imali su značajno više vrijednosti 24 satne proteinurije, te serumske koncentracije LDL i ukupnog kolesterola u odnosu na bolesnike s IGAN
- bolesnici s IGAN i MN imali su značajnu jaću glomerularnu ekspresiju C3 komponente komplementa u odnosu na bolesnike s FSGS
- bolesnici s IGAN imali su značajno veći indeks ozljede u odnosu na bolesnike s FSGS i MN
- glomerularna ekspresija ET-1 statistički je značajno veća u svim pojedinim skupinama bolesnika kao i svih bolesnika zajedno nego u ispitanika kontrolne skupine
- tubulointersticijska ekspresija ET-1 nije se razlikovala između pojedinih podskupina bolesnika i kontrolne skupine, ali je bila statistički značajno veća u skupini svih bolesnika (sve tri podskupine zajedno) u odnosu na kontrolnu skupinu
- bubrežna ekspresija TGF- $\beta$ 1 nije se bitno razlikovala između skupina bolesnika i kontrolne skupine, najvjerojatnije zbog dugotrajnog uzimanja jednog ili više RAAS blokatora u vremenu prije biopsije bubrega
- ograničenja ovog rada jesu relativno maleni broj ispitanika, kratkoća perioda praćenja i uzimanje RAAS blokatora prije biospija bubrega (u smislu određivanja ekspresije TGF- $\beta$ 1 u bubrežnom tkivu).



## 10. SAŽETAK

**CILJ ISTRAŽIVANJA:** ispitati intenzitet i tkivnu raspodjelu imunoekspresije pretvorbenog čimbenika rasta beta-1 (TGF- $\beta$ 1) i endotelina-1 (ET-1) u tri najčešća primarna glomerulonefritisa: IgA nefropatiji (IGAN), membranskom glomerulonefritisu (MN) i fokalnoj segmentalnoj glomerulosklerozi (FSGS), te njihovu povezanost s varijablama bubrežne funkcije odnosno tijekom bolesti.

**ISPITANICI I METODE:** u 91 bolesnika dobi od 18 do 80 godina biopsijom bubrega uz druge laboratorijske pretrage definiran je jedan od gore navedenih primarnih glomerulonefritisa. Uz rutinski histološki pregled bioptata, na uzorcima bubrežnog parenhima provedeno je imunohistokemijsko ispitivanje ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ET-1. Kao kontrolnu skupinu koristili smo bioptate 18 ispitanika s prolaznom blagom eritrociturijom ili proteinurijom, kojima u bubrežnom parenhimu nisu nađene patološke promjene. Bolesnicima su određeni klinički i laboratorijski parametri prilikom biopsije bubrega, te nakon godine dana praćenja.

**REZULTATI:** ekspresija TGF- $\beta$ 1 nije se značajno razlikovala u odnosu na kontrolnu skupinu. U skupini bolesnika s IGAN, glomerularna ekspresija TGF- $\beta$ 1 povezana je s nižom koncentracijom serumskog kreatinina na kraju praćenja, te stupnjem intersticijske fibroze i tubularne atrofije, a u bolesnika s MN je pozitivno povezana s procijenjenom glomerularnom filtracijom na kraju praćenja. Nadalje, glomerularna ekspresija ET-1 statistički je značajno veća u svakoj od pojedinih skupina bolesnika s GN u odnosu prema kontrolnoj skupini. U bolesnika s MN glomerularna ekspresija ET-1 statistički je značajno povezana s 24h proteinurijom prilikom biopsije bubrega, a u bolesnika s FSGS sa stupnjem hijalinoze arteriola. Nađena je statistički značajno snižena glomerularna ekspresija ET-1 u bolesnika koji su postigli djelomičnu ili kompletnu remisiju.

**ZAKLJUČCI:** glomerularna imunoekspresija ET-1 povezana je s tijekom bolesti, no za potvrdu toga potrebna su dugotrajna prospektivna istraživanja s većim brojem bolesnika.

**Ključne riječi:** endotelin, glomerulonefritis, pretvorbeni čimbenik rasta beta.

## **The influence of transforming growth factor beta and endothelin-1 in the course of primary glomerulonephritis**

**OBJECTIVE:** to investigate the level of immunoexpression and the tissue distribution of the TGF- $\beta$ 1 and the ET-1 in the kidney biopsy specimens of the patients with three the most common primary glomerulonephritides, and to examine the possible relationship between the immunoexpression of the cytokines and the course of glomerulonephritis.

**SUBJECTS AND METHODS:** 91 patients who were diagnosed with the primary form of IgA nephropathy (IGAN), membranous nephropathy (MN) or focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) were followed prospectively for one year. Initial clinical, laboratory and pathohistological parameters at the time of the renal biopsy as well as the laboratory parameters at the end of follow up period were compared with level of the TGF- $\beta$ 1 and the ET-1 immunoexpression in biopsy specimens.

**RESULTS:** TGF- $\beta$ 1 renal immunoexpression was not significantly higher in comparison to control group. In IGAN patients, glomerular TGF- $\beta$ 1 expression was negatively correlated with the tubulointerstitial fibrosis and with serum creatinine level after one year, in MN group positively correlated with estimated glomerular filtration rate at the end of the study. Opposite results were found with ET-1 expression, where glomerular expression of ET-1 was significantly higher in all three patient subgroups compared to the control group. In IgAN group significant positive correlation is found between glomerular ET-1 expression level and the serume LDL concentration as well as with the endocapillary proliferation. In MN lower baseline serum albumine level and higher 24h proteinuria were correlated with a higher glomerular ET-1 expression. In FSGS group glomerular ET-1 expression was in positive correlation with the grade of an arteriolar hyalinosis. In patients who achieved partial or complete remission, glomerular ET-1 expression appeared significantly lower compared to those patients who experienced stationar course or disease progression.

**CONCLUSION:** glomerular ET-1 immunoexpression was significantly higher among patients with glomerulonephritides compared to the control group and influenced on the course of glomerulonephritis. This should be further investigated in future long-term prospective studies with larger number of patients.

**Key words:** endothelin, glomerulonephritis, transforming growth factor beta.

PhD student: Miroslav Tišljarić, MD, 2016.

## 11. LITERATURA

1. Rose BD. Clinical characteristics of glomerular disease. In: Rubenstein E, Federmann DD, eds. Scientific American medicine. New York: Scientific American, 1989; section X (IV):1.
2. Collins A, Xue JL, Ma JZ, Louis T. Estimating number of patients and medicine cost for end stage renal disease in the US to the year 2010. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:133A.
3. US Renal Data System, USRDS 1997. Annual Data Report, Bethesda: National Institutes of Health, National Institutes of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases.
4. Horvatic I, Tisljar M, Bulimbasic S i sur. Epidemiologic data of adult native biopsy-proven renal diseases in Croatia. *Int Urol Nephrol*. 2013;45:1577-87.
5. Rennke HG. Glomerular adaptations to renal injury or ablation. Role of capillary hypertension in the pathogenesis of progressive glomerulosclerosis. *Blood Purif*. 1988; 6(4):230-9.
5. Anderson S, Brenner BM. The role of intraglomerular pressure in the initiation and progression of renal disease. *J Hypertens Suppl*. 1986;4(5):S236-8.
7. Meyer TW, Anderson S, Rennke HG, Brenner BM. Reversing glomerular hypertension stabilizes established glomerular injury. *Kidney Int*. 1987;31(3):752-9.
8. Ayo SH, Radnik RA, Garoni J, Glass WF, Kreisberg JI. High glucose causes an increase in extracellular matrix proteins in cultured mesangial cells. *Am J Pathol* 1990;136:1339–1348.
9. D'Agati V, Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. RAGE, glomerulosclerosis and proteinuria: Roles in podocytes and endothelial cells. *Trends Endocrinol Metab*. 2010; 21(1):50-6.
10. Verzola D, Bertolotto BM, Villaggio B. Oxidative Stress Mediates Apoptotic Changes Induced by Hyperglycemia in Human Tubular Kidney Cells. *J Am Soc Nephrol* 2004;15: 85–87.
11. Shore VG, Forte T, Licht H, Lewis SB. Serum and urinary lipoproteins in human nephrotic syndrome: Evidence for renal catabolism of lipoproteins. *Metabolism* 1982;31:258-268.
12. Neverov N, Ivanov A, Severgina E, Kolonduck N, Srinivias K, Tareyeva I. Cytoplasmic lipid inclusions and low-density lipoproteins depositions in renal biopsies of nephrotic patients. *Nephrol Dial Transplant* 1991;10:776.

13. Ong ACM, Jowett TP, Moorhead JF, Own JS. Human high density lipoproteins stimulate endothelin 1 release by cultured human renal proximal tubular cells. *Kidney Int* 1994;45:1315-1321.
14. Axelsson J, Bergsten A, Qureshi AR i sur. Elevated resistin levels in chronic kidney disease are associated with decreased glomerular filtration rate and inflammation, but not with insulin resistance. *Kidney International* 2006;69:596–604.
15. Couser WG. Mediation of Immune Glomerular Injury. *J Am Soc Nephrol* 1993;1:13-29.
16. Main IW, Nicolic-Paterson DJ, Atkins RC. T cells and macrophages and the role in renal injury. *Sem Nephrol* 1992;12:393-407.
17. Segerer S, Nelson PJ, Schlondorff D. Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:52-176.
18. Taal MW, Omer SA, Nadim MK, Makenzie HS. Cellular and molecular mediators in common pathway mechanisms of chronic renal disease progression. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000;9:323-333.
19. Panzer U, Stahi R. Chemokines and renal inflammation. *Nephrologie* 1999;20:335-341.
20. Mezzano SA, Droguett A, Burgos ME i sur. Overexpressions of chemokines, fibrogenic cytokines, and myofibroblasts in human membranous nephropathy. *Kidney Int* 2000;57:147-158.
21. Zeisberg M, Strutz F, Muller GA. Renal fibrosis: an update. *Curr Opin in Nephro Hypert* 2001;10:315-320.
22. Klahr S, Schreiner G, Ischikawa I. The progression of renal disease. *N Engl J Med* 1988; 318:1657-1666.
23. Remuzzi G, Ruggenti P, Benigni A. Understanding the nature of renal disease progression. *Kidney Int* 1997;51:2-15.
24. Maack T, Park CH, Camargo MJF. Renal filtration, transport and metabolism of proteins, in *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, edited by Seldin DW, Giebisch G, New York, Raven Press, 1985;1773-1803.
25. Fine LG, Orphanides C, Norman JT. Progressive renal disease: the chronic hypoxia hypothesis. *Kidney Int Suppl* 1998;65:S74–S78.
26. Muller GA, Zeisberg M, Strutz F. The importance of tubulointerstitial damage in progressive renal disease, *Nephrol Dial Transplant* 2000;15(6):76-77.

27. Forbes SM, Thornhill TB, Chevalier RL. Proximal tubular injury and rapid formation of atubular glomeruli in mice with unilateral ureteral obstruction: a new look at an old model. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011;301(1):110-7.
28. Nath KA. Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. *Am J Kidney Dis* 1992;20:1-17.
29. Bohle A, Wehrmann M, Bogenschutz O. The long-term prognosis of the primary glomerulonephritides. A morphological and clinical analysis of 1747 cases. *Pathol Res Pract* 1992;188:908–924.
30. "Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia" (GISEN) Urinary protein excretion rate is the best independent predictor of ESRF in non-diabetic proteinuric chronic nephropathies. *Kidney Int* 1998;53(5):1209-16.
31. Burton C, Harris KBG. The Role of Proteinuria in the Progression of Chronic Renal Failure. *Am J Kidney Dis* 1996;27(6):765-775.
32. Remuzzi G, Chiurciu C, Ruggenti P. Proteinuria predicting outcome in renal disease: nondiabetic nephropathies (REIN). *Kidney Int* 2004;92:90-6.
33. Praga M, Morales E. Renal damage associated with proteinuria. *Kidney Int* 2002;82:42-6.
34. Keane WF. Proteinuria: Its clinical importance and role in progressive renal disease. *Am J Kidney Dis* 2000;35:S97-S105.
35. Ruggenti P, Perna A, Remuzzi G. Retarding progression of chronic renal disease: the neglected issue of residual proteinuria. *Kidney Int* 2003;63:2254-61.
36. Zagr RA, Scimpf BA, Bredi CR, Gmur DJ. Inorganic iron effects on in vitro hypoxic proximal tubular cell injury. *J Clin Invest* 1993;91:702-708.
37. Donadelli R, Abbate M, Zanchi C i sur. Protein Traffic Activates NF-kB Gene Signaling and Promotes MCP-1-Dependent Interstitial Inflammation. *Am J of Kidney diseases* 2000;36:1226-1241.
38. Hirschberg R. Bioactivity of glomerular ultrafiltrate during heavy proteinuria may contribute to renal tubulo-interstitial lesions. *J Clin Invest* 1997;98:116-124.
39. Couser WG. Glomerular injury induced by the C5b-9 membrane attack complex of complement, In Hatano M *Nephrology*, Springer, Berlin Heidelberg New York 1991;182-190.
40. Ziyadeh F, Jin Y, Guo J, Ericksen M, Sharma K. Up-regulation of type II TGF- $\beta$  receptor mRNA by IGF-1 in proximal tubular cells. *J Am Soc Nephrol* 1995;6:1053.

41. Okuda S, Languino LR, Ruoslahti E, Border WA. Elevated expression of transforming growth factor- $\beta$  and proteoglycan production in experimental glomerulonephritis: Possible role in expansion of mesangial extracellular matrix. *J Clin Invest* 1990;86:453-462.
42. Bricker NS. On the meaning of the intact nephron hypothesis. *Am J Med.* 1969;46(1):1-11.
43. Provoost AP, Baudoin P, De Keijzer MH. The role of nephron loss in the progression of renal failure: experimental evidence. 1991;17:27-32.
44. Zavadil J, Bitzer M, Liang D i sur. Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor beta. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2001;98:6686-6691.
45. Strutz F, Muller GA, Neilson EG. Transdifferentiation: a new angle on renal fibrosis. *Exp Nephrol* 1996;4:267-270.
46. Kriz W, Gretz N, Lemley KV. Progression of glomerular diseases: is the podocyte the culprit? *Kidney Int* 1998;54:687-697.
47. Kopp JB, Factor VM, Mozes M, Nagy P. Transgenic mice with increased plasma levels of TGF develop progressive renal disease. *Lab Invest* 1996;74:991-1003.
48. Kang DH, Kanellis J, Hugo C. Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:806-816.
49. Shimizu A, Kitamura H, Masuda Y. Rare glomerular capillary regeneration and subsequent capillary regression with endothelial cell apoptosis in progressive glomerulonephritis. *Am J Pathol* 1997;151:1231-1239.
50. Roberts AB, Sporn MB. The transforming growth factors. In *Peptide Growth Factors and Their Receptors, Part I* (Sporn, M. B., and Roberts, A. B., eds). Springer-Verlag, Berlin. 1990;95:419-472.
51. Roberts AB, Sporn MB. Differential expression of the TGF isoforms in embryogenesis suggests specific roles in developing and adult tissues. *Mol. Reprod. Dev.* 1992;32:91-98.
52. Shull MM, Ormsby I, Kier AB i sur. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992;359:693-699.
53. Gentry LE, Webb NR, Lim GJ. Type 1 transforming growth factor: amplified expression and secretion of mature and precursor polypeptides in Chinese hamster ovary cells. *Mol Cell Biol* 1987;7:3418-3427.
54. Munger JS, Harpel JG, Gleizes PE, Mazzieri R, Nunes I, Rifkin DB. Latent transforming growth factor-structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int.* 1997;51:1376-1382.

55. Piek E, Heldin CE, Ten Dijke P. Specificity, diversity, and regulation in TGF- $\beta$  superfamily signaling. *FASEB J* 1999;13:2105–2124.
56. Munger JS, Harpel JG, Giancotti FG, Rifkin DB. Interactions between growth factors and integrins: latent forms of transforming growth factor- $\beta$  are ligands for the integrin  $\alpha 1$ . *Mol Biol Cell* 1998;9:2627–2638.
57. Flaumenhaft R, Moscatelli D, Rifkin DB. Heparin and heparan sulfate increase the radius of diffusion and action of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol* 1990;111:1651–1659.
58. Nakagawa T, Lan HY, Glushakova O et al. Role of ERK1/2 and p38 Mitogen-Activated Protein Kinases in the Regulation of Thrombospondin-1 by TGF- $\beta$  in Rat Proximal Tubular Cells and Mouse Fibroblasts. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:899-904.
59. Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF in vivo. *Cell* 1998;93:1159–1170.
60. Massague J, Cheifetz S, Boyd FT, Andres JL. TGF- $\beta$  receptors and TGF- $\beta$  binding proteoglycans: recent progress in identifying their functional properties. In: Piez KA, Sporn MB, Eds. *Transforming Growth Factor- $\beta$ : Chemistry, Biology, and Therapeutics*, 1st ed. New York: New York Academy of Sciences, 1990;59–72.
61. Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. Negative regulation of transforming growth factor- $\beta$  by the proteoglycan decorin. *Nature* 1990;346:281–284.
62. Paralkar VM, Vukicevic S, Reddi AH. Transforming growth factor type 1 binds to collagen IV of basement membrane matrix: Implications for development. *Dev Biol* 1991;143:303–308.
63. Fava RA, McClure DB. Fibronectin-associated transforming growth factor. *J Cell Physiol* 1987;131:184–189.
64. LaMarre J, Hayes MA, Wollenberg GK, Hussaini I, Hall SW, Gonias SL. An 2-macroglobulin receptor-dependent mechanism for the plasma clearance of transforming growth factor-1 in mice. *J Clin Invest* 1991;87:39–44.
65. Chen RH, Moses HL, Maruoka EM, Derynck R, Kawabata M. Phosphorylation-dependent interaction of the cytoplasmic domains of the type I and type II transforming growth factor-receptors. *J Biol Chem* 1995;270:12235–12241.
66. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF- $\beta$  receptor. *Nature* 1994;370:341–347.
67. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF- $\beta$  signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997;390:465–471.

68. Sekelsky JJ, Newfeld SJ, Raftery LA, Chartoff EH, Gelbart WM. Genetic characterization and cloning of Mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 1995;139:1347–1358.
69. Savage C, Das P, Finelli AL. *Caenorhabditis elegans* genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor pathway components. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:790–794.
70. Massague J. TGF- signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998;67:753–791.
71. Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, Wrana JL. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGF receptor. *Cell* 1998;95:779–791.
72. Wu R, Zhang Y, Feng X, Derynck R. Heteromeric and homomeric interactions correlate with signaling activity and functional cooperativity of Smad3 and Smad4/DPC4. *Mol Cell Biol* 1997;17:2521–2528.
73. Schnaper H, Hayashida WT, Hubchak SC, Poncelet AC. TGF- signal transduction and mesangial cell fibrogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;284:243–252.
74. Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A, Massague J. Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-signalling pathways. *Nature* 1996;383:832–836.
75. Zhang W, Ou J, Inagaki Y, Greenwel P, Ramirez F. Synergistic cooperation between Sp1 and Smad3/Smad4 mediates TGF1 stimulation of 2(I) collagen (COL1A2) transcription. *J Biol Chem* 2000;275:39237– 39245.
76. Zhang Y, Feng XH, Derynck R. Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-induced transcription. *Nature* 1998;394:909–913.
77. Shi Y, Wang YF, Jayaraman L, Yang H, Massague J, Pavletich NP. Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF- signaling. *Cell* 1998; 94:585–594.
78. Jonk LJC, Itoh S, Heldin CH, ten Dijke P, Kruijer W. Identification and functional characterization of a Smad binding element (SBE) in the JunB promoter that acts as a transforming growth factor- activin, and bone morphogenetic protein-inducible enhancer. *J Biol Chem* 1998;273:21145–21152.
79. Liberati NT, Datto MB, Frederick JP i sur. Smads bind directly to the Jun family of AP-1 transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:4844–4849.
80. Chung AC, Huang XR, Meng X, Lan HY. miR-192 mediates Tgf-beta1/Smad3-driven renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21:1317-25.



81. Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G i sur. Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem.* 2001;276:12477-80.
82. Wang W, Huang XR, Li AG i sur. Signaling mechanism of Tgf-beta 1 in prevention of renal inflammation: role of Smad7. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16:1371-83.
83. Schiffer M, Schiffer LE, GuptanA i sur. Inhibitory Smads and TGF- Signaling in Glomerular Cells. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:2657–2666.
84. ChenYG. Endocytic regulation of TGF-b signaling. *Cell Research* 2009;19:58-70.
85. Shibuya H, Yamaguchi K, Shirakabe K i sur. TAB1: an activator of the TAK1 MAPK in TGF- signal transduction. *Science* 1996;272:1179–1182.
86. Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H i sur. Identification of a member of the MAPK family as a potential mediator of TGF- signal transduction. *Science* 1995;270:2008–2011.
87. Hartsough MT, Mulder KM. Transforming growth factor activation of p44mapk in proliferating cultures of epithelial cells. *J Biol Chem* 1995;270:7117–7124.
88. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995;270:1326–1331.
89. Ziyadeh FN, Sharma K, Ericksen M i sur. Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by activation of transforming growth factor-β. *J Clin Invest* 1994;93:536-541.
90. Cheng S, Lovett DH. Gelatinase A. MMP-2 is necessary and sufficient for renal tubular cell epithelial-mesenchymal transformation. *Am J Pathol* 2003;162:1937–1949.
91. Zeisberg M, Bonner G, Maeshima Y.nRenal fibrosis: Collagen composition an assembly regulates epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Am J Pathol* 2001;159:1313–1321.
92. Kagami S, Border WA, Ruoslahti E, Noble NA. Coordinated expression of b1 integrins and transforming growth factor-b- induced matrix proteins in glomerulonephritis. *Lab Invest* 1993;69:68–76.
93. Yaoita E. Behavior of rat mesangial cells cultured within extracellular matrix is regulated by extracellular matrix. *Lab Invest* 1989;61:410–418.
94. David PB. The transforming growth factor β system in kidney disease and repair: recent progress and future directions. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1999;8:21-30.
95. Katavetin P. VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med* 2008;359:205–206.

96. Kehrl JH, Roberts AB, Wakefield LM, Jakowlew S, Sporn MB, Fauci AS. Transforming growth factor b is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J Immunol* 1986;137:3855–3860.
97. Gamble JR, Vadas MA. Endothelial adhesiveness for blood neutrophils is inhibited by transforming growth factor-beta. *Science* 1988;242:97–99.
98. Rook AH, Kehrl JH, Wakefield LM i sur. Effects of transforming growth factor b on the functions of natural killer cells: depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. *J Immunol* 1986;136:3916–3920.
99. Suto TS, Fine LG, Kitamura M. Mesangial cell derived transforming growth factor-b1 reduces macrophage adhesiveness with consequent deactivation. *Kidney Int* 1996;50:445–452.
100. Smith WB, Noack L, Khew-Goodall Y, Isenmann S, Vadas MA, Gamble JR. Transforming growth factor-beta 1 inhibits the production of IL-8 and the transmigration of neutrophils through activated endothelium. *J Immunol* 1996;157:360–368.
101. Wahl SM, McCartney-Francis N, Mergenhagen SE. Inflammatory and immunomodulatory roles of TGF- $\beta$ . *Immunol Today* 1989;10:258–261.
102. Kitamura M, Suto ST. Molecular Basis of Renal Disease TGF- $\beta$  and glomerulonephritis: anti-inflammatory versus prosclerotic actions *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:669–679.
103. Lee HS. Mechanisms and consequences of TGF- $\beta$  overexpression by podocytes in progressive podocyte disease. *Cell Tissue Res* 2012;347:129–140.
104. Alexandrow MG, Moses HL. Transforming growth factor and cell cycle regulation. *Cancer Res* 1995;55:1452–1457.
105. Polyak K. Negative regulation of cell growth by TGF-b1. *Biochem Biophys Acta* 1996;1242:185–199.
106. Reynisdottir I, Polyak K, Iavarone A, Massague J. Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-b1. *Genes Dev* 1995;9:1831–1845.
107. Cheng J, Grande JP. Transforming Growth Factor- Signal Transduction and Progressive Renal Disease. *Exp Biol Med* 2002;227:943–956.
108. Harris RC, Neilson EG. Toward a unified theory of renal progression. *Annu Rev Med* 2006;57:365–380.
109. Bohle A, Christ H, Grund KE, Mackensen S. The role of the interstitium of the renal cortex in renal disease. *Contrib Nephrol* 1979;16:109–114.

110. Kadler KE, Hill A, Canty-Laird EG. Collagen fibrillogenesis: Fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. *Curr Opin Cell Biol* 2008;20:495–501.
111. McDougall S, Dallon J, Sherratt J, Maini P. Fibroblast migration and collagen deposition during dermal wound healing: Mathematical modelling and clinical implications. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 2006;364:1385–1405.
112. Eddy AA. Plasminogen activator inhibitor-1 and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;283: F209–F220.
113. Ricardo SD, van Goor H, Eddy AA. Macrophage diversity in renal injury and repair. *J Clin Invest* 2008;118:3522–3530.
114. Rohatgi R, Flores D. Intratubular hydrodynamic forces influence tubulointerstitial fibrosis in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2010;19:65–71.
115. Smeets B, Angelotti ML, Rizzo P. Renal progenitor cells contribute to hyperplastic lesions of podocytopathies and crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2009;20: 2593–2603.
116. Kim D, Dressler GR. Nephrogenic factors promote differentiation of mouse embryonic stem cells into renal epithelia. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:3527–3534.
117. Kelly KJ, Burford JL, Dominguez JH. Post-ischemic inflammatory syndrome: A critical mechanism of progression in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;297:923–931.
118. Horster MF, Braun GS, Huber SM. Embryonic renal epithelia: induction, nephrogenesis, and cell differentiation. *Physiol Rev* 1999;79:1157–1191.
119. El Nahas AM. Plasticity of kidney cells: Role in kidney remodeling and scarring. *Kidney Int* 2003;64:1553–1563.
120. Yang J, Liu Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol* 2001;159:1465–1475.
121. Lan HY. Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation mechanisms in proximal tubule cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003;12:25–29.
122. Yang J, Shultz RW, Mars WM *in situ*. Disruption of tissue-type plasminogen activator gene in mice reduces renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Clin Invest* 2002; 110:1525–1538.
123. Yang J, Dai C, Liu Y. Hepatocyte growth factor gene therapy and angiotensin II blockade synergistically attenuate renal interstitial fibrosis in mice. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:2464–2477.

124. 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;110:341–350.
125. 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;19:2282–2287.
126. Li Y, Kang YS, Dai C, Kiss LP, Wen X, Liu Y. Epithelial-to-mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria. *Am J Pathol* 2008;172:299–308.
127. Yamaguchi Y, Iwano M, Toyoda M Epithelial-mesenchymal transition as an explanation for podocyte depletion in diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2009;54:653–664.
128. Lee HS. Pathogenic role of TGF- $\beta$  in the progression of podocyt diseases. *Histol Histopathol* 2011;26:107–116.
129. Liu Y. New Insights into Epithelial-Mesenchymal Transition in Kidney Fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:212–222.
130. Dessapt C, Baradez MO, Hayward A i sur. Mechanical forces and TGF $\beta$ 1 reduce podocyte adhesion through  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 integrin downregulation. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:2645–2655.
131. Nadasdy T, Laszik Z, Blick KE, Johnson DL, Silva FG. Tubular atrophy in the end-stage kidney: A lectin and immunohistochemical study. *Hum Pathol* 1994;25:22–28.
132. Ng YY, Fan JM, Mu W i sur. Glomerular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in the evolution of glomerular crescent formation. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:2860–2872.
133. Jinde K, Nikolic-Paterson DJ, Huang XR i sur. Tubular phenotypic change in progressive tubulointerstitial fibrosis in human glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* 2001;38:761–769.
134. Rastaldi MP, Ferrario F, Giardino L. Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies. *Kidney Int* 2002;62:137–146.
135. Fan JM, Ng YY, Hill PA. Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in vitro. *Kidney Int* 1999;56:1455–1467.
136. Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H. BMP-7 Counteracts Tgf-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* 2003;9:964–968.

137. Liu Y. Epithelial to Mesenchymal Transition in Renal Fibrogenesis: Pathologic Significance, Molecular Mechanism, and Therapeutic Intervention. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1–12.
138. Li Y, Yang J, Dai C, Wu C, Liu Y. Role for integrin-linked kinase in mediating tubular epithelial to mesenchymal transition and renal interstitial fibrogenesis. *J Clin Invest* 2003;112:503–516.
139. Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin A. Transforming growth factor-1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 2001;12:27–36.
140. He W, Dai C, Li Y, Zeng G, Monga SP, Liu Y. Wnt/catenin signaling promotes renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:765–776.
141. Botinger EP, Bitzer M. TGF- $\beta$  Signaling in Renal Disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2600–2610.
142. Dai C, Yang J, Liu Y. Transforming Growth Factor-1 Potentiates Renal Tubular Epithelial Cell Death by a Mechanism Independent of Smad Signaling. *J Biol Chem* 2003; 278;(14):12537–12545.
143. Bagchus WM, Jeunink MF, Elema JD. The mesangium in anti-Thy-1 nephritis: influx of macrophages, mesangial cell hypercellularity, and macromolecular accumulation. *Am J Pathol* 1990;137:215–223.
144. Border WA, Nobel NA, Yamamoto T i sur. Decorin, a natural inhibitor of transforming growth factor- $\beta$ , protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature* 1992; 360:361-364.
145. Khanna A, Li B, Li P, Suthanthiran M. Transforming growth factor- : regulation with a TGF $\beta$ antisense oligomer. *Kidney Int* 1996;53:2–6.
146. Terashima H, Kato M, Ebisawa M i sur. R-268712, an orally active transforming growth factor- $\beta$  type I receptor inhibitor, prevents glomerular sclerosis in a Thy1 nephritis model. *Eur J Pharmacol.* 2014;734:60-6.
147. Akagi Y, Isaka Y, Arai M i sur. Inhibition of TGF-beta 1 expression by antisense oligonucleotides suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 1996;50:148-55.
148. Sanderson N, Factor V, Nagy P i sur. Hepatic expression of mature transforming growth factor 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92:2572–2576.

149. Isaka Y, Fujiwara Y, Ueda N, Kaneda Y, Kamada T, Imai E. Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth factor-beta or platelet-derived growth factor gene into the rat kidney. *J Clin Invest* 1993;92:2597-601.
150. Tamaki K, Okuda S, Ando T, Iwamoto T, Nakayama M, Fujishima M. TGF- $\beta$ 1 in glomerulosclerosis and interstitial fibrosis of adriamycin nephropathy. *Kidney Int* 1994;45:525-36.
151. Abbate M, Zoja C, Morigi M i sur. Transforming growth factor-1 is up-regulated by podocytes in response to excess intraglomerular passage of proteins. A central pathway in progressive glomerulosclerosis. *Am J Pathol* 2002;161:2179–2193.
152. Rhyu DY, Park J, Sharma BR, Ha H. Role of reactive oxygen species in transforming growth factor-beta1-induced extracellular matrix accumulation in renal tubular epithelial cells. *Transplant Proc.* 2012;44(3):625-8.
153. Strutz F, Zeisberg M, Renziehausen A i sur. Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor. *Kidney Int* 2000;59:579-595.
154. Verrechia F, Mauviel A. Control of connective tissue gene expression by TGF-beta: role of Smad proteins in fibrosis. *Curr Rheumatol Rep* 2002;4:143-149.
155. Liu X, Sun Y, Constantinescu SN, Kara E, Weinberg RA, Lodish HF. Transforming growth factor-beta phosphorylation of Smad3 is required for growth inhibition and transcriptional induction in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:10669-10674.
156. Nakamura T, Miller D, Ruoslahti E, Border WA. Production of extracellular matrix by glomerular epithelial cells is regulated by transforming growth factor-1. *Kidney Int* 1992;41:1213–1221.
157. Sakairi T, Abel Y, Kopp JB. TGF-beta1 reduces Wilms' tumor suppressor gene expression in podocytes. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:2746–2752.
158. Vuong MT, Lundberg S, Gunnarsson I i sur. Genetic variation in the transforming growth factor- $\beta$ 1 gene is associated with susceptibility to IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:3061–3067.
159. Neng Lai K, Joseph C, Leung K i sur. Podocyte injury induced by mesangial-derived cytokines in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:62–72.
160. Neng Lai K, Tang S, Guh JY i sur. Polymeric IgA1 from Patients with IgA Nephropathy Upregulates Transforming Growth Factor- Synthesis and Signal Transduction in Human Mesangial Cells via the Renin- Angiotensin System. *J Am Soc Nephrol* 2003;14: 3127–3137.

161. Loretta Y.Y.C., Leung J, Tsan A i sur. Activation of tubular epithelial cells by mesangial-derived TNF- $\alpha$ : Glomerulotubular communication in IgA nephropathy. *Kidney Int* 2005;67:602–612.
162. Ihm CG, Jeong KW, Lee SH, Lee TW, Park JK. Effects of therapeutic agents on the inflammatory and fibrogenic factors in IgA nephropathy. *Nephrology* 2007;12:25-6.
163. Lai KN, Tang SC, Guh JY i sur. Polymeric IgA1 from patients with IgA nephropathy upregulates transforming growth factor-beta synthesis and signal transduction in human mesangial cells via the renin-angiotensin system. *J Am Soc of Nephrol* 2003;14:3127-37.
164. Tsakas S, Goumenos DS. Accurate measurement and clinical significance of urinary transforming growth factor-beta1. *Am J Nephrol* 2006;26:186–193.
165. Haramaki R, Tamaki K, Fujisawa M, Ikedo H, Haramaki N, Okuda S. Steroid therapy and urinary transforming growth factor- $\beta$ 1 in IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2001;38:1191-1198.
166. Dominguez GC, Costa RS, Dantas M, Kimachi T, Coimbra TM. Transforming growth factor beta (TGF beta) activity in urine of patients with glomerulonephritis. *Braz J Med Biol Res.* 1995;28:1061-4.
167. Senatorski G, Paczek L, Sułowicz W, Gradowska L, Bartłomiejczyk I. Urine activity of cathepsin B, collagenase and urine excretion of TGF-beta 1 and fibronectin in membranous glomerulonephritis. *Res Exp Med.* 1998;198:199-206.
168. Honkanen E, Teppo AM, Tornroth T, Groop PH, Gronhagen-Riska C. Urinary transforming growth factor-b 1 in membranous glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12: 2562–2568.
169. De Muro P, Faeddab R, Fresu P. Urinary transforming growth factor-1 in various types of nephropathy. *Pharmacological Research* 2004;49:293–298.
170. Kanai H, Mitsuhashi H, Ono K, Yano S, Naruse T. Increased excretion of urinary transforming growth factor beta in patients with focal glomerular sclerosis. *Nephron* 1994;66:391-5.
171. Bauvois B, Mothu N, Nguyen J. Specific changes in plasma concentrations of matrix metalloproteinase-2 and 9, TIMP-1 and TGF-b1 in patients with distinct types of primary glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:1115–1122.
172. Goumenos DS, Tsakas S, El Nahas AM. Transforming growth factor-b1 in the kidney and urine of patients with glomerular disease and proteinuria. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:2145–2152.

173. Shin GT, Kim SJ, Ma KA, Kim HS, Kim D. ACE inhibitors attenuate expression of renal transforming growth factor-beta 1 in humans. *Am J Kidney Dis.* 2000;36(5):894-902.
174. Yamamoto T, Noble NA, Cohen AH i sur. Expression of transforming growth factor-beta isoforms in human glomerular diseases. *Kidney Int* 1996;49:461-9.
175. Chihara Y, Ono H, Ishimitsu T, Ono Y. Roles of TGF-beta1 and apoptosis in the progression of glomerulosclerosis in human IgA nephropathy. *Clin Nephrol* 2006;65:385-92. 442.
176. Iwano M, Akai Y, Fujii Y, Dohi N, Dohi MK. Intraglomerular expression of transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) mRNA in patients with glomerulonephritis: quantitative analysis by competitive polymerase chain reaction. *Clin Exp Immunol* 1994;97:309-314.
177. Nonaka TS, Fujita T, Takahashi T i sur. TGF-beta1 and CTGF mRNAs are correlated with urinary protein level in IgA nephropathy. *J Nephrol* 2008;21:53-63.
178. Ruan Y, Zhang Z, Zhang X, Liu C, Guo M. The expressions of TGF-beta1 and Smad 2 mRNA on diseased glomeruli and their significance in the development of glomerulosclerosis. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2002;31(4):314-7.
179. Han SY, Ihm CG, Cha DR i sur. Effect of IgA aggregates on transforming growth factor-beta1 production in human cells and the intraglomerular expression of transforming growth factor-beta1 in patients with IgA nephropathy. *Korean J Intern Med* 2005;20:40-7.
180. Brabcova I, Tesar V, Honsova E i sur. Association of advanced vasculopathy and transforming growth factor-beta1 gene expression with immunoglobulin A nephropathy progression. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:573-579.
181. Yang CW, Hsueh S, Wu MS, Lai PC. Glomerular transforming growth factor-beta1 mRNA as a marker of glomerulosclerosis-application in renal biopsies. *Nephron* 1997;77:290-7.
182. Ballardie FW, Gordon MT, Sharpe PT, Darvill AM, Cheng H. Intrarenal cytokine mRNA expression and location in normal and IgA nephropathy tissue: TGF alpha, TGF beta, IGF 1, IL-4 and IL-6. *Nephrol Dial Transplant* 1994;9(11):1545-52.
183. Eikmans M, Baelde HJ, Hagen EC i sur. Renal mRNA Levels as Prognostic Tools in Kidney Diseases. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:899-907.
184. Taniguchi Y, Yorioka N, Masaki T i sur. Role of Transforming Growth Factor- $\beta$  in Glomerulonephritis. *Journal of International Medical Research* 1997;25:71-80.



185. Wada T, Hamakawa S, Hori Y i sur. Immunohistochemical localization of latent transforming growth factor-beta binding protein in IgA nephropathy. *Kidney Int* 1997;63:182-4.
186. Meng H, Zhang L, Xiaoqiang E i sur. Application of Oxford classification, and overexpression of transforming growth factor- $\beta$ 1 and immunoglobulins in immunoglobulin A nephropathy: correlation with World Health Organization classification of immunoglobulin A nephropathy in a Chinese patient cohort. *Translational Research* 2014;163:8–18.
187. Ebefors K, Granqvist A, Ingelsten M, Molne J, Haraldsson B, Nystrom J. Role of Glomerular Proteoglycans in IgA Nephropathy. *PLoS ONE* 2011;6(4): e18575.
188. Muda OA, Feriozzi S, Rahimi S, Faraggiana T. Expression of TGF-beta receptors type I and II in human glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:279-84.
189. Taniguchi Y, Yorioka N, Masaki T, Asakimori Y, Yamashita K, Yamakido M. Localization of transforming growth factors beta1 and beta2 and epidermal growth factor in IgA nephropathy. *Scand J Urol Nephrol* 1999;4:243-7.
190. Endo T, Nakabayashi K, Sekiuchi M, Kuroda T, Soejima A, Yamada A. Matrix metalloproteinase-2, matrix metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the peripheral blood of patients with various glomerular diseases and their implication in pathogenetic lesions: study based on an enzyme-linked assay and immunohistochemical staining. *Clin Exp Nephrol* 2006;10:253–26.
191. Kim WH, Moon CK, Park SY, Hong HK, Lee HS. Differential expression of platelet-derived growth factor and transforming growth factor- $\beta$  in relation to progression of IgA nephropathy. *Nephrology* 2002;7:131–139.
192. Yamamoto T, Watanabe T, Ikegaya N i sur. Expression of Types I, II, and III TGF- $\beta$  Receptors in Human Glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:2253-2261.
193. Goumenos DS, Tsamandas AC, Oldroyd S i sur. Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 and Myofibroblasts: A Potential Pathway towards Renal Scarring in Human Glomerular Disease. *Nephron* 2001;87:240–248.
194. Kim TS, Kim JY, Hong HK, Lee HS. mRNA expression of glomerular basement membrane proteins and TGF-beta1 in human membranous nephropathy. *J Pathol* 1999;189(3):425-30.
195. Kim HJ, Kim KB, Moon KC. Activation of the TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2003;64:1715–1721.

196. Mattii L, Segnani C, Cupisti A. Kidney expression of RhoA, TGF-beta1, and fibronectin in human IgA nephropathy. *Nephron Exp Nephrol* 2005;101:16-23.
197. De Heer E, Sijpkens YWJ, Verkade M. Morphometry of interstitial fibrosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15:72-73.
198. Rastaldi MP, Tunesi S, Ferrario F i sur. Transforming growth factor-b, endothelin-1, and c-fos expression in necrotizing/crescentic IgA glomerulonephritis *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:1668–1674.
199. Ito Y, Goldschmeding R, Kasuga H. Expression patterns of connective tissue growth factor and of TGF- $\beta$  isoforms during glomerular injury recapitulate glomerulogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010;299:545-558.
200. Niemir ZI, Stein H, Irene L i sur. PDGF and TGF- $\beta$  contribute to the natural course of human IgA glomerulonephritis. *Kidney Int* 1995;48:1530-1541.
201. Silva GE, Costa RS, Ravinal RC, dos Reis MA, Dantas M, Coimbra TM. Mast cells, TGF-beta1 and alpha-SMA expression in IgA nephropathy. *Dis Markers* 2008;24(3):181-90.
202. Danilewicz M, Wagrowska-Danilewicz M. Morphometric and immunohistochemical insight into focal segmental glomerulosclerosis in obese and non-obese patients. *Nefrología* 2009;29(1):35-41.
203. Hlupić LJ. Prognostička vrijednost beta-transformirajućeg faktora rasta u fokalnoj segmentalnoj glomerulosklerozi. Magistarski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2000.
204. Alexopoulos E, Stangou M, Papagianni A, Pantzaki A, Papadimitriou M. Factors influencing the course and the response to treatment in primary focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:1348-1356.
205. Ballermann BJ, Zeidel ML, Gunning ME, Brenner BM. Vasoactive peptides and the kidney. In: The edited by B. M. Brenner and F.J. Rector. Philadelphia PA: Saunders, 1991; 510-583.
206. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura Y i sur. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332:411-415.
207. Klogg Y, Ambar I, Sokolovsky M, Wollberg Z. Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. *Science Wash.* 1988;242:268-270.
208. Niall HD. The evolution of peptide hormones. *Annu Rev Physiol* 1982;44:615-624.
209. Harris RB. Processing of pro-hormone precursor proteins. *Arch Biochem Biophys* 1989;275:315-333.

210. Opgenorth TJ, Wu-Wong JR, Shiosaki K. Endothelin-converting enzymes. *FASEB* 1992;6:2653-2659.
211. Luscher TF, Barton M. Endothelins and Endothelin Receptor Antagonists: Therapeutic Considerations for a Novel Class of Cardiovascular Drugs. *Circulation*. 2000;102:2434-2440.
212. Ritz MF, Stuenkel EL, Dayanithi G, Jones R, Nordmann RR. Endothelin regulation of neuropeptide release from nerve endings of the posterior pituitary. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89:8371-8375.
213. Yanagisawa M, Akihiro I, Ishikawa T i sur. Primary structure, synthesis, and biological activity of rat endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor. *Proc Natl Acad Sci* 1988;85: 6964-6967.
214. Inoqe A, Yanagisawa M, Kimura Y i sur. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Nat Acad Sci* 1999;86:2863-2867.
215. Simonson MS. Endothelins: Multifunctionals Renal Peptides. *Physiological reviews* 1993;73:375-410.
216. Herman WH, Emancipator SN, Rhoten RLP, Simonson MS. Vascular and glomerular expression of endothelin-1 in normal human kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 1998;44:8–17.
217. Simonson MS, Dunn MJ. Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *FASEB J*. 1990;4:2989-3000.
218. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature Land*. 1990;348:730-732.
219. Cyr C, Heubner K, Druck T, Kris R. Cloning and chromosomal localization of a human endothelin ETRA receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1991;181:184-190.
220. Nakamuta M, Takayanagi R, Sakai Y. Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding human non-selective type of endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;177:34-39.
221. Nakamura S, Naruse M, Naruse K, Demura H, Uemura H. Immunocytochemical localization of endothelin in cultured bovine endothelial cells. *Histochemistry* 1990;94:475-477.
222. Vane JR, Botting R, Masaki T. Endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989;13:S1-S231.
223. Ortega Mateo A, Artinano AA. Highlihts on Endothelins: A Review. *Pharmacological Research* 1997;36:339-351.

224. Flynn MA, Haleen SJ, Welch KM, Cheng XM, Reynolds EE. Endothelin B receptors on human endothelial and smooth-muscle cells show equivalent binding pharmacology. See comment in PubMed Commons below J Cardiovasc Pharmacol. 1998;32(1):106-16.
225. Martin ER, Brenner BM, Ballermann BJ. Heterogeneity of cell surface endothelin receptors. J Biol Chem 1990;265:14044-14049.
226. Kohzuki M, Johnston CI, Chai SY, Casley D, Mendesohn FA. Localization of endothelin receptors in rat kidney. Eur J Pharmacol 1989;160:193-194.
227. Jones, CR, Hiley CR, Pelton JT, Miller RC. Autoradiographic localization on endothelin binding sites in kidney. Eur J Pharmacol 1989;163:379-382.
228. Wagner OF, Christ G, Wojta J. Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. J Biol Chem 1992;267:16066-16068.
229. Maccumber MW, Ross CA, Glaser MB, Synder SN. Endothelin: visualization of mRNAs by in situ hybridization provides evidence for local action. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86:7285-7289.
230. Erdos EG, Skidgel RA. Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones. FASEB J 1989;163:145-151.
231. Hirata Y, Yoshimi H, Takaichi S, Yanagisawa M, Masaki T. Binding and receptor down-regulation of a novel vasoconstrictor endothelin in cultured rat vascular smooth muscle cells. FEBS Lett. 1988;239:13-17.
232. Hallam TJ, Rink TJ. Receptor-mediated Ca<sup>2</sup> entry: diversity of function and mechanism. Trends Pharmacol Sci 1989;10:8-10.
233. Berridge MJ, Irvine RV. Inositol phosphates and cell signaling. Nature Lond 1990; 341:197-205.
234. Rasmussen K, Printz MT. Depolarization potentiates endothelin-induced effects on cytosolic calcium in bovine adrenal chromaffin cells. Biochem Biophys Res Commun. 1989;165:306-311.
235. Resink TJ, Scott-Burden T, Buhler FR. Activation of multiple signal transduction pathways by endothelin in cultured human vascular smooth muscle cells. Eur J Biochem 1990;189:415-421.
236. Badr KF, Munger KA, Sugiura M, Snajdar RM, Schwartzberg M, Inagami T. High and low affinity binding sites for endothelin on cultured rat glomerular mesangial cells. Biochem Biophys Res Commun 1989;161:776-781.

237. Lopez-Farre AD, Gomez-Garre F, Bernabeu I, Montanes I, Millas I, Lopez-Novoa JM. Renal effects and mesangial cell contraction induced by endothelin are mediated by PAF. *Kidney Int* 1991;39:624-630.
238. Kohan DE. The renal medullary endothelin system in control of sodium and water excretion and systemic blood pressure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006;15:34-40.
239. Simonson MS, Jones JM, Dunn MJ. Differential regulation of fos and jun gene expression and AP-1 cis-element activity by endothelin isopeptides: possible implications for mitogenic signaling by endothelin. *J Biol Chem* 1992;267:8643-8649.
240. Zoja C, Orisio S, Perico N i sur. Constitutive expression of endothelin gene in cultured human mesangial cells and its modulation by transforming growth factor, thrombin, and a thromboxane A analogue. *Lab Invest.* 1991;64:16-25.
241. Cairns H, Rogerson ME, Fairbanks LD, Nield GH, Westwick J. Endothelin induces an increase in renal vascular resistance and a fall in glomerular filtration rate in the rabbit isolated perfused kidney. *Br J Pharmacol* 1989;98:155-160.
242. King AJ, Brenner BM, Anderson S. Endothelin: a potent renal and systemic vasoconstrictor peptide. *Am J Physiol* 1989;25:1051-1058.
243. Kitamura K, Tanaka T, Kato J, i sur. Regional distribution of immunoreactive endothelin in porcine tissue: abundance in inner medulla of kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:348-352.
244. Dhaun N, Goddard J, Webb DJ. The Endothelin System and Its Antagonism in Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:943-955.
245. Nord EP. Renal actions of endothelin. *Kidney Int* 1993;44:451-463.
246. Dancu M, Berardi D, Vanden Heuvel J, Tarbell J. Asynchronous shear stress and circumferential strain reduces endothelial NO synthase and cyclooxygenase-2 but induces endothelin-1 gene expression in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:2088-2094.
247. Evans R, Madden A, Oliver J, Lewis T. Effects of ETRA and ETRB receptor antagonists on regional kidney blood flow, and response to intravenous endothelin-1, in anaesthetized rabbits. *J Hypertens* 2001;19:1789- 1799.
248. Ge Y, Ahn D, Stricklett P i sur. Collecting duct-specific knockout of endothelin-1 alters vasopressin regulation of urine osmolality. *Am J Physiol* 2005; 288:912-920.

249. Prins BA, Hu RM, Nazario B i sur. Prostaglandin E2 and prostacyclin inhibit the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 1994; 269:11938-44.
250. Sorokin A, Kohan DE. Physiology and pathology of endothelin-1 in renal mesangium. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285:279-289.
251. Simonson MS, Wann S, Mene P i sur. Endothelin stimulates phospholipase C, Na /H exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells. *J Clin Invest* 1989; 83:708–712.
252. Simonson M, Dunn MJ. Endothelin-1 stimulates contraction of rat glomerular mesangial cells and potentiates adrenergic-mediated cyclic adenosine monophosphate accumulation. *J Clin Invest* 1990;85:790–797.
253. Iwamoto T, Tamaki K, Nakayama M, Okuda S, Fujishima M. Effect of endothelin 1 on fibrinolysis and plasminogen activator inhibitor 1 synthesis in rat mesangial cells. *Nephron* 1996;73:273–279.
254. Yao J, Morioka T, Li B, Oite T. Endothelin is a potent inhibitor of matrix metalloproteinase-2 secretion and activation in rat mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280:628–635.
255. Bakris GL, Re RN. Endothelin modulates angiotensin II-induced mitogenesis of human mesangial cells. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 1993;264:937–942.
256. Jaffer FE, Knauss TC, Poptic E, Abboud HE. Endothelin stimulates PDGF secretion in cultured human mesangial cells. *Kidney Int* 1990;38:1193–1198.
257. Chen Y, Sun Y, Lin J, Zhou A, Wang H. Research on the mechanism of endothelin inflammatory effects on human mesangial cells. *Chin Med J* 1997;110:530–534.
258. Ebihara I, Nakamura T, Tomino Y, Koide H. Effect of a specific endothelin receptor A antagonist and an angiotensin-converting enzyme inhibitor on glomerular mRNA levels for extracellular matrix components, metalloproteinases (MMP) and a tissue inhibitor of MMP in aminonucleoside nephrosis. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:1001–1006.
259. Orth SR, Amann K, Gehlen F, Unger L, Wagner J, Raschack M, Ritz E. Adult human mesangial cells (HMCs) express endothelin-B-receptors which mediate endothelin-1-induced cell growth. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;36:232–237.
260. Hughes AK, Padilla E, Kutchera WA, Michael JR, Kohan DE. Endothelin-1 induction of cyclooxygenase-2 expression in rat mesangial cells. *Kidney Int* 1995;47:53–61.

261. Fukunaga M, Fujiwara Y, Ochi S i sur. Mechanism of induction of prostaglandin E2 production by endothelin 1 in cultured rat mesangial cells. *Exp Nephrol* 1996;4:340–349.
262. Gomez-Garre D, Ruiz-Ortega M, Ortego M i sur. Effects and interactions of endothelin-1 and angiotensin II on matrix protein expression and synthesis and mesangial cell growth. *Hypertension* 1996;27:885–892.
263. Kitamura A, Kagami S, Urushihara M i sur. Endothelin-1 is a potent stimulator of  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 integrin-mediated collagen matrix remodeling by rat mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;299:555–561.
264. Kalluri R. Proteinuria with and without renal glomerular podocyte effacement. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2383–2389.
265. Barton M. Reversal of proteinuric renal disease and the emerging role of endothelin. *Nat Cline Pract Neph* 2008;40:490-501.
266. Fogo AB. Progression and potential regression of glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2001; 59:804–819.
267. Morigi M, Buelli S, Angioletti S i sur. In response to protein load podocytes reorganize cytoskeleton and modulate endothelin-1 gene: implication for permselective dysfunction of chronic nephropathies. *Am J Pathol* 2005;66:1309-1320.
268. Saleh MA, Boesen EI, Pollock JS i sur. Endothelin-1 increases glomerular permeability and inflammation independent of blood pressure in the rat. *Hypertension* 2010;56:942-949.
269. Liu B, Yanagisawa M, Preisig P. The endothelin B (ETB) receptor mediates compensatory renal hypertrophy. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:496A.
270. Zoja C, Morigi M, Figliuzzi M i sur. Proximal tubular cell synthesis and secretion of endothelin-1 on challenge with albumin and other proteins. *Am J Kidney Dis* 1995;26:934–41.
271. Gomez-Garre D, Largo R, Tejera N, Fortes J, Manzarbeitia F, Egido J. Activation of NF-kappa B in tubular epithelial cells of rats with intense proteinuria: role of angiotensin II and endothelin-1. *Hypertension* 2001;37:1171–8.
272. Helset E, Sildnes T, Seljelid R, Konopski ZS. Endothelin-1 stimulates human monocytes in vitro to release TNF-alfa, IL-1 $\beta$  and IL-6. *Mediators of inflammation* 1993;2:417-422.
273. Iwasaki S, Homma T, Matsuda Y, Kon V. Endothelin receptor subtype B mediates autoinduction of endothelin-1 in rat mesangial cells. *J Biol Chem.* 1995; 24:270(12):6997–7003.

274. Yard BA, Chorionopulos E, Herr D, Fokko VDW. Regulation of endothelin-1 and transforming growth factor beta-1 production in cultured proximal tubular cells by albumin and heparan sulfate glycosaminoglycans. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:1769-1775.
275. Kotsantis P, Papadimitropoulos A, Drakopoulos A, Vlachoianis JG, Katsoris P. Albumin upregulates eNOS mRNA through ETRA/B in human proximal tubular epithelial cells. *J Nephrol* 2013;26(3):510-6.
276. Ong ACM, Jowett TP, Firth JD, Burton S, Kitamura M, Fine LG. A new paracrine loop implicated in human tubulo-interstitial fibrosis: Tubular-derived endothelins modulate renal interstitial fibroblast function. *J Am Soc Nephrol* 1993;4:473.
277. Li M, Chen Y, Zhang Z, Gao J. Inhibition of mesangial cell proliferation by antisense oligodeoxynucleotide targeting preproendothelin-1 mRNA in vitro. *Chin Med J* 1999; 112:790–793.
278. Benigni A, Zoja C, Corna D, Orisio S, Facchinetti D, Benati L, Remuzzi G. Blocking both type A and B endothelin receptors in the kidney attenuates renal injury and prolongs survival in rats with remnant kidney. *Am J Kidney Dis* 1996;27(3):416–423.
279. Nakamura T, Ebihara I, Fukui M i sur. Modulation of glomerular endothelin and endothelin receptor gene expression in aminonucleoside-induced nephrosis. *J Am Soc Nephrol* 1995;5:1585–90.
280. Hoher B, Thöne-Reineke C, Rohmeiss P. Endothelin-1 Transgenic Mice Develop Glomerulosclerosis, Interstitial Fibrosis, and Renal Cysts but Not Hypertension. *J Clin Invest* 1997;99:1380–1389.
281. Schwarz A, Godes M, Thöne-Reineke C i sur. Tissue-dependent expression of matrix proteins in human endothelin-1 transgenic mice. *Clin Sci* 2002;48:39-43.
282. Bruzzi I, Corna D, Zoja C i sur. Time course and localization of endothelin-1 gene expression in a model of renal disease progression. *Am J Pathol* 1997;151(5):1241–1247.
283. Boffa JJ, Tharaux PL, Dussaule JC. i sur. Regression of renal vascular fibrosis by endothelin receptor antagonism. *Hypertension* 2001;37:490-496.
284. Feldman DL, Mogelesky TC, Chou M, Jeng AY. Attenuation of puromycin aminonucleoside-induced glomerular lesions in rats by CGS 26303, a dual neutral endopeptidase/endothelin-converting enzyme inhibitor. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36:S342–S345.



285. Yoshimura A, Iwasaki S, Inui K, Ideura S, Koshikawa S, Yanagisawa M, Masaki T. Endothelin-1 and endothelin B type receptor are induced in mesangial proliferative nephritis in the rat. *Kidney Int* 1995;48:1290–1297.
286. Gomez-Garre D, Largo R, Liu XH, Gutierrez S, Lopez-Armada MJ, Palacios I, Egido J. An orally active ETRA/ETRB receptor antagonist ameliorates proteinuria and glomerular lesions in rats with proliferative nephritis. *Kidney Int* 1996;50:962–972.
287. Nakamura T, Ebihara I, Fukui M, Tomino Y, Koide H. Effect of a specific endothelin receptor A antagonist on glomerulonephritis of ddY mice with IgA nephropathy. *Nephron*. 1996;72(3):454-60.
288. Zoja C, Corna D, Bruzzi I i sur. Passive Heymann nephritis: evidence that angiotensin-converting enzyme inhibition reduces proteinuria and retards renal structural injury. *Exp Nephrol* 1996;4:213-21.
289. Benigni A, Corna D, Maffi R, Benedetti G, Zoja C, Remuzzi G. Renoprotective effect of contemporary blocking of angiotensin II and endothelin-1 in rats with membranous nephropathy. *Kidney Int* 1998;54:353–359.
290. Benigni A, Zoja C, Corna D, Orisio S, Longaretti L, Bertani T, Remuzzi G. A specific endothelin subtype A receptor antagonist protects against injury in renal disease progression. *Kidney Int* 1993;44(2):440–444.
291. Hartleben B, Godel M, Meyer-Schwesinger C i sur. Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice. *J Clin Invest* 2010; 120:1084–1096.
292. Ortmann J i sur. Role of podocytes for reversal of glomerulosclerosis and proteinuria in the aging kidney after endothelin inhibition. *Hypertension* 2004;44:974–981.
293. Maixnerová D, Merta M, Reiterová J. The Influence of Three Endothelin-1 Polymorphisms on the Progression of IgA Nephropathy. *Folia Biologica (Praha)* 2007;53:27-32.
294. Nakamura T, Ebihara I, Shirato I, Fukui M, Tomino Y, Koide H. Endothelin-1 mRNA expression by peripheral blood monocytes in IgA nephropathy. *Lancet* 1993;342:1147-8.
295. Chen HC, Guh JY, Chang JM, Lai YH. Differential effects of FMLP-activated neutrophils from patients with IgA nephropathy enhanced endothelin 1 production of glomerular mesangial cells. *Nephron*. 2001;89:274-9.
296. Roccatello D, Mosso R, Ferro M i sur. Urinary endothelin in glomerulonephritis patients with normal renal function. *Clin Nephrol*. 1994; 41(6):323-30.

297. Chen HC i sur. Plasma and urinary endothelin-1 in focal segmental glomerulosclerosis. *J Clin Lab Anal* 2001; 15:59–63.
298. Ohta K, Hirata Y, Shichiri M i sur. Urinary excretion of endothelin-1 in normal subjects and patients with renal disease. *Kidney Int.* 1991; 39(2):307-11.
299. Duan SB, Liu FY, Luo JA, and Peng YM. Assessment of urinary endothelin-1 and nitric oxide levels and their relationship with clinical and pathologic types in primary glomerulonephritis. *Yonsei Med J* 1999; 40: 425–429.
300. Chen CL, Fang HC, Chou KJ i sur. Increased endothelin 1 expression in adult-onset minimal change nephropathy with acute renal failure. *Am J Kidney Dis* 2005;45:818-825.
301. Vlachojannis JG, Tsakas S, Petropoulou C, Goumenos DS, Alexandri S. Endothelin-1 in the kidney and urine of patients with glomerular disease and proteinuria. *Clin Nephrol* 2002; 58(5):337-43.
302. Drakopoulos A, Goumenos DS, Vlachojannis JG, Tsakas S. Endothelin receptors in the kidney of patients with proteinuric and non-proteinuric nephropathies. *Ren Fail* 2006;28:461-467.
303. Horvatić I. Uloga nitričnog oksida i endotelina-1 na razvoj glomerulonefritisa. Magistarski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilišta u Zagrebu, 2009.
304. Chu TS, Wu MS, Hsieh BS. Urinary endothelin-1 in patients with renal disease. *J Formos Med Assoc* 1998;97(10):667-72.
305. Wolf SC, Smolczyk H, Brehm BR, Erley CM, Risler T. Endothelin-1 and endothelin-3 levels in different types of glomerulonephritis. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;31:482-5.
306. Zanatta CM, Veronese FV, Loreto MS. Endothelin-1 and endothelin a receptor immunoreactivity is increased in patients with diabetic nephropathy. *Ren Fail.* 2012;34(3):308-15.
307. Lehrke I, Waldherr H, Eberhard R, Wagner J. Renal Endothelin-1 and Endothelin Receptor Type B Expression in Glomerular Diseases with Proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:2321–2329.
308. Nagai Y, Hara N, Yamaguchi S. Immunohistochemical study of endothelin-1 in preeclamptic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 1997;29(3):345-54.
309. Donadio JV, Grande JC. IgA nephropathy. *N Engl J Med* 2002;347:738-48.
310. Glasscock RJ. Diagnosis and natural course of membranous nephropathy. *Semin Nephrol* 2003;23:324-332.

311. Cattran DC, Coppo R, Terence Cook T i sur. The Oxford classification of IgA nephropathy: rationale, clinicopathological correlations, and classification. *Kidney Int* 2009;76:534–545.
312. D’AgatiVD. Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis. *Sem Nephrol* 2003;23:117-134.
313. Yamamoto T, Noble NA, Miller DE, Border WA. Sustained expression of TGF- $\beta$ 1 underlies development of progressive kidney fibrosis. *Kidney Int* 1994;45:916–927.
314. Herman WH, Emancipator SN, Rhoten RLP, Simonson MS. Vascular and glomerular expression of endothelin-1 in normal human kidney. *Am J Physiol* 1998;275:8–17.
315. Karet FE, Davenport AP. Localization of endothelin peptides in human kidney. *Kidney Int* 1996;49(2):382-7.
316. Lawton LN, Bonaldo MF, Jelenc PC i sur. Identification of a novel member of TGF- $\beta$ 1 superfamily highly expressed in human placenta. *Gene* 1997;203:17-26.
317. Malassiné A, Cronier L, Mondon F, Mignot TM, Ferre F. Localization and production of immunoreactive endothelin-1 in the trophoblast of human placenta *Cell Tissue Res* 1993;271:691-6.
318. Yoshioka K, Takemura T, Murakami K i sur. Transforming growth factor-beta protein and mRNA in glomeruli in normal and diseased human kidneys. *Lab Invest* 1993;68:154-63.
319. Hahn AWA, Resink TJ, Bernhardt J i sur. Stimulation of autocrine platelet-derived growth factor AA-homodimer and transforming growth factor b in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;178:1451–1458.
320. Border WA, Modler DE, Noble NA. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through modulation of transforming growth factor- $\beta$  expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1994;93:2431-2437.
321. Wang C, Liu X, Peng H i sur. Mesangial cells stimulated by immunoglobulin A1 from IgA nephropathy upregulates transforming growth factor-beta1 synthesis in podocytes via renin-angiotensin system activation. *Arch Med Res* 2010;41:255-60.
322. Wolf G, Ziyadeh FN, Zahner G, Stahl RAK. Angiotensin II-stimulated expression of transforming growth factor beta in renal proximal tubular cells: attenuation after stable transfection with the c-mas oncogene. *Kidney Int* 1995;48:1818–1827.

323. Wolf G, Ziyadeh FN, Stahl R. Angiotensin II stimulates expression of transforming growth factor b receptor type II in cultured mouse proximal tubular cells. *J Mol Med* 1999;77:556–564.
324. Syrjanen J, Mustonen J, Pasternack A. Hypertriglyceridemia and hyperuricemia are risk factors for progression of IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:34-42.
325. Chitalia VC, Wells E, Robson RA, Searle M, Lynn KL. Predicting renal survival in primary focal glomerulosclerosis from the time of presentation. *Kidney Int* 1999;56:2236-2242.
326. Murer L, Zacchello G, Basso A i sur. Immunohistochemical distribution of endothelin in biopsies of pediatric nephrotic syndrome. *Am J Nephrol* 1994;14:157-161.

## 12. ŽIVOTOPIS

Miroslav Tišljar rođen je 23.12.1981. u Zagrebu, gdje je završio Osnovnu školu „Mladost“ i 1. Opću gimnaziju. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao je 2000.g. te diplomirao 2006.g. Pripravnički staž obavljao je od 2006./2007.g. u Kliničkom bolničkom centru Sestre milosrdnice u Zagrebu. Od 2007. do 2011. radi kao znanstveni novak-asistent na Zavodu za nefrologiju i hemodijalizu Kliničke bolnice Dubrava u Zagrebu. Od 2011. g. radi u Klinici za unutarnje bolesti u svojstvu specijalizanta interne medicine, a specijalistički ispit iz interne medicine polaže 14.05.2015. godine. Poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pohađao je od 2007. do 2010. godine. Prijedlog teme doktorske disertacije „Utjecaj pretvorbenog čimbenika rasta beta i endotelina-1 na tijek primarnog glomerulonefritisa“ prihvaćen je 2009. godine. Kao autor ili koautor publicirao je 3 rada indeksiranih u CC časopisima, i još nekoliko radova indeksiranih u Experta Medica, Index Medicus. Autor je nekoliko poglavlja u sveučilišnom udžbeniku Bolesti glomerula primarne i sekundarne, izdavač Medicinska naklada Zagreb, 2014. godine. Aktivno sudjeluje u nastavi, vježbama i seminarima iz kolegija Klinička propedeutika i Interna medicina na Medicinskom fakultetu i na kolegiju Fiziologija s anatomijom čovjeka na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U dosadašnjem radu dobitnik je triju nagrada: nagrada za najbolju poster prezentaciju na VII Općem internističkom kongresu, Opatija 09/2012., nagrada za najbolji prikaz slučaja na natjecanju specijalizanata i specijalista interne medicine, Plitvička jezera 03/2012. godine, nagrada za najbolju poster prezentaciju na 12. BANTAO skupu, 15-18. listopada 2015. u Opatiji.