



UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
KLINIČKA MEDICINA

BIOMARKER LIPOKALIN 2 U DIJAGNOSTICI PRIMARNIH GLOMERULONEFRITISA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Prof. dr Igor Mitić

Kandidat: Asist. dr Gordana Stražmešter
Majstorović

Novi Sad, 2016. godina

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Gordana Stražmešter Majstorović
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Igor Mitić, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu
Naslov rada: NR	Biomarker lipokalin 2 u dijagnostici primarnih glomerulonefritisa
Jezik publikacije: JP	srpski
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina, Novi Sad
Godina: GO	2016.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Medicinski fakultet, Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Fizički opis rada: FO	broj poglavlja: 9; broj stranica: 144; broj slika: 9; broj grafikona: 39; broj tabela: 38; broj referenci: 133; broj priloga: 4
Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Nefrologija

Predmetna odrednica, ključne reči: PO	lipokalini; glomerulonefritis; biomarkeri; dijagnostika; proteinurija; bubrežna insuficijencija; prognoza; ishod lečenja
UDK	616.611-002-076
Čuva se: ČU	Biblioteka Medicinskog fakulteta u Novom Sadu
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>Primarni glomerulonefritisi predstavljaju inflamatorna oboljenja bubrega, kod kojih su primarno zahvaćeni glomerulusi, ali promene na tubulointercijumu imaju veliki značaj za tok i prognozu bolesti. Pored kliničko-laboratorijskih ispitivanja, perkutana biopsija bubrega zauzima značajno mesto u dijagnostici posebnih oblika glomerulonefritisa. Lipokalin vezan za neutrofilnu gelatinazu (NGAL) zauzima značajno mesto medju novijim biomarkerima u nefrologiji. Osnovna funkcija mu je transport gvoždja, ali ima ulogu i u regulaciji metabolizma gvoždja, regulaciji inflamacije, dok u masnom tkivu utiče na razvoj insulinske rezistencije i dijabetesa. Cilj ispitivanja je utvrditi nivo lipokalina 2 u serumu i urinu bolesnika sa primarnim glomerulonefritsom, te utvrditi postojanje korelacije izmedju nivoa lipokalina 2 i patohistološkog oblika glomerulonefritisa, stepenom bubrežne insuficijencije i brzinom progresije bubrežne insuficijencije. Takodje, cilj ispitivanja je bio analizirati povezanost lipokalina 2 sa odogovorom na primenjenu terapiju glomerulonefritisa. Ispitivanje je sprovedeno na 60 bolesnika sa dijagnozom primarnih glomerulonefritisa. Nivo lipokalina 2 je odredjivan pri postavljanju dijagnoze i nakon minimalno šest meseci lečenja. Rezultati studije ukazuju da bolesnici sa primarnim glomerulonefritsom imaju značajno veće nivoe lipokalina 2 u odnosu na zdrave osobe. Bolesnici sa proliferativnim oblicima primarnih glomerulonefritisa imaju veće nivoe NGAL-a u serumu i odnosa uNGAL/kreatinin, ali razlika nije statistički značajna. Nije utvrđeno postojanje značajne razlike u prosečnim nivoima NGAL-a u serumu, niti urinu, pri postavljanju dijagnoze, izmedju bolesnika sa pozitivnim i negativnim efektom lečenja primarnog glomerulonefritisa. Utvrđeno je postojanje korelacije izmedju nivoa NGAL-a u serumu i vrednosti kreatinina,</p>

	<p>ureje, mokraćne kiseline, klirensa kreatinina i broja leukocita, dok je sa nivoom NGAL-a u urinu utvrđena korelacija sa klirensom kreatinina, dnevnom proteinurijom i serumskim albuminima. Utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike u prosečnim nivoima NGAL-a u serumu u zavisnosti od stadijuma bubrežne insuficijencije. Nije utvrđeno postojanje značajne razlike u prosečnim nivoima NGAL-a u serumu pri postavljanju dijagnoze, između bolesnika sa povoljnim i nepovoljnim efektom lečenja na bubrežnu funkciju.</p>
<p>Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP</p>	<p>25.09.2012.</p>
<p>Datum odbrane: DO</p>	
<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	<p>predsednik: član: član: član: član:</p>

University of Novi Sad
ACIMSI
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD
Author: AU	Gordana Stražmešter Majstorović
Mentor: MN	Prof. dr Igor Mitić
Title: TI	Lipocalin 2 biomarker in diagnosis od primary glomerulonephritis
Language of text: LT	serbian
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina, Novi Sad
Publication year: PY	2016.
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	Medical faculty, Novi Sad, Hajduk Veljkova 9
Physical description: PD	chapters 9; pages 144; pictures 9; graphs 39; tabeles 38; refferences 133; appendix 4
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Nephrology
Subject, Key words SKW	Lipocalins; Glomerulonephritis; Biomarkers; Diagnosis; Proteinuria; Renal Insufficiency; Prognosis; Treatment Outcome
UC	616.611-002-076
Holding data: HD	Library of Medical faculty in Novi Sad

<p>Note: N</p>	
<p>Abstract: AB</p>	<p>The primary glomerulonephritis are inflammatory kidney diseases. Glomerulus are primarily affected, but tubulointerstitial changes are very important for course and prognosis of the disease. In addition to clinical and laboratory testing, percutaneous renal biopsy has an important place in the diagnosis of specific forms of glomerulonephritis. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) occupies an important place among the newer biomarkers in nephrology. The main function of NGAL is transport of iron, whether it has a role in the regulation of iron metabolism, regulation of inflammation, while in adipose tissue affects the development of insulin resistance and diabetes. The aim of this study was to determine the level of lipocalin 2 in serum and urine of patients with primary glomerulonephritis and determine the existence of a correlation between the level of lipocalin 2 and histological forms of glomerulonephritis, the degree of renal insufficiency and speed of progression of renal insufficiency. Also, the aim of this study was to analyze the association of lipocalin 2 with the effect of therapy for glomerulonephritis. The study was conducted on 60 patients diagnosed with primary glomerulonephritis. The levels of lipocalin 2 were determined at diagnosis and after a minimum of six months of treatment. The study results show that patients with primary glomerulonephritis have significantly higher levels of lipocalin 2 compared to healthy people. Patients with proliferative forms of primary glomerulonephritis have higher levels of NGAL in serum and ratio uNGAL/creatinine, but the difference was not statistically significant. There was no significant differences in average levels of NGAL in serum or urine at the beginning, between patients with positive and negative effects of the treatment of primary glomerulonephritis. Correlation was found between the level of NGAL in serum and creatinine, urea, uric acid, creatinine clearance and the number of leukocytes, while the level of NGAL in urine correlated with creatinine clearance, the daily proteinuria and serum albumin. Statistically significant differences in mean levels of NGAL in serum depending on the</p>

	severity of renal insufficiency were found. No evidence of significant differences in average levels of NGAL in serum at the beginning, among patients with favorable and unfavorable effects of treatment on renal function were found.
Accepted on Scientific Board on: AS	25.09.2012.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	president: member: member: member: member:

Zahvaljujem se svima koji su doprineli i pomogli izradi ove doktorske teze.

*Zahvaljujem se svom mentoru **Prof. dr Igoru Mitiću** na velikoj pomoći prilikom odabira teme istraživanja, dragocenim savetima, podršci i strpljenju prilikom izrade teze.*

Zahvaljujem se svojim kolegama i celokupnom osoblju Klinike za nefrologiju i kliničku imunologiju KC Vojvodine na nesebičnoj pomoći prilikom izrade teze. Posebno se zahvaljujem osoblju Polikliničke službe i Imunološke laboratorije naše klinike, bez kojih ovo istraživanje ne bi bilo moguće.

Takodje se zahvaljujem i kolektivu Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma KC Vojvodine, koji su mi omogućili sprovođenje dela istraživanja na svojoj klinici.

*Zahvaljujem se svojoj porodici, na ogromnoj podršci i pomoći i beskrajnom stpljenju i razumevanju. Zahvaljujem se svojoj deci, **Heleni i Aleksandru**, kojima posvećujem ovaj rad.*

Autor

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. GLOMERULONEFRITISI	1
1.1.1. KLASIFIKACIJA GLOMERULONEFRITISA	1
1.1.2. KLINIČKI SINDROMI PRIMARNIH GLOMERULONEFRITISA	3
1.1.3. DIJAGNOZA PRIMARNIH GLOMERULONEFRITISA	5
1.1.4. TERAPIJA PRIMARNIH GLOMERULONEFRITISA	7
1.1.5. PROGNOZA I TOK PRIMARNIH GLOMERULONEFRITISA	8
1.2. BIOMARKERI	8
1.3. PORODICA LIPOKALINA	10
1.3.1. LIPOKALIN 2	11
1.3.1.1. Struktura lipokalina 2	11
1.3.1.2. Lokalizacija lipokalina 2	13
1.3.1.3. Ligandi lipokalina 2	14
1.3.1.4. Membranski receptori lipokalina 2	17
1.3.1.5. Metabolizam gvoždja	18
1.3.1.6. Funkcije lipokalina 2	19
1.3.1.7. Regulacija ekspresije lipokalina 2	26
1.4. LIPOKALIN 2 U BUBREŽNIM OBOLJENJIMA	28
1.4.1. METABOLIZAM LIPOKALINA 2 I GVOŽDJA U BUBREZIMA	28
1.4.2. INFLAMACIJA, PRIMARNI IMUNITET I LIPOKALIN 2 U BUBREŽNIM OBOLJENJIMA	30
1.4.3. LIPOKALIN 2 I AKUTNA BUBREŽNA LEZIJA	34
1.4.4. LIPOKALIN 2 I HRONIČNA BUBREŽNA INSUFICIJENCIJA	36
1.4.5. LIPOKALIN 2 I SEKUNDARNI GLOMERULONEFRITISI U OKVIRU SISTEMSKOG LUPUSA I VASKULITISA	38
1.4.6. LIPOKALIN 2 I PRIMARNI GLOMERULONEFRITISI	40
1.4.7. LIPOKALIN 2 I DRUGE BUBREŽNE BOLESTI	43
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	45
3. RADNE HIPOTEZE	46
4. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA	47
4.1. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	52
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA	53
5.1. DEMOGRAFSKE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA	54
5.1.1. POLNA STRUKTURA ISPITANIKA	54
5.1.2. STAROSNA STRUKTURA ISPITANIKA	54
5.2. VREDNOSTI NGAL-A U SERUMU I URINU ISPITANIKA	55
5.3. NIVO NGAL-A I PATOHISTOLOŠKI TIP GLOMERULONEFRITISA	57

5.4.	NIVO NGAL-A I STEPEN INTERSTICIJALNE FIBROZE I STEPEN TUBULSKE ATROFIJE	62
5.4.1.	NIVO NGAL-A I STEPEN INTERSTICIJALNE FIBROZE	62
5.4.2.	NIVO NGAL-A I STEPEN ATROFIJE TUBULA	64
5.5.	NIVO NGAL-A I KLINIČKA SLIKA PRIMARNIH GLOMERULONEFRITISA	67
5.5.1.	NIVO NGAL-A I POSTOJANJE ARTERIJSKE HIPERTENZIJE	70
5.6.	NIVO NGAL-A I TERAPIJA PRIMARNIH GLOMERULONEFRITISA	71
5.6.1.	NIVO NGAL-A I PRIMENA ACE INHIBITORA U TERAPIJI	72
5.7.	NIVO NGAL-A I ODGOVOR NA PRIMENJENU TERAPIJU	73
5.8.	NIVO NGAL-A I PROGNOСТИČKI LOŠI OBLICI PRIMARNIH GLOMERULONEFRITISA	76
5.9.	NIVO NGAL-A I PARAMETRI BUBREŽNE FUNKCIJE	77
5.9.1.	NIVO NGAL-A I BUBREŽNA INSUFICIJENCIJA	79
5.9.2.	NIVO NGAL-A I POGORŠANJE BUBREŽNE FUNKCIJE	83
5.10.	NIVO NGAL-A I 24-ČASOVNA PROTEINURIJA	86
5.11.	NIVO NGAL-A I MIKROHEMATURIJA	91
5.12.	NIVO NGAL-A, SERUMSKI ALBUMINI I UKUPNA KOLIČINA VODE U ORGANIZMU	92
5.13.	NIVO NGAL-A I PARAMETRI INFLAMACIJE	93
5.14.	NIVO NGAL-A I PARAMETRI METABOLIZMA GVOŽDJA	95
5.15.	NIVO NGAL-A I STEPEN UHRANJENOSTI	98
6.	DISKUSIJA	100
7.	ZAKLJUČCI	128
8.	LITERATURA	130
9.	PRILOZI	139
9.1.	SPISAK SKRAĆENICA	139
9.2.	TEKST INFORMATIVNOG PRISTANKA BOLESNIKA	141
9.3.	INFORMACIJA ZA BOLESNIKA O UČEŠĆU U ISPITIVANJU	142
9.4.	PROTOKOL ISTRAŽIVANJA	143

1. UVOD

1.1. GLOMERULONEFRITISI

Glomerulonefritisi (GN) predstavljaju heterogenu grupu oboljenja u kojoj je inflamatornim procesom predominantno oštećena struktura ili funkcija glomerulusa. Još Hipokrat je opisao oboljenje koje karakterišu bolovi u leđima i pojava krvi u mokraći, a u daljem toku dovodi do razvoja oligoanurije. Ovo oboljenje bi odgovaralo akutnom glomerulonefritisu. U drugoj polovini XVIII veka je opisano oboljenje koje je povezano sa šarlahom i dobilo je naziv „vodena bolest“. Richard Bright je 1827. godine dao najdetaljniji opis oboljenja, te je po njemu dobilo naziv Bright-ova bolest. Razvojem mikroskopa započinje ispitivanje i definisanje patohistoloških promena na glomerulusima. Početkom XX veka su uradjene prve otvorene biopsije bubrega. Iversen i Brun su 1951. godine uradili prve perkutane biopsije bubrega, sa upotrebom igle za biopsiju, koje sada predstavljaju uobičajenu proceduru u dijagnostici primarnih glomerulonefritisa. (1)

Primarni glomerulonefritisi se razlikuju prema etiopatogenezi, kliničkoj slici i morfološkim promenama bubrežnih struktura. Jedna od uobičajenih podela glomerulonefritisa je na primarne i sekundarne, u zavisnosti da li se glomerulonefritis javlja kao jedina manifestacija oboljenja ili je samo deo kliničke slike u okviru oboljenja koje zahvata više organskih sistema. Kod primarnih glomerulskih bolesti osnovne promene se javljaju na glomerulusima, ali se mogu naći prateće promene i ostalih struktura bubrega. Ekstrarenalni poremećaji se javljaju sekundarno, kao posledica oštećenja bubrežnog parenhima. Primarne glomerulske bolesti se dalje mogu podeliti na idiopatske, odnosno nepoznatog uzroka, koje su najčešće i one poznatog uzroka, u čijoj osnovi su infekcije ili lekovi. Sekundarni glomerulonefritisi se javljaju u okviru različitih sistemskih, metaboličkih ili hereditarnih oboljenja. Ekstrarenalne manifestacije bolesti obično prethode glomerularnim promenama. Na osnovu morfoloških promena u bubrežnom parenhimu, glomerulonefritisi se dele na proliferativne i neproliferativne forme. Neproliferativni glomerulonefritisi se odlikuju promenama glomerularne bazalne membrane i procesima skleroze. Proliferativni glomerulonefritisi se odlikuju umnožavanjem mezangijalnih, endotelnih ili epitelnih ćelija Bowman-ove kapsule glomerulusa.

Patološki procesi u bubrezima u okviru glomerulonefritisa, se na osnovu proširenosti mogu podeliti na:

1. fokalne, sa zahvatanjem samo nekih glomerulusa,
2. difuzne, sa zahvatanjem svih ili skoro svih glomerulusa,
3. segmentalne, sa zahvatanjem samo nekih delova glomerulusa i
4. globalne, sa zahvatanjem celih glomerulusa.

1.1.1. KLASIFIKACIJA GLOMERULONEFRITISA

Prve klasifikacije glomerulonefritisa se javljaju krajem XIX i početkom XX veka kada su glomerulonefritisi, prema toku oboljenja, podeljeni na akutni, subakutni i hronični glomerulonefritis. Nezadovoljan ovom podelom, Volhard 1918. godine pravi novu klasifikaciju glomerulonefritisa, koja uključuje: 1. nefrozu, 2. fokalni nefritis, 3. akutni

difuzni glomerulonefritis i 4. hronični difuzni glomerulonefritis. Bell, 1938. godine, ponovo u upotrebu vraća staru klasifikaciju na akutni, subakutni i hronični glomerulonefritis, s tim što definiše 7 podtipova akutnog glomerulonefritisa, prema etiološkim i morfološkim razlikama. Tokom 1942. godine Ellis definiše dva tipa glomerulonefritisa, gde prvi tip karakteriše nagao početak nakon infekcije, sa prisustvom hematurije i relativno dobrim tokom oboljenja, dok su za drugi tip karakteristični masivna proteinurija i edemi, sa retkom spontanom remisijom. Već dve godine kasnije, Fahr ponovo predlaže upotrebu podele na akutni, subakutni (subhronični) i hronični glomerulonefritis, koju je 1947. godine prihvatio i Becher. Habib 1961. godine, prva predlaže podelu glomerulonefritisa na osnovu morfoloških promena u bubrezima na (1):

1. Minimalne promene,
2. Zadebljanje kapilarnih zidova (membranski glomerulonefritis),
3. Ekstrakapilarni, proliferativni glomerulonefritis,
4. Endokapilarni proliferativni glomerulonefritis,
5. Endokapilarni proliferativni glomerulonefritis sa hijalnim nodulima (Lobularni glomerulonefritis).

Deset godina kasnije 1971. godine, Glyda predlaže podelu glomerulonefritisa na četiri grupe i nekoliko podgrupa na osnovu prognostičkih kriterijuma i patoanatomskih promena u bubrezima. Idućih nekoliko godina, Cameron, Kincaid-Smith i Thoenes objavljuju klasifikacije glomerulonefritisa, koje se zasnivaju na podeli predloženoj od strane Habib. (1)

Prema morfološko-kliničkoj klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije iz 1982. godine, glomerulonefritisi su podeljeni u grupu primarnih i sedam grupa sekundarnih glomerulonefritisa.

I - Primarne glomerulske bolesti (Glomerulonefritisi i slična stanja)

1. Minimalne glomerularne abnormalnosti,
2. Fokalno - segmentne lezije,
3. Difuzni glomerulonefritis:
 - Membranozni glomerulonefritis,
 - Mezangioproliferativni glomerulonefritis,
 - Endokapilarni proliferativni glomerulonefritis,
 - Mezangiokapilarni glomerulonefritis (membranoproliferativni, tip I i III),
 - Glomerulonefritis gustih membranskih depozita (membranoproliferativni tip II),
 - Ekstrakapilarni glomerulonefritis sa stvaranjem polumeseca,
 - Sklerozirajući glomerulonefritis,
4. Neklasifikovani glomerulonefritis;

II - Glomerulonefritisi u sistemskim bolestima

glomerulonefritis u okviru sistemskog eritemskog lupusa (lupus nefritis), Goodpasture-ovog sindroma, sindroma preklapanja bolesti vezivnog tkiva, reumatoidnog artritisa, Sjögrenovog sindroma, sklerodermije, sepse i drugih oboljenja;

III - Glomerulonefritisi u toku vaskularnih bolesti

glomerulonefritis u okviru granulomatoze sa poliangitisom, Periarteritis nodosa, Trombotičke mikroangiopatije, Henoch–Schönlein-ove purpore; Benigna i maligna nefroskleroza;

IV - Glomerulopatije u toku metaboličkih bolesti

V - Hereditarne nefropatije

VI - Različite glomerulopatije

VII - Sklerotičan bubreg (*end-stage kidney*)

VIII - Glomerulopatije transplantiranog bubrega.

U novije vreme se opisuju i fibrilarni i imunotaktoidni glomerulonefritis, koji se većinom javljaju kao primarni glomerulonefritisi, ali se mogu razviti i kao sekundarni u okviru hepatitis C infekcije.

1.1.2. KLINIČKI SINDROMI PRIMARNIH GLOMERULONEFRITISA

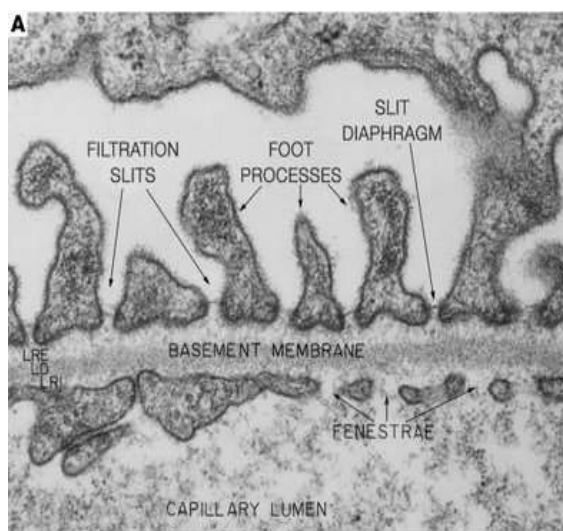
Glomerularne bolesti, veoma različite po imunopatogenezi, etiologiji i morfološkim promenama u bubrezima, klinički se ispoljavaju relativno ograničenim brojem simptoma i laboratorijskih nenormalnosti. Laboratorijskim pretragama urina se kvalitativno i kvantitativno određuje prisustvo proteinurije, dok se pregledom sedimenta urina utvrđuje prisustvo hematurije, te cilindara ili leukocita u urinu. Razvoj oštećenja bubrežne funkcije se dokazuje na osnovu povećanih koncentracija ureje i kreatinina u serumu i smanjenih vrednosti klirensa kreatinina. Smanjenje jačine glomerularne filtracije i retencija natrijuma i vode dovode do razvoja edema i arterijske hipertenzije. Različitim kombinacijama navedenih poremećaja dobijamo osnovne kliničke sindrome glomerularnih oboljenja, koji obuhvataju:

1. *Akutni nefritisni sindrom* koji karakteriše nagao početak, hematurija, proteinurija, oligurija, edemi, arterijska hipertenzija i porast azotnih materija;
2. *Brzo progresivni nefritisni sindrom* koji karakteriše nagao ili redje postepen početak, hematurija, proteinurija, anemija i brzo i progresivno oštećenje bubrežne funkcije;
3. *Rekurentna ili perzistentna hematurija* koju karakteriše nagao ili postepen početak makroskopske ili mikroskopske hematurije sa neznatnom ili normalnom proteinurijom, bez drugih simptoma ili znakova nefritisnog sindroma;
4. *Hronični nefritisni sindrom* koji karakteriše sporo progresivna bubrežna insuficijencija, proteinurija, hematurija i arterijska hipertenzija;
5. *Nefrotski sindrom* koji karakteriše obilna proteinurija, hipoproteinemija, hipoalbuminemija, disproteinemija, edemi i hiperlipoproteinemija.

Uz akutnu bubrežnu leziju nepoznatog uzroka, nefrotski sindrom predstavlja najčešću indikaciju za perkutanu biopsiju bubrega. (2-6) To je česta i ozbiljna klinička manifestacija glomerulonefritisa, koju karakteriše postojanje obilne proteinurije, uz pojavu testastih edema, hipoproteinemije i hiperlipidemije. Nefrotsku proteinuriju predstavljaju vrednosti veće od $3\text{gr}/1,73\text{m}^2/24\text{h}$, mada se i manje vrednosti proteinurije mogu smatrati nefrotskim, ako dovode po razvoja hipoalbuminemije i edema. Osnovni poremećaj u

nefrotskom sindromu je povećana propustljivost glomerularne bazalne membrane (GBM), što uslovljava gubitak proteina urinom.

Kao što je već napomenuto, proteinurija je deo kliničke slike većine glomerulonefritisa. U fiziološkim uslovima postoje dve barijere koje ne dozvoljavaju prolazak proteina kroz GBM. Mehaničku barijeru bazalne membrane predstavljaju filtracioni prorezi između podocita, prosečne veličine oko 12 nm, kao i pore (fenestre) između endotelnih ćelija glomerulusa, prosečne veličine oko 60-80 nm. (7,8) Ova mehanička barijera sprečava prolazak serumskih proteina srednje velike i velike molekulske mase. Drugu barijeru prolasku serumskih proteina u urin, predstavlja selektivnost GBM prema naelektrisanju molekule. Na spoljašnjoj i unutrašnjoj strani bazalne membrane se nalazi sloj izgrađen od heparin sulfata proteoglikana, koji membranu čine negativno naelektrisanom. (8,9) Negativnom naelektrisanju doprinosi i površinski sloj koji oblaže podocite i sačinjen je od sijalinske kiseline. (9)



Slika 1. Gradnja glomerularne bazalne membrane
(izvor: Farquhar MG, *J Clin Invest.* 2006;116:8:2090-2093)

Ova električna barijera sprečava prolazak negativno naelektrisanih čestica, čak i male molekulske mase, poput albumina. Promene biohemijske strukture bazalne membrane glomerulusa sa jedne strane dovode do povećanja filtracionih proreza i pora, čime se omogućava prolazak čestica velike molekulske mase, a sa druge strane dolazi do promene naelektrisanja GBM, sa smanjenjem negativnog naelektrisanja, što dalje vodi povećanju propustljivosti za negativno naelektrisane serumске proteine. U nefrotskom sindromu su, u većini slučajeva, oštećene obe barijere.

Osim oštećenja bazalne membrane, na nivo proteinurije utiču i nivo serumskih albumina, sa jačinom onkotskog pritiska plazme i jačina glomerulske filtracije. Proteinurijom, u prvom redu dolazi do gubitka albumina, zbog njihove male molekulske mase, ali se gube i proteini veće molekulske mase poput imunoglobulina, opsonina, transferina, eritropoetina, antitrombina III i drugih inhibitora aktivnosti plazminogena i proteina koji služe kao nosači hormona. Klinička slika zavisi od metaboličke funkcije

proteina čija se koncentracija u serumu smanjuje. Do razvoja edema, ascitesa ili pleuralnih izliva dolazi zbog hipoalbuminemije i smanjenja onkotskog pritiska plazme. Bolesnici sa nefrotskim sindromom su podložni pojavi infekcija, prvenstveno usled smanjenja belančevina koje učestvuju u imunom odgovoru. Povećana je sklonost pojavi tromboembolijskih komplikacija, koje mogu biti veoma ozbiljne kod bolesnika sa nefrotskim sindromom. Osim urinarnog gubitka antitrombina III, povećana sinteza faktora koagulacije u jetri, trombocitni poremećaji i hiperviskoznost usled intravaskularne hipovolemije, takodje imaju protrombogeni efekat. Hiperlipoproteinemija se razvija usled povećane sinteze u jetri proteinskog dela lipoproteina i smanjenog katabolizma lipida u perifernih tkivima.

Druga značajna manifestacija glomerulonefritisa je postojanje hematurije. Poslednjih godina se ističe značaj povezanosti postojanja glomerularne hematurije i razvoja oštećenja bubrežnih tubula i sledstvene bubrežne insuficijencije. (10) Prisustvo glomerularne hematurije ukazuje na postojanje oštećenja glomerularne bazalne membrane, kroz koje dolazi do prolaska eritrocita iz glomerularnih kapilara u urinarni prostor. U glomerulonefritisima tokom kojih dolazi do infiltracije glomerulusa leukocitima, defekti bazalne membrane se objašnjavaju dejstvom leukocita koji proizvode različite proinflatorne citokine i različite tipove metaloproteinaza. (10,11) Ovi produkti inflamatornih ćelija dovode do promena strukture matriksa bazalne membrane. Dokazano je da osim infiltrišućih leukocita, sve vrste ćelija glomerulusa mogu oslobadati metaloproteinaze, čija gelatinazna aktivnost se smatra najznačajnijom u nastanku defekata bazalne membrane. (11) Prolaskom eritrocita kroz tubularni lumen, dolazi do njihovog oštećenja. Produkti raspada eritrocita poput hemoglobina, hema i gvoždja dovode do oštećenja tubula. (10) Slobodni hemoglobin povećava stvaranje slobodnih kiseoničnih radikala i peroksidaciju lipida i indukuje renalnu vazokonstrikciju. (10) Pomoću transportnog sistema megalin-kubulin, slobodni hemoglobin ulazi u ćelije tubula, gde pokreće mehanizme ćelijske apoptoze.

1.1.3. DIJAGNOZA PRIMARNIH GLOMERULONEFRITISA

Sumnja na postojanje primarnog glomerulonefritisa se postavlja na osnovu postojanja simptoma i kliničkih znakova oboljenja, uz karakterističan laboratorijski nalaz urina i seruma. Najčešći laboratorijski nalazi u okviru glomerulonefritisa su postojanje proteinurije, nalaz eritrocita i cilindara u sedimentu urina i oštećenje bubrežne funkcije. Za postavljanje dijagnoze i klasifikaciju patohistološkog tipa glomerulonefritisa je neophodna analiza tkiva bubrega dobijenog perkutanom biopsijom bubrega (PBB). Prve, otvorene biopsije bubrega su sprovedene početkom XX veka, dok je prva perkutana biopsija bubrega upotrebom tehnike aspiracione biopsije iglom, uradjena 1951. godine. (1,2) Danas se PBB sprovode tehnikom *core* biopsije, upotrebom *tru-cut* igle, koje se mogu koristiti manuelno ili češće automatski pomoću aparata za okidanje – pištolja, koji su u upotrebi od 1980-tih godina prošlog veka. Perkutana biopsija bubrega se sprovodi pod kontrolom ultrazvuka ili kompjuterizovane tomografije.

Problem u dijagnostici bubrežnih oboljenja se javlja kod bolesnika sa postojanjem apsolutnih kontraindikacija za PBB u koje spadaju policistična bolest bubrega, značajan poremećaj položaja ili oblika bubrega, značajno smanjenje veličine bubrega kao posledica uznapredovale hronične bubrežne bolesti i uznapredovala trudnoća. Postoji i značajan broj relativnih kontraindikacija za PBB poput postojanja jednog bubrega, anatomski ili funkcionalno, postojanje poremećaja hemostaznog mehanizma, loše kontrolisana arterijska hipertenzija, postojanje hidronefroze, infekcija bubrega, nesaradnja bolesnika i druge. (2) Uzorak bubrežnog tkiva dobijen perkutanom biopsijom bubrega se potom pregleda svetlosnom, imunofluorescentnom i elektronskom mikroskopijom, radi određivanja postojanja i intenziteta patološkog procesa u bubrežima. U patološke procese na glomerulusima spadaju mezangijalna, endokapilarna ili ekstrakapilarna proliferacija, zadebljanje ili duplikatura glomerularne bazalne membrane, prisustvo akutnih lezija poput nekroze, postojanja depozita ili granulocita u glomerulusima, prisustvo hroničnih lezija odnosno globalne ili segmentalne glomeruloskleroze, nakupljanje materija poput hijalina ili amiloida i ultrastrukturne promene prstastih nastavaka podocita. U akutne patohistološke procese na tubulima i intersticijumu spadaju vakuolizacija citoplazme, nekroza tubulskog epitela, intersticijalni edem i infiltracija inflamatornih ćelija, dok hronične promene predstavljaju atrofija tubula i intersticijalna fibroza. Promene na krvnim sudovima se najčešće javljaju na arterijama i arteriolama i predstavljene su fibrointimalnim zadebljanjem zida krvnog suda, hijalinom i hiperplastičnom arteriolosklerozom, prisustvom tromba i ateromatoznih embolusa. (2) Imunofluorescentnim pregledom bioptata bubrega se dokazuje prisustvo antitela, imunoglobulina ili komplementa u tkivu bubrega. Elektronska mikroskopija je posebno značajna u postavljanju dijagnoze glomerulonefritisa minimalnih promena, Alportovog sindroma, bolesti tankih membrana, kao i u bolestima odlaganja, posebno amiloida.

Sama procedura perkutane biopsije bubrega ili neke od potrebnih analiza uzoraka bubrežnog tkiva, često nisu dostupne svim zdravstvenim centrima. Takodje, u određenim slučajevima, materijal dobijen PBB nije reprezentativan za analizu. Biopsija bubrega predstavlja invazivnu dijagnostičku proceduru, koja sa sobom nosi rizik za razvoj komplikacija, od kojih su najčešća krvarenja u vidu hematurije i perirealnog ili većeg, retroperitonealnog hematoma. (2,12) Ozbiljnija krvarenja mogu zahtevati supstituciju transfuzijama dekantiranih eritrocita, dovesti do opstrukcije urinarnog trakta ili u slučaju profuznih krvarenja predstavljati indikaciju za hitan operativni zahvat i potencijalno nefrektomiju. Mikrohematurija se može očekivati kod 35% bolesnika nakon biopsije bubrega, makrohematurija kod 7%, a ozbiljnija krvarenja kod 1,5% bolesnika nakon PBB. (2) U retke komplikacije PBB spadaju razvoj infekcije, pneumotoraksa, lezija susednih organa ili razvoj arteriovenske fistule. (2,12) Zbog svega navedenog se teži razvoju neinvazivnih dijagnostičkih metoda, na prvom mestu pronalaženja adekvatnog biomarkera, koje bi bar donekle dale uvid o postojanju, tipu i opsežnosti bubrežnih lezija, samim tim pomogle u izboru terapije i proceni toka oboljenja, a bez postojanja ranije navedenih prepreka u dijagnostici glomerulomefritisa. Potencijalni biomarker bi takodje pomogao u praćenju efekata primenjene terapije, kao i progresije oboljenja.

1.1.4. TERAPIJA PRIMARNIH GLOMERULONEFRITISA

Terapija primarnih glomerulonefritisa se može podeliti na simptomatsku i imunosupresivnu terapiju. Simptomatska terapija na prvom mestu podrazumeva mere za smanjenje proteinurije, a potom lečenje arterijske hipertenzije, hipoproteinemije i edema, hiperlipoproteinemije i sprečavanje potencijalnih komplikacija nefrotskog sindroma. U dijetetske mere spadaju restrikcija unosa soli i zasićenih masnih kiselina u ishrani. Ne postoje jasne preporuke o unosu proteina ishranom kod bolesnika sa glomerulonefritisima, posebno ako su praćeni obilnom proteinurijom. Visokoproteinska ishrana povećava proteinuriju, a samim tim i oštećenja bazalne membrane, dok niskoproteinska ishrana pogoršava hipoalbuminemiju. Kod odraslih osoba se preporučuje dnevni unos od 0,8 grama proteina visoke biološke vrednosti po kilogramu telesne mase bolesnika, plus 1 gram proteina dnevno po gramu proteinurije. (2,13)

Postoje preporuke za upotrebu različitih lekova u cilju smanjenja proteinurije, medju kojima se nalaze nesteroidni antiinflamatorni lekovi, dipiridamol, inhibitori konvertaze angiotenzina (ACE inhibitori) i blokatori angiotenzinskih receptora (AT blokatori). Osim smanjenja proteinurije efektom sniženja krvnog pritiska, ACE inhibitori i AT blokatori imaju i hipoproteinemijski efekat posredovan smanjenjem intraglomerularnog hidrostatskog pritiska. ACE inhibitori i AT blokatori predstavljaju i lekove izbora u regulaciji arterijske hipertenzije u okviru nefrotskog sindroma, ali se njihova kombinovana terapija ne preporučuje, sem u određenim situacijama. U lečenju edema se, pored smanjenog unosa soli, preporučuje primena diuretika, dok je intravenska primena albumina rezervisana za bolesnike sa izrazito niskim nivoom albumina i jasnim znacima intravaskularne hipovolemije. Češće se upotrebljuju kod bolesnika u dečijem uzrastu. U krajnjim slučajevima, u terapiji hipervolemije se mogu koristiti metode zamene bubrežne funkcije (spora kontinuirana ultrafiltracija ili peritonealna dijaliza), iako one nose rizik za razvoj akutne bubrežne insuficijencije. Uz dijetetski mere, u cilju lečenja hiperlipoproteinemije, koriste se statini i fibrati, a u redjim slučajevima i ezetimib ili LDL-fereza.

Imunosupresivna terapija je efikasnija u suzbijanju imunološki uslovljene inflamacije i smanjenju procesa oživaljanja u bubrežima, što je povezano sa dužim očuvanjem bubrežne funkcije i preživljavanjem bubrega i bolesnika. U okviru imunosupresivne terapije, kortikosteroidi predstavljaju lekove prvog izbora. Kada kortikosteroidna terapija nije dovoljna da se postigne kontrola bolesti, ili je primena steroida kontraindikovana, neophodno je uvođenje imunosupresora poput ciklofosfamida, ciklosporina, takrolimusa, sirolimusa, mikofenolat mofetila, azatioprina, hlorambucila ili drugih lekova. Ispitivano je dejstvo različitih bioloških lekova u terapiji glomerulonefritisa, ali se za sada samo rituksimab pokazao kao efikasan. (2) Kombinovana terapija kortikosteroidima i imunosupresorima je neophodna u lečenju većine bolesnika sa nefrotskim sindromom. Kod bolesnika koji razvijaju terminalni stadijum bubrežne insuficijencije, neophodna je privremena ili trajna primena metoda zamene bubrežne funkcije, hemodijalize ili peritonealne dijalize, kao i sprovođenje transplantacije bubrega.

1.1.5. PROGNOZA I TOK PRIMARNIH GLOMERULONEFRITISA

Tok primarnih glomerulonefritisa varira od blagih formi koje se povlače spontano ili uz minimalnu simptomatsku terapiju, do onih sa progresivnim tokom i brzim razvojem bubrežne insuficijencije. Brojni faktori utiču na tok i prognozu oboljenja, od kojih je svakako najznačajniji patohistološki tip glomerulonefritisa. Na brzinu progresije oboljenja i razvoj hronične bubrežne insuficijencije takodje utiču pravovremeno postavljanje dijagnoze i započinjanje terapije, kao i pridržavanje preporučenim higijensko-dijetetskim merama i terapiji od strane bolesnika.

Ako se brzo ne postavi dijagnoza i ne započne sa terapijom, glomerulonefritisi sa ekstrakapilarnim proliferacijama imaju veoma lošu prognozu. Ozbiljan tok bolesti obično imaju i membranoproliferativni glomerulonefritis i fokalno - segmentna skleroza i hijalinoza. Nešto bolju prognozu imaju glomerulonefritis minimalnih promena i mezangioproliferativni glomerulonefritis, uključujući i IgA nefropatiju.

Iako se kod glomerulonefritisa najveća pažnja posvećuje glomerularnim lezijama, potrebno je istaći značaj postojanja promena na tubulima, intersticijumu i krvnim sudovima bubrega. Jasno je dokazana povezanost izmedju promena u tubulointersticijumu, odnosno atrofije tubula i intersticijalne fibroze, i progresije bubrežne insuficijencije. (14-19) Tipovi glomerulonefritisa za koje se zna da imaju lošiju prognozu, imaju ozbiljnije promene u intersticijumu. Gušći ćelijski infiltrat, odnosno veći broj ćelija koje infiltrišu intersticijum, se javlja kod ekstrakapilarnog i membranoproliferativnog glomerulonefritisa, za koje se zna da nose povećan rizik od bržeg oštećenja bubrežne funkcije, u odnosu na ostale tipove glomerulonefritisa i zdrave osobe. (15) Najizraženije promene u vidu ćelijske infiltracije i fibroze intersticijuma i tubularne atrofije, se zapažaju kod ekstrakapilarnog glomerulonefritisa, fokalno segmentne glomeruloskleroze i membranoproliferativnog glomerulonefritisa. (15)

Za nastanak promena u intersticijumu značajnu ulogu imaju tubularne ćelije, koje svojim hemoreaktantnim materijama, poput monocitnog hemotaksičnog proteina 1 (MCP-1) i faktora tumorske nekroze α (Tumor necrosis factor TNF- α), povećavaju broj mononuklearnih ćelija u intersticijumu. Makrofagi prisutni u intersticijumu, kao i ćelije proksimalnih tubula oslobadaju citokine, koji privlače fibroblaste u intersticijum čime se ubrzava proces fibroze. (15)

1.2. BIOMARKERI

Termin biomarker je nastao skraćanjem izraza biološki marker bolesti. Odnosi se na široku kategoriju medicinskih znakova, odnosno medicinskih parametara, koje zapaža i meri stručno lice. (20) Po tome se razlikuju od medicinskih simptoma, koje zapaža sam pacijent. National Institute of Health je 1998. godine definisao biomarkere kao karakteristiku koja se objektivno može izmeriti i oceniti kao indikator normalnih bioloških i patoloških procesa, ili farmakološkog odgovora na terapijsku intervenciju. (21) Zajednična akcija Medjunarodne organizacije rada i Medjunarodnog programa za hemijsku bezbednost, pod pokroviteljstvom Svetske zdravstvene organizacije i Ujedinjenih nacija, je definisala biomarkere kao bilo koju supstanciju, strukturu ili proces, koji se može meriti

kao celina ili neki njegov sastavni element, a ima uticaja ili predvidja incidencu ili ishod oboljenja. Svetska zdravstvena organizacija je postavila još širu definiciju biomarkera, prema kojoj je biomarker bilo koje merenje, koje odražava interakciju između biološkog sistema i potencijalne opasnosti na njega, koje može biti hemijsko, fizičko ili biološko. Mereni odgovor može biti funkcionalan, fiziološki, biohemijski na ćelijskom nivou ili molekularna interakcija. Ova definicija u sebi uključuje ukazivanje na incidencu, ishod i efekte terapije ili intervencije. Biomarker bi predstavljao medicinski znak, koji se lako i jednostavno meri, sa stabilnim vrednostima u ponovljenim merenjima. Mora dobro korelisati sa postojanjem oboljenja i njegovom težinom i određivati se u biološkim materijalima koji su lako dostupni. Potrebno je da ima dokumentovane referentne vrednosti, a da je cena procesa određivanja široko pristupačna. U biomarkere spadaju različiti molekuli koji su prisutni u biološkom uzorku u kojem se određuju (metaboliti, proteini, geni i sl. u uzorcima urina, krvi ili tkiva), fiziološki parametri (krvni pritisak, diureza i sl.), podaci dobijeni radiološkim tehnikama (kompjuterizovana tomografija, magnetna rezonanca i sl.)

Biomarkeri se koriste za rano postavljanje dijagnoze hroničnih bolesti i akutnih stanja, određivanje podtipova određenih oboljenja, kao i procenu rizika za razvoj bolesti. Takođe se koriste za predviđanje prognoze oboljenja i procenu efikasnosti i toksičnosti terapije. Značaj biomarkera je posebno velik za pravovremeno postavljanje dijagnoze u oboljenjima koja zahtevaju rano započinjanje terapije, kao i u oboljenjima kod kojih do sada pristupačne dijagnostičke metode ne omogućavaju brzo otkrivanje oboljenja. Biomarkeri mogu biti značajni u praćenju progresije oboljenja i detekciji relapsa i recidiva oboljenja, otkrivanju pojave komplikacija određenih hroničnih oboljenja, kao i proceni prognoze oboljenja. Kada biomarker koreliše sa težinom oboljenja, može se koristiti za procenu efikasnosti terapije.

Biomarkeri koji se koriste u dijagnostici bolesti bubrega se mogu podeliti na tradicionalne i nove. (21) Tradicionalni nefrološki biomarkeri obuhvataju markere smanjene glomerularne filtracije, poput kreatinina i cistatina C i markere bubrežnog oštećenja, koji podrazumevaju pregled sedimenta urina i prisustvo albuminurije. Njihove vrednosti se značajno menjaju relativno kasno tokom razvoja bubrežnih oštećenja, što je ukazalo na potrebu pronalaženja novijih biomarkera, koji bi se mogli detektovati u ranijim fazama oštećenja i omogućiti sprovođenje mera prevencije progresije bubrežnog oboljenja.

Novi biomarkeri bubrežnog oštećenja imaju nekoliko potencijalnih uloga, koje obuhvataju:

1. precizniju dijagnozu akutnog bubrežnog oštećenja u ranim fazama oboljenja,
2. bolju korelaciju sa glomerulskom filtracijom, kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom,
3. preciznije određivanje mesta anatomske lokalizacije ozlede (npr. glomerulus, tubuli, intersticijum, krvni sudovi),
4. preciznije određivanje uzroka pojave akutne ili hronične bubrežne lezije,
5. preciznije praćenje efikasnosti primenjenog lečenja,

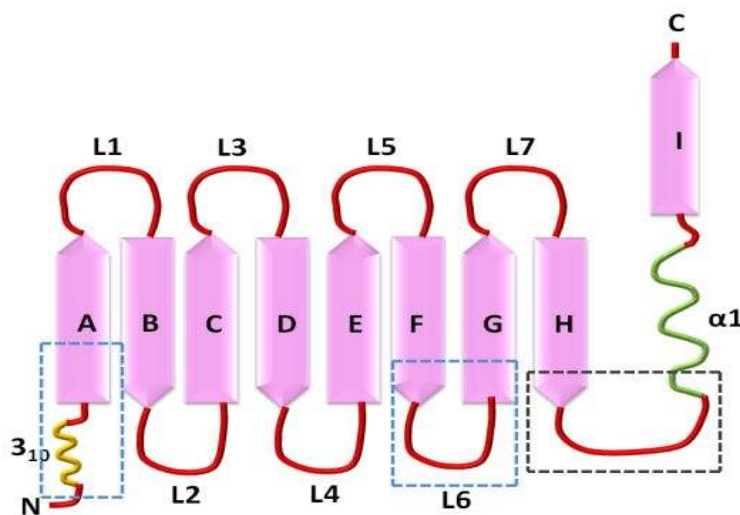
6. ukazivanje na potencijalni tok i prognozu akutne ili hronične bubrežne lezije. (21)

Biomarkeri u nefrologiji se mogu određivati iz seruma ili plazme i urina. Urinarni biomarkeri se dalje mogu podeliti na dve grupe. Prvu grupu čine biomarkeri koji se i u fiziološkim uslovima nalaze u bubrezima, a oslobadaju se tokom lezije, poput enzima proksimalnih tubula. U urinu se pojavljuju veoma brzo nakon oštećenja. Drugu grupu čine biomarkeri čije je stvaranje indukovano tubularnim oštećenjem, te je za njihovu pojavu u urinu potrebno određeno vreme. U ovu grupu spadaju KIM-1 (Kidney Injury Molecule-1), NGAL (Neutrophil gelatinase - associated lipocalin) i interleukin 18. Serumski biomarkeri posebnu ulogu imaju u dijagnostici bubrežnog oboljenja kod anuričnih bolesnika.

1.3. PORODICA LIPOKALINA

Porodica lipokalina je velika i šarolika grupa sekretornih, lipofilnih, ekstracelularnih proteina. Sadrži preko 30 solubilnih glikoproteina male mase. Većina lipokalina je sačinjena od 160 - 180 aminokiselina. U prirodi se nalaze u različitim oblicima, a prisutni su u različitim organizmima od insekata do čoveka. (22) Iako su veoma raznoliki u strukturi, zajedničko im je postojanje tri kratka lanca amino kiselina. Lipokalini koji sadrže sva tri lanca se nazivaju "kernel" („centralni“) lipokalini, dok se oni koji sadrže samo jedan ili dva lanca nazivaju "outlier" („periferni“) lipokalini. (23-25)

Kada se posmatraju aminokiselinske sekvence lipokalina, članovi lipokalinske porodice se dosta razlikuju i ponekad sadrže samo 20% istih aminokiselinskih sekvenci. (23) Ali, sekundarna i tercijarna struktura svih lipokalina je veoma slična. Karakteriše je prisustvo simetrične strukture, sačinjene od β lanaca, koji su poput naboranih listića. Osam β lanaca je, pomoću sedam kratkih petlji (L1-L7), hidrogenskim vezama medjusobno povezano u niz, antiparalelnim redom.



Slika 2. Shematski prikaz strukture lipokalina
(izvor: Prof. Francisco Veas (Chakraborty et al.); InTech, 2011.)

Petlja L1 formira strukturu sličnu poklopcu, koja zatvara šupljinu za vezivanje liganda. Sa jedne strane se nastavlja na α spiralu, a potom na C – terminalni listić. N - terminalni region proteina formira šupljinu, koja je zatvorena 3_{10} spiralnim lancem. Molekul je uvijen, sa krajevima koji se približavaju jedan drugome formirajući bačvastu, šuplju strukturu, kaliks. (22-24,26-28) Kaliks lipokalina predstavlja mesto za vezivanje liganda. Različitošć specifičnih amino kiselina omogućava lipokalinima širok spektar liganda za vezivanje i prenos.

Lipokalini imaju veliki afinitet za vezivanje hidrofobnih liganda. Pokazuju tendenciju da formiraju komplekse sa solubilnim makromolekulima. Primer je vezivanje lipokalina 2 za humanu neutrofilnu gelatinazu. Odredjeni lipokalini mogu povećati aktivnost vezanog liganda. Osnovna funkcija lipokalina je transport različitih lipofilnih supstanci poput masnih kiselina, retinoida, steroida i gvoždja. (23,29) Takodje, imaju ulogu u modulaciji imunog odgovora, regulaciji ćelijskog rasta i razvoja tkiva, stabilizaciji ćelijskih procesa i metabolizma i zaštiti ćelija od oštećenja. Kod nekih životinja učestvuju u osećaju ukusa i mirisa, odnosno služe kao transporteri feromona. Imaju uticaja i na sintezu prostanglandina. Kod odredjenih beskičmenjaka, posebno insekata i jastoga odredjuju boju životinje. (22-25,27,30)

1.3.1. LIPOKALIN 2

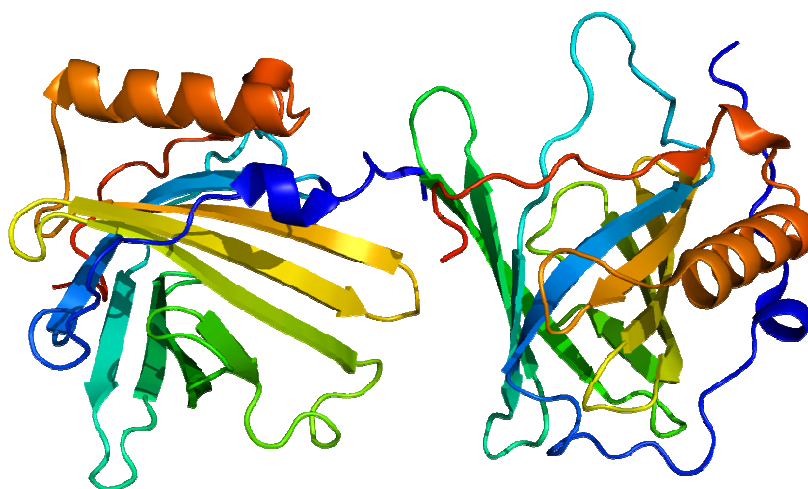
Lipokalin 2 (NGAL - Neutrophil gelatinase - associated lipocalin – lipokalin vezan za neutrofilnu gelatinazu) je glikoprotein male molekulske mase (25 kDa), koji pripada superfamiliji lipokalina. Poznat je pod različitim nazivima poput humani neutrofilni lipokalin, siderokalin, 24p3, neutrofilni glukozaminidaza-povezani lipokalin, uterokalin, onkogeni *neu-related* lipokalin, faktor inhibicije stimulatora migracije i protein povezan sa alfa-1 mikroglobulinom. NGAL se sastoji od 198 aminokiselina i predstavnik je "kernel" grupe lipokalina, odnosno sadrži sva tri aminokiselinska lanca. (23,24) Gen za sintezu NGAL-a je lociran na hromozomskom lokusu 9q34.11. (23) Sadrži 7 eksona, koji produkuju bar 5 funkcionalnih prepisa, odnosno informacionih RNA za sintezu proteina.

U literaturi se lipokalin 2 prvi put pominje još 1961.godine. Prvi put je izolovan 1989. godine iz bubrega miševa zaraženih majmunske virusom (SV-40). (23,24,27,31) Triebel i sar. su potom dokazali kovalentno-disulfidnu vezu između proteina koji su nazvali protein povezan sa α 2-mikroglobulinom i enzima MMP-9 (matriks metaloproteinaza 9 ili gelatinaza B). (22-24) Axelsson i sar. su 1995. godine primetili da je NGAL u fiziološkim uslovima, stalno prisutan u plazmi u malim koncentracijama od prosečno 72ng/ml (u intervalu 40-109ng/ml). (23) Cabece i sar. su prvi lokalizovali NGAL u ljudskom organizmu, kao komponentu sekundarnih, azurofilnih granula neutrofila, gde se nalaze zajedno sa mijeloperoksidazom. (23,30-36)

1.3.1.1. Struktura lipokalina 2

Najranije studije usmerene ka razjašnjavanju trodimenzionalne strukture lipokalina 2 su objavili Chu i sar. 1998. godine i Coles. i sar. godinu dana kasnije. (23) Kao i druge lipokaline, NGAL karakteriše trodimenzionalna struktura, sačinjena od 8 β lanaca.

Analizom nuklearnom magnetnom rezonancom, utvrđeno je da je lipokalin 2 sačinjen od N-terminalnog 3_{10} -heliksa, na koji se nastavlja 8 antiparalelnih β lanaca, koji se završavaju sa α -heliksom i C-terminalnim β lancem. Osam β lanaca formira strukturu oblika bureta ili šolje, sa unutrašnjom šupljinom, kaliksom. (37-40) Lanci formiraju dva β listića, prvi formiraju $\beta 2$ - $\beta 4$ lanci, a drugi $\beta 6$ - $\beta 8$ lanci. Uočeno je prisustvo tri izbočenja, jedan na prvom listiću, a dva na drugom listiću, za koje se smatra da pomažu pri vezivanju liganda. Unutar kaliksa, pri njegovom otvoru, se nalaze tri istaknuta džepa, koji predstavljaju bočne lance tri pozitivno naelektrisane rezidue - Arg81, Lys125 i Lys134, koji takodje imaju značaja za vezivanje liganda. (23,38) Centralni kaliks, koji predstavlja hidrofobnu šupljinu, poseduje mesta za vezivanje velikog broja različitih molekula, uključujući i makromolekule poput proteina. (23)



Slika 3. Struktura lipokalina 2 (izvor: Wikipedia Protein LCN2 PDB 1dfv.pn)

Kaliksna šupljina NGAL-a je šira i manje ispunjena nego kod drugih lipokalina. (30) Lipokalin 2 ima mnogo jači afinitet za vezivanje hidrofobnih, u odnosu na hidrofilne ligande. (23)

Zahvaljujući svojoj strukturi, molekul NGAL-a nije podložan fragmentaciji. Ovo ga čini pogodnim za analiziranje, jer mu je spontana biodegradibilnost mala.

Humani NGAL ima malo sličnosti sa proteinskim sekvencama mišijeg ili pacovskog lipokalina 2, što može imati značaja u interpretaciji mnogobrojnih studija o lipokalinu 2 koja su radjena na pomenutim životinjama.

Axelsson i sar. su 1995. godine prvi utvrdili da postoji nekoliko molekularnih izoformi NGAL-a. (23) Oni su NGAL izolovali u obliku monomera i dimera. Sada se zna da se NGAL javlja u tri molekularne izoforme:

- monomer, veličine 25 kDa,
- homodimer, koji je vezan disulfidnim vezama i veličine je 45 - 46 kDa i
- heterodimer veličine 135 kDa, gde je monomer kovalentno vezan za neutrofilnu gelatinazu (matriks-metaloproteinazu – MMF 9) disulfidnim mostom. (22,27,30,31,38,41)

Odredjene izoforme NGAL-a su specifični za pojedine ćelije ili oboljenja. Aktivisani neutrofili oslobadjaju homodimer i u manjoj meri monomer. (27,31,41,42) Tokom stresa, tubulske ćelije bubrega sintetišu većinom monomer, a u manjoj meri heterodimer, tako da se u urinu može naći više molekularnih izoformi NGAL-a. (27,31,41,42) Monomer lipokalina 2 se predominantno nalazi u urinu bolesnika tokom akutne bubrežne lezije, dok u urinu bolesnika sa infekcijom urinarnog trakta preovladava homodimer. (31,41) Iste izoforme NGAL-a, poreklom iz različitih ćelija, se dodatno medjusobno razlikuju. Za razliku od drugih monomera lipokalina 2, monomeri poreklom iz tubulskih ćelija bubrega, nemaju mogućnost stvaranja dimerskih oblika.

1.3.1.2. Lokalizacija lipokalina 2

Kod ljudi, NGAL je primarno dokazan u sekundarnim granulama neutrofila. U fiziološkim uslovima, cirkulišući neutrofili su i glavni izvor serumskog NGAL-a. (43) Lipokalin 2 se najbrže sintetiše od svih neutrofilnih proteina, zbog čega se smatra markerom neutrofilne degranulacije. (22,23,44-46) U koštanoj srži se tokom mijelopoeze NGAL sintetiše u prekursorima neutrofila, sakuplja u sekundarnim granulama i čuva do oslobadjanja, nakon aktivacije zrelih neutrofila. (31,47,48) Njegova sinteza se zaustavlja indukcijom maturacije neutrofila. (23) Kada tokom infekcije dodje do aktivacije i degranulacije neutrofila, sa oslobadjanjem NGAL-a, njegova osnovna funkcija je inhibicija bakterijskog rasta. NGAL je i hemoatraktant za nove neutrofile, čime intenzivira odgovor organizma na prisustvo bakterija. (24)

Ali, porast nivoa NGAL-a nije povezan samo sa infektivnim stanjima, nego i drugim oblicima inflamacije, kao i procesima koji nisu direktno vezani za postojanje inflamacije. To ukazuje da i druga tkiva mogu proizvoditi i oslobadjati NGAL. U tkivima koja su u stalnom ili čestom dodiru sa mikroorganizmima, poput traheje, pluća, pljuvačnih žlezda, endotela i epitela tankog creva, kolona, prostate i kože, NGAL se nalazi nisko ekspimiran, uz povećanje koncentracije tokom akutnih infekcija. (49) Veoma je zastupljen u epitelu bubrežnih tubula, odakle se oslobadja nakon lezije. Ekspresija lipokalina 2 i njegove mRNA (messenger RNA - informaciona RNA) je utvrđena i u drugim tkivima medju kojima su želudac, jetra, uterus i kanalići dojke. Klinički je značajno prisustvo i sinteza NGAL-a u masnom tkivu, zbog njegovog uticaja na razvoj dijabetesa i gojaznosti. Prisustvo NGAL-a u makrofagima ima dodatnu ulogu u imunološkom odgovoru organizma. (22,24,27,31,33,41-43,50-52) Takodje je značajno prisustvo NGAL-a u ćelijama aterosklerotskog plaka i srčanom mišiću neposredno nakon infarkta miokarda. (29) Lezija miokarda utiče na povećano oslobadjanja lipokalina 2 iz endotela i intime krvnih sudova, koji dalje reguliše intenzivno remodelovanje krvnih sudova u ovom području. (31,37,43) Povećana ekspresija lipokalina 2 i MMP-9 u endotelnim, glatkomišićnim ćelijama i prisutnim makrofagima, u području aterosklerotskog plaka, se objašnjava njihovim pokušajem razlaganja fibroznog plaka. (23) Lipokalin 2 je prisutan u progenitornim ćelijama eritrocita, gde ima uticaja na eritropoezu. (53) Takodje je u manjem obimu prisutan u slezini i timusu, a potpuno nedostaje u mozgu i skeletnim mišićima. (24,53)

Ekspresija NGAL-a je visoka na mestima sa velikim ćelijskim obrtom, odnosno kod ćelija u rastu i displastičnih ćelija. (28,54) Ograničena ispitivanja na ljudskim fetalnim tkivima su pokazala ekspresiju NGAL-a na trofoblastnim ćelijama placente, hondrocitima (ćelijama koje formiraju hrskavicu), epidermalnim ćelijama fetalne kože i epitelnim ćelijama tokom razvoja pluća i tankog creva. (24) Ureteralni pupoljak, tokom organogeneze bubrega, sintetiše NGAL koji kontroliše diferencijaciju epitelnih ćelija i formiranje tubula iz neepitelnih mezenhimalnih ćelija (24,39,54)

Ekspresija NGAL-a je značajno povećana u tkivima različitih malignih tumora digestivnog, respiratornog i urogenitalnog trakta, štitaste žlezde, jajnika i dojke, kao i tokom leukemija. (22-24,26,30,34,35,38,55-57) Osim malignih oboljenja, primećena je povećana ekspresija i kod adenoma crevnog epitela.

1.3.1.3. Ligandi lipokalina 2

Najvažniji ligandi lipokalina 2 su *siderofori*, niskomolekularna jedinjenja, koja luči veliki broj mikroorganizama, poput bakterija, kvasaca i gljiva. (31,37,58,59) I sisari stvaraju hemijska jedinjenja, koja svojom hemijskom strukturom i funkcijom odgovaraju bakterijskim sideroforima. Reč siderofor potiče iz grčkog jezika i znači *protein koji prenosi gvoždje*. Dokazano je postojanje više od 500 tipova siderofora, koji se nazivaju još i enterohelini (FeEnt) i enterobaktini. Neki mikroorganizmi mogu lučiti više od jednog tipa siderofora. Smatra se da su siderofori nastali tokom adaptacije bakterija na život u okolini sa malom količinom gvoždja, koje je neophodno za njihov razvoj i razmnožavanje. Bakterije koje žive u zemljištu ili vodi, pomoću siderofora izvlače gvoždje iz okoline i apsorbuju ga. Sideroferi imaju visok afinitet za vezivanje i helaciju gvoždja (Fe), ali vezuju samo trovalentno gvoždje, u feri obliku - Fe^{+3} . (23) Pojačano se luče kada su bakterije u sredini sa malom koncentracijom gvoždja, odnosno u slučaju veće potrebe bakterije za gvoždjem. U organizmu ljudi i životinja, veoma mala količina gvoždja se nalazi u slobodnom obliku i lako dostupna bakterijama. Većina je vezana za proteinske nosače u cirkulaciji ili uskladištena u tkivima. Tokom bakterijske infekcije, siderofori se sa proteinima domaćina takmiče za slobodno gvoždje iz intersticijalne tečnosti i makrofaga. Oni vezuju gvoždje većim afinitetom i jačim vezama u odnosu na transferin ili laktoferin. (30) Tako mogu preoteti slobodno gvoždje ili ga oslobodili iz već formirane veze sa transferinom ili laktoferinom. (26) Nakon vezivanja sa sideroforom, gvoždje se preko receptora za siderofore unosi u bakterijsku ćeliju. Tokom bakterijske invazije organizma, dolazi do aktivacije toll-like receptora (TLR – Toll like receptor), što stimuliše urodjeni imuni odgovor i razvoj stečenog imuniteta. Aktivacija TLR za posledicu ima i povećano oslobađanje NGAL-a, koji vezuje bakterijske siderofore, čime sprečava ulazak siderofora u bakterijsku ćeliju i apsorpciju gvoždja od strane bakterije, a samim tim ometa njen rast i razmnožavanje. (26,28,31,38) Na ovom mehanizmu se zasniva bakteriostatsko dejstvo NGAL-a.

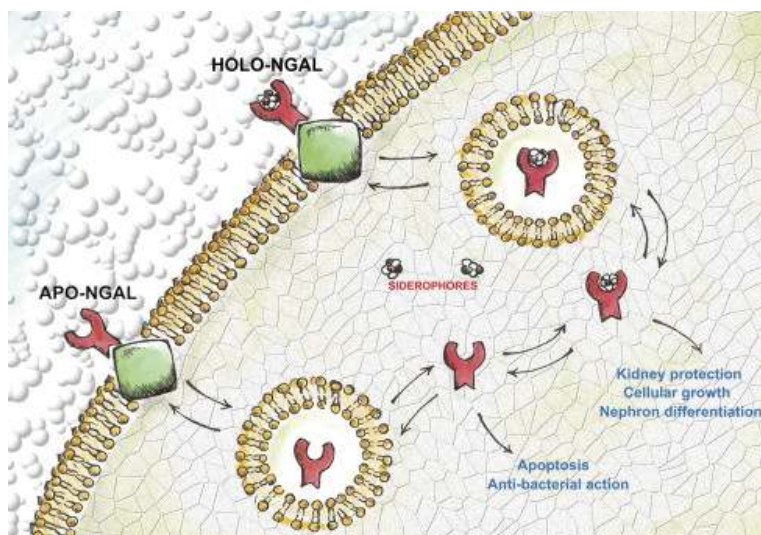
Mikroorganizmi mogu koristiti siderofore koje su sami sintetisali ili već formirane siderofore drugih mikroorganizmi. U zavisnosti od strukture i načina helacije gvoždja, siderofori se mogu podeliti u tri grupe:

- hidrosamati,

- fenolati/kateholati i
- α -hidroksikarboksilati. (23,30,38)

NGAL se ne vezuje istim afinitetom za sve bakterijske siderofore. Ima mali afinitet za siderofore tipa aerobaktina, koje luče Echerichia coli i neki tipovi Shigella, piohelina, koje luči Pseudomonas aeruginosa i jersiniabaktina koje luče neki tipovi iz grupe Yersinia, određene enterobakterije i neki sojevi Echerichia coli. (38) Ovim se objašnjava njegova smanjena efikasnost u sprečavanju infekcija bakterijama koje sintetiziraju pomenute tipove siderofora.

Zbog veličine kaliksa i pozitivnog naelektrisanja, NGAL ne može direktno vezati pozitivan jon gvoždja. (30) Zato se visokim afinitetom i specifičnošću vezuje za negativno naelektrisane siderofore. (30,39) Kompleks NGAL:siderofor:Fe se ostvaruje tako što NGAL interponira bočne lance, odnosno tri pozitivno naelektrisana rezidue (Arg81, Lys125 i Lys134), između tri kateholatna prstena siderofora, stvarajući ciklične, hibridne jonske i katjonske veze. (30,38)



Slika 4. Apo HNAL i Holo NGAL

(izvor: Bolignano D et al. AJKD 2008; 52: 3: 595-605)

NGAL ima snažan afinitet za vezivanje siderofora, bez razlike da li su siderofori vezani za gvoždje ili ne. Kada se NGAL u cirkulaciji nalazi kao samostalan protein, naziva se *apo - NGAL*. Po formiranju kompleksa NGAL:siderofor:Fe, naziva se *holo - NGAL*. (24,34,58,60)

Dokazano je da i sisari stvaraju jedinjenje koje vezuje gvoždje, a po funkciji i hemijskom sastavu je veoma slično sideroforima. Ovaj siderofor sisara, za koji se NGAL vezuje, je 2,5 – dihidroksi benzoična kiselina (2,5–DHBA 2,5-dihydroxy benzoic acid) i hemijski je veoma sličan enterobaktinu koji luči Echerichia coli. Primarna uloga ovog jedinjenja je da iznosi suvišno gvoždje iz ćelije, u uslovima ćelijskog preopterećenja gvoždjem. Nedostatak 2,5-DHBA dovodi po intracelularnog nagomilavanja gvoždja, što vodi povećanju ćelijskog stresa sa mogućim razvojem apoptoze. Dokazano je da i bakterije mogu koristiti ove siderofore sisara, čime 2,5–DHBA može pospešiti razvoj bakterijske

infekcije. Bakterije takodje mogu uneti u ćeliju i gvoždje vezano za L-norepinefrin, neuroendokrini kateholamin. (23,59) NGAL vezuje kompleks gvoždje-L-norepinefrin, čime smanjuje njegovu dostupnost bakterijama. Ovo je još jedan mehanizam kojim lipokalin 2 sprečava bakterije da preuzmu gvoždje. U odsustvu NGAL-a, L-norepinefrin vezuje feri oblik (Fe^{3+}) gvoždja i redukuje ga u fero (Fe^{2+}) oblik, tokom čega dolazi do stvaranja reaktivnih slobodnih radikala, koji su izrazito patogeni za tkivo. Vezivanjem za L-norepinefrin, NGAL sprečava reakciju redukcije gvoždja i razvoj štetnih slobodnih radikala. (23) Ozbiljno tkivno oštećenje, koje se javlja tokom politrauma ili masivnih opekotina, dovodi do oslobadjanja velike količine norepinefrina, koji se cirkulacijom donosi u creva. Crevnim bakterijama je u fiziološkim uslovima limitirano gvoždje, ali povećan nivo norepinefrina omogućuje veću dostupnost gvoždja bakterijama, čime dolazi do njihovog ubrzanog razmnožavanja, sa mogućnošću razvoja intraabdominalne sepse. Vezivanjem gvoždje-L-norepinefrin kompleksa, NGAL, bar donekle, smanjuje mogućnost razvoja ove potencijalno fatalne komplikacije.

Drugi značajan ligand lipokalina 2 je matriks mijeloperoksidaza 9 (MMP-9). (58) Porodicu mijeloperoksidaza, čiji je MMP-9 član, sačinjava veliki broj endopeptidaza, čija je osnovna uloga degradacija različitih ekstracelularnih proteinskih matriksa, ali imaju ulogu i u drugim procesima u organizmu, poput imuniteta, aktivacije leukocita, a utiču i na ćelijsku migraciju i dejstvo određenih citokina. (61) NGAL se za MMP-9 vezuje kovalentnim, sulfidnim vezama, čime dovodi do stabilizacije matriks metaloproteinaze 9, sprečava degradaciju i stimuliše njegovu proteolitičku aktivnost. (23,62,63) Veza nema uticaja na enzimsku aktivnost MMP-9, odnosno NGAL utiče na stabilnost, ali ne i na aktivnost MMP-9. (23) Osnovna funkcija MMP-9 je razgradnja bazalnih membrana i komponenti ekstracelularnog matriksa, uključujući kolagen tipa I, IV, V i XI, tip I gelatina i proteoglikane hrskavice. (22-24) Poremećaj u metabolizmu MMP-9 ima značajno mesto u nastanku i progresiji intesticijalne fibroze, tokom oboljenja bubrega. Iako je osnovna funkcija MMP-9 razgradnja ekstraćelijskog matriksa, dokazano je da tokom bubrežnog oštećenja ima profibrotički efekat. (61,64) Miofibroblasti su odgovorni za povećanu proizvodnju ekstraćelijskog matriksa i razvoj bubrežne fibroze. Oni mogu nastati aktivacijom intersticijalnih fibroblasta, perivaskularnih fibroblasta ili pericita, ili pretvaranjem endotelnih ili epitelnih ćelija tubula u mezenhimalne. Dokazano je da MMP-9 može indukovati prelaz epitelnih ćelija tubula u miofibroblaste i na taj način pospešiti razvoj fibroze. (64) Tokom inflamacije u bubrezima dolazi do povećane ekspresije MMP-9 na mezangijalnim ćelijama, ali za sada nije do kraja razjašnjen uzrok ove pojave.

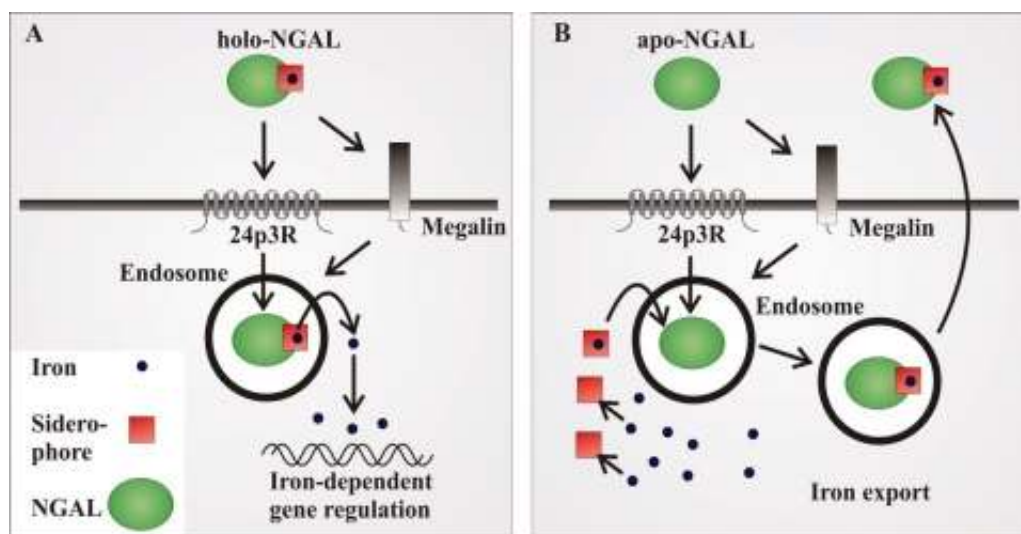
Postoje i drugi endogeni ligandi, koji mogu vezati NGAL, poput leukotriena B4 (LT-B4) ili faktora aktivacije trombocita (PAF – platelet activating factor), ali je ova veza mnogo slabija u odnosu na vezu NGAL-a sa sideroforima. (28,40,58,65) NGAL takodje ima interakcije i sa drugim jedinjenjima, kao što su hepatocitni faktor rasta (HGF - hepatocyte growth factor) i ekstraćelijske proteinske kinaze. (58)

Ova osobina lipokalina 2 da vezuje veliki broj različitih liganda se u literaturi naziva „ligandska plastičnost“ lipokalina 2. (23)

1.3.1.4. Membranski receptori lipokalina 2

Kako bi ispoljio svoje intracelularne efekte, lipokalin 2, pomoću membranskog receptora mora ući u ćeliju. Do sada je dokazano postojanje dva tipa receptora za NGAL. Jedan od njih je membranski receptor 24p3R (24p3 receptor), koji je visoko specifičan za lipokalin 2, a karakterišu ga 12 transmembranskih spirala. (29,36,38,59,63,66,67) Može se naći u svim ćelijama organizma, ali mu je koncentracija najveća na epitelnim ćelijama bubrega, gde je prisutan na apikalnim membrana distalnih tubula i sabirnih kanalića, ali ne i na proksimalnim tubulima. (68) 24p3 receptor se može naći i u mozgu, gde ima ulogu transportera katjona. Drugi ćelijski receptor za NGAL je megalin-kubulin (gp330), koji pripada familiji lipokalinskih receptora male gustine. (26,28,29,36,38,49,60,65) Nalazi se na membranama većine epitelnih ćelija, kao i na četkastoj površini bubrežnih tubulskih ćelija, posebno proksimalnih tubula. (28,39,58,65) Megalin-kubulin vezuje NGAL i preuzima ga u ćeliju, bez obzira da li je NGAL vezan za siderofor ili ne. Osim u tubulima, receptori za NGAL se detektovani i u glomerulusima. Njihovu ekspresiju može indukovati interleukin 1 β (IL-1 β), koji se tokom inflamacije oslobadja iz mezangijalnih ćelija. (34) Tkivna ekspresija megalin-kubulin receptora tokom inflamacije se poklapa sa povećanom koncentracijom NGAL-a. (58)

Posle interakcije sa ćelijskim receptorima, NGAL ulazi u ćeliju procesom endocitoze. Na sam proces endocitoze ne utiče da li je NGAL u apo ili holo obliku, ali krajnji efekat na ćelijski metabolizam zavisi od unesenog oblika NGAL-a. (34,58-60)



Slika 5. Shematski prikaz membranskih receptora NGAL-a
(izvor: Schmidt-Ott KM et al. JASN 2007; 18: 407-413)

Po ulasku u citoplazmu, holo-NGAL se unutar endozomalnih vezikula oslobadja vezanog gvoždja, čime se povećava njegova intracelularna koncentracija, što dalje dovodi do aktivacije specifičnih ćelijskih mehanizama, zavisnih od gvoždja. Takodje dolazi do aktivacije transferinskih i feritinskih receptora. Preostali proteinski deo NGAL-a se oslobadja u citoplazmu kao apo-NGAL ili se degradira u lizozomima. (28,60) NGAL u endozomima može, u manjoj meri, ponovo vezati određenu količinu gvoždja i vratiti ga u

ekstracelularni prostor. (60) NGAL vezan za megalin-kubulin ne podleže reciklaži, već se razgrađuje. (39) Sa druge strane, kada receptor unese apo-NGAL u ćeliju, on vezuje intracelularno gvoždje i iznosi ga iz ćelije, čime se smanjuje koncentracija intracelularnog Fe što dovodi do disregulacije mnogobrojnih ćelijskih mehanizama, a u nekim prilikama može dovesti do apoptoze ćelije. (28,58-60) Važno je naglasiti da je ćelijski metabolizam NGAL-a u potpunosti odvojen od ćelijskog metabolizma transferina. (38)

1.3.1.5. Metabolizam gvoždja

Gvoždje u organizmu ulazi u sastav brojnih molekula poput hemoglobina, mioglobina i različitih enzima. Učestvuje u regulaciji mnogobrojnih vitalnih procesa u ćelijama. Od ukupne količine gvoždja u telu čoveka, oko 75% se nalazi u sastavu aktivnih molekula, dok 25% čini gvoždje vezano za transportne proteine i deponovano u tkivima. Gvoždje je hemijski veoma aktivno, posebno u slobodnom obliku, kada može izazvati promenu strukture različitih molekula, gde treba istaći reakciju sa proteinima i mastima ćelijskih membrana. U fiziološkim uslovima, gvoždje se u organizmu nalazi vezano za proteine, čime se smanjuje njegov toksični efekat. Vezivanjem gvoždja za apoferitin nastaje feritin, osnovni protein za skladištenje gvoždja u organizmu. Apotransferin je β globulin, koji nakon vezivanja dva atoma gvoždja postaje transferin, glavni protein za prenos gvoždja u organizmu. U fiziološkim uslovima, zasićenost transferina gvoždjem iznosi 20-40%. (30) Da bi se moglo vezati za feritin ili transferin, gvoždje mora biti u dvovalentnom fero obliku (Fe^{2+}). Po vezivanju za proteine, dolazi do oksidacije gvoždja u trovalentni feri oblik (Fe^{3+}). U uslovima preopterećenja gvoždjem, feritin se može denaturisati, a potom dolazi do agregacije gvoždja u micle hemosiderina. Mobilizacija gvoždja iz hemosiderina je značajno sporija u odnosu na gvoždje vezano sa feritin. Većina ćelija gvoždje preuzima od transferina, dok se manji deo gvoždja prenosi drugim, paralelnim putevima transporta, poput laktoferina ili NGAL:siderofor:Fe kompleksa. Ove pomoćne mehanizme dopremanja gvoždja najviše koriste organi u razvoju, koji zahtevaju najveću količinu gvoždja. Treba pomenuti da se različiti mehanizmi transporta gvoždja često preklapaju i medjusobno utiču na mehanizme dejstva.

Lizozomi, u kojima započinje intraćelijski metabolizam NGAL/siderofor/Fe kompleksa, imaju nisku pH vrednost, odnosno veću kiselost. Kisela sredina dovodi do redukcije gvoždja iz feri (Fe^{+3}) u fero oblik (Fe^{+2}), što je posredovano enzimom ferireduktazom. Tokom redukcije dolazi do oslobađanja gvoždja, pošto siderofor nema afinitet za vezivanje fero oblika - Fe^{2+} . (54)

Na intraćelijski metabolizam gvoždja utiču regulatorni protein gvoždja (iron-regulatory protein - IRPs), feritin kompleks i enzim hem oksigenaza 1 (HO-1) (39,69) IRPs reguliše stepen sinteze feritina i transferinskih receptora, vezivanjem za njihove mRNA. Aktivnost IRPs je na prvom mestu regulisana nivoom intraćelijskog gvoždja, ali određeni uticaj imaju i hipoksija, oksidativni stres, nivo azot oksida i stepen fosforilacije. U uslovima zasićenosti gvoždjem, dolazi do vezivanja Fe sa sumporom, navedeni kompleks se vezuju sa IRPs i inaktiviraju ga. Pošto je regulatorni protein gvoždja neophodan za pravilno funkcionisanje mRNA za transferinske receptore, inaktivacija IRPs dovodi do destabilizacije mRNA za transferinske receptore, sa sledećim prestankom sinteze istih i

smanjenjem unosa Fe u ćeliju. Sa druge strane inaktivnost IRPs-a utiče na povećanu aktivnost mRNA za feritin, čime se povećava sinteza feritina i deponovanje gvoždja. (69) U uslovima manjka gvoždja u ćelijama, IRPs je aktivan, što utiče na povećanu sintezu transferinskih receptora i povećan unos Fe u ćeliju, uz inhibiciju sinteze feritina i smanjenje deponovanja cirkulišućeg gvoždja.

HO-1 je enzim koji katalizuje konverziju hema u biliverdin, čime se oslobadja gvoždje i stvaraju žučne boje i ugljen monoksid. (70) Kao odgovor na različite stimuluse poput ishemije, iradijacije, dejstva teških metala, različitih citokina ili lekova, dolazi do brze aktivacije gena za HO-1, sa povećanom produkcijom HO-1, koji u zahvaćenim tkivima ima protektivni efekat. Do sada je najbolje ispitan protektivni efekat HO-1 na bubrežno tkivo, tokom akutne bubrežne lezije. Postoje tri mehanizma ovog zaštitnog delovanja. Prvi je degradacija endogenog toksina hema, čime se povećava koncentracija citoprotektanata u koje spadaju žučne boje, ugljen monoksid i feritin, što predstavlja drugi mehanizam zaštite. HO-1 ima i značajno mesto u održanju i zaštiti homeostaze gvoždja, čime se održava minimalna količina, hemijski veoma reaktivnog, slobodnog gvoždja. (70) HO-1 sprečava preterano preuzimanje Fe od strane ćelija, čime smanjuje opterećenje ćelije gvoždjem i njeno oštećenje. (39) Krajni efekat pomenutih mehanizama je vazorelaksacija, uz antioksidativni, antiinflamatorni i antiapoptički efekat. Do povećanog oslobađanja HO-1 u proksimalnim tubulima dolazi tokom akutnog bubrežnog oštećenja u okviru različitih bolesti i stanja poput sepse, kardiorrenalnog sindroma, akutnog odbacivanja transplantata, lečenja cisplatinom, tokom ishemije-reperfuzije i opstrukcije urinarnog trakta. (70) Eksperimentalno je dokazano da je tokom ishemije, tretman kompleksom NGAL:siderofor:Fe, u malim dozama, praćen povećanjem ekspresije HO-1 u tkivima pogodjenim ishemijom. (39) Osim povećanja ekspresije HO-1 enzima, kompleks NGAL:siderofor:Fe dostavlja proksimalnim tubulima odgovarajuću količinu Fe, koja je neophodna za procese reparacije. (39) Sa druge strane, kompleks odstranjuje višak gvoždja, koji nastaje usled povećane aktivnosti HO-1 enzima. (39) Sve ovo zaštitno deluje na oštećene tubule i utiče na brži oporavak.

1.3.1.6. Funkcije lipokalina 2

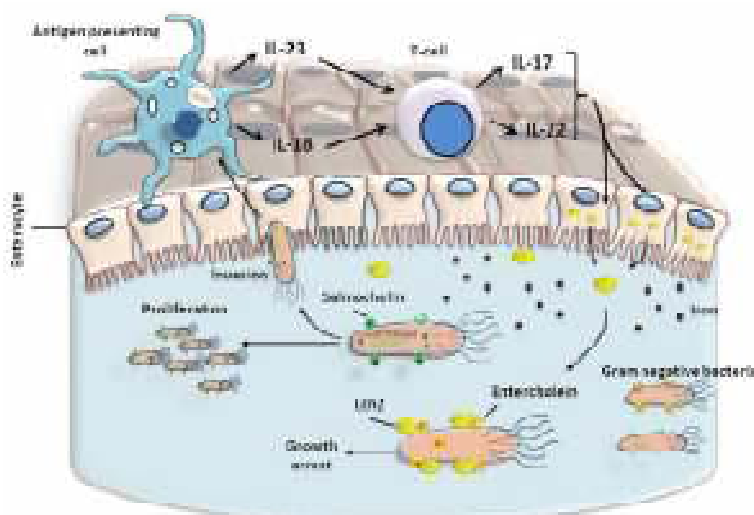
Funkcije NGAL-a su mnogobrojne i veoma kompleksne. Smatra se da su funkcije, bar donekle, povezane sa prirodom tkiva od kojeg NGAL potiče. (31)

Transportna funkcija: Osnovna funkcija NGAL-a je transport gvoždja, čime ima značajan uticaj na veliki broj bioloških funkcija zavisnih od gvoždja, odnosno homeostazu intra i ekstraćelijskog metabolizma. Uloga u metabolizmu gvoždja ima i zaštitni efekat na mnoga tkiva. Pošto gvoždje katalizuje konverziju hidrogen-peroksida u slobodne (oksigen) radikale, koji su veoma toksični za tkiva, povećana koncentracija ekstraćelijskog gvoždja može uzrokovati oštećenja tkiva i organa. (31) Smanjenjem koncentracije ekstracelularnog gvoždja, NGAL ima antioksidativno dejstvo, odnosno predstavlja inhibitor ćelijskog stresa. (24,31)

Osim gvoždja, NGAL transportuje i neke masne kiseline. (22,53)

Primarni imunitet, infekcije i inflamacija: Bakteriostatski efekat NGAL-a ima veliki značaj za njegovu ulogu u primarnom (urođenom) imunitetu. (22,27,28,30,34,36,51,58,63,71) Zbog porasta cirkulišućeg NGAL-a tokom infektivnih i inflamatornih stanja, smatra se reaktantom akutne faze, dok ga neki autori nazivaju i citokinom zbog pro-inflamatornog efekta. (22,23,28,37,48,67,72)

Nakon prodora bakterija u organizam, TLR prepoznaju pojedine molekule bakterijskog porekla i dolazi do aktivacije antigen prezentujućih ćelija, poput makrofaga i dendritičnih ćelija, u cilju zaštite organizma od infekcije. Ove aktivisane ćelije oslobadjaju citokine, posebno interleukine IL-23 i IL-18, koji potom aktiviraju T limfocite, koji dalje oslobadjaju IL-17 i IL-22, koji vode povećanom oslobadjanju lipokalina 2 iz granulacija neutrofila, kao i njegove povećane sinteze u makrofagima, epitelnim ćelijama i jetri. (23,25) U fiziološkim uslovima, bakterijska infekcija predstavlja najčešće stanje u kojem dolazi do masivnog oslobadjanja NGAL-a iz aktivisanih neutrofila. (31,49,58) Ekspresija NGAL-a je visoko indukovana stimulacijom TLR receptora različitim agonistima, od kojih su najznačajniji i najviše proučeni lipopolisaharidi. (73-75) Oslobodjeni NGAL se potom vezuje za bakterijske siderofore i onemogućava dopremanje dovoljne količine gvoždja bakterijama, čime limitira njihov dalji rast i razvoj. NGAL prvenstveno štiti organizam od Gram negativnih bakterija i infekcija mikobakterijama. (24) To potvrđuju i ispitivanja u kojima su miševi bez NGAL-a bili podložniji bakterijskim infekcijama, posebno Gram-negativnim klicama. (49,58) NGAL je efikasan u odbrani organizma samo protiv bakterija koje luče i koriste siderofore za dopremanje gvoždja u ćeliju. Neefikasnost NGAL-a u odredjenim infekcijama se objašnjava invazijom bakterija koje ne koriste siderofore ili malim afinitetom vezivanja NGAL-a za siderofore, koje ta bakterija luči. (38)



Slika 6. Bakteriostatski efekat NGAL-a na primeru infekcije *Salmonella typhimurium* (izvor: Chakraborty et al. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1826: 1: 129-169)

Iako je NGAL otporan na većinu proteaza, nekoliko mikroorganizama se prilagodilo da luči proteaze koje razlažu NGAL, čime neutrališu njegove efekte. (26,47,48)

Osim limitiranja gvoždja bakterijama, NGAL ima i imunomodulatorno dejstvo, time što pospešuje ekspanziju T regulatnormih ćelija. (33) Takodje, vezuje i povećava klirens

lipofilnih medijatora inflamacije. (30) Vezivanjem sa MMP-9 (matriks metaloproteinaza 9) NGAL sprečava njegovu degradaciju. MMP-9 ima značajnu ulogu u primarnom imunitetu svojim uticajem na migraciju neutrofila. (22) Uz MMP-2 i MMP-8, MMP-9 se nalazi na ćelijama imunog sistema, poput monocita, aktivisanih makrofaga i alveolarnih makrofaga i neutrofila. Uticajem na različite citokine, mijeloperoksidaze mogu imati pro i antiinflamatorne efekte. (76)

Ulogu NGAL-a u zaštiti od infekcija potvrđuje njegovo prisustvo u organima i tkivima koja su često izložena mikroorganizmima, poput traheje, pluća, pljuvačnih žlezda i prostate. (49) Nakon kontakta sa bakterijama značajno se povećava ekspresija NGAL-a, kao prvi nivo odbrane. (22,30,31,50,55,56) Studijama je dokazan povišen nivo NGAL-a tokom septičnih stanja, akutnog septičnog peritonitisa, egzacerbacija hroničnog bronhitisa i akutnih urinarnih infekcija. (31,48) Tokom bronhitisa, pro-inflamatorni citokin IL-1 β utiče na značajno povećanje oslobađanja i sinteze NGAL-a. (23) Povećana je i aktivnost NGAL-a u Panet-ćelijama tankog creva, kao i ćelijama koje proizvode sluz u pankreasnim kanalićima, bilijarnom stablu i epitelu bronhija. Na ovim mestima NGAL vezuje i odnosi različite bakterijske produkte. Ispitivanjima je dokazano da se NGAL ne nalazi u zdravim ćelijama kolona, već samo onim zahvaćenim inflamatornim ili tumorskim procesom, odnosno na mestima gde je normalna crevna barijera oštećena, te je omogućen prodor intraluminalnih bakterija i njihovih produkata u tkivo creva. (22)

Osim povećane lokalne ekspresije NGAL-a, tokom infekcije dolazi i do aktivacije drugih tkiva u kojima je NGAL prisutan. Unutar četiri sata od početka infekcije, dolazi do značajnog povećanja nivoa lipokalina 2, čak 22 puta, uz povećanu ekspresiju lipokalina 2 na hepatocitima i adipocitima. (23,72,77) Nivo lipokalina 2 dostiže pik nakon 24 časa od početka infekcije, a potom dolazi do postepenog pada vrednosti. Osim povećanja serumskog nivoa lipokalina 2, tokom sistemskih infekcija i sepsi dolazi i do povećanja urinarnog nivoa NGAL-a, zbog otpuštanja iz neutrofila koji se akumuliraju u lumenu bubrežnih tubula. (27) Smirivanjem infekcije, sa smanjenjem broja bakterija, dolazi do smanjenja nivoa NGAL-a. (78)

Dosadašnja ispitivanja ukazuju da bi NGAL mogao biti dobar marker za razlikovanje bakterijske od virusne infekcije, ali su potrebna dalje ispitivanja. (22)

Tokom infekcija i septičnih stanja NGAL ima i određeni protektivni efekat na tkiva. Sprečavanjem razmnožavanja bakterija smanjuje se inflamacija, kao i stepen oksidativnog stresa, ćelijske apoptoze i ekspresije proinflamatornih gena. (67) NGAL čak vezuje i neutralizuje neke proinflamatorne produkte bakterija. Ovo zaštitno dejstvo NGAL-a bi u budućnosti moglo biti iskorišćeno u lečenju infekcija i sepe.

Poznato je da nivo lipokalina 2 raste u okviru brojnih inflamatornih oboljenja, koja nisu direktno povezana sa infekcijom. (22,23,44,50,51,55,67,78,79) Tako su povišene vrednosti NGAL-a primećene tokom oboljenja poput pankreatitisa, inflamatornih oboljenja creva, meningitisa, miokarditisa, psorijaze i periodontitisa. (24) Tokom inflamacije, NGAL se otpušta iz neutrofila, makrofaga i drugih ćelija koje učestvuju u imunom odgovoru. Nije sa sigurnošću utvrđeno da li prevashodno dolazi do porasta apo-NGAL ili holo-NGAL oblika. (67)

Apoptoza ćelija: Jedna od značajnih funkcija NGAL-a je regulacija ćelijske apoptoze. Poznat je uticaj gvoždja na razvoj apoptoze, zbog čega je potrebna stroga regulacija njegovog intracelularnog nivoa. Posebno je toksična njegova fero Fe^{2+} forma, koja katalizuje reakcije u kojima dolazi do stvaranja visoko reaktivnih hidroksilnih radikala koji dovode do ćelijske apoptoze. Promena koncentracije intracelularnog gvoždja ima uticaj na razvoj apoptoze u različitim ćelijama. Ulazak apo-NGAL-a ili kompleksa NGAL:siderofor, koji za sebe nema vezano Fe, u ćeliji dovodi do deplecije intracelularne koncentracije gvoždja, poremećaja određenih ćelijskih ciklusa, što dalje vodi apoptozi. (22,26,58,65,80) Sa druge strane, opterećenje tkiva gvoždjem takodje može dovesti do apoptoze i razvoja fibroze zahvaćenog tkiva. Smanjenjem koncentracije ekstracelularnog gvoždja, NGAL sprečava oštećenje tkiva uzrokovano slobodnim radikalima, u čijem nastanku Fe ima značajnu ulogu. (31)

Xu i sar. su in vitro dokazali da NGAL indukuje apoptozu kardiomiocita, čime utiče na razvoj kardijalnog popuštanja. (29) U kulturi kardiomiocita su zapazili da NGAL aktivira intrizični apoptotični mehanizam, tokom kojeg dolazi do prekida mitohondrijalnih membrana, aktivacije kaspaze 3, proteina koji ima značajnu ulogu u apoptozi ćelija. Prekid mitohondrijalne membrane dovodi do kondenzacije i fragmentacije nuklearne DNK, što takodje vodi ćelijskoj smrti. NGAL može regulisati broj leukocita, indukujući apoptozu granulocita i limfocita, nakon receptor-posredovane signalizacije. (22,39,53,77) Značajan nivo ekspresije NGAL-a u žlezdanog tkivu dojke i uterusu se povezuje sa nastankom tumora ovih organa, pošto NGAL indukcijom apoptoze neutrofila, povećava mogućnost da patološki klon preživi i umnoži se.

Iz navedenog se može zaključiti da lipokalin 2 u organizmu može imati pro-apoptotičku i anti-apoptotičku aktivnost. Kakav krajnji efekat na preživljavanje ćelija će lipokalin 2 imati, najverovatnije zavisi od kompleksnih mehanizama regulacije, koji nisu do kraja razjašnjeni.

Gojaznost i insulinska rezistencija: Poznato je da je masno tkivo kompleksan i veoma aktivan metabolički i endokrini organ. Adipociti produkuju različite citokine (adipokini) koji modifikuju energetske metabolizam i sistemsku insulinsku senzitivnost. Adipokini su povezani sa razvojem inflamacije, insulinske rezistencije i autoimuniteta. Jedan od značajnih adipokina je lipokalin 2. (29,36,40,49,63,77,81) Deluje kao antagonist efekta inflamatornih molekula i utiče na sekreciju drugih adipokina, posebno leptina. (49) Lipokalin 2 je visoko indukovano tokom diferencijacije adipocita. (49) Prisutan je tokom cele adipogeneze, ali se sekrecija značajno povećava nakon konverzije preadipocita u maturisane adipocite. (36,40,77)

Za procenu uhranjenosti i količine masnog tkiva u organizmu se mogu koristiti različite metode. Na prvom mestu se nalazi merenje telesne mase, koje ne daje pouzdane podatke o stepenu uhranjenosti, obzirom na značajne razlike u visini i telesnom sastavu osoba. Indeks telesne mase BMI (Body mass index) nešto bolje ukazuje na stepen uhranjenosti, obzirom da i telesna visina ima uticaja na njegove vrednosti. Na osnovu vrednosti BMI, osobe se mogu podeliti u jednu od sledećih kategorija:

- pothranjeni – $BMI \leq 18,5 \text{ kg/m}^2$,
- normalno uhranjeni – $BMI 18,5 - 24,9 \text{ kg/m}^2$,

- previše uhranjeni – BMI 25 – 29,9 kg/m²,
- gojazni – BMI ≥ 30 kg/m².

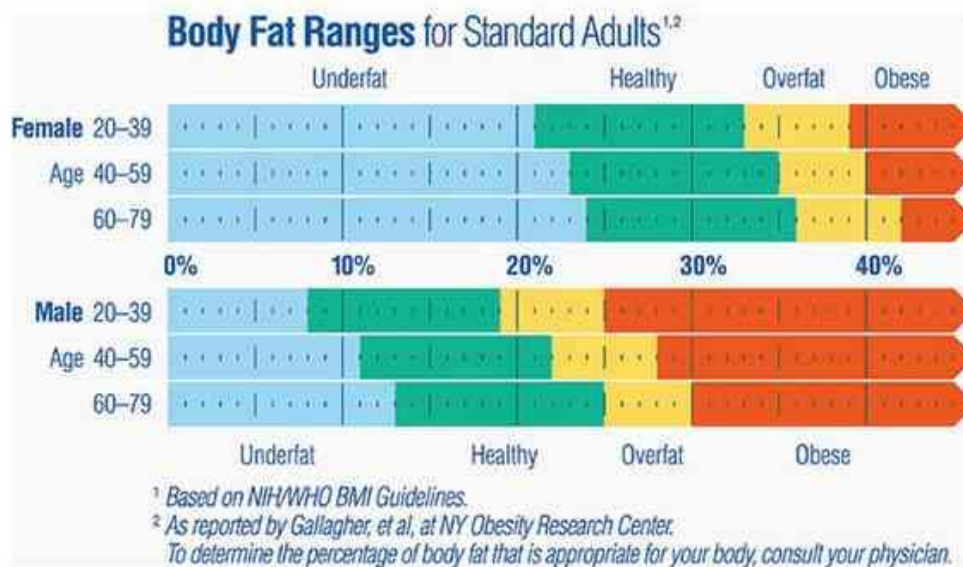
Kod bolesnika sa oboljenjem bubrega i prisustvom proteinurije dolazi do nakupljanja tečnosti u organizmu, čime se značajno menja njegov sastav. Ovi bolesnici su samo jedan od primera poremećene telesne kompozicije, gde BMI ne daje adekvatan podatak o stepenu uhranjenosti osobe. Poznato je da i gustina koštane mase i kvalitet mišića donekle utiču na telesnu masu i samim tim menjaju telesni sastav. Postoji nekoliko metoda određivanja telesne kompozicije. Metoda analize bioelektričnom impedancom (BIA) je široko rasprostranjena, kako u određivanju masne mase i stepena uhranjenosti osobe, tako i za određivanje stepena hidracije organizma. (82,83) BIA je brza, neinvazivna, bezbolna i relativno jeftina metoda procene telesnog sastava. Električna struja male jačine (oko 50 kHz, 500 mA), se propušta kroz telo ispitanika, a BIA analizatorom se meri otpor tkiva toku struje kroz njega (bioimpedanca). Tečnost u mišićima i drugim telesnim tkivima lako provodi električnu struju, dok masno tkivo pravi otpor protoku električne struje. Bezmasno tkivo ima veću količinu vode i elektrolita u odnosu na masno tkivo, te ono pravi mali otpor i ima veliku provodljivost, a masno tkivo pravi veliki otpor i ima malu provodljivost električne struje. Što su otpor, odnosno impedanca veći i količina masnog tkiva je veća. (82-84)

Na vrednosti BIA očitavanja imaju uticaja okolina, etnička pripadnost, faza menstrualnog ciklusa i zdravstveno stanje ispitanika, odnosno postojanje određenih oboljenja. Izraženi edemi ekstremiteta koji se vidjaju tokom nefrotskog sindroma, srčanog popuštanja, jetrene ciroze, hipoalbuminemije ili limfedema mogu značajno uticati na BIA očitavanja. (82) Zbog ovoga se smatra da BIA najveću specifičnost i senzitivnost ima kod zdravih, euvolemičnih osoba.

Na osnovu dobijene vrednosti procenta telesne masti, osobe se, prema NIH/WHO BMI preporukama, svrstavaju u jednu od sledećih grupa (85):

- žene:
 - 20 – 40 godina: mala količina masti – < 21%, normalna količina masti – 21-33%, velika količina masti – 33-39%, gojazne - > 39%,
 - 41 – 60 godina: mala količina masti – < 23%, normalna količina masti – 23-35%, velika količina masti – 35-40%, gojazne - > 40%,
 - 61 – 79 godina: mala količina masti – < 24%, normalna količina masti – 24-36%, velika količina masti – 36-42%, gojazne - > 42%,
- muškarci:
 - 20 – 40 godina: mala količina masti – < 8%, normalna količina masti – 8-19%, velika količina masti – 19-25%, gojazni - > 25%,
 - 41 – 60 godina: mala količina masti – < 11%, normalna količina masti – 11-22%, velika količina masti – 22-27%, gojazni - > 27%,
 - 61 – 79 godina: mala količina masti – < 13%, normalna količina masti – 13-25%, velika količina masti – 25-30%, gojazni - > 30%.

Normalne vrednosti ukupne telesne vode za žene iznose 45-60%, a za muškarce 50-65%.



Slika 7. Raspon telesne mase kod odraslih osoba

Ekspresija NGAL-a, kao i mRNA za NGAL su značajno povišeni u masnom tkivu i jetri gojaznih osoba. (24,36,40,49,77) Primećen je i povišen plazmatski nivo NGAL-a, koji korelira sa stepenom gojaznosti, indeksom telesne mase (BMI), nivoom triglicerida i holesterola, zbog čega se smatra da NGAL ima ulogu u razvoju gojaznosti. (77,81,86) Catalán i sar. u svom ispitivanju nisu zapazili povišen serumski nivo samog NGAL-a, već kompleksa NGAL-MMP-9. (36)

U adipocitima, NGAL utiče na ćelijske mehanizme zavisne od gvoždja, koji podstiču razvoj insulinske rezistencije. Lipokalin 2 modifikuje inflamatorni odgovor u masnom tkivu i aktivise metabolički put 12-lipooksigenaze, čime stimuliše adipocite na sekreciju TNF- α . Ovo dovodi do lokalne inflamacije, poremećaja homeostaze energije na lokalnom nivou i razvoja insulinske rezistencije. (40) TNF- α može i direktno, nezavisno od NGAL-a, oštetiti insulinsku signalizaciju u ćeliji. Kao i drugi agensi koji stimulišu insulinsku rezistenciju, poput kortikosteroida, TNF- α indukuje ekspresiju lipokalina 2, što dalje stimuliše adipocite na sekreciju dodatnog TNF- α . (77) Osim TNF- α i drugi citokini koji se oslobadjaju u masnom tkivu gojaznih osoba mogu podstaći povećano oslobadjanje NGAL-a. (49,77,86)

Povišene vrednosti insulina povećavaju vrednosti cirkulišućeg NGAL-a. (24) Hiperglikemija takodje dovodi do povećane ekspresije lipokalina 2 u adipocitima, a sa druge strane smanjuje insulinsku senzitivnost. Dokazana je pozitivna korelacija izmedju lipokalina 2 i vrednosti glukoze naše, ali i pozitivna korelacija sa parametrom akutne faze, C reaktivnim proteinom, što samo dodatno potvrđuje povezanost inflamacije sa razvojem insulinske rezistencije i dijabetesa. (40) Smanjenje lipokalina 2 u kulturi adipocita poboljšava insulinsku senzitivnost. (77) Dopremanje gvoždja masnom tkivu putem NGAL:siderofor:Fe kompleksa, takodje doprinosi razvoju dijabetesa zbog direktnog uticaja gvoždja na povećanu lipolizu u adipocitima. Poznato je da akumulacija gvoždja predstavlja samostalni faktor rizika za nastanak dijabetesa. (77) Sve ovo povećava mogućnost za razvoj insulinske rezistencije i dijabetesa, a NGAL se smatra nezavisnim

faktorom rizika, što potvrđuju i in vitro ispitivanja u kojima endogeni lipokalin 2 uzrokuje insulinsku rezistenciju u kulturi hepatocita. (40,63,77,81,87) Trudnice sa gestacijskim dijabetesom imaju značajno veće vrednosti NGAL-a u odnosu na zdrave trudnice. (24)

Maligniteti: Ekspresija NGAL-a je značajno povećana tokom tumora različitih solidnih organa i hematoloških maligniteta. (22,24,26,30,38,50,85-87) U digestivnom traktu je povezan sa razvojem karcinomom pankreasa, jednjaka, kolona i rektuma. (22,24,30,34,38) Povišen je kod tumora respiratornog trakta, posebno pluća. (22,24,30,34) Takođe se pominje povezanost na tumorima štitne žlezde i reproduktivnih organa, posebno jajnika, dojke, endometrijuma i prostate. (22,24,30,34,38) Povišena ekspresija je primećena i kod malignih tumora kože i uroepitela. (24,30) Od hematoloških tumora, najznačajnija je povezanost sa leukemijama. (22,38) Osim malignih oboljenja, primećena je povećana ekspresija lipokalina 2 kod adenoma crevnog epitela.

Povišen nivo NGAL-a pogoduje nastanku tumorskog procesa i njegovoj progresiji. (22) Vrednost NGAL-a koreliše sa karakteristikama tumora i prognozom oboljenja, odnosno često ukazuju na lošiju prognozu oboljenja. (22,38) Smatra se da NGAL svoj proonkogeni efekat iskazuje smanjenjem apoptoze malignih ćelija. (23) Indukcijom apoptoze neutrofila, povećava se mogućnost preživljavanja patološkog kлона ćelija. Značajan je i efekat NGAL-a na MMP-9, odnosno sprečavanje njegove degradacije, obzirom da je MMP-9 povezan sa procesima tumorske invazije tkiva, angiogeneze i povećanjem metastatskog potencijala malignih ćelija. (22,23,73) Sa druge strane, smanjenjem količine ekstracelularnog gvoždja, koje je neophodno za rast i razmnožavanje tumorskih ćelija, NGAL usporava progresiju oboljenja. (38) Zbog postojanja ovog dvojnog dejstva NGAL-a, potrebna su dalja ispitivanja njegovih efekata i mogućnosti upotrebe u ovom polju medicine.

Proliferacija i diferencijacija ćelija: Gvoždje, a samim tim i NGAL, su veoma bitni za proliferaciju i diferencijaciju različitih ćelija. (28,30,38) Tokom organogeneze, NGAL ima ulogu već u fazi implantacije embriona, ali i kasnije pri porođaju. (72) Njegova značajna ekspresija je uočena u ćelijama epidermisa od 20. do 24. gestacijske nedelje. (23) Za ovaj rad posebnu važnost ima uloga NGAL-a u organogenezi bubrega. (28,31,38,51,58,65,71,72,88) Jedan od najznačajnijih događaja tokom razvoja bubrega je diferencijacija epitelnih ćelija i formiranje tubula iz neepitelnih mezenhimalnih ćelija. Ova transformacija progenitornih ćelija u epitelne tubule je kontrolisana faktorom koji luči ureteralni pupoljak. Ispitivanjima je dokazano da je ovaj faktor NGAL:siderofor:Fe kompleks. (24,39,54) NGAL deluje kao promotor strukturalne diferencijacije i formiranja bubrežnih epitelnih ćelija. Tokom formiranja epitelnih ćelija u primordijalnom bubregu, NGAL ćelijama dostavlja neophodno gvoždje, čime indukuje diferencijaciju epitelnih ćelija. (26,28,38) Intraćelijsko gvoždje reguliše mnogobrojne gene, uključujući i neke koji nisu direktno uključeni u metabolizam gvoždja. Aktivacijom gena dolazi do stvaranja jedinjenja koja stimulišu mezenhimalne ćelije da postanu epitelne. (54) In vitro, dodavanje prečišćenog NGAL-a mezenhimalnim progenitornim ćelijama, dovodi do njihove proliferacije, sa daljom diferencijacijom i stvaranjem formacija poput nefrona, u kojima se nalaze ćelijski markeri glomerulusa, proksimalnih i distalnih tubula. (28,31,58,89)

Dopremanje gvoždja nije jedini mehanizam kojim NGAL reguliše razvoj bubrega. Efekti su prisutni i pri koncentracijama NGAL-a koje su manje od potrebnih za transport gvoždja. (28) Veruje se da NGAL deluje i aktivacijom klasičnih faktora rasta. (28) Treba pomenuti da NGAL nije jedini regulator organogeneze bubrega, obzirom da i u slučajevima nedostatka NGAL-a, dolazi do formiranja bubrega. Nefrogenezu regulišu i retinoidna kiselina, angiotenzin II i faktori rasta poput fibroblastnog faktora rasta (FGF – fibroblast growth factor) i neurotrofnog faktora rasta izvedenog iz glijalnih ćelija. U toku su i ispitivanja funkcije različitih proteoma u regulaciji organogeneze bubrega. (90)

NGAL svoje efekte na razvoj bubrega iskazuje u početnim fazama organogeneze, kada prisustvo transferina nije potrebno. U kasnijim stadijumima razvoja, dopremanje gvoždja se u potpunosti oslanja na transferin. (54) Transferin stimuliše determinisane, metanefričke mezenhimalne ćelije da završe svoj razvoj. (54) Ovaj efekat transferina nije moguć bez primarne stimulacije progenitornih ćelija NGAL-om. I u kasnijim stadijumima je NGAL dostupan mezenhimalnim ćelijama, posebno u slučaju odsustva transferina, ali NGAL ne može završiti transformaciju mezenhimalnih u epitelne ćelije, bez njegovog prisustva. (54) U kasnijim fazama razvoja bubrega, transferin doprema gvoždje iz cirkulacije, a NGAL reguliše lokalni transfer Fe između bubrežnih ćelija. Unos gvoždja u ćeliju, njegovo subcelularno kretanje i krajnja destinacija u ćeliji, se razlikuju u zavisnosti da li je dostavljeno transferinom ili NGAL-om. (54) Osim na bubreg u razvoju, NGAL ima određen efekat proliferacije, posebno tubulskih ćelija i u bubregu odrasle osobe. (28,58)

Razvoj anemije: NGAL ima uticaja na produkciju eritrocita u kosnoj srži. Indukuje apoptozu progenitornih ćelija eritrocita i inhibiše diferencijaciju proeritroblasta. (53) Pod uticajem različitih citokina, ekspresija NGAL-a se tokom akutne anemije smanjuje u koštanoj srži i slezini, gde su progenitorne ćelije eritrocita dominantno lokalizovane. Anemija koja se javlja u hroničnim oboljenjima, poput hronične inflamacije, hronične bubrežne insuficijencije ili maligniteta, je delimično uzrokovana povećanim nivoom NGAL-a, poreklom iz neutrofila, bubrežnih tubulskih ili malignih ćelija. (53)

Ostalo: NGAL ima određenu ulogu u zarastanju rana, sa jedne strane zbog modifikacije inflamatornog odgovora, a sa druge zbog stabilizacije MMP-9. (24) Pominju se povišene vrednosti NGAL-a tokom preeklampsije, ali tačna uloga tokom ovog oboljenja još uvek nije potpuno razjašnjena. (24)

1.3.1.7. Regulacija ekspresije lipokalina 2

U fiziološkim uslovima, biološke tečnosti sadrže veoma malu količinu NGAL-a. Još uvek nije jasno definisan normalan nivo NGAL-a u serumu i urinu. Za sada se možemo osloniti na njegove vrednosti izmerene kod zdravih osoba, korišćenih kao kontrolne grupe u različitim ispitivanjima. Prema objavljenim podacima, kod zdravih osoba se mogu očekivati vrednosti NGAL-a u serumu u rasponu od 7,5 – 100 ng/ml. (16,19,44-46,65,73,80,91-98) U ispitivanjima na bolesnicima kod kojih nije prisutno bubrežno oboljenje, poput gojaznih osoba, obolelih od policistične bolesti ovarijuma ili kardioloških bolesnika, navode se nivoi NGAL-a u serumu u rasponu od 25 - 100 ng/ml. (92-95,98) Kod

bolesnika sa bubrežnim oboljenjima, poput akutne bubrežne lezije, hronične bubrežne insuficijencije ili glomerulonefritisa, dobijene vrednosti NGAL-a u serumu značajno rastu, te se nalaze u rasponu od 10 – 950 ng/ml. (16,19,45,46,73,80,91,96,97)

NGAL u sistemske cirkulaciji potiče od aktivisanih neutrofila, makrofaga i drugih imunih ćelija, kao i niske aktivnosti u jetri, slezini i bubrezima. Poluživot lipokalina 2 u cirkulaciji je relativno kratak, za monomere iznosi 10 minuta, a za dimere 20 minuta. (23,46) Bubrežni klirens je najznačajniji faktor regulacije nivoa NGAL-a. (23)

Prema do sada objavljenim podacima, očekivani nivo NGAL-a u urinu, u fiziološkim uslovima, takodje nije jasno definisan. Prema izmerenim vrednostima kod zdravih kontrola tokom različitih ispitivanja, mogu se očekivati koncentracije od 1 - 20 ng/ml NGAL-a u urinu. U sličnom obimu se nalaze i koncentracije NGAL-a dobijene kod bolesnika bez oboljenja bubrega. (19,47,65,73,79,80,97-103) U studijama na bubrežnim bolesnicima, u okviru bubrežne insuficijencije ili glomerulonefritisa, nivoi NGAL-a u urinu su značajno veći i kreću se u rasponu od 4 – 5320 ng/ml. (19,30,47,73,79,80,91,97,99-103)

Produkcija NGAL-a je značajno povećana u različitim ćelijama u okviru inflamacije, ishemije ili neoplastične transformacije, kao i tokom povećanog oksidativnog stresa. (41)

Različita oboljenja i stanja u organizmu dovode do povećanja lokalnih ili sistemskih koncentracije NGAL-a. Medju oboljenjima, na prvom mestu se nalaze infektivna i septična oboljenja, kao što je već pomenuto. Takodje je opisan porast NGAL-a tokom različitih neoplastičnih procesa. Veoma veliki značaj, posebno za ovaj rad ima povećana ekspresija NGAL-a tokom različitih oboljenja bubrega, koja će kasnije biti detaljnije obradjena. Od drugih oboljenja, potrebno je pomenuti uticaj višegodišnje arterijske hipertenzije i anemije na nivo NGAL-a. (48,57,97) Uticaj na serumski nivo NGAL-a ima stanje hipoksije. (41,48) Pojedine operacije, posebno kardiohirurške su praćene povećanim koncentracijama NGAL-a, najverovatnije usled razvoja postoperativne bubrežne lezije. Ekspresija NGAL-a je povišena u ćelijama koje su u procesu involucije, poput ćelija uterusu u postpartalnoj fazi ili žlezdanim ćelijama dojki u fazi prestanka laktacije.

Različiti citokini, hormoni, faktori rasta, vitamini, minerali i lekovi mogu uticati na nivo NGAL-a. Proinflamatorni citokini stimulišu ekspresiju gena za NGAL, uz povećanje mRNA NGAL i produkcije samog polipeptida. Stimulatorni efekat na sekreciju NGAL-a je dokazan za interleukine 1 α (IL-1 α) i 1 β (IL-1 β), faktor nekroze tumora (TNF- α Tumor necrosis factor α) i interferon γ . (24,25,31,34,36,40,63,77,81,87) Indukcija sinteze je dozno i vremenski zavisna. (23,34,40) Osim samog NGAL-a, primećen je i uticaj IL-a i interferona γ na povećanu ekspresiju njegovog receptora. (34,40) Bakterijska stimulacija TLR4 i TLR9 signalnih puteva dovodi do povećane ekspresije mRNA za NGAL u crevnim kriptama, što ukazuje na uticaj NGAL-a na regulaciju intraluminalne mikroflore. (104) Lipopolisaharidi intenzivno stimulišu ekspresiju NGAL-a na ćelijama krvi, adipocitima i hepatocitima, stimulacijom TLR. (36) Različiti drugi endotoksini i bakterijske komponente takodje utiču na nivo NGAL-a tokom infekcija i inflamacija. (87)

Medju faktorima rasta je potrebno istaći uticaj transformišućeg faktora rasta β 1 (TGF- β 1 transforming growth factor β 1), koji stimuliše produkciju NGAL-a, ali ne utiče na nivo njegovih receptora. (34,40)

Tabela 1. Uticaj različitih faktora na ekspresiju NGAL-a.

	FAKTOR	EFEKAT NA NGAL
Citokini	IL-1 α	↑
	IL-1 β	↑
	IL-17	↑
	IL-22	↑
	TNF- α	↑
	Interferon γ	↑
Faktori rasta	TGF- β 1	↑
	GM-CSF	↑
	bFGF	↔
	IGF 1	↑
	EGF	↑/↓
Hormoni	Insulin	↑
	Progesteron	↔
	Estrogen	↑/↓
Lekovi	Deskametazon	↑
	ACE inhibitori	↓
	Deferomksamin	↑
Komponente bakterija	Lipopolisaharidi	↑
	Lipoteikoična kiselina (zid Gram + bakterija)	↑
	Peptidoglikan (zid Gram + bakterija)	↑

Legenda: ↑ - povećava ekspresiju, ↔ - nema značajan efekat na ekspresiju, ↑/↓ - efekat zavisi od dodatnih uslova sredine. IL – interleukin, TNF – faktor nekroze tumora (tumor necrosis factor), TGF - Transformišući faktor rasta (Transforming growth factor), GM-CSF - Stimulišući faktor granulocitno monocitne kolonije – (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor), bFGF - Osnovni fibroblastni faktor rasta (Basic fibroblast growth factor), IGF 1 - Insulinu sličan faktor rasta 1 (Insulin-like growth factor 1), EGF - Epidermalni faktor rasta (Epidermal growth factor)

Smatra se da je C3 komponenta komplekta negativan regulator ekspresije NGAL-a. (23) Medju lekovima koji utiču na koncentraciju NGAL-a najznačajniji je efekat deksametazona, koji povećava nivo cirkulišućeg NGAL-a, kao i primena insulina i kalcijuma. (23,24,36,77,81) Terapija ACE inhibitorima smanjuje koncentraciju NGAL-a, kao i primena sartana. (52,105) Na nivo NGAL-a takodje može uticati upotreba različitih droga, poput metamfetamina i fenciklidina i alkohola. (23)

1.4. LIPOKALIN 2 U BUBREŽNIM OBOLJENJIMA

1.4.1. METABOLIZAM LIPOKALINA 2 I GVOŽDJA U BUBREZIMA

Biološke tečnosti organizma u normalnim uslovima sadrže veoma male količine NGAL-a i kompleksa NGAL:siderofor:Fe, kao što je navedeno u prethodnom poglavlju. Imunohistohemijska ispitivanja su dokazala prisutnost NGAL-a u epitelnim ćelijama proksimalnih i distalnih tubula zdravih i oštećenih bubrega, dok je ekspresija u ostalim delovima bubrega mala, ali je bitno istaći da je NGAL prisutan i u mezangijalnim ćelijama bubrega. (34) Cirkulišući NGAL se u glomerulusima slobodno filtrira zbog svoje male

molekulske mase i pozitivnog naelektrisanja. (31,48,58,65,89,97) Smatra se da se dnevno profiltrira 3,4 – 4 mg NGAL-a. Ova količina se skoro sasvim resorbuje u proksimalnim tubulima. Tubulski transport je omogućen vezivanjem NGAL-a za membranski receptor megalin- kubulin, koji se nalazi na četkastoj površini tubularnih ćelija. (30,31,65) Nakon vezivanja, NGAL se procesom endocitoze unosi u ćelije tubula. U lumenu zaostaje oko 0,1 - 0,2 % filtriranog NGAL-a. (89) Reapsorbovani NGAL se vraća u cirkulaciju ili u ćelijskim lizozomima dolazi do njegove degradacija i fragmentacije. (65) Ispitivanjima na glodarima sa radioaktivnim jodom (I^{131}), primećeno je da postoje dve faze u ekskreciji lipokalina 2. Prva faza se javlja unutar sat vremena od infuzije radioaktivnog joda, tokom koje dolazi do brze ekskrecije monomernih formi lipokalina 2. Tokom druge faze dolazi do ujednačene ekskrecije monomernih i dimernih formi lipokalina 2. (23)

Deo NGAL-a koji se izlučuje urinom je poreklom od serumskog NGAL-a (sNGAL), koji nakon filtracije nije resorbovan u tubulima. Drugi deo potiče od povećanog oslobađanja iz neutrofila i epitela mokraćnih puteva, uključujući i epitel mokraćne bešike, tokom različitih patoloških procesa u bubrezima. (65)

Do povećanja NGAL-a u urinu (uNGAL) dolazi različitim patološkim mehanizmima, u stanjima kada nivo filtriranog NGAL-a prevazilazi kapacitet reapsorpcije u proksimalnim tubulima ili pri povećanoj sintezi u bubrežnim tubulima. (24) Oštećenja glomerularne bazalne membrane omogućavaju prolazak veće količine serumskih proteina, uključujući i NGAL-a, što povećava njegovu koncentraciju u primarnom urinu. Poremećena reapsorpcija na nivou proksimalnih tubula dozvoljava da veća količina filtriranog NGAL-a zaobidje reapsorpciju i izgubi se urinom. (48) Oštećene tubulske ćelije nisu u mogućnosti da resorbuju adekvatnu količinu filtriranih proteina. Sa druge strane, dolazi do smanjenja aktivnosti kompleksa kubulin-megalin, sa smanjenjem procesa endocitoze. (58,65) U uslovima obilne protienurije dolazi do prezasićenja ovog transportnog sistema, jer je kompleks kubulin-megalin nespecifični transportni sistem, koji osim NGAL-a, transportuje albumine, ostale lipokaline i druge proteine. Pri velikim proteinskim gubicima urinom, dolazi do kompeticije NGAL-a sa drugim proteinima za megalinske receptore, koji postaju pezasićeni. (58,65)

Drugi mehanizam porasta NGAL-a u urinu je povećana sinteza NGAL-a, od strane epitelnih ćelija proksimalnih tubula, kao odgovor na štetne stimuluse poput ishemijske, infekcije ili dejstvo toksina. (48) Sintetisani NGAL se luči u lumen tubula i gubi urinom. (53,89) Proksimalni tubuli su mesto najveće sinteze NGAL-a tokom bubrežne lezije. U novije vreme je dokazana značajna uloga ćelija ascedentnog kraka Henlejeve petlje i sabirnih kanalića u sintezi NGAL-a. (27,28,31,33,48,51,52,58) Posebno se izdvajaju alfa umetnute ćelije (alfa intercalated cells A-ICs), koje su lokalizovane u sabirnim kanalićima bubrega, gde sekretuju NGAL u prisustvu bakterijske infekcije. (78) Transkripcija NGAL je indukovana aktivacijom TLR 4 na A-ICs ćelijama. (78) Alfa umetnute ćelije su visoko specijalizovane ćelije, čija je primarna funkcija održavanje acidobazne homeostaze. Sposobne su da detektuju urinarnu infekciju čak i kada je ona ograničena samo na mokraćnu bešiku, što ukazuje da su najverovatnije prisutne i u epitelu mokraćne bešike i uretera. U nešto manjoj meri, produkcija NGAL-a je povećana u epitelu sabirnih kanalićima i mokraćne bešike. Izvor povećane količine NGAL-a u urinu su i neutrofilni i

makrofagi, donešeni sistemskom cirkulacijom na mesto ćelijskog stresa. (48,65) Na porast NGAL-a utiče i razvoj glomerularne lezije. (27)

Gvoždje ima značajan uticaj na razvoj bubrežnog oštećenja. Primećeno je povećanje količine gvoždja u tkivu i urinu, tokom bubrežne lezije. Jedna od najranijih disfunkcija koja se kod ljudi javlja tokom oštećenja bubrega, ali i drugih organa poput srca ili jetre, jesu promene u metabolizmu gvoždja. (39,65) Nevezano gvoždje katalizuje konverziju hidrogen peroksida (H_2O_2) u hidrogene jone (OH^-), koji su visoko reaktivni i deluju na mnoge molekule, uključujući lipide, nukleotide i molekule DNK. (39) Opterećenje životinja gvoždjem pogoršava bubrežno oštećenje, dok ga smanjenje gvoždja helatorima, ublažava. I prisustvo povećane količine transferina u tubulima, koje se javlja usled glomerulske disfunkcije i prolaska transferina u urin, dovodi do oštećenja tubulskih ćelija. (65) NGAL povećava rezistenciju oštećenih tubulskih ćelija na apoptozu. Ovaj efekat je direktno povezan sa dopremanjem gvoždja tubulskim ćelijama od strane kompleksa NGAL:siderofor:Fe. (51,106,107) Samo holo NGAL ima zaštitni efekat, dok apo NGAL, naprotiv ima proapoptotičko dejstvo, jer iznošenje gvoždja iz ćelije vodi ka njenoj smrti. (28,58) NGAL:siderofor kompleks je tokom akutne bubrežne lezije u mogućnosti da preusmeri gvoždje iz drugih organa, poput jetre ili slezine u oštećene bubrege. (28,58)

Povećana količina gvoždja u urinu takodje potencira razvoj urinarnih infekcija. (65)

1.4.2. INFLAMACIJA, PRIMARNI IMUNITET I LIPOKALIN 2 U BUBREŽNIM OBOLJENJIMA

Primarno oštećenje tokom glomerulonefritisa je u najvećem broju slučajeva izazvano imunološkim činiocima, a u manjem broju genetskim, metaboličkim ili ishemijsko/toksičnim lezijama. Obično se radi o humoralnom imunom odgovoru sa formiranjem antigen-antitelo kompleksa, dok je ćelijski imunitet retko uzrok primarnog glomerularnog oštećenja, ali zauzima značajnu ulogu u inflamatornom odgovoru koji se javlja nakon primarne lezije. Antitela u glomerulusima reaguju sa *in situ* prisutnim antigenima, uz lokalno stvaranje kompleksa ili dolazi do odlaganja u bubrezima preformiranih antigen-antitelo kompleksa, koji se cirkulacijom dopremaju do glomerulusa. Tokom ćelijski posredovane imune reakcije, infiltrisane T ćelije oštećuju bubrežno tkivo direktnom citotoksičnošću i sekrecijom citokina ili indirektno, aktivacijom makrofaga. (14) Bez obzira na primarnu leziju, kao odgovor na oštećenje, dolazi do razvoja inflamacije. Različiti pro-inflamatorni stimulusi, dovode do značajne stimulacije transkripcije mRNA za NGAL i povećanja sinteze samog glikoproteina. (23) U eksperimentalnom modelu lupus nefritisa, nakon izlaganja anti-dsDNA antitelima, NGAL-knockout miševi imaju manje bubrežno oštećenje i manju aktivnost gena vezanih za apoptozu. (72) Ovo ukazuje da NGAL-a može imati značajnu ulogu u nastanku sekundarnog glomerulonefritisa.

Postoji sve više dokaza o ulozi primarnog imuniteta u nastanku i razvoju bubrežnih oboljenja. Aktivacija Toll-like receptora se povezuje sa razvojem autoimunih oboljenja u bubrezima. (2,108) Dokazano je da, osim infektivnih, postoje i endogeni molekuli, koji mogu stimulisati TLR, dovesti do aktivacije imunog sistema i razvoja sterilne inflamacije. Oni se nalaze u cirkulaciji ili se ovi preformirani agonisti TLR mogu osloboditi tokom ćelijske nekroze ili posredstvom medijatora inflamacije. Neki od endogenih molekula koji

stimulišu TLR su anti-dsDNA, fibrinogen, adenzin, biglikani, kristali mokraćne kiseline i drugi. (108) U bubrezima obolelih od lupus nefritisa, Lu i sar. su dokazali povišen nivo TLR-9 i NGAL-a (32), a Machida i sar. su našli povećanu ekspresiju TLR-9 na oštećenim podocitima glomerulusa. (109) Ova pojava je reverzibilna i ekspresija TLR-9 se smanjuje kod bolesnika u remisiji. Nakon vezivanja odgovarajućeg agoniste za TLR, oni aktiviraju NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells - nuklearni faktor za kapa-laki-lanac pojačivač odgovora aktiviranih B ćelija), proteinski kompleks koji u ćelijskom jedru reguliše transkripciju DNA i dovodi do produkcije inflamatornih citokina poput TNF- α , IL-6 i interferona γ . On takodje reguliše i sintezu NGAL-a i MMP-9, čime se objašnjava povećanje njihovog nivoa nakon stimulacije TLR. (32,109) I drugi agensi poput IL-1 β i TNF- α , dovode do aktivacije NF- κ B. (14,23,110) Povećan prolazak proteina kroz tubularne ćelije takodje dovodi do aktivacije NF- κ B u njima. (14) Chakraborty i sar. u svom radu navode da NGAL deluje po principu negativne povretne sprege i dovodi do smanjenja ekspresije NF- κ B, čime smanjuje dalju transkripciju gena za citokine. (23)

Tokom inflamacije u bubrezima dolazi do aktivacije sistema komplementa, koji može direktno oštetiti glomerularne ćelije ili stimulisati sekreciju citokina. Oštećenje epitelnih ćelija dovodi do aktivacije kaskade komplementa, sa posledičnom apoptozom ćelija. C3 komponenta komplementa se smatra negativnim regulatorom ekspresije NGAL-a. (23)

Infiltracija leukocita, na prvom mestu neutrofila, kao i interakcija između leukocita i endotela, su veoma značajni za progresiju inflamacije tokom glomerulonefritisa. Degranulacijom granulocita se oslobadja preformirani NGAL iz sekundarnih granula. Poznato je da NGAL može regulisati broj leukocita, indukujući apoptozu granulocita i limfocita, a apoptoza neutrofila predstavlja snažan anti-inflamatorni signal za ostale ćelije imunog sistema. (22,39,53,77) Za razvoj glomerulonefritisa je posebno značajna infiltracija makrofaga i T limfocita, do čega dolazi usled uticaja različitih citokina i hemoatraktanata, među kojima se nalazi i NGAL. (24) T ćelije se smatraju ključnim ćelijama za razvoj većine glomerulonefritisa. U zavisnosti u kakvom citokinskom okruženju se nalaze, T limfociti se diferenciraju u podtipove, koji imaju različite uloge u daljem procesu. (2) Pod uticajem transformišućeg faktora rasta TGF- β , nastaju regulišući T_{REG} limfociti, koji izlučuju TGF- β i IL-10 i za koje se smatra da vode smanjenju imunog odgovora. NGAL pospešuje ekspanziju T regulatornih ćelija. (33) Pod uticajem IL-12 nastaje Th1 podtip T limfocita, koji stvara interferon γ i TNF- α i promoviše dalje oštećenje bubrega. Smatra se da Th1 ćelije imaju značajnu ulogu u razvoju krescentnih i proliferativnih formi glomerulonefritisa. (14) U prisustvu veće koncentracije IL-2, IL-4 i IL-13 nastaje Th2 podtip T ćelija, koji uzrokuje humoralni tip inflamatorne reakcije. Tokom glomerulonefritisa je dominantan Th17 tip T limfocita, koji dovodi do povećanja nivoa IL-9, IL-17A, IL-21, IL-22, TNF- α i nakupljanja polimorfonukleara, a IL-17 povećava nivo NGAL-a. (23) Poremećaj funkcije T ćelija se nalazi u osnovi disfunkcije glomerularnih podocita, što je ključni momenat u razvoju glomerulonefritisa minimalnih promena. (14)

Makrofagi imaju mnogobrojne funkcije tokom razvoja glomerulonefritisa. Oni stvaraju citokine poput TNF- α i interleukina, otpuštaju hemoatraktante za leukocite i različite faktore rasta, dovode do proliferacije, kako drugih makrofaga, tako i ćelija

glomerulosa i uzrokuju apoptozu ćelija. Takođe utiču i kontrolišu procese reparacije i fibroze intersticijuma, putem citokina, faktora rasta i metaloproteinaza. (2,110) Makrofagna infiltracija bubrega tokom glomerulonefritisa je povezana sa razvojem rane inflamacije, patogenezom arterionefroskleroze i povećane intersticijalne fibroze. (87) Aktivisani makrofagi takođe dovode i do povećanja ekspresije NGAL-a, kako na samim makrofagima, tako i na mezigijalnim ćelijama glomerula. (23) Smatra se da lipokalin 2 dovodi do deaktivacije makrofaga, čime se smanjuje produkcija proinflamatornih citokina i ublažava rani inflamatorni odgovor. (111) Osim deaktivacije, NGAL indukuje apoptozu lokalnih makrofaga, čime smanjuje njihove gore pomenute efekte. (73)

Mezigijalne ćelije takođe mogu proizvoditi NGAL, kao odgovor na inflamatorni stimulus, što je dokazano *in vitro* ispitivanjima na kulturama mezigijalnih ćelija, u kojima je dodatak anti dsDNA antitela rezultovao povećanom produkcijom NGAL-a. (56,71,87)

Tokom razvoja inflamatornog procesa u bubrezima dolazi do oslobađanja velikog broja faktora rasta i citokina. Bubrezi su značajno mesto nastanka i delovanja transformišućeg faktora rasta TGF- β . Receptori za TGF- β , kao i aktivan molekul su dokazani u svim bubrežnim ćelijama, uključujući glomerulose i proksimalne tubule. Ima značajnu ulogu u promenama mezigijuma tokom glomerulonefritisa, time što reguliše produkciju ekstracelularnog matriksa, stimulišući mezigijalne i epitelne ćelije na povećanu sintezu proteina ekstracelularnog matriksa, uključujući proteoglikane, fibrinonektin, kolagen tipa IV i laminin. (14,110) TGF- β stimuliše i tkivnu produkciju inhibitora metaloproteinaza. Sa druge strane TGF- β inhibiše sintezu kolagenaza. Sve ovo vodi smanjenoj degradaciji ekstracelularnog matriksa i njegovoj akumulaciji, uz usporenje procesa fibroze. Prisustvo miofibroblasta u intersticijumu, glavnog izvora kolagena tipa III, reguliše TGF- β . (14) Reguliraju i ćelijsku proliferaciju, ekspresiju različitih gena i apoptozu podocita. (14) Uz sve navedene funkcije, TGF- β stimuliše produkciju NGAL-a, ali ne utiče na nivo njegovih receptora. (34,40)

Krajnji efekti citokina koji se oslobađaju tokom inflamacije u bubrezima se veoma razlikuju. Izvori citokina su mononuklearne ćelije koje infiltrišu intersticijum, kao i ćelije bubrežnog porekla, na prvom mestu mezigijalne ćelije. IL-1, IL-17 i TNF- α indukuju produkciju hemoatraktanata od strane mezigijalnih ćelija, čime se povećava broj leukocita u bubrezima. Interleukini i TNF- α u tubularnim ćelijama povećavaju produkciju citokina, čime intenziviraju inflamaciju. TNF- α , poreklom iz makrofaga utiče na povećanje genske ekspresije NGAL-a u mezigijumu, kao i sekreciju NGAL-a u različitim ćelijama. (87) TNF- α je dobro poznat proinflamatorni citokin, koji je značajan za regulaciju inflamacije, apoptoze i oksidativnog stresa u bubrezima i ima dokazanu ulogu u razvoju glomerulonefritisa. Blokiranje TNF- α usporava glomerularno oštećenje kod pacova. Poznato je da lipokalin 2 modifikuje inflamatorni odgovor u masnom tkivu i stimuliše adipocite na sekreciju TNF- α , što dovodi do lokalne inflamacije. (40) Postoji mogućnost, da NGAL osim adipocita, stimuliše i bubrežne ćelije na produkciju TNF- α , čime se povećava inflamacija u bubrezima. Na ovo ukazuje studija Wu i sar. u kojoj su dokazane povišene vrednosti NGAL-a i TNF- α u tkivu obolelog bubrega. (112)

Tokom glomerulonefritisa dolazi do povećanja sekrecije različitih interleukina. Povišen nivo IL-1 pospešuje akutnu i hroničnu bubrežnu inflamaciju. Takođe povećava proliferaciju mezigijalnih ćelija, produkciju ekstracelularnog matriksa i infiltraciju

intersticijuma makrofagima koji, posebno tokom krescentnog glomerulonefritisa, oslobadaju velike količine IL-1. Ovaj citokin povećava produkciju NGAL-a. (14) Ekspresija receptora za NGAL na tubulskim ćelijama i u glomerulusima je indukovana IL-1 β , koji se oslobadja iz mezangijalnih ćelija. (34) IL-4, sintetisan od strane mononuklearnih ćelija krvi moduliše funkciju B ćelija. IL-12 indukuje produkciju interferona γ , koji dalje utiče na oslobađanje proinflamatornih citokina, uključujući i nove količine IL-12. U in vitro uslovima mezangijalne ćelije pokazuju povećanu ekspresiju receptora za IL-12, koji ima svoje efekte na T ćelije, makrofage i endotelne ćelije. Interferon γ , koji proizvode mononuklearne ćelije krvi dovodi do povećane sinteze citokina od strane bubrežnih ćelija, posebno IL-1 α , IL-1 β i TNF- α , a takodje i NGAL-a. Pospešuje aktivnost T limfocita, ćelija prirodnih ubica i lokalnih makrofaga, a stimuliše i oslobađanje MCP-1 (MCP-1 - renal monocyte chemoattractant protein), koji regulišu aktivnost T ćelija i stimuliše dalju produkciju citokina. (14)

Osim što različiti citokini dovode do povećane sinteze NGAL-a, poznato je da i NGAL stimuliše oslobađanje različitih citokina, čime može intenzivirati inflamatorni proces. (72) Sa druge strane, NGAL vezuje i povećava klirens lipofilnih medijatora inflamacije, čime ima suprotan efekat. (30)

Osim NGAL-a, tokom aktivne faze glomerulonefritisa je primećena povećana ekspresija MMP-9 na mezangijalnim ćelijama. MMP-9 ima značajnu ulogu u primarnom imunitetu svojim uticajem na migraciju neutrofila. (22) MMP-9 se, kao i drugi članovi njegove porodice, može u fiziološkim uslovima naći u većoj meri eksprimiran na ćelijama imunog sistema, poput monocita, aktivisanih makrofaga i alveolarnih makrofaga i neutrofila. Uticajem na različite citokine, mijeloperoksidaze tokom inflamacije mogu imati pro i anti-inflamatorne efekte. (76) Poznato je da vezivanjem sa MMP-9, NGAL sprečava njegovu degradaciju. Iako je osnovna funkcija MMP-9 degradacija ekstracelularnog mezangijalnog matriksa, on tokom bubrežnog oštećenja ima pro-fibrotički efekat, odnosno stimuliše razvoj intersticijalna fibroze. (22,24,61,64) U ispitivanjima na tumorskom tkivu i miokardiocitima nakon akutne lezije, zaključeno je da MMP-9 stimuliše angiogenezu i regulišu intenzivno remodelovanje krvnih sudova u oštećenom području. (31,37,43) Takodje je dokazano je da MMP-9 može indukovati prelaz epitelnih ćelija tubula u miofibroblaste, koji stvaraju kolagena tipa III, i na taj način pospešiti razvoj fibroze. (64)

Povećan prolazak proteina kroz bazalnu membranu, sa poremećajem reapsorpcije u proksimalnim tubulima, dovodi do oštećenja tubulskih ćelija i stimulacije sekrecije NGAL-a od strane samih tubula. (56) U tubulskim ćelijama se takodje povećava i ekspresija hemokina i pro-fibrogenih citokina, i faktora rasta, koji dalje utiču na pojavu proliferacije mezangijalnih ćelija i sintezu matriksa. (106) Najveća pažnja se posvećuje osteopontinu i monocitnom hemoaktraktantnom proteinu bubrega MCP-1. Kod idiopatske membranske nefropatije je dokazana povezanost proteinurije sa stepenom tubulointesticijalne infiltracije. (14) NGAL smanjuje broj aktivisanih leukocita koji invadiraju područja oštećenja u bubrežima, smanjujući koncentraciju proinflamatornih citokina i njihov štetan efekat. (39) Protrahovana proteinurija vodi ireverzibilnom oštećenju epitelnih ćelija, nakon čega dolazi do aktivacije kaskade komplementa sa posledičnom apoptozom ćelija. Apoptozu tubulskih ćelija sprečava enzim hem oksigenaza 1, čiju aktivaciju stimuliše NGAL. Enzim ima i antioksidativno dejstvo, odnosno štiti ćelije od oštećenja uzrokovanog slobodnim

kiseoničnim radikalima. (23,28,39,58,68) Smanjenjem tubularnog oštećenja, NGAL na indirektan način dovodi do inhibicije mezangijalne ćelijske proliferacije i štiti glomerulose i intersticijum od daljih oštećenja. NGAL obezbeđuje bubrežnim tubulima gvoždje neophodno za proces reparacije, čime smanjuje broj apoptotičnih ćelija i indukuje i ubrzava reepitelizaciju oštećenih tubula, zbog čega se smatra faktorom rasta. (39,50,58,87,113) Neki autori međutim smatraju da NGAL osim stimulacije proliferacije i kontrole dediferencijacije tubulskih epitelnih ćelija, dovodi i do proliferacije mezangijalnih ćelija, čime intenzivira glomerularno oštećenje. (40,87) Na povećanu ćelijsku proliferaciju utiče i aktivacija epidermalnog faktora rasta (EGF epidermal growth factor), koji se povezuje sa povišenim vrednostima NGAL-a. (50,51,106)

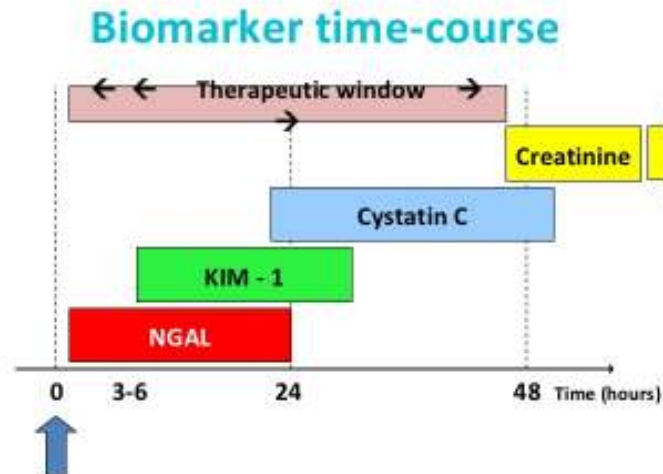
Smatra se da NGAL dovodi do smanjenja glomeruloskleroze i intersticijalne fibroze, koje se javljaju nakon redukcije broja nefrona. Kod miševa, primena malih doza od 10µg egzogenog lipokalina 2, neposredno pre štetnog stimulusa ili tokom inicijalne faze bubrežnog oštećenja, dovodi do značajnog smanjenja patohistoloških oštećenja, broja apoptotičnih ćelija i nivoa serumskog kreatinina. (28,39,50)

Na osnovu svega do sada iznesenog se može zaključiti da još uvek nije razjašnjena tačna uloga NGAL-a tokom glomerulonefritisa, ali je jasno da veza postoji. Moguće je da NGAL ima i pro-inflamatorne i zaštitne efekte, a da krajnji efekat NGAL-a na bubrežni parenhim, zavisi od lokalnih uslova, odnosno aktivnosti različitih ćelija i prisustva odgovarajućih citokina i drugih medijatora inflamacije, koji modifikuju ekspresiju NGAL-a.

1.4.3. LIPOKALIN 2 I AKUTNA BUBREŽNA LEZIJA

Mnogobrojna ispitivanja ukazuju na NGAL, kao dobar biomarker u akutnoj bubrežnoj leziji (Acute kidney injury - AKI). (22,28,37,42,50,51,56,79,89,105,107) Supavekin i sar. su prvi primetili da je u bubrežima miševa, nakon ishemijske lezije, najveća ekspresija gena za lipokalin 2. (114) Dalja ispitivanja na glodarima su ukazala na porast nivoa NGAL-a, neposredno nakon eksperimentalne bubrežne lezije uzrokovane ishemijom, infekcijom ili toksinima. (43)

Niske koncentracije NGAL-a se nalaze u bubrežima i u normalnim okolnostima. Vrednosti značajno rastu usled intenzivnog oslobađanja iz tubularnih ćelija nakon akutne ishemijske ili toksične lezije. (19,51,58,71,87) Već 3 - 4 h nakon lezije dolazi do ekspresije NGAL-a u bubrežnom tkivu i povećanja njegovog serumskog i urinarnog nivoa. (27,34,50,56,58,72,89) Do porasta kreatinina, najčešće korišćenog parametra u praćenju bubrežne funkcije, dolazi za 1 - 3 dana nakon lezije. Pojava NGAL-a u urinu prethodi pojavi drugih urinarnih markera AKI. (48) Nivo serumskog NGAL-a raste za 7 - 16 puta, a urinarnog za 25 - 100 puta. Porast NGAL-a tokom AKI je reverzibilan, s tim da se povišene vrednosti održavaju tokom nekoliko dana. (65) U ispitivanju na bolesnicima nakon kardiohirurške intervencije, Bennett i sar. su primetili značajno veći porast NGAL-a u urinu ispitanika koji su razvili AKI u odnosu na ispitanike bez bubrežne lezije. Kod bolesnika koji su razvili AKI, unutar 2 sata nakon operacije, nivo NGAL-a u urinu je bio 15 puta veći u odnosu na bazalni, a nakon 4 - 6 časova čak 25 puta. (103) Navedeni autori smatraju da se AKI može predvideti korišćenjem vrednosti NGAL-a u urinu od 100 ng/ml.

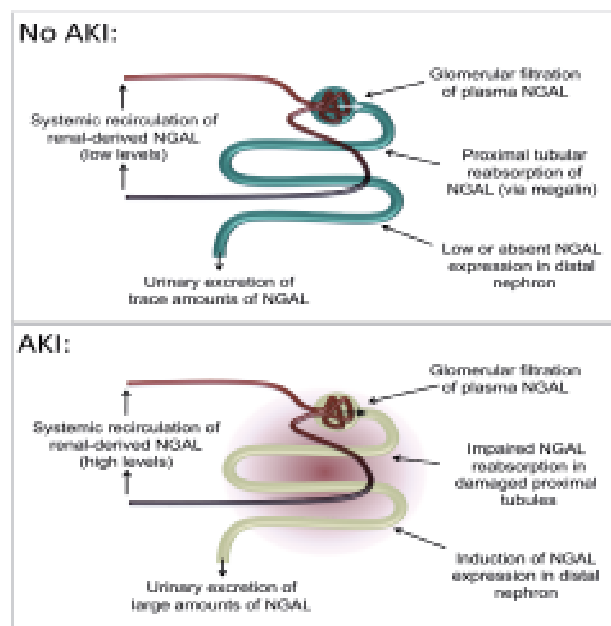


McIlroy DR, Wagener G, Lee HT. *Anesthesiology* 2010; **112**: 998-1004

Slika 8. Shematski prikaz biomarkera u akutnoj bubrežnoj leziji

Ispitivanja biopsijskog materijala bolesnika sa akutnom bubrežnom lezijom su dokazala značajnu stimulaciju informacione RNA za NGAL, sa povećanjem koncentracije NGAL-a, u 50% ćelija kortikalnih tubula. (27,31,48,52,58,114)

Nivo NGAL-a, posebno urinarnog NGAL-a, je dobar prediktor intenziteta bubrežnog oštećenja. (58,65) Ukazuje na bolesnike kod kojih možemo očekivati nepovoljan klinički tok bubrežne lezije. Kod bolesnika u jedinicama intenzivne nege, plazmatski nivo NGAL-a je dobar prediktor potrebe za zamenom bubrežne funkcije, kod bolesnika sa AKI. (24,65) Takođe se može smatrati prediktorom smrtnog ishoda kod bolesnika sa AKI. (65)



Slika 9. NGAL u Akutnoj bubrežnoj leziji
(Izvor: Schmidt-Ott KM. *JASN* 2007;18:407-413)

Kod bolesnika sa ranije prisutnom bubrežnom insuficijencijom lipokalin 2 može ukazati na pogoršanja bubrežne funkcije. (34) Specifičnost NGAL-a kao markera bubrežne lezije se smanjuje kod bolesnika sa izraženom sistemskog inflamacijom i većim multiorganskim oštećenjima. (27)

Lipokalin 2, koji se tokom akutne bubrežne lezije pojavljuje u urinu obolelih, je najvećim delom sintetisan u proksimalnim tubulima, dok se manji deo oslobadja iz ćelija ascedentnog kraka Henlejeve petlje i sabirnih kanalića bubrega. (24,27,28,31,33,48,51,52,58) Određena količina serumskog NGAL-a, koja nije reapsorbovana u proksimalnim tubulima, se gubi urinom i takodje povećava nivo NGAL-a u urinu. (28) Tokom AKI dolazi do porasta i serumskog NGAL-a, s tim da bubrezi nisu njegov primarni izvor. Bubrežna lezija utiče na povećanu ekspresiju mRNA za NGAL u udaljenim organima poput jetre i pluća, kao i endotelnim ćelijama vaskularne mreže, gde dolazi do povećane sinteze lipokalina 2. (48,60) Tokom AKI je zapažena infiltracija bubrega neutrofilima, koji nakon aktivacije oslobadjuju NGAL, uz povećanje produkcije NGAL-a od strane makrofaga i drugih imunih ćelija. (24,31) Sa druge strane, poremećaj glomerularne filtracije koji se javlja tokom akutne lezije bubrega, dovodi do smanjene filtracije cirkulišućeg NGAL-a i povećanja njegove koncentracije u serumu. (48) Merenjem koncentracije NGAL-a u renalnim venama dokazan je prelazak određene količina NGAL-a lokalno produkovanog u bubrezima, u krvotok. (28)

Ukupna količina NGAL-a koja se nalazi u urinu tokom akutne renalne lezije je kombinacija različitih izoformi. Monomeri su rezultat povećane sinteze od strane tubularnih ćelija, kao i deo NGAL-a poreklom iz sistemske cirkulacije. Dimeri se sintetišu od strane infiltrisanih neutrofila, dok je drugi deo, poreklom iz cirkulacije i najčešće se odlaže u glomerulusima. (31)

Osim što je dijagnostički biomarker, NGAL ima ulogu u mehanizmima bubrežnog oštećenja, kao i zaštiti od istih. (106,107) Ove efekte pokazuje stimulacijom različitih ćelijskih procesa, poput proliferacije, diferencijacije i sprečavanja apoptoze. (22,28,34,35,48,58,72,89,105) U lezijama po tipu ishemije i reperfuzije, krajnji efekat zavisi od metabolizma Fe u proksimalnim tubulima, koji je posredovan kompleksom NGAL:siderofor:Fe. (72)

1.4.4. LIPOKALIN 2 I HRONIČNA BUBREŽNA INSUFICIJENCIJA

U do sada objavljenim ispitivanjima, lipokalin 2 se pokazao kao dobar biomarker postojanja i progresije hronične bubrežne insuficijencije (HBI). (19,24,27,31,37,42,48,52,56-58,72,79,87,89,105-107) Bolesnici u terminalnom stadijumu bubrežne insuficijencije, koji su na hroničnom hemodijaliznom programu, imaju značajno veće vrednosti NGAL-a u odnosu na zdrave osobe. (91) Povećana ekspresija NGAL-a je primećena u biopsijskom materijalu bolesnika sa HBI različite etiologije. (52)

U mnogobrojnim radovima je dokazano postojanje korelacije između nivoa NGAL-a u serumu, odnosno urinu i parametara bubrežne funkcije. Urinarni NGAL pozitivno koreliše sa vrednostima serumskog kreatinina i visinom proteinurije, dok serumski i urinarni nivo NGAL-a imaju visoku inverznu korelaciju sa jačinom glomerulske filtracije. (19,44,48,60,71,80,87,89,107) Utvrđena je i korelacija NGAL-a sa serumskim nivoom

mokraćne kiseline, koja se, uz TNF- α , povezuju sa povećanim rizikom za razvoj i progresiju HBI. (87) Takodje je primećena i povezanost nivoa lipokalina 2 i ekspresije solubilnog receptora za TNF- α , koji se smatra faktorom rizika i za razvoj glomerularnog oštećenja. Nivo lipokalina 2 koreliše sa brojem leukocita, a postojanje umerene inflamacije se povezuje sa određenim patogenetskim mehanizmima u progresiji HBI. (87) Kod bolesnika na hemodijalizi, nivo NGAL-a blisko koreliše sa vrednostima serumskog feritina i saturacijom transferina (TSAT), dva glavna parametra zasićenja organizma sa Fe. (91) Primećeno je da bolesnici na hroničnom hemodijaliznom programu, sa saturacijom transferina (TSAT) manjom od 20%, koja karakteriše deficit gvoždja, imaju manji nivo NGAL-a. Nakon korekcije deficita gvoždja, dolazi do porasta NGAL-a. (91) Smatra se da bi NGAL, kod dijaliznih bolesnika, mogao biti bolji prediktor deficijencije gvoždja od feritina. (91)

U biopsijskom materijalu bubrega bolesnika sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom, utvrđena je korelacija ekspresije NGAL-a sa postojanjem i stepenom intersticijalne fibroze i tubularne atrofije, s tim da vrednosti urinarnog NGAL-a bolje iskazuju postojanje tubularnog oštećenja. (19,56,81,87,89,107)

Određena ispitivanja ukazuju da bi nivo NGAL-a mogao ukazivati na bolesnike koji će imati bržu progresiju bubrežnog oštećenja. Utvrđeno je da bolesnici sa bazično većim vrednostima NGAL-a u urinu i serumu češće imaju brzu progresiju bubrežne insuficijencije do terminalnog stadijuma. (19,42,99,106) U drugom i trećem stadijumu HBI, vrednosti serumskog NGAL-a imaju bolje dijagnostičke performanse u odnosu na vrednosti urinarnog NGAL-a. U kasnijim stadijumima HBI, serumski i urinarni NGAL imaju istu prognostičku vrednost, s tim da bolesnici sa većim vrednostima NGAL-a u urinu, brže dostižu terminalni, dijalizno zavisni, stadijum HBI. (80)

Postoji nekoliko mehanizama povećanja nivoa NGAL-a tokom hronične bubrežne insuficijencije. Oštećeni bubrezi sintetišu veće količine NGAL-a, posebno u proksimalnim tubulima i ascedentnom kraku Henleove petlje. (24,52) U manjoj meri, NGAL se pojačano sintetiše i luči i u inflamiranoj vaskulaturi, koja se vidja tokom HBI. Oštećenje bubrega dovodi do dramatičnog porasta mRNA za NGAL u udaljenim organima, kao što su pluća ili jetra. (44,56) NGAL iz ovih organa, uz NGAL koji se povećano izlučuje iz aktivisanih neutrofila i makrofaga, dovodi do povećanja njegovog serumskog nivoa. Oštećenje glomerularne bazalne membrane dovodi do smanjenja filtracije NGAL-a i njegove akumulacije u organizmu. (44,56) Ekstrakorporalne procedure poput hemodijalize, dovode do oslobađanja veće količine NGAL-a, najverovatnije kao odgovor na stres. (91)

Porast vrednosti NGAL-a tokom hronične bubrežne insuficijencije nije samo pasivna posledica oštećenja bubrežne funkcije, već NGAL aktivno učestvuje u mehanizmima progresije oboljenja. (80) Inflamacija koja se javlja tokom HBI, uzrokuje povećanu infiltraciju bubrega makrofagima, uz povećanu ekspresiju TNF- α i toll-like receptora 4 (TLR 4), koji utiču na povećanje koncentracije NGAL-a u mezangijumu. Povećane vrednosti NGAL-a imaju ulogu faktora rasta. Dok nije dokazano da se radi o NGAL-u, ovaj faktor rasta se nazivao stimulisani, superinducibilni protein. On uzrokuje povećanu proliferaciju epitelnih i mezangijalnih ćelija. (40,87) Infiltracija makrofaga, sa

lokalnim povećanjem NGAL-a, je takodje povezana sa ubrzanim procesima arterionefroskleroze, koja dalje vodi razvoju fibroze. Ovo povezuje makrofagnu infiltraciju sa početnim oštećenjima u okviru HBI, kao i kasnijim fazama popravke oštećenjih područja. Ovaj mehanizam je važan i tokom razvoja glomerulonefritisa, posebno proliferativnih formi. (87)

Prema hipotezi „forest fire theory“ (teorija šumskog požara), porast NGAL-a tokom HBI je posledica povećane produkcije od strane još uvek funkcionalnih, ali inflamiranih tubularnih i mezigijalnih ćelija, dok je porast kreatinina i razvoja smanjenja jačine glomerularne filtracije, pasivni rezultat gubitka funkcionalnih ćelija i nefrona. (19,37,58,80) Prema ovoj teoriji, NGAL bi predstavljao pravovremeni indikator postojanja aktivnih, potencijalno reverzibilnih oštećenja u bubrežima u okviru HBI. Stoga se serumski i urinarni NGAL mogu koristiti kao prediktori rizika za progresiju hronične bubrežne insuficijencije različitih etiologija, odnosno ukazati na pojavu inflamacije ili nove bubrežne lezije u okviru starih, hroničnih oštećenja. (47,80)

1.4.5. LIPOKALIN 2 I SEKUNDARNI GLOMERULONEFRITISI U OKVIRU SISTEMSKOG LUPUSA I VASKULITISA

Na osnovu dobre efikasnosti NGAL-a kao biomarkera u akutnoj bubrežnoj leziji i hroničnoj bubrežnoj insuficijenciji, započeta su ispitivanja njegove uloge i potencijalne dijagnostičke koristi i u drugim oboljenjima bubrega. Primećene su povišene vrednosti NGAL-a kod bolesnika sa sekundarnim glomerulonefritisom u okviru sistemskog lupusa. Bolesnici sa lupus nefritisom (LN) imaju više nivoe NGAL-a u serumu i vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin u poredjenju sa bolesnicima sa sistemskim lupusom bez razvijenog nefritisa ili zdravim kontrolama. (34,51,56,58,71,72,79,113,115,116) Povećana ekspresija NGAL-a ne koreliše sa aktivnošću sistemskog lupusa, (32) mada su neki autori uočili povezanost sa SLEDAI skorom. (113,115) Ovo ukazuje da na nivo NGAL-a utiče prisustvo lupus nefritisa tokom sistemskog eritemskog lupusa (SLE). Takodje je utvrđeno da su vrednosti uNGAL-a i odnosa uNGAL/kreatinin veće kod bolesnika sa aktivnim lupus nefritisom u odnosu na bolesnike u fazi remisije. (116) Kod bolesnika sa aktivnim LN-om je dokazana i veća ekspresija NGAL-a i mRNA za NGAL, u bubrežnom parenhimu. (32,58) Takodje je dokazano i povećanje ekspresije receptora za NGAL, kako na tubulskim, tako i na mezigijalnim ćelijama (34) Glomerulska i tubulointercijalna ekspresija NGAL-a tokom lupus nefritisa značajno korelišu. (32)

Povezanost NGAL-a sa sekundarnim glomerulonefritisom u okviru sistemskog lupusa se bar donekle može objasniti aktivacijom Toll-like receptora. Poznato je da osim bakterija i različite endogene materije, uključujući i dupla spirala DNA, mogu aktivirati TLRs. Aktivacija TLRs rezultuje povećanom sintezom NGAL-a. Ovo je dokazano i ispitivanjima u kojima je dodavanje anti dsDNA antitela dovelo do povećane ekspresije NGAL-a u bubrežima. (72,113) Važno je istaći da se povećana ekspresija NGAL-a javlja i na mezigijalnim ćelijama tretiranim anti dsDNA antitelima. (72,115)

Nivo urinarnog i serumskog NGAL-a kod bolesnika sa lupus nefritisom, dobro korelišu sa visinom dnevne proteinurije i odnosom urinarni protein/kreatinin. (32,58,113,115) Ekspresija NGAL-a u tubulointercijumu bolesnika sa LN-om, je takodje

u značajnoj korelaciji sa proteinurijom i bubrežnom funkcijom, odnosno vrednostima kreatinina i glomerularne filtracije (GFR). (32,58) Nivo ekspresije NGAL-a dobro koreliše i sa indeksom aktivnosti i indeksom hroniciteta utvrđenih patohistološkim pregledom bioptata bubrega. (32,58) I urinarni nivo NGAL-a je kod bolesnika sa LN-om povezan sa određenim patohistološkim nalazima na bioptatu bubrega. Tako su primećene veće vrednosti uNGAL-a kod bolesnika sa difuznim proliferativnim formama LN-a, u odnosu na bolesnike sa membranskim oblicima oboljenja. Ovo zapažanje je potvrđeno i kod bolesnika u pedijatrijskom uzrastu. (34,71,116,117) U ispitivanjima na miševima je primećen visok nivo urinarnog lipokalina 2 tokom LN-a sa razvojem krescentnih formacija, a visoke vrednosti su se poklapale sa postojanjem aktivnih krescenta u bubrezima. (115)

Ova povećana ekspresija NGAL-a u bubrezima obolelih od lupus nefritisa, može ukazivati na njegovo učešće u patogenezi nefritisa, ili na protektivno dejstvo, u cilju smanjenja oštećenja bubrežnog tkiva. Takođe, može samo reflektovati aktivaciju nekog drugog patogenog mehanizma. NGAL pospešuje bubrežno oštećenje indukovano odlaganjem antitela, time što stimuliše oslobađanje različitih citokina i ubrzava apoptozu bubrežnih ćelija. (72) NGAL-knockout miševi nakon izlaganja anti dsDNA antitelima imaju značajno manje bubrežno oštećenje i manji stepen proteinurije, kao i manju aktivnost gena vezanih za apoptozu. (72) Izlaganje miševa sa postojećim anti dsDNA antitelima egzogenom lipokalinu 2, dovodi do pogoršanja histoloških lezija u bubrezima i povećanja mortaliteta. (113) Ovo ukazuje na ulogu NGAL-a u nastanku i progresiji lupus nefritisa. Makrofagna infiltracija, a samim tim i NGAL su povezani sa razvojem rane inflamacije u bubrezima, patogenezom arterionefroskleroze i povećane intersticijalne fibroze. (87) Sa druge strane, u tubulima zahvaćenim patološkim procesom, povećanje nivoa NGAL-a indukuje i ubrzava reepitelizaciju oštećenih tubula. (87,113)

Povećane vrednosti serumskog NGAL-a tokom lupus nefritisa su sa jedne strane odraz sistemske inflamatorne reakcije, a sa druge povećanog oslobađanja iz udaljenih organa. Kao što je ranije pomenuto, bubrežno oštećenje dovodi do povećanja ekspresije informacione RNA za NGAL, u udaljenim organima, posebno jetri i plućima, što uz NGAL iz cirkulišućih neutrofila i makrofaga, povećava nivo NGAL-a u sistemskej cirkulaciji. (113) Smanjenje glomerularne filtracije, dovodi do smanjenja klirensa i akumulacije NGAL-a. Osim toga, u bubrezima dolazi do povećane sinteze NGAL-a, od strane tubulskih i mezangijalnih ćelija, infiltrisanih neutrofila i epitela inflamirane vaskulature. (71) U in vitro ispitivanjima na kulturi mezangijalnih ćelija, dodatak anti dsDNA antitela dovodi do povećane produkcije NGAL-a. (56,71) Mezangijalne ćelije mogu proizvoditi NGAL i kao odgovor na inflamatorni stimulus. (87) TNF α , poreklom iz infiltrišućih makrofaga utiče na povećanje genske ekspresije NGAL u mezangijumu. (87) Povećanje glomerularne proteinurije i poremećena reapsorpcija u proksimalnim tubulima, dovode do oštećenja tubularnih ćelija i stimulacije sekrecije NGAL-a od strane samih tubula. (56)

Ispitivanjem postojanja povezanosti NGAL-a sa odgovorom na terapiju, primećena je razlika u tubulointersticijalnoj ekspresiji NGAL-a između grupa koje su različito reagovale na terapiju LN-a. (32,79) Bolesnici sa lošim odgovorom na terapiju imaju manju tubulointersticijalnu ekspresiju NGAL-a. (72) Ovo bi moglo ukazivati da nedostatak NGAL-a u bubrezima ima za posledicu loš odgovor na terapiju, odnosno da NGAL ima protektivno dejstvo tokom LN-a. Primećena je i povezanost nivoa NGAL-a sa primenom visokih doza

kortikosteroida. Poznato je da kortikosteroidi podižu nivo NGAL-a, ali je moguće da je NGAL povišen kod ovih bolesnika zbog izraženih bubrežnih lezija, koje zahtevaju intenzivno lečenje. Neki autori smatraju da nivo NGAL u serumu i urinu, odnosno uNGAL/kreatinin odnos, mogu predvideti relaps lupus nefritisa. (52,72,117)

Zbog svega navedenog, NGAL se može smatrati potencijalno dobrim biomarkerom aktivnosti lupus nefritisa. (32,37,42,48,56,71,72,79)

Povišene vrednosti NGAL-a su utvrđene i kod sekundarnog glomerulonefritisa u okviru vaskulitisa, posebno ANCA asociranih. (37,43-46,118) Ohlsson i sar. su utvrdili povišene vrednosti NGAL-a kod bolesnika sa proteinaza 3 pozitivnim vaskulitisom, čak i bez postojanja oštećenja bubrežne funkcije. (46) ANCA antitela mogu dovesti do aktivacije neutrofila i njihove degranulacije, što sa jedne strane utiče na mehanizme razvoja oboljenja, a sa druge dovodi do povećanja NGAL-a. Neutrofilna degranulacija sa porastom vrednosti NGAL-a je primećena i kod bolesnika sa takozvanim slaboimunim (pauci-immune) glomerulonefritisima. (45) Postoji mali broj objavljenih podataka o potencijalnoj ulozi NGAL-a u razvoju vaskulitisa, kao i o mogućnostima primene NGAL-a u dijagnostici ovih oboljenja.

1.4.6. LIPOKALIN 2 I PRIMARNI GLOMERULONEFRITISI

Zbog dokazanog značaja NGAL-a kao biomarkera kod obolelih od lupus nefritisa, započela su i ispitivanja njegove efikasnosti u dijagnostici primarnih glomerulonefritisa. Iako je poznato da je NGAL u bubrežima najviše eksprimiran na tubulskim ćelijama, značaj uticaja tubulointersticijske lezije na tok i ishod primarnih glomerulonefritisa, upućuje da bi NGAL mogao biti koristan u njihovoj dijagnostici. Sa druge strane, to potkrepljuju i podatak o postojanju receptora za NGAL na mezangijalnim ćelijama, kao i njihova sposobnost da produkuju NGAL, kao odgovor na inflamatorne stimulse. (87) Primarni glomerulonefritisi su inflamatorne bolesti bubrega, a ranije je već objašnjeno mesto i značaj NGAL-a u inflamatornom procesu tokom razvoja oboljenja. Tokom aktivne faze glomerulonefritisa, u okviru inflamacije, dolazi do značajne infiltracije bubrega neutrofilnim granulocitima, koji predstavljaju glavni izvor NGAL-a u organizmu. Za sada još uvek ima relativno malo objavljenih podataka o ulozi NGAL-a u etiopatogenezi i dijagnostici primarnih glomerulonefritisa.

Najviše do sada objavljenih ispitivanja NGAL-a u primarnim glomerulonefritisima, je u okviru IgA nefropatije. Dokazane su povišene vrednosti NGAL-a u urinu obolelih, kao i povećana tubularna ekspresija NGAL-a u biopsijskom materijalu bolesnika sa IgA nefropatijom. (16,34,42,48,51,52,58,87,106) Opisane promene se vidjaju već u ranim stadijumima oboljenja. (16,47) Postoje neslaganja u objavljenim podacima oko nivoa NGAL-a u serumu obolelih od IgA nefropatije, mada veći broj autora ukazuje na njegove povišene vrednosti. (16,87) Kod bolesnika sa membranskom nefropatijom i membranoproliferativnim glomerulonefritisom primećeni su povišeni nivoi urinarnog i serumskog NGAL-a, u odnosu na zdrave osobe. (19,34,35,37,43,51,52,55,58) NGAL u urinu i odnos uNGAL/kreatinin su takodje povišeni kod bolesnika sa glomerulonefritisom minimalnih promena i fokalno-segmentnom sklerozom, u poredjenju sa zdravim kontrolama. (52,62,105) Ispitivanjem biopsijskog materijala bubrega, kod bolesnika sa

dijagnozom akutnog proliferativnog glomerulonefritisa je dokazana povećana ekspresija receptora za NGAL, u poredjenju sa biopsijskim materijalom obolelih od drugih bubrežnih oboljenja ili zdravih osoba. (34) Bolesnici sa nefrotskim sindromom, jednom od najčešćih i najozbiljnijih kliničkih manifestacija primarnih glomerulonefritisa, imaju povišene vrednosti NGAL-a u urinu, što je potvrđeno i kod bolesnika u pedijatrijskom uzrastu. (35,89,99,105) Povećan nivo urinarnog NGAL-a se javlja već kod dnevne proteinurije od oko 1 grama. Treba istaći da je nivo NGAL-a povišen kod bolesnika sa primarnim glomerulonefritisom čak i kada nema kliničko-laboratorijskih znakova postojanja bubrežne insuficijencije. (37,58,105)

Do porast NGAL-a u urinu bolesnika sa patološkom proteinurijom dolazi na više načina. Kroz oštećenja glomerularne bazalne membrane dolazi do povećanog pasivnog gubitka cirkulišućeg NGAL-a. (35,43,58) Pri dužem trajanju masivne proteinurije, u ćelijama tubula dolazi do zasićenja megalin-kubulin transportnog sistema, što vodi smanjenju reapsorpcije filtriranog NGAL-a. Zbog prisustva velike količine proteina u tubularnom lumenu dolazi do kompeticije proteina za ćelijske receptore. Sa druge strane javlja se povećana aktivna produkcija NGAL-a u tubulima, kao odgovor epitelnih tubulskih ćelija na hronični stres uzrokovan protrahovanom proteinurijom. (16) U in vitro ispitivanjima je dokazano da ćelije bubrežnih tubula luče NGAL kao odgovor na faktor rasta hepatocita (HGF - Hepatocyte growth factor), koji nastaje u epitelnim ćelijama bubrežnih tubula tokom oboljenja. Osim HGF-om, sintezu NGAL-a mogu indukovati i drugi citokini, poput TNF- α , Il-1 i interferon γ , koje oslobadjaju imune ćelije koje infiltrišu bubrege ili epitelne ćelije tubula. (47) Ovaj nososintetisani NGAL se potom oslobadjaju u urin. (35,43,58) Povećana sinteza NGAL-a u uslovima masivne, dugotrajne proteinurije se može shvatiti i kao zaštitni mehanizam tubulskih ćelija, odnosno pokušaj da se smanji oštećenje uzrokovano proteinurijom. (35,43) Filtrirani proteini u lumenu tubula toksično deluju na epitelne ćelije i često dovode do njihove apoptoze, koju inhibiše povećana količina NGAL-a. (55) U cilju regeneracije epitela dolazi do ubrzane izmene ćelija epitela, sa povećanom potrebom za gvoždjem, koje biva dopremljeno od strane lipokalina 2. (34) Ali, ispitivanja ukazuju da povećane količine NGAL-a takodje i promovišu bubrežno oštećenje tokom glomerulonefritisa. Kao što je poznato, ativnost matriks-metaloproteinaze 9 je regulisana NGAL-om. (62) Vezivanjem NGAL-a za MMP-9, on sprečava njegovu degradaciju, čime se stimuliše aktivnost MMP-9. (62) Iako je primarna uloga MMP-9 razgradnja ekstracelularnog matriksa, dokazano je da tokom glomerulonefritisa on ima profibrozni efekat, koji NGAL pospešuje. Ispitivanja na životinjama takodje ukazuju da NGAL može stimulisati mezenhimalnu proliferaciju. (88) Sve ovo ukazuje da još uvek nije do kraja razjašnjenja tačna uloga NGAL-a u procesu nastanka, progresije i regeneracije primarnog glomerulonefritisa, kao i da su potrebna dalja ispitivanja u tom pravcu.

Osim produkcije u bubrežima, tokom masivne proteinurije dolazi do povećane sekrecije NGAL-a u vanbubrežnim tkivima. Ovo se javlja kao odgovor na sistemski stres uzrokovan proteinurijom i disproteinemijom. Porast serumskog NGAL-a u ovom slučaju, deličimno predstavlja pokazatelj sistemske imune disregulacije povezane sa masivnom proteinurijom. (43) Hiperprodukcija od strane jetre, pluća, aktivisanih neutrofila i endotela krvnih sudova dovodi do povećanja sistemskog nivoa NGAL-a tokom nefrotskog sindroma. (37,43)

Kod bolesnika sa primarnim glomerulonefritisima je primećena pozitivna korelacija između nivoa serumskog i urinarnog NGAL-a. (37,89) Smatra se da povišene vrednosti NGAL-a korelišu sa težinom oboljenja. Nivo NGAL inverzno koreliše sa rezidualnom bubrežnom funkcijom, a direktno sa vrednostima serumskog kreatinina, kod obolelih od glomerulonefritisa. (35,43,51,55,58,105) Značajna je i korelacija NGAL-a sa vrednostima dnevne proteinurije. (35,37,43,47,51,55,58,89) Odnos urinarni NGAL/kreatinin pokazuje visoku korelaciju sa histološkim i kliničkim znacima aktivnosti glomerulonefritisa. (51) Primećena je pozitivna korelacija nivoa NGAL-a sa intenzitetom tubularne ekspresije NGAL-a, intenzitetom mezangijalne proliferacije i tubulointersticijalnog oštećenja, odnosno stepenom intersticijalne fibroze i tubulske atrofije, kod bolesnika sa glomerulonefritisom. (48,87) Rhee i sar. su na osnovu svog ispitivanja zapazili da najveće vrednosti NGAL-a u urinu imaju ispitanici sa umerenim oštećenjima tubulointersticijuma, u poredjenju sa bolesnicima sa izraženim promenama na tubulima i intersticijumu, odnosno bolesnike bez postojanja hroničnih promena. Ovo je dovelo do zaključka da NGAL u urinu reflektuje samo rano oštećenje tubula i ne može ukazati na podmakle promene, jer se ekspresija mRNA za NGAL smanjuje intenziviranjem tubularnih oštećenja, čime je i produkcija manja. (16) Kod dece sa dijagnozom nefrotskog sindroma je potvrđena korelacija između nivoa NGAL-a i arterijskog krvnog pritiska, vrednosti cistatina C i razvoja remisije oboljenja. (105)

Obzirom da dosada dobijeni podaci upućuju da aktivan proces u bubrežima dovodi do povišenih vrednosti NGAL-a, započela su ispitivanja lipokalina 2, kao markera odgovora glomerulonefritisa na primenjenu terapiju. Na ovo navodi i podatak o postojanju korelacija NGAL-a u urinu sa težinom bolesti, koja je pronađena kod bolesnika sa steroid rezistentnim nefrotskim sindromom. (99) Kod ove dece je NGAL bio značajno veći, u odnosu na decu sa steroid senzitivnim nefrotskim sindromom i zdravu decu. (99,105) Ponavljanim određivanjem nivoa lipokalina 2 tokom lečenja primarnih glomerulonefritisa, primećen je značajan pad nivoa, kod bolesnika sa zadovoljavajućim odgovorom na primenjenu imunosupresivnu terapiju. (37,43,51,52,89) Već nakon 6 meseci lečenja dolazi do značajnog pad nivoa urinarnog NGAL-a, kod bolesnika koji povoljno reaguju na terapiju, dok kod ostalih bolesnika, vrednosti stagniraju ili rastu. (58,89) Do smanjenja nivoa dolazi čak i pre smanjenja proteinurije i vrednosti azotnih materija. (37) Rhee i sar. su zapazili da visoke vrednosti NGAL-a u serumu i urinu obolelih od IgA nefropatije, pri postavljanju dijagnoze, ukazuju na loš ishod lečenja i mogući razvoj bubrežne insuficijencije, nezavisno od postojanja tubulointersticijalne fibroze na biopsijskom materijalu bubrega. (16) Oni navode da je potrebna kombinovana upotreba serumskog i urinarnog NGAL-a radi određivanja rizika za progresiju bubrežne insuficijencije. Izrazito visok nivo NGAL-a u urinu, pri postavljanju dijagnoze, je povezan sa rizikom za smanjenje glomerulske filtracije za preko 50% ili razvoj terminalnog stadijuma bubrežne insuficijencije u roku od godinu dana. (16,35,58) I tokom nefrotskog sindroma u pedijatrijskom uzrastu, NGAL predstavlja faktor rizika za razvoj bubrežne insuficijencije. Flo i sar. su zaključili da se viši nivoi NGAL-a u serumu mogu smatrati faktorom rizika za bolesnike koji neće razviti remisiju nefrotskog sindroma, u čijoj osnovi se nalazi glomerulonefritis minimalnih promena i fokalno segmentna skleroza. (89)

Nije u potpunosti jasan razlog smanjenja NGAL-a tokom razvoja remisije nefrotskog sindroma. Cilj terapije je smanjenje proteinurije, čime se smanjuje glomerularna filtracija NGAL-a, kao i preopterećenje kubulin-megalin transportnog sistema u tubulima. Primena imunosupresivne terapije, koja najčešće uključuje kortikosteroide i neki od imunomodulatora, smanjuju oštećenje tubularnih ćelija, čime smanjuju produkciju NGAL-a i poboljšavaju reapsorpciju. (89)

Nov porast vrednosti NGAL-a tokom remisije nefrotskog sindroma, može ukazivati na razvoj relapsa glomerulonefritisa. Promena nivoa NGAL-a prethodi pogoršanju proteinurije i progresije bubrežne insuficijencije. (37) Ovo je potvrđeno i kod dece sa steroid senzitivnim nefrotskim sindromom. (99)

1.4.7. LIPOKALIN 2 I DRUGE BUBREŽNE BOLESTI

Osim već pomenutih bubrežnih bolesti, povišene vrednosti NGAL-a su primećene i u drugim oboljenjima bubrega, kao i bolestima i stanjima koje primarno nisu vezane za bubreg, ali dovode do bubrežnog oštećenja.

Urinarne i serumske vrednosti NGAL-a su povišene kod autozomno dominantne policistične bolesti bubrega. (24,34,37,42,43,48,52,58,65) Njihove vrednosti dobro korelišu sa rezidualnom bubrežnom funkcijom i vrednostima kreatinina. (43) NGAL je posebno povišen kod bolesnika sa brзом progresijom bubrežne insuficijencije, najverovatnije zbog direktnog uticaja na njen razvoj. (34,42) Nezavisno od rezidualne bubrežne funkcije, bolesnici sa većim brojem bubrežnih cista i većim bubrežnim dijametrom, imaju veći nivo NGAL-a. (58) Ovo se objašnjava ulogom NGAL-a u razvoju bubrežnih cista. (37) Tokom organogeneze bubrega, NGAL utiče na organizaciju epitelnih ćelija u tubularne strukture. Inhibicija dejstva NGAL-a dovodi do formiranja cističnih formacija, umesto pravilno raspoređenih tubula. (28) Zbog ovoga se smatra da NGAL ima uticaj na određene patofiziološke procese tokom progresije policistične bolesti bubrega. (58)

Već je ranije pomenuto da je NGAL prediktor insulinske rezistencije i razvoja hiperglikemije. (24) Vrednosti su povišene kod gojaznih bolesnika i postojanja hiperinsulinemije i insulinske rezistencije. U masnom tkivu, insulin dovodi po povećanje produkcije NGAL-a od strane adipocita. (81) Ovaj efekat insulina je doznо zavistan. Sa druge strane, NGAL stimuliše razvoj insulinske rezistencije u adipocitima i hepatocitima. (81) Ovaj efekat NGAL-a je značajan u razvoju dijabetes melitusa. Povišene vrednosti serumskog i urinarnog NGAL-a su dokazane kod bolesnika sa dijabetesnom nefropatijom u okviru tipa 2 dijabetes melitusa. (24,37,42,52,81,87,89) Porast NGAL-a je primećen i pre razvoja mikroalbuminurije. (80) Smatra se da povišene vrednosti uNGAL-a tokom šećerne bolesti nisu posledica povećane sinteze u bubrezima, već poremećaja reapsorpcije na nivou tubula. Dokazane su i povišene vrednosti NGAL-a u tipu 1 dijabetes melitusa, već u ranim fazama bolesti. (52)

Vrednosti serumskog i urinarnog NGAL-a su povišene, prvog dana nakon transplantacije bubrega, kod bolesnika kod kojih se kasnije javlja odložena funkcija alografta. (24,58,65,114) Smatra se da može biti dobar marker razvoja akutnog odbacivanja bubrega. (24,58,65,114) Urinarne vrednosti NGAL-a nakon transplantacije bubrega, mogu predvideti potrebu za dijaliznim procedurama u daljem toku lečenja. (24,58,65,114)

Protokolarnе biopsije transplantata bubregu su pokazale da ekspresija NGAL-a u bioptatu koreliše sa vremenom hladne ishemije i najvišim postoperativnim vrednostima kreatinina. (58) Iako vrednosti NGAL-a dobro korelišu sa razvojem odložene funkcije grafta i akutnog odbacivanja transplantata, ima veoma malo podataka o ulozi NGAL-a u dijagnostici hroničnog odbacivanja transplantata.

Povišene vrednosti NGAL-a su primećene kod intersticijalnog nefritisa. (89) Ureteralna opstrukcija dovodi do porast NGAL-a usled povećane sinteze u ascedentnom kraku Henlejeve petlje. (89)

Kod dece sa hemolizno–uremijskim sindromom (HUS), dolazi do porasta uNGAL-a. (37,48,58,103,114) Pozitivna i značajna korelacija NGAL-a i proteinurije je dokazana kod trudnih žena sa razvojem preeklampsije. (33) Takodje dolazi do porasta NGAL-a tokom nefropatije u okviru infekcije HIV virusom. (48,52)

Unutar dva časa nakon primene jodnih kontrastnih sredstava u radiologiji, dolazi do porasta urinarnog i serumskog NGAL-a, kod bolesnika kod kojih se razvija kontrastna nefropatija. (37,48,58,103,114) Bolesnici sa oštećenjem bubrežne funkcije, kao posledicom ciklosporinske nefrotoksičnosti, takodje imaju povišene vrednosti NGAL-a, posebno u urinu. (52,97)

Povećan serumski nivo NGAL-a je dokazan kod bolesnika sa dugotrajnom arterijskom hipertenzijom. (60,105) Vrednosti NGAL-a korelišu sa vrednostima sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska. (105) Do porasta najverovatnije dolazi kao rezultat ishemije bubrežnog tkiva i njegovog oštećenja. Primena blokatora angiotenzinskih receptora dovodi do smanjenja vrednosti uNGAL-a, najverovatnije svojim efektom na smanjenje proteinurije. (89)

NGAL se koristi kao marker razvoja akutne bubrežne lezije nakon kardiohirurških i drugih operacija, kao i nakon politrauma, posebno u jedinicama intenzivne nege. (37,48)

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Utvrditi nivo lipokalina 2 u serumu i urinu ispitanika sa dijagnozom primarnog glomerulonefritisa.
2. Analizirati povezanost između nivoa lipokalina 2 i patohistološkog oblika primarnog glomerulonefritisa.
3. Analizirati povezanost između nivoa lipokalina 2 i stepena bubrežne insuficijencije pri postavljanju dijagnoze.
4. Analizirati povezanost nivoa lipokalina 2 sa brzinom progresije bubrežne insuficijencije kod ispitanika sa primarnim glomerulonefritisom.
5. Analizirati povezanost nivoa lipokalina 2 sa odgovorom na terapiju primenjenu u lečenju primarnog glomerulonefritisa.

3. RADNE HIPOTEZE

1. Serumski i urinarni nivo lipokalina 2 su povišeni kod bolesnika sa dijagnozom primarnog glomerulonefritisa.
2. Bolesnici sa proliferativnim oblicima primarnih glomerulonefritisa imaju značajno veći nivo serumskog i urinarnog lipokalina 2, pri postavljanju dijagnoze u odnosu na bolesnike sa neproliferativnim oblicima primarnih glomerulonefritisa.
3. Kod bolesnika sa dijagnozom primarnog glomerulonefritisa, bolesnici sa oštećenjem bubrežne funkcije imaju značajno veći serumski i urinarni nivo lipokalina 2, u odnosu na bolesnike bez oštećenja bubrežne funkcije.
4. Bolesnici sa dijagnozom primarnih glomerulonefritisa i progresivnim oštećenjem bubrežne funkcije imaju značajno veći serumski i urinarni nivo lipokalina 2, u odnosu na bolesnike bez oštećenja bubrežne funkcije, odnosno bolesnike bez progresije bubrežnog oštećenja, tokom perioda praćenja.
5. Bolesnici sa dijagnozom primarnih glomerulonefritisa, kod kojih, nakon perioda praćenja, nije primećen željeni odgovor na primenjenu terapiju glomerulonefritisa, imaju pri postavljanju dijagnoze veće vrednosti serumskog i urinarnog lipokalina 2, u odnosu na bolesnike sa adekvatnim odgovorom na primenjenu terapiju.

4. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA

Istraživanje je sprovedeno kao prospektivna, opservacijska studija na grupi od 60 ispitanika sa dijagnozom primarnog glomerulonefritisa. Ispitanici su lečeni na Klinici za nefrologiju i kliničku imunologiju, Kliničkog centra Vojvodine u Novom Sadu, u periodu od 01.01.2012. - 01.02.2016. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog odbora Kliničkog centra Vojvodine Novi Sad i Etičkog odbora Medicinskog fakulteta u Novom Sadu. Uključeni su samo ispitanici sa dijagnozom primarnog glomerulonefritisa, kojima je u okviru rutinske dijagnostike uradjena perkutana biopsija bubrega pod kontrolom ultrazvuka. Ispitanici su praćeni od perkutane biopsije bubrega sa postavljanjem dijagnoze primarnog glomerulonefritisa, tokom sledećih 6 - 25 meseci.

Po dolasku na Kliniku za nefrologiju i kliničku imunologiju, a pre započinjanja samih analiza, ispitanici su dobili potpuno obaveštenje o svim aspektima navedenog kliničkog ispitivanja i njihove uloge u njemu, a potom su potpisali pristanak za učešće u istraživanju. (prilog 2. i prilog 3.)

Kriterijumi za uključivanje u ispitivanje

1. bolesnici sa dijagnozom primarnog glomerulonefritisa,
2. bolesnici bez oštećenja funkcije bubrega u okviru oboljenja druge etiologije (sekundarni glomerulonefritisi, dijabetes melitus, rekurentne infekcije, nasledne nefropatije i sl.),
3. bolesnici stariji od 18. godina,
4. bolesnici mlađi od 75. godina.

Kriterijumi za isključivanje iz ispitivanja

1. bolesnici sa dijagnozom sekundarnog glomerulonefritisa,
2. bolesnici sa oštećenjem funkcije bubrega koje je postojalo i pre pojave glomerulonefritisa i povezano je sa oboljenjem druge etiologije (hipertenzija, dijabetes, rekurentne infekcije, nasledne nefropatije i sl.),
3. bolesnici sa postojanjem infekcije mokraćnih puteva na početku ispitivanja,
4. bolesnici sa postojanjem septičnog stanja,
5. bolesnici sa značajnim oštećenjem jetrene funkcije, u okviru kojeg se javlja poremećaj sintetske funkcije jetre,
6. bolesnici sa postojanjem značajne srčane inusuficijencije,
7. bolesnici sa postojanjem maligniteta,
8. bolesnice koje su trudne ili u periodu laktacije.

Nakon uzimanja anamnestičkih podataka, svim bolesnicima su uradjena imunološka ispitivanja radi isključivanja sekundarnog glomerulonefritisa u okviru sistemskog eritemskog lupusa i vaskulitisa. Uradjen je pregled očnog dna radi utvrđivanja postojanja dijabetesne i hipertenzivne retinopatije, kako u istraživanje ne bi bili uključeni bolesnici sa postojanjem dijabetes melitusa i višegodišnje arterijske hipertenzije sa uznapredovalim sklerotičnim promenama. Dijabetes je isključen i na osnovu nalaza šećera

u krvi. Ultrasonografskim pregledom bubrega je isključeno postojanje značajnog smanjenja veličine bubrega pri postavljanju dijagnoze, kao i patomorfološkog poremećaja na bubrezima, koji bi mogao imati uticaja na bubrežnu funkciju, a obuhvata postojanje multiplih cista bubrega, opstrukcije sa hidronefrozom, tumorskog procesa na bubrezima ili značajnih malformacija urinarnog sistema. Mikrobiološkim pregledom urina je isključeno postojanje urinarne infekcije.

Ispitivanje je sprovedeno u dve tačke preseka, u kojima je uradjen klinički pregled ispitanika i uzeti krv i urin za laboratorijska ispitivanja:

- tačka 1: pri postavljanju dijagnoze primarnog glomerulonefritisa i
- tačka 2: 6 – 25 meseci nakon postavljanja dijagnoze primarnog glomerulonefritisa.

Tokom studije su praćene sledeće laboratorijske analize:

1. parametri bubrežne funkcije:
 - vrednost ureje,
 - vrednost serumskog kreatinina,
 - vrednost mokraćne kiseline,
 - klirens kreatinina:
 - a) odredjen prema koncentraciji kreatinina u 24-časovnom urinu,
 - b) odredjen Modification of diet in renal disease group (MDRD) formuli,
2. vrednost 24 - časovne proteinurija,
3. pregled urina, radi odredjivanja postojanja hematurije,
4. vrednost kreatinina u urinu, radi odredjivanja odnosa NGAL u urinu/kreatinin u urinu (uNGAL/kreatinin),
5. urinokultura, radi isključivanja postojanja urinarne infekcije,
6. parametri inflamacije:
 - sedimentacija eritrocita,
 - C reaktivni protein,
 - fibrinogen,
7. vrednost serumskih albumina,
8. iz kompletne krvne slike su uzimani podaci o :
 - broju leukocita,
 - vrednosti hematokrita,
9. vrednosti feremije, serumskog transferina i feritina,
10. vrednost šećera u serumu, radi isključivanja postojanja dijabetes melitusa.

U cilju odredjivanja koncentracije NGAL-a u serumu i urinu, uzeti su uzorci krvi i urina pri postavljanju dijagnoze primarnih glomerulonefritisa i u tački 2, nakon 6 - 25 meseci praćenja. Svi uzorci su centrifugirani, a potom zamrzavani i čuvani na temperaturi od -80°C, do trenutka analiziranja. Koncentracija NGAL-a (lipokalina 2) u serumu i urinu ispitanika je odredjivana kvantitativnom sendvič ELISA tehnikom u Imunološkoj laboratoriji Klinike za nefrologiju i kliničku imunologiju, Kliničkog centra Vojvodine u Novom Sadu. Metoda spada u klasične sendvič ELISA metode, gde su mikroploče

obeležene monoklonskim antitelima specifičnim za humani NGAL, na koje se dodaje serum ili urin ispitanika. Sav NGAL prisutan u uzorku se vezuje za antitela. Nakon ispiranja svih nevezanih materija, dodaje se enzim-vezano monoklonalno antitelo specifično za humani NGAL, koje se vezuje za prisutni NGAL. Potom se ispere višak enzim-vezanih antitela i dodaje se reastvor supstrata, nakon čega dolazi do promene boje. Meri se intenzitet razvijene prebojenosti, koji zavisi od koncentracije NGAL-a u ispitivanom biološkom materijalu. Rezultat se izražava kvantitativno, prema linearnoj regresivnoj krivi, koja se formira prema standardima datim od strane proizvođača. U našem ispitivanju je korišćena originalna ELISA mikroploča, sa inkorporiranim monoklonskim antitelima na lipokalin 2 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA), a rezultati su očitavani MULTISCANE MCC 340 ELISA čitačem. Uzorci seruma su dilutirani u odnosu 1:20. Uzorci urina nisu dilutirani. Očitavanje je izvršeno na talasnoj dužini od 450 nm, dok je koncentracija NGAL-a u serumu dobijena očitavanjem iz kalibracione krive i množenjem sa faktorom 20. Koncentracija NGAL-a u urinu je dobijena očitavanjem iz kalibracione krive. Proizvođač nije preporučio cut-off vrednosti serumskog i urinarnog NGAL-a. Vrednosti su izražene u ng/ml. Sa dobijenim vrednostima nivoa NGAL-a u urinu i vrednošću kreatinina u urinu je potom izračunat odnos uNGAL/kreatinin, prema formuli:

$$\text{uNGAL/kreatinin} = \frac{\text{NGAL u urinu}}{\text{kreatinin u urinu}}$$

Vrednost NGAL-a u urinu korigovana prema vrednosti kreatinina u urinu se smatra senzitivnijim pokazateljem nivoa NGAL-a u urinu, obzirom da se na ovaj način smanjuje uticaj insuficijencije bubrega na njegov nivo. Vrednost odnosa uNGAL/kreatinin je izražena u jedinicama ng/mg.

Dijagnoza primarnog glomerulonefritisa je postavljena na osnovu kliničke slike, laboratorijskih analiza i nalaza perkutane biopsije bubrega pod kontrolom ultrazvuka, a po isključenju svih bolesti ili stanja u kojima se taj vid glomerulonefritisa može javiti u sekundarnom obliku. Dijagnoza određenih oblika glomerulonefritisa je postavljena na osnovu nalaza karakterističnih lezija na bioptatu bubrega. Perkutana biopsija bubrega je radjena u lokalnoj anesteziji, pod kontrolom ultrazvuka, TRU-CUT iglom. Dobijeni bubrežni parenhim je podeljen u dva dela. Prvi deo bioptata je fiksiran u 70% alkoholu, potom kalupljen u parafinu. Parafinski kalupi su sečeni na mikrotomu (debljina rezova 5 µm) i bojeni standardnim metodama (hemoxilin eosin, PAS i Gomory), a potom pregledani svetlosnim mikroskopom. Drugi deo dobijenog biopsijskog materijala je zamrzavan na -20°C, a potom isečen na mikrotomu (debljina rezova 4-6 µm), a rezovi su fiksirani na sobnoj temperaturi u trajanju od 15 minuta. Materijal je potom tretiran FITC konjugovanim antiserumima (antihumana antitela konjugovana fluoresceinom) i analiziran na imunofluorescentnom mikroskopu.

Na osnovu patohistološkog i imunofluorescentnog nalaza bioptata bubrega, određen je tip glomerulonefritisa, a bolesnici su svrstani u jednu od sledećih grupa:

- membranoproliferativni glomerulonefritis,

- mezangioproliferativni glomerulonefritis,
- membranska nefropatija,
- fokalnosegmentna skleroza i hijalinoza,
- glomerulonefritis minimalnih promena,
- krescentni (rapidoprogresivni) glomerulonefritis i
- hronični (neklasifikovani) glomerulonefritis.

U grupu hroničnih glomerulonefritisa su svrstani ispitanici kod kojih su, pregledima bioptata bubrega, verifikovane uznapredovale, hronične, nespecifične histološke promene, te određivanje tipa glomerulonefritisa nije bilo moguće.

Na osnovu histološkog nalaza je semikvantitativno određen stepen tubulske atrofije i intersticijalne fibroze. Za oba kriterijuma je korišćena ista gradacija: 1. bez postojanja promena, 2. blage promene, 3. umerene promene i 4. intenzivne promene.

Određivanje stepena uhranjenosti ispitanika je vršeno merenjem telesne mase ispitanika, izračunavanjem Indeksa telesne mase – BMI (Body mass index) na osnovu telesne visine i telesne mase ispitanika i određivanjem masne mase u telesnoj kompoziciji metodom električne bioimpedance – BIA.

Indeks telesne mase BMI je računat prema formuli:

$$\text{BMI} = \frac{\text{telesna masa}}{(\text{telesna visina})^2}$$

Vrednost indeksa telesne mase BMI je izražena u jedinicama kg/m^2 .

Određivanje učešća masne mase u telesnoj kompoziciji je radjeno metodom električne bioimpedance – BIA. BIA je brza, neinvazivna, bezbolna i relativno jeftina metoda procene telesnog sastava. Električna struja male jačine (oko 50 kHz, 500 mA), se propušta kroz telo ispitanika, a BIA analizatorom se meri otpor tkiva toku struje kroz njega (bioimpedanca). Tečnost u mišićima i drugim telesnim tkivima lako provodi električnu struju, dok masno tkivo pravi otpor protoku električne struje. Bezmasno tkivo ima veću količinu vode i elektrolita u odnosu na masno tkivo, te ono pravi mali otpor i ima veliku provodljivost, a masno tkivo pravi veliki otpor i ima malu provodljivost električne struje. Što je otpor, odnosno impedanca veća, veća je i količina masnog tkiva.

Merenje telesne kompozicije je radjeno na aparatima TANITA Japan, tip BC 418 MA i TANITA Japan, tip TBF 105.

Određivani su procenat masne mase, masna masa u kilogramima i ukupna telesna voda (TBW Total body water).

Merenja su kod svih ispitanika radjena tokom prepodneva.

Za određivanje zasićenosti organizma gvoždjem su korišćene vrednosti feremije, koncentracije feritina, transferina i hemoglobina, koje su merene iz krvi, kao i saturacija transferina, koja je računata prema formuli:

$$\text{Saturacija transferina (\%)} = \frac{\text{serumsko gvoždje } \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{l}}\right) \times 3,982}{\text{serumski transferin (g/l)}}$$

Za normalne vrednosti saturacije transferina je uzeto 20 – 50% za muškarce i 15 – 50% za žene.

Korišćeni su podaci iz istorija bolesti i polikliničkih kartona obolelih, Klinike za nefrologiju i kliničku imunologiju, Kliničkog centra Vojvodine - Novi Sad. U prikupljanju podataka je korišćen originalni upitnik (prilog 4.).

Vrednosti lipokalina 2 i nabrojanih laboratorijskih parametara su određivane pri postavljanju dijagnoze primarnog glomerulonefritisa i 6 – 25 meseci nakon postavljanja dijagnoze oboljenja. Prema odgovoru na primenjenu terapiju, ispitanici su podeljeni na one koji su razvili kompletnu remisiju, koji su razvili parcijalnu remisiju, one koji nisu imali adekvatan odgovor na primenjenu terapiju, ispitanike koji su razvili terminalni stadijum bubrežne insuficijencije i one koji su preminuli tokom perioda praćenja.

Kompletna remisija primarnog glomerulonefritisa je definisana kao:

1. odsustvo kliničkih znakova aktivnosti oboljenja, povlačenje nefrotskog sindroma,
2. proteinurija manje od 500mg/dU,
3. normalan urinarni sediment (manje od 10 dismorfičnih eritrocita po vidnom polju, odsustvo čelijskih cilindara),
4. normalizacija bubrežne funkcije, kreatinina i klirensa kreatinina u okviru 10-15% od normale ili kreatinin manji od 130% od najmanjeg kreatinina od početka,
5. da gore navedeni uslovi budu ispunjeni tokom minimalno 3 meseca.

Parcijalna remisija primarnog glomerulonefritisa je definisana kao:

1. poboljšanje i smanjenje aktivnosti oboljenja za najmanje 50% u laboratorijskim parametrima, poboljšanje znakova nefrotskog sindroma u smislu smanjenja edema, pleuralnih efuzija i ascitesa,
2. smanjenje proteinurije za 50% od početne vrednosti (za nefrotsku proteinuriju smanjenje za preko 50% tako da vrednost bude manja od 3g/dU, za nenefrotsku proteinuriju smanjenje za 50%), s tim da vrednosti dnevne proteinurije iznose preko 500mg/dU,
3. stabilizacija bubrežne funkcije na nivou koji ne zahteva dijalizu,
4. da gore navedeni uslovi budu ispunjeni tokom minimalno 3 meseca.

Nereagovanje na primenjenu terapiju primarnog glomerulonefritisa je definisano kao prisustvo aktivne bolesti bubrega, pored optimalne doze lekova, tokom minimalno 5 meseci. Podrazumeva sledeće:

1. vrednosti 24h proteinurije preko 3,0g/dU, sa perzistiranjem kliničkih znakova nefrotskog sindroma,

2. pogoršanje bubrežne funkcije ili perzistiranje ozbiljnog oštećenja bubrežne funkcije (III-V stadijum bubrežne insuficijencije).

4.1. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Prikupljeni podaci su kodirani i uneti u bazu podataka u Excel-u, posebno kreiranu za potrebe istraživanja. Prilikom statističke obrade podataka, računate su deskriptivne statistike: prosečna vrednost, medijana, standardna devijacija, minimum, maksimum, frekvencije i procenti. Podaci su predstavljeni pomoću tabela, a grafički pomoću stubičastih dijagrama, boks dijagrama i dijagrama rasipanja. Normalnost raspodele promenljivih je ispitivana Kolmogorov-Smirnov testom. U statističkoj analizi korišćeni su hi-kvadrat test, Men Vitnjev test, Kruskal Valisov test i testovi višestrukog poređenja. Povezanost između vrednosti pojedinih varijabli proveravane su Pirsonovim koeficijentima korelacije. Za ispitivanje povezanosti više različitih varijabli korišćena je analiza višestruke regresije.

Za testiranje hipoteza je korišćena kritična vrednost p kao rizik zaključivanja prema sledećim vrednostima:

- $p > 0,100$ – nema značajne razlike testiranih varijabli,
- $0,100 > p > 0,050$ – postoji razlika između testiranih varijabli, ali je povećan rizik zaključivanja i
- $p < 0,050$ – postoji statistički značajna razlika između posmatranih varijabli.

Za statističku obradu podataka su korišćeni Microsoft Excel 2007 i statistički paket Statistica 13 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA), za koji postoji univerzitetska licenca za Univerzitet u Novom Sadu.

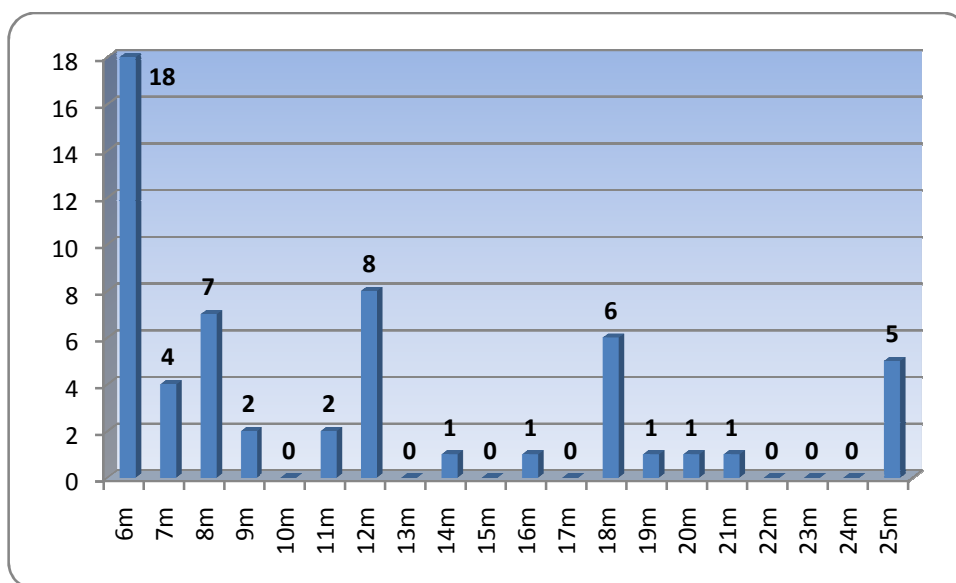
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

Ispitivanjem je obuhvaćeno 60 ispitanika sa dijagnozom primarnog glomerulonefritisa, koji su lečeni na Klinici za nefrologiju i kliničku imunologiju Kliničkog centra Vojvodine u Novom Sadu, u periodu od januara 2012. godine do februara 2016. godine. Svim ispitanicima je, u okviru rutinske dijagnostike bubrežnog oboljenja, uradjena perkutana biopsija bubrega, pod kontrolom ultrazvuka.

Kliničko-laboratorijske analize, uključujući i nivo lipokalina 2 u urinu i serumu, su kod ispitanika određivane u dve tačke:

- tačka 1 - pri postavljanja dijagnoze primarnog glomerulonefritisa, odnosno na početku ispitivanja i
- tačka 2 - nakon 6 - 25 meseci od postavljanja dijagnoze primarnog glomerulonefritisa i započinjanja lečenja oboljenja.

Kod najvećeg broja ispitanika je kontrolni pregled uradjen 6 meseci nakon postavljanja dijagnoze (n = 18; 31,58%). Broj ispitanika u ovoj grupi se statistički značajno razlikuje od ostalih grupa ispitanika. (p = 0,005) Prosečno vreme proteklo od postavljanja dijagnoze primarnog glomerulonefritisa do kontrolnog pregleda je 11,42 meseca (medijana 15,5 meseci).



Grafikon 1. Kontrolni pregled ispitanika (tačka 2)

U tački 1 su kliničko-laboratorijska ispitivanja, koja su praćena u okviru studije, radjena na 100% uključenih ispitanika (n = 60).

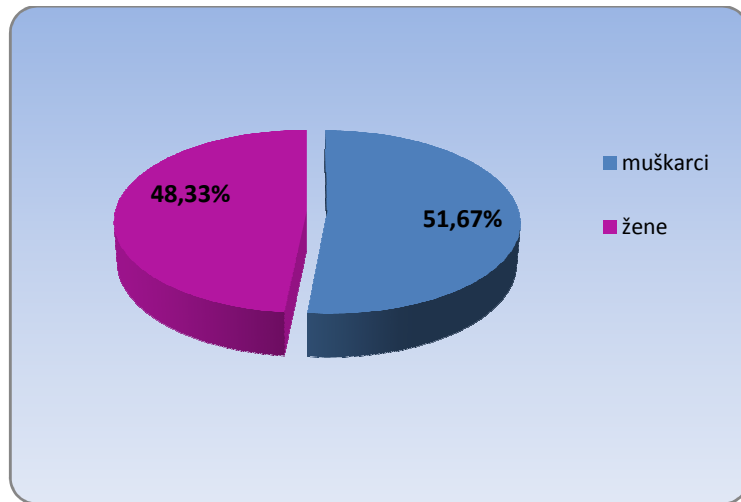
U tački 2 su kliničko-laboratorijska ispitivanja, praćena tokom studije, radjena na 95% ispitanika (n = 57). U periodu kraćem od šest meseci, koliko je u studiji iznosilo najkraće vreme do kontrolne tačke 2, preminulo je 3,33% ispitanika (n = 2), dok 1,67% ispitanika (n = 1) razvilo terminalni stadijum bubrežne insuficijencije sa započinjanjem hroničnog hemodijaliznog programa. Kao što je već navedeno terminalni stadijum

bubrežne insuficijencije, kao i sama dijalizna procedura značajno utiču na očitavanja NGAL-a.

5.1. DEMOGRAFSKE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA

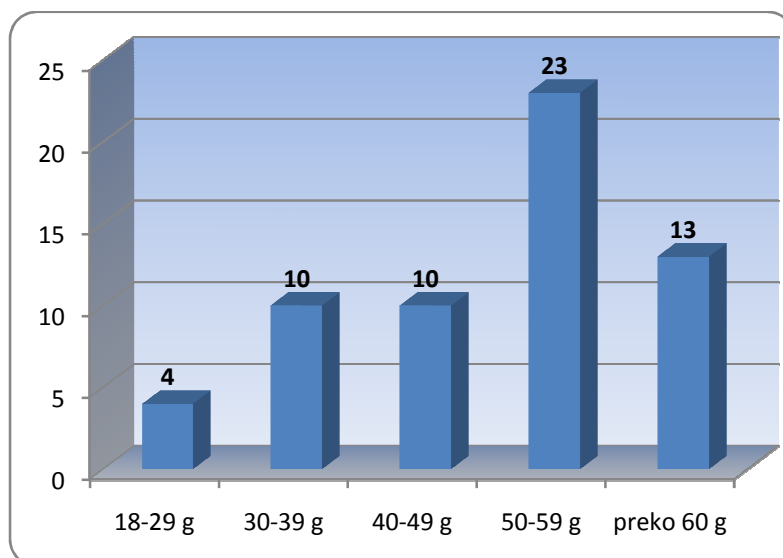
5.1.1. POLNA STRUKTURA ISPITANIKA

Od ukupno 60 ispitanika (100%), muškarci predstavljaju 51,67% ispitanika (n = 31), a žene 48,33% ispitanika (n = 29). Nema statistički značajne razlike između broja muškaraca i žena uključenih u studiju, čime se po pitanju polne strukture, uzorak može smatrati homogenim. (p = 0,4)



Grafikon 2. Polna struktura ispitanika

5.1.2. STAROSNA STRUKTURA ISPITANIKA



Grafikon 3. Starosna struktura ispitanika

Prosečna starost ispitanika, pri postavljanju dijagnoze je 50,88 godina. Najmlađi ispitanik je na početku ispitivanja imao 21 godinu, a najstariji 75 godina.

Najveći broj ispitanika $n = 23$ (38,33%) se nalazio u starosnoj kategoriji od 50 - 59 godina, kao što je prikazano na grafikonu 3.

Nije primećena statistički značajna razlika u distribuciji ispitanika po starosnim grupama, te se uzorak može smatrati homogenim po pitanju starosti uključenih ispitanika. ($p = 0,920$)

5.2. VREDNOSTI NGAL-A U SERUMU I URINU ISPITANIKA

Lipokalin 2 (NGAL) je izmeren u serumu i urinu ispitanika uzetih u tački 1, prilikom postavljanja dijagnoze primarnog glomerulonefritisa i uzetih u tački 2, nakon minimalno 6 meseci lečenja. Na osnovu izmerenih vrednosti NGAL-a u urinu i vrednosti kreatinina u urinu je izračunat odnos NGAL u urinu/kreatinin u urinu (uNGAL/kreatinin).

Vrednosti nivoa NGAL-a u serumu (sNGAL) i NGAL-a u urinu (uNGAL) su iskazane u ng/ml, a odnosa uNGAL/kreatininu (uNGAL/kr) u ng NGAL-a / mg kreatinina u urinu (ng/mg).

Tabela 2. Prosečni nivoi NGAL-a u serumu, NGAL-a u urinu i odnosa uNGAL/uKreatinin

Varijabla		N	Mean	Minimum	Maximum	Std.Dev.
NGAL u serumu (ng/ml)	tačka 1	60	166,8370	40,26000	349,7400	72,63827
	tačka 2	57	178,9232	39,58000	293,0800	68,91072
NGAL u urinu (ng/ml)	tačka 1	60	13,5244	2,44200	45,9800	5,32913
	tačka 2	57	10,9689	0,90800	14,9680	3,88854
uNGAL/kreatinin (ng/mg)	tačka 1	60	20,3246	1,43900	49,8580	12,35233
	tačka 2	57	19,0884	2,11200	56,8240	13,2548

Obzirom da za sada još uvek nema jasnih preporuka o referentnim vrednosima nivoa NGAL-a, nivoi NGAL-a u serumu i NGAL-a u urinu naših ispitanika su upoređeni sa podacima objavljenim u drugim studijama.

Kao referentne vrednosti NGAL-a u serumu, korišćeni su objavljeni podaci o nivoima NGAL-a u serumu dobijeni kod zdravih kontrola u drugim studijama. (vidi tabela 36.) Uzeti su podaci iz 16 studija, u kojima su se nivoi NGAL-a u serumu zdravih osoba kretali od 7,8–102 ng/ml (srednja vrednost 46,372 ng/ml, Std.Dev. 30,7315). Kruskal-Wallis-ovim testom je utvrđeno da su nivoi NGAL-a u serumu dobijeni kod naših ispitanika značajno veći u odnosu na nivoe NGAL-a u serumu koje su drugi ispitivači dobili kod svojih zdravih kontrola. Sa objavljenim podacima iz drugih studija su poredjeni nivoi NGAL-a u serumu dobijeni kod naših ispitanika pri postavljanju dijagnoze, $n = 60$ ($p = 0,000$), nivoi dobijeni nakon minimalno 6 meseci lečenja, $n = 57$ ($p = 0,000$), kao i zbirno uzeti podaci iz oba merenja $n = 117$ ($p = 0,000$) i u sva tri slučaja postoji statistički značajna razlika u nivoima NGAL-a u serumu.

Za referentne vrednosti NGAL-a u urinu su korišćeni objavljeni podaci o nivoima NGAL-a u urinu dobijeni kod zdravih kontrola u drugim studijama. (vidi tabela 37.) Uzeti su podaci iz 12 studija, u kojima su se nivoi NGAL u urinu zdravih kontrola kretale od

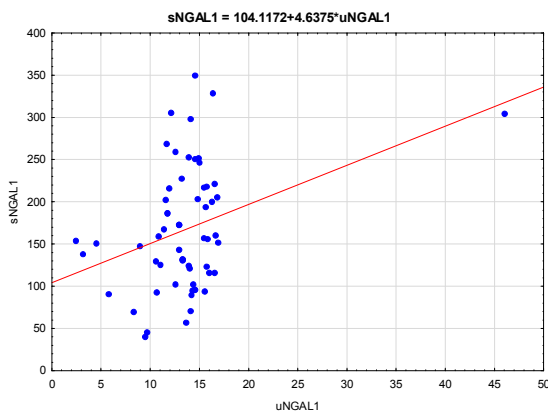
0,34 - 20,41 ng/ml (srednja vrednost 8,922 ng/ml, Std.Dev. 7,082). Kruskal-Wallis-ovim testom je utvrđeno da su nivoi NGAL-a u urinu naših ispitanika, pri postavljanju dijagnoze $n = 60$, značajno veći u odnosu na nivoe NGAL-a u urinu koje su drugi ispitivači dobili kod svojih zdravih kontrola. ($p = 0,018$) Ako posmatramo zbirno, nivoe dobijene u oba merenja NGAL-a u urinu $n = 117$, takodje su nivoi značajno veći u odnosu na objavljene podatke. ($p = 0,039$) Nivoi NGAL-a u urinu naših ispitanika dobijeni nakon minimalno šest meseci praćenja i lečenja $n = 57$, se ne razlikuju značajno u odnosu na podatke o nivoima NGAL-a u urinu zdravih osoba, objavljenih od strane drugih istraživača. ($p = 0,122$)

Dobijene vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin nisu mogle biti upoređene sa ranije objavljenim podacima, obzirom da većina istraživača navedeni odnos nije računala za zdrave osobe, ili ih samo nije objavila u svojim ispitivanjima.

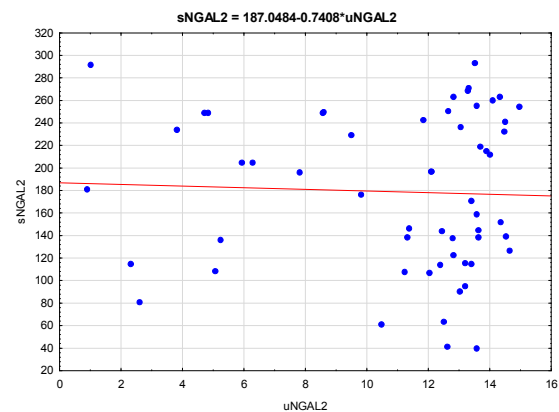
Odredjivanjem koeficijenta korelacije je uradjeno ispitivanje postojanja povezanosti izmedju nivoa NGAL-a u serumu i nivoa NGAL-a u urinu. Utvrđeno je postojanje linearne korelacije izmedju nivoa NGAL-a u serumu i NGAL-a u urinu u tački 1, što je prikazano grafikonom 4. ($p = 0,008$)

Na statističku značajnost korelacije u ovom slučaju utiče jedno očitavanje NGAL-a u urinu (45,98ng/ml) koje se značajno razlikuje od ostalih. Ako se to očitavanje isključi, gubi se statistički značajna korelacija.

Odredjivanjem koeficijenta korelacije nije utvrđeno postojanje korelacije izmedju nivoa NGAL-a u serumu i nivoa NGAL-a u urinu, u tački 2, što je prikazano na grafikonu 5. ($p = 0,757$)

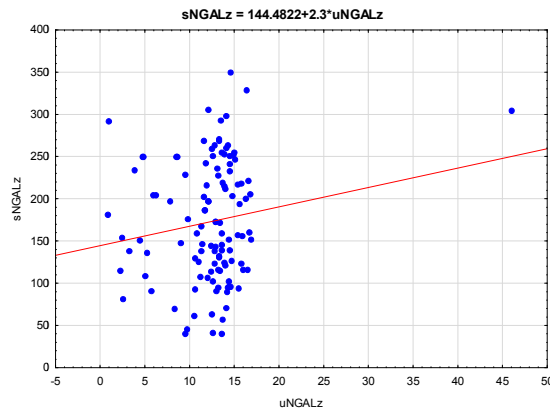


Grafikon 4. Korelacija sNGAL i uNGAL u tački 1



Grafikon 5. Korelacija sNGAL i uNGAL u tački 2

Ako se koeficijent korelacije odredi za nivoe serumskog i urinarnog NGAL-a posmatrano zbirno u tačkama 1 i 2 ($n = 117$), ne verifikuje se postojanje korelacije izmedju zbirnog nivoa NGAL-a u serumu (sNGALz) i zbirnog nivoa NGAL-a u urinu (uNGALz), što je prikazano na grafikonu 6. ($p = 0,091$)

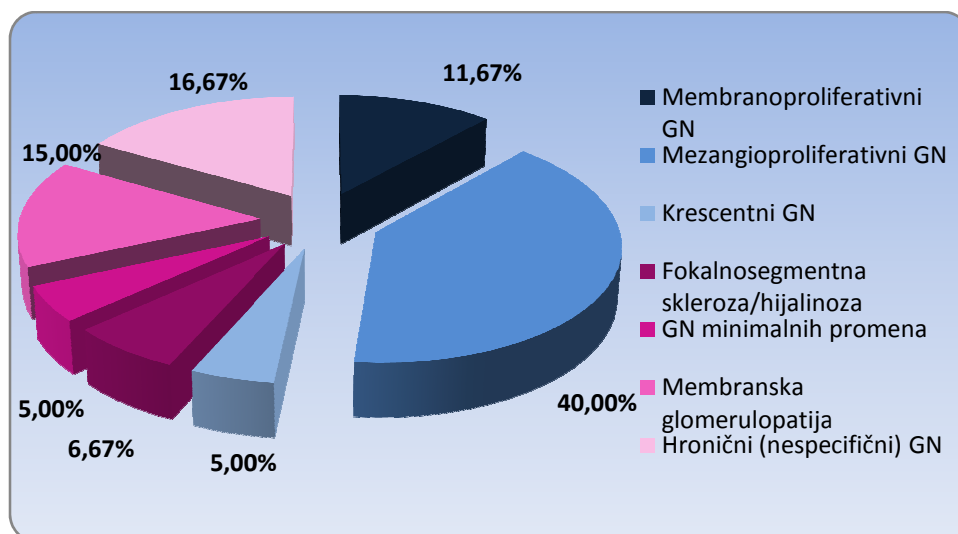


Grafikon 6. Korelacija sNGAL i uNGAL zbirno u tačkama 1 i 2

5.3. NIVO NGAL-A I PATOHISTOLOŠKI TIP GLOMERULONEFRITISA

Na osnovu kliničke slike ispitanika, laboratorijskih analiza i imunofluorescentnog i patohistološkog nalaza bioptata bubrega je postavljena dijagnoza određenog tipa glomerulonefritisa:

- proliferativni glomerulonefritisi (n = 34; 56,67%):
 - * membranoproliferativni glomerulonefritis – MP GN (n = 7; 11,67%)
 - * mezangioproliferativni glomerulonefritis – MZGP GN (n = 24; 40%)
 - * krescentni (rapidoprogresivni) glomerulonefritis – RP GN (n = 3; 5%)
- neproliferativni glomerulonefritisi (n = 26; 43,33%)
 - * fokalno-segmentalna skleroza i hijalinoza – FSSH (n = 4; 6,67%)
 - * glomerulonefritis minimalnih promena (*minimal change*) – MC GN (n = 3; 5%)
 - * membranska nefropatija - Memb GN (n = 9; 15%)
 - * hronični (nespecifični) glomerulonefritis - Chr GN (n = 10; 16,67%).



Grafikon 7. Dijagnoze primarnih glomerulonefritisa

U grupi ispitanika sa postavljenom dijagnozom proliferativnih glomerulonefritisa se nalazi veći procenat ispitanika 56,67% (n = 34), u odnosu na grupu ispitanika sa dijagnozom neproliferativnih glomerulonefritisa (43,33%), ali razlika nije dostigla statističku značajnost. (p = 0,464).

Posmatajući sve uključene ispitanike, upotrebom Pearson Chi-kvadrat testa se zaključuje da je najveći broj ispitanika sa dijagnozom mezangioproliferativnih glomerulonefritisa 40%, n = 24, što jeste statistički značajno. (p = 0,000)

U tabeli 3. su prikazane prosečne vrednosti NGAL-a u serumu, NGAL-a u urinu i odnosa uNGAL/kreatinin prema dijagnozama primarnih glomerulonefritisa u tački 1.

Tabela 3. Vrednosti NGAL-a u serumu i urinu i odnosa uNGAL/kreatinin prema dijagnozama primarnog glomerulonefritisa u tački 1

TIP GLOMERULONEFRITISA		tačka 1	NGAL (ng/ml); uNGAL/kreatinin (ng/mg)				
			N	Mean	Minimum	Maximum	Std.Dev.
PROLIFERATIVNI GN	membranoproliferativni GN	sNGAL	7	170,9686	94,44000	305,7400	77,33488
		uNGAL		13,4887	10,57800	16,9200	1,95534
		uNGAL/kr		31,3469	15,36900	49,85800	15,43676
	mezangioproliferativni GN	sNGAL	24	159,5000	40,26000	298,1600	69,16891
		uNGAL		12,9696	2,44200	16,8300	3,63157
		uNGAL/kr		16,83229	1,43900	40,97300	11,11423
	krescentni GN	sNGAL	3	293,8467	203,2800	349,7400	79,14741
		uNGAL		15,2447	14,5930	16,3520	0,96397
		uNGAL/kr		34,7500	20,35900	43,57800	12,56943
	UKUPNO	sNGAL	34	173,7153	40,26000	349,7400	79,13352
		uNGAL		13,2772	2,44200	16,9200	3,22079
		uNGAL/kr		21,4016	1,4390	49,8580	14,7553
NEPROLIFERATIVNI GN	FSSH	sNGAL	4	166,2525	138,1800	215,6000	35,27742
		uNGAL		9,8545	3,2090	12,9150	4,47644
		uNGAL/kr		24,9000	8,343	43,6770	19,10951
	GN minimalnih promena	sNGAL	3	156,8200	102,0600	221,3000	60,21132
		uNGAL		13,3033	8,9870	16,5480	3,89275
		uNGAL/kr		16,2070	7,6990	26,4820	9,51535
	membranska nefropatija	sNGAL	9	140,1733	90,12000	303,8400	69,45535
		uNGAL		16,4176	5,75200	45,9800	11,50228
		uNGAL/kr		19,5682	5,65000	40,6460	10,16736
	hronični GN	sNGAL	10	170,6870	56,48000	251,9200	71,97120
		uNGAL		13,2950	8,31200	16,2830	2,41422
		uNGAL/kr		16,7490	7,06800	22,1820	5,53526
	UKUPNO	sNGAL	26	157,8423	56,48000	303,8400	63,54242
		uNGAL		13,8475	3,20900	45,9800	7,28961
		uNGAL/kr		18,9163	5,6500	43,6770	10,1890

Metodom višestrukog poredjenja je utvrđeno da nema statistički značajne razlike u nivoima NGAL-a u serumu, između grupa ispitanika sa različitim dijagnozama primarnog glomerulonefritisa u tački 1. (p = 0,265) Posebna poredjenja Kruskal-Wallis testom grupa ispitanika sa različitim dijagnozama, prema vrednosti NGAL-a u serumu u tački 1 je iznešeno u tabeli 4.

Tabela 4. Ispitivanje značajnosti razlike u nivoima NGAL-a u serumu u tački 1, prema dijagnozama

p-vrednost sNGAL tačka 1	MP GN	MZGP GN	RP GN	FSSH	MC GN	Mem GN	Chr GN
MP GN	/	0,8130	0,0530	0,4500	0,9090	0,2230	1,000
MZGP GN	0,8130	/	0,0250	0,6940	0,8170	0,2930	0,6500
RP GN	0,0530	0,0250	/	0,0770	0,1270	0,0210	0,0430
FSSH	0,4500	0,6940	0,0770	/	1,000	0,2170	0,5720
MC GN	0,9090	0,8170	0,1270	1,000	/	0,4050	0,8660
Mem GN	0,2230	0,2930	0,0210	0,2170	0,4050	/	0,3690
Chr GN	1,000	0,6500	0,0430	0,5720	0,8660	0,3690	/

Kruskal-Wallis testom je utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u nivoma NGAL-a u serumu u tački 1 između grupe ispitanika sa rapidoprogresivnim glomerulonefritisom u odnosu na grupe ispitanika sa mezangioproliferativnim glomerulonefritisom, membranskom nefropatijom i hroničnim glomerulonefritisom. Razlika između grupa sa krescentnim glomerulonefritisom i membranoproliferativnim glomerulonefritisom se nalaze na samoj granici značajnosti.

Testiranjem nivoa NGAL u urinu po grupama ispitanika sa različitim dijagnozama primarnog glomerulonefritisa, metodom višestrukog poredjenja, takodje nije utvrđena statistički značajna razlika. (p = 0,414)

Kruskal-Wallis testom je utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u nivoma NGAL-a u urinu u tački 1 samo između grupe sa krescentnim glomerulonefritisom u odnosu na grupu sa fokalno segmentnom sklerozom/hijalinozom. Razlika između grupa sa krescentnim glomerulonefritisom i membranoproliferativnim glomerulonefritisom se nalaze na samoj granici značajnosti. Posebna poredjenja Kruskal-Wallis testom grupa ispitanika sa različitim dijagnozama, prema vrednosti NGAL-a u urinu u tački 1 je iznešena u tabeli 5.

Tabela 5. Ispitivanje značajnosti razlike u nivoima NGAL-a u urinu u tački 1, prema dijagnozama

p-vrednost uNGAL tačka 1	MP GN	MZGP GN	RP GN	FSSH	MC GN	Mem GN	Chr GN
MP GN	/	0,9620	0,0870	0,0590	0,7320	0,7110	0,9220
MZGP GN	0,9620	/	0,2170	0,1010	0,8770	0,9030	0,8500
RP GN	0,0870	0,2170	/	0,0340	0,5130	0,1660	0,2370
FSSH	0,0590	0,1010	0,0340	/	0,2890	0,0640	0,1200
MC GN	0,7320	0,8770	0,5130	0,2890	/	0,9260	0,7350
Mem GN	0,7110	0,9030	0,1660	0,0640	0,9260	/	0,9350
Chr GN	0,9220	0,8500	0,2370	0,1200	0,7350	0,9350	/

Testiranjem vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin po grupama ispitanika sa različitim dijagnozama primarnog glomerulonefritisa, metodom višestrukog poredjenja, nije utvrđena statistički značajna razlika. (p = 0,107)

Kruskal-Wallis testom je utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u vrednostima odnosa uNGAL/kreatinin u tački 1 između grupe ispitanika sa krescentnim

Rezultati istraživanja

glomerulonefritisom u odnosu na grupe sa mezangioproliferativnim i hroničnim glomerulonefritisom. Takođe je uočena statistički značajna razlika između grupe ispitanika sa membranoproliferativnim glomerulonefritisom u odnosu na grupe sa dijagnozom mezangioproliferativnog i hroničnog glomerulonefritisa.

Tabela 6. Ispitivanje značajnosti razlike u odnosima uNGAL/kreatinin u tački 1, prema dijagnozama

p-vrednost uNGAL/kr tačka 1	MP GN	MZGP GN	RP GN	FSSH	MC GN	Mem GN	Chr GN
MP GN	/	0,0110	0,9090	0,2570	0,1380	0,1860	0,0400
MZGP GN	0,0110	/	0,0370	0,4700	1,0000	0,3740	0,6500
RP GN	0,9090	0,0370	/	0,4800	0,1270	0,1160	0,0430
FSSH	0,2570	0,4700	0,4800	/	0,4800	0,8770	0,7770
MC GN	0,1380	1,0000	0,1270	0,4800	/	0,7820	1,0000
Mem GN	0,1860	0,3740	0,1160	0,8770	0,7820	/	0,6240
Chr GN	0,0400	0,6500	0,0430	0,7770	1,0000	0,6240	/

Ispitivanjem Mann-Whitney U testom nije utvrđena statistički značajna razlika između serumskog nivoa NGAL-a između grupa ispitanika sa dijagnozom proliferativnog i dijagnozom neproliferativnog glomerulonefritisa. ($p = 0,442$) Takođe nije primećena statistički značajna razlika između urinarnog nivoa NGAL-a između grupa ispitanika sa dijagnozom proliferativnog i dijagnozom neproliferativnog glomerulonefritisa. ($p = 0,451$) Nema statistički značajne razlike u vrednostima odnosa uNGAL/kreatinin između grupa ispitanika sa dijagnozom proliferativnog glomerulonefritisa i grupe ispitanika sa dijagnozom neproliferativnog glomerulonefritisa. ($p = 0,687$)

Potom su ispitanici podeljeni u grupe prema izmerenom nivou NGAL-a u serumu i urinu u tački 1, a potom je posmatrano prisustvo određenih dijagnoza u pomenutim grupama.

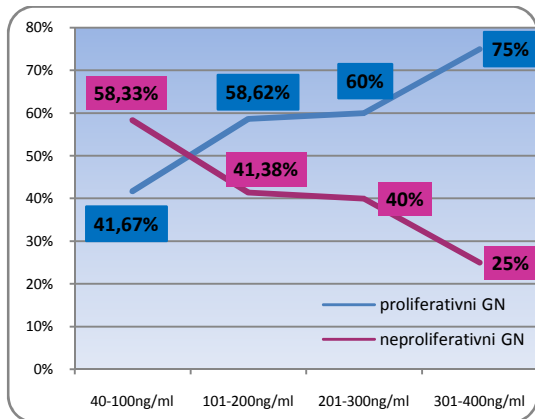
Na osnovu nivoa NGAL-a u serumu u tački 1, ispitanici su podeljeni u četiri grupe:

- I grupa – nivo NGAL-a u serumu 40 - 100 ng/ml,
- II grupa – nivo NGAL-a u serumu 101 - 200 ng/ml,
- III grupa – nivo NGAL-a u serumu 201 - 300 ng/ml i
- IV grupa – nivo NGAL-a u serumu 301 - 400 ng/ml.

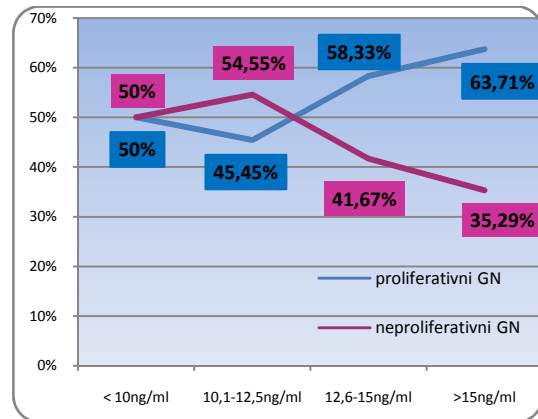
Tabela 7. Vrednosti serumskog NGAL-a u odnosu na tip glomerulonefritisa u tački 1

sNGAL tačka 1	Proliferativni			Neproliferativni				Ukupno
	MP GN	MZGP GN	RP GN	FSSH	MC GN	Mem GN	Chr GN	
40-100 ng/ml	1	4	0	0	0	4	3	12 (100%)
	5 (41,67%)			7 (58,33%)				
101-200 ng/ml	4	13	0	3	2	4	3	29 (100%)
	17 (58,62%)			12 (41,38%)				
201-300 ng/ml	1	7	1	1	1	0	4	15 (100%)
	9 (60%)			6 (40%)				
301-400 ng/ml	1	0	2	0	0	1	0	4 (100%)
	3 (75%)			1 (25%)				

Rezultati istraživanja



Grafikon 8. Zastupljenost oblika GN prema nivou NGAL-a u serumu u tački 1



Grafikon 9. Zastupljenost oblika GN prema nivou NGAL-a u urinu u tački 1

Upotrebom Pearson Chi-kvadrat testa je utvrđeno da postoje statistički značajne razlike u distribuciji tipova glomerulonefritisa prema različitim nivoima NGAL-a u serumu u tački 1. ($p = 0,020$) Ali, posmatranjem odnosa grupa proliferativnih i neproliferativnih glomerulonefritisa sa određenim nivoima NGAL-a u serumu u tački 1, nije utvrđena statistički značajna razlika. ($p = 0,624$) Ipak, može se zapaziti da zastupljenost ispitanika sa proliferativnim oblicima glomerulonefritisa raste, a ispitanika sa neproliferativnim oblicima glomerulonefritisa opada, sa porastom vrednosti NGAL-a u serumu u tački 1.

Na osnovu nivoa NGAL-a u urinu u tački 1, ispitanici su podeljeni u četiri grupe:

- I grupa – nivo NGAL-a u urinu manji od 10 ng/ml,
- II grupa – nivo NGAL-a u urinu 10,1 - 12,5 ng/ml,
- III grupa – nivo NGAL-a u urinu 12,6 - 15 ng/ml i
- IV grupa – nivo NGAL-a u urinu preko 15 ng/ml.

Tabela 8. Nivoi urinarnog NGAL-a u odnosu na tip glomerulonefritisa

uNGAL tačka 1	Proliferativni			Neproliferativni				Ukupno
	MP GN	MZGP GN	RP GN	FSSH	MC GN	Mem GN	Chr GN	
< 10ng/ml	0	4	0	1	1	1	1	8 (100%)
	4 (50%)			4 (50%)				
10,1-12,5 ng/ml	2	3	0	2	0	1	3	11 (100%)
	5 (45,45%)			6 (54,55%)				
12,6-15 ng/ml	4	8	2	1	1	5	3	24 (100%)
	14 (58,33%)			20 (41,67%)				
>15,1ng/ml	1	9	1	0	1	2	3	17 (100%)
	11 (64,71%)			6 (35,29%)				

Upotrebom Pearson Chi-kvadrat testa nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u distribuciji određenih tipova glomerulonefritisa prema nivoima NGAL-a u urinu u tački 1. ($p = 0,793$), kao ni pri podeli glomerulonefritisa na proliferativne i neproliferativne glomerulonefritise. ($p = 0,757$)

Na osnovu vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin, ispitanici su podeljeni u dve grupe:

- I grupa – vrednost odnosa uNGAL/kreatinin 0 - 25ng/mg i
- II grupa – vrednost odnosa uNGAL/kreatinin preko 25ng/mg.

Upotrebom Pearson Chi-kvadrat testa nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u distribuciji ispitanika sa različitim dijagnozama prema vrednostima odnosa uNGAL/kreatinin (0,620), kao ni poredjenjem grupe sa dijagnozom proliferativnih glomerulonefritisa i iz grupe sa dijagnozom neproliferativnih glomerulonefritisa prema vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin. ($p = 0,757$)

Tabela 9. Vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin prema tipu glomerulonefritisa u tački 1

uNGAL/krea	Proliferativni			Neproliferativni				Ukupno
	MP GN	MZGP GN	RP GN	FSSH	MC GN	Mem GN	Chr GN	
≤ 25ng/mg	4	19	1	2	2	8	10	46 (100%)
	24 (52,17%)			22(47,83%)				
> 25ng/mg	3	5	2	2	1	1	0	14 (100%)
	10 (71,43%)			4 (28,57%)				

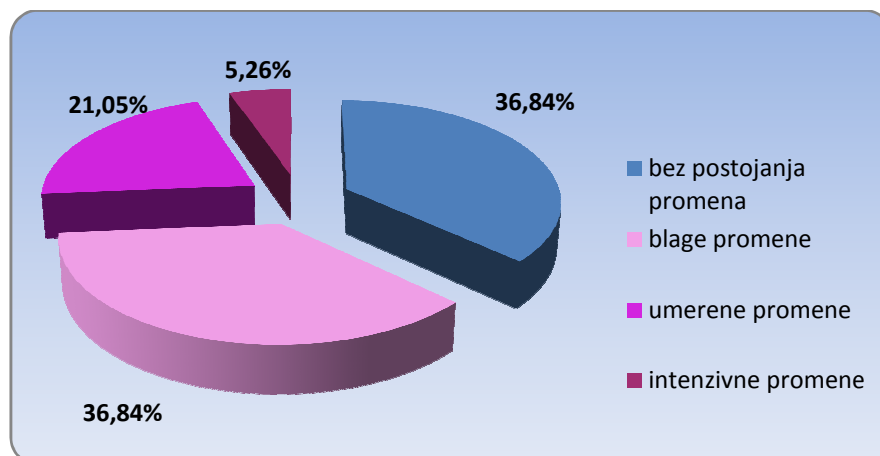
5.4. NIVO NGAL-A I STEPEN INTERSTICIJALNE FIBROZE I STEPEN TUBULSKE ATROFIJE

Na osnovu patohistološkog nalaza bioptata bubrega je, semikvantitavno određen stepen tubulske atrofije i intersticijalne fibroze, kod 95% ispitanika ($n = 57$). Kod 5% bolesnika ($n = 3$), materijal poslat na patohistološku analizu nije bio adekvatan za analizu.

5.4.1. NIVO NGAL-A I STEPEN INTERSTICIJALNE FIBROZE

U odnosu na verifikovane promene na biopsijskom preparatu bubrega u smislu postojanja i intenziteta intersticijalne fibroze, ispitanici su podeljeni u četiri grupe:

- I grupa - bez postojanja promena po tipu intersticijalne fibroze $n = 21$; 36,84%,
- II grupa – prisutne blage promene po tipu intersticijalne fibroze $n = 21$; 36,84%,
- III grupa - prisutne umerene promene po tipu intersticijalne fibroze $n = 12$; 21,05%,
- IV grupa - prisutne intenzivne promene po tipu intersticijalne fibroze $n = 3$; 5,26%.



Grafikon 10. Prisustvo intersticijalne fibroze

Rezultati istraživanja

Medju svim ispitanicima, bio je 21 ispitanik (36,84%) bez prisustva intersticijalne fibroze na biopsijskom materijalu bubrega, dok su kod 36 ispitanika (63,16%) pronadjene promene po tipu intersticijalne fibroze.

U tabeli 10. su prikazane prosečne vrednosti NGAL-a u serumu, NGAL-a u urinu i odnosa uNGAL/kreatinin, u tački 1 i tački 2, ispitanika bez postojanja intersticijalne fibroze, odnosno ispitanika sa postojanjem blage, umerene ili intenzivne intersticijalne fibroze na pregledu bioptata bubrega.

Tabela 10. Izmerene vrednosti NGAL-a u odnosu na postojanje intersticijalne fibroze

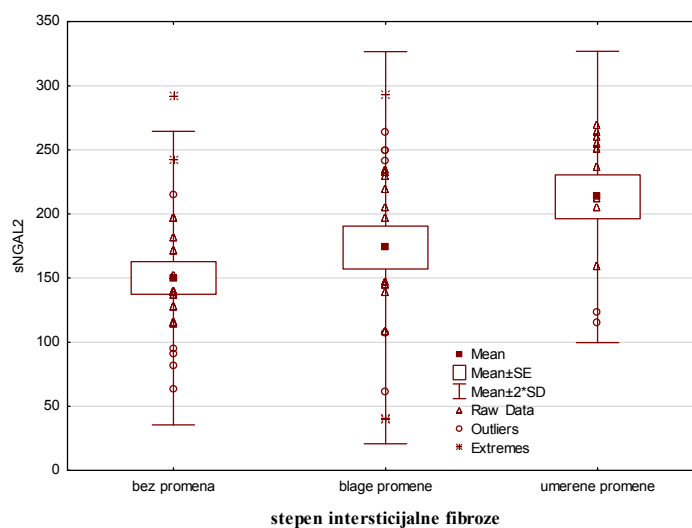
INTERSTICIJALNA FIBROZA		Variable	tačka 1 NGAL (ng/ml) uNGAL/kreatinin (ng/mg)				
			N	Mean	Minimum	Maximum	Std.Dev.
BEZ	bez	sNGAL	21	150,4914	70,08000	298,1600	63,55716
		uNGAL		13,4460	5,75200	16,9200	2,95288
		uNGAL/kr		19,0653	5,65000	49,8580	11,06382
PRISUTNA	blago	sNGAL	21	150,5238	40,26000	303,8400	69,84968
		uNGAL		13,6799	2,44200	45,9800	8,48182
		uNGAL/kr		21,3323	1,43900	44,52800	14,30643
	umereno	sNGAL	12	195,9042	94,44000	305,7400	63,89972
		uNGAL		13,4223	11,02500	16,8300	1,74778
		uNGAL/kr		20,6310	7,82100	48,54500	12,95664
	intenzivno	sNGAL	3	233,9367	186,6000	328,5200	81,91158
		uNGAL		13,2877	11,7550	16,3520	2,65379
		uNGAL/kr		15,2347	12,67200	20,35900	4,43780
	ukupno	sNGAL	36	172,6017	40,26000	328,5200	72,49662
		uNGAL		13,5613	2,44200	45,9800	6,51869
		uNGAL/kr		20,5904	1,43900	48,54500	13,17803
INTERSTICIJALNA FIBROZA		Variable	tačka 2 NGAL (ng/ml) uNGAL/kreatinin (ng/mg)				
			N	Mean	Minimum	Maximum	Std.Dev.
BEZ	bez	sNGAL	20	150,0420	63,66000	291,7000	57,21730
		uNGAL		10,4080	0,90800	14,6480	4,88084
		uNGAL/kr		18,4519	2,11200	47,49800	12,33959
PRISUTNA	blago	sNGAL	11	213,3382	115,1800	268,9000	56,79673
		uNGAL		12,8126	6,2900	14,9680	2,26925
		uNGAL/kr		19,9136	2,25300	56,82400	16,24345
	umereno	sNGAL	21	173,8033	39,58000	293,0800	76,48202
		uNGAL		10,5843	3,82300	14,4830	3,67931
		uNGAL/kr		17,7394	7,05600	38,51200	8,75984
	intenzivno	sNGAL	2	249,3900	249,3400	249,4400	0,070711
		uNGAL		8,5770	8,5530	8,6010	0,033941
		uNGAL/kr		11,3160	11,28500	11,34700	/
	ukupno	sNGAL	34	191,0403	39,58000	293,0800	71,30102
		uNGAL		11,1872	3,82300	14,9680	3,36003
		uNGAL/kr		18,7044	2,25300	56,82400	13,70077

Kruskal-Wallis testom je utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u prosečnom nivou NGAL-a u serumu u tački 2, izmedju ispitanika sa postojanjem intersticijalne fibroze i onih bez fibroze u intersticijumu bubrega. ($p = 0,029$) Ispitanici sa postojanjem intersticijalne fibroze na bioptatu bubrega, su u tački 2 imali značajno veće

nivoa NGAL-a u serumu. Statistički značajna razlika u nivoima NGAL-a u serumu u tački 2 između ispitanika sa i bez intersticijalne fibroze je potvrđeno i Mann-Whitney testom. ($p = 0,023$)

Nije primećena statistički značajna razlika između grupe ispitanika bez intersticijalne fibroze i grupe ispitanika sa postojanjem intersticijalne fibroze u nivoima NGAL-a u urinu u tački 1 ($p = 0,888$), niti u tački 2 ($p = 0,175$) ispitivanja, kao ni u nivou NGAL-a u serumu na početku ispitivanja ($p = 0,084$).

Takodje, nije primećena statistički značajna razlika između prosečne vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin između ispitanika bez postojanja intersticijalne fibroze i ispitanika sa postojanjem intersticijalne fibroze u tački 1 ($p = 0,728$), ako ni u tački 2. ($0,654$) Daljim posmatranjem odnosa nivoa NGAL-a u serumu u tački 2 i stepena intersticijalne fibroze u bioptatu bubrega, utvrđena je statistički značajna razlika između prosečnog nivoa NGAL-a u serumu između ispitanika bez promena u vidu intersticijalne fibroze i ispitanika sa umerenim stepenom intersticijalne fibroze. ($p = 0,023$) Nije primećena statistički značajna razlika u prosečnim nivoima NGAL-a u serumu između grupe ispitanika bez intersticijalne fibroze i grupe ispitanika sa blagim promenama po tipu intersticijalne fibroze ($p = 0,719$), niti između grupa ispitanika sa blagim i umerenim promenama u vidu intersticijalne fibroze. ($p = 0,270$) U grupi ispitanika sa promenama u vidu intenzivne intersticijalne fibroze u tački 2 se nalaze samo dva ispitanika, te je ta grupa morala biti isključiti iz dalje statističke analize. Dobijeni podaci su iskazani sledećim box dijagramom.



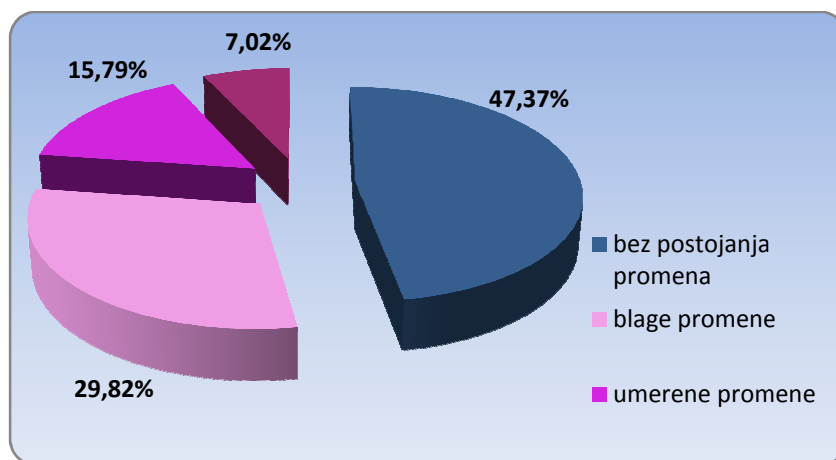
Grafikon 11. NGAL u serumu u tački 2 i prisustvo intersticijalne fibroze

5.4.2. NIVO NGAL-A I STEPEN ATROFIJE TUBULA

Prema znacima postojanja i intenziteta tubulske atrofije na patohistološkom pregledu bioptata bubrega, ispitanici su podeljeni u četiri grupe:

- I grupa - bez postojanja promena tipa atrofije tubula $n = 27$; 47,37%,
- II grupa - prisutna blago izražena atrofija tubula $n = 17$; 29,82%,
- III grupa - prisutna umereno izražena atrofija tubula $n = 9$; 15,79%,
- IV grupa - prisutna izražena atrofija tubula $n = 4$; 7,02%.

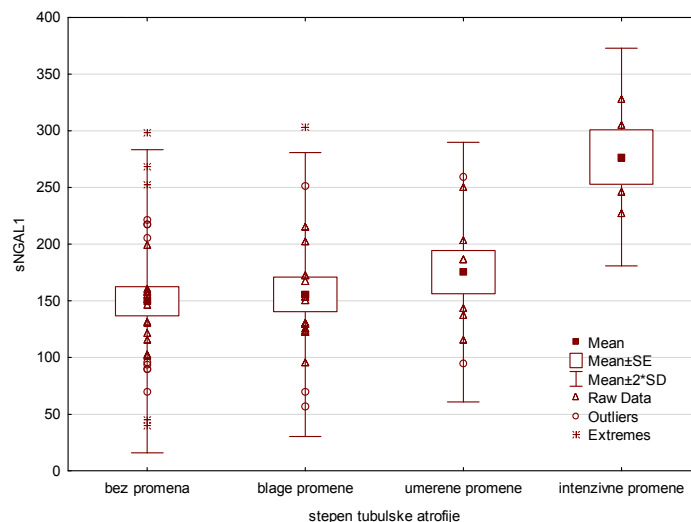
Analiziranjem svih biopsijskih uzoraka, 27 ispitanika (47,37%) je bilo bez prisustva atrofije tubula, dok su kod 30 ispitanika (52,63%) pronađene promene po tipu tubulske atrofije na biopsijskom materijalu.



Grafikon 12. Prisustvo atrofije tubula

Prosečne vrednosti NGAL-a u serumu i urinu, kao i odnosa uNGAL/kreatinin, u tačkama 1 i 2, u odnosu na postojanje tubulske atrofije, su prikazani u tabeli 11.

Kruskal-Wallis testom je utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u prosečnom nivou NGAL-a u serumu u tački 1 između ispitanika sa postojanjem atrofije tubula i onih bez promena na tubulima bubrega. ($p = 0,025$) Ispitanici sa postojanjem tubulske atrofije na bioptatu bubrega, su u tački 1 imali značajno veće nivoe NGAL-a u serumu u odnosu na ispitanike bez tubulske atrofije.



Grafikon 13. Stepen tubulske atrofije i NGAL u serumu u tački 1

Daljom razradom po grupama je primećena statistički značajna razlika u nivou NGAL-a u serumu u tački 1 između grupe ispitanika bez tubulske atrofije i grupe ispitanika sa intenzivnom atrofijom tubula ($p = 0,019$), kao i između grupe ispitanika sa blagom tubularnom atrofijom i grupe ispitanika sa intenzivnom atrofijom tubula na nalazu

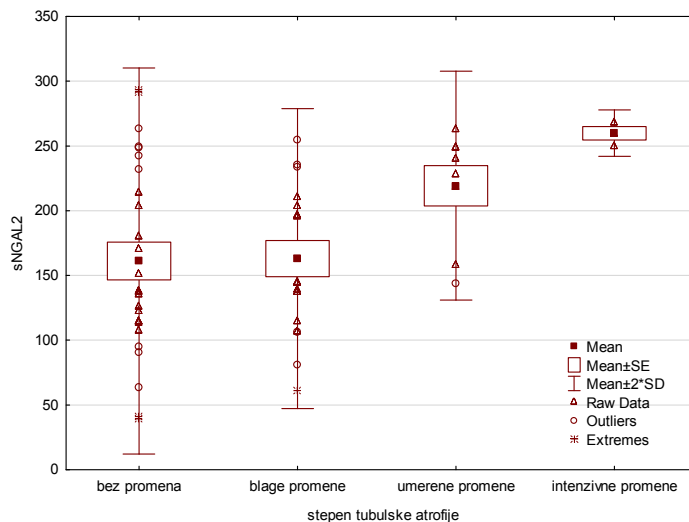
bioptata bubrega ($p = 0,042$), što je prikazano i na grafikonu broj 13. Ispitanici sa intenzivnom tubulskom atrofijom su imali značajno veće vrednosti NGAL-a u serumu na početku ispitivanja, u odnosu na ispitanike bez ili sa blagom tubulskom atrofijom.

Tabela 11. Izmerene vrednosti NGAL-a u odnosu na postojanje atrofije tubula

TUBULSKA ATROFIJA		Variable	tačka 1 NGAL (ng/ml) uNGAL/kreatinin (ng/mg)				
			N	Mean	Minimum	Maximum	Std.Dev.
BEZ	bez	sNGAL1	27	149,6970	40,26000	298,1600	66,91755
		uNGAL1		13,7803	5,75200	16,9200	2,78733
		uNGAL/kr		20,1780	5,6500	49,85800	11,38349
PRISUTNA	blago	sNGAL1	17	155,6535	56,48000	303,8400	62,64702
		uNGAL1		13,5001	2,44200	45,9800	9,08149
		uNGAL/kr		20,2281	1,43900	44,52800	13,91666
	umereno	sNGAL1	9	175,3811	94,44000	259,3400	57,26664
		uNGAL1		12,4768	3,20900	16,5130	3,81134
		uNGAL/kr		19,6232	4,82300	48,54500	16,00947
	intenzivno	sNGAL1	4	276,9050	227,0600	328,5200	48,01651
		uNGAL1		14,1780	12,1390	16,3520	1,88687
		uNGAL/kr		19,1497	14,54700	22,18200	3,26459
	ukupno	sNGAL1	30	177,7387	56,48000	328,5200	70,37451
		uNGAL1		13,2835	2,44200	45,9800	7,08647
		uNGAL/kr		19,9028	1,43900	48,54500	13,37257
TUBULSKA ATROFIJA		Variable	tačka 2 NGAL (ng/ml) uNGAL/kreatinin (ng/mg)				
			N	Mean	Minimum	Maximum	Std.Dev.
BEZ	bez	sNGAL2	26	161,1754	39,58000	293,0800	74,55851
		uNGAL2		10,3320	0,90800	14,6480	4,66113
		uNGAL/kr		19,9691	2,11200	56,82400	15,42082
PRISUTNA	blago	sNGAL2	17	163,0182	61,38000	254,4600	57,89673
		uNGAL2		10,9545	2,60300	14,9680	3,67266
		uNGAL/kr		15,42794	2,25300	39,64900	8,44540
	umereno	sNGAL2	8	219,3325	144,1400	263,3800	44,16250
		uNGAL2		11,7070	8,5530	14,4830	2,43014
		uNGAL/kr		17,7637	4,19700	42,67700	13,94391
	intenzivno	sNGAL2	3	259,8933	250,8600	268,9000	9,020030
		uNGAL2		13,3360	12,6340	14,1020	0,736090
		uNGAL/kr		27,1353	20,22800	38,51200	9,92760
	ukupno	sNGAL2	28	189,4875	61,38000	268,9000	61,26893
		uNGAL2		11,4246	2,60300	14,9680	3,18325
		uNGAL/kr		17,3497	2,25300	42,67700	10,62975

Kruskal-Wallis testom je utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u prosečnom nivou NGAL-a u serumu u tački 2 između ispitanika sa postojanjem atrofije tubula i onih bez promena na tubulima bubrega. ($p = 0,010$) Ispitanici sa postojanjem tubulske atrofije na bioptatu bubrega, su u tački 2 imali značajno veće nivoe NGAL-a u serumu u odnosu na ispitanike bez tubulske atrofije.

Daljom razradom po grupama je primećena statistički značajna razlika u nivou NGAL-a u serumu u tački 2 između grupe ispitanika bez tubulske atrofije i grupe ispitanika sa intenzivnom atrofijom tubula ($p = 0,050$). Takodje je primećena razlika u nivou NGAL-a u serumu u tački 2 između grupa ispitanika bez tubulske atrofije i sa umerenim stepenom tubulske atrofije, ali razlika nije dostigla statističku značajnost. ($p = 0,061$) Navedeni odnosi su grafički prikazani sledećim box dijagramom.



Grafikon 14. Stepen tubulske atrofije i NGAL u serumu u tački 2

Nije primećena statistički značajna razlika između ispitanika sa postojanjem tubulske atrofije na bioptatu bubrega i ispitanika bez atrofije tubula, u prosečnim nivoima NGAL-a u urinu ni u tački 1 ($p = 0,164$), niti u tački 2 ($p = 0,710$).

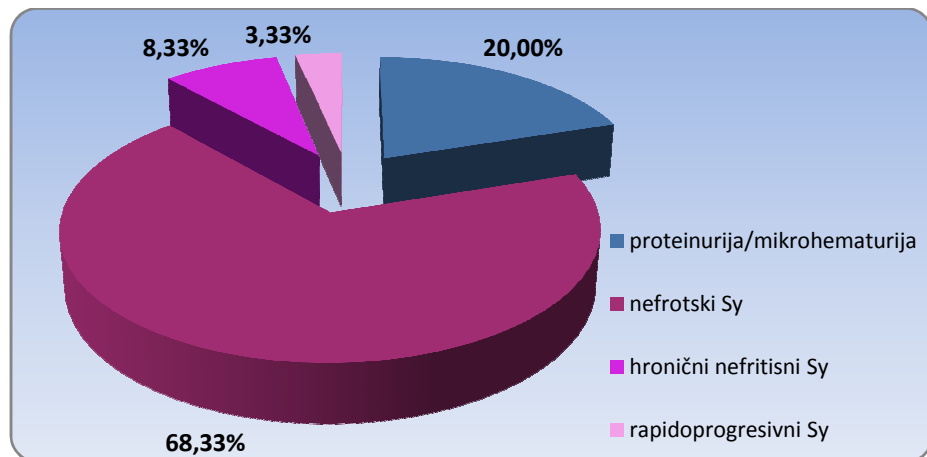
Nije primećena statistički značajna razlika u prosečnoj vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin između ispitanika bez tubulske atrofije i ispitanika sa postojanjem tubulske atrofije, ni u tački 1 ($p = 0,848$), niti u tački 2 ispitivanja. ($p = 0,795$)

5.5. NIVO NGAL-A I KLINIČKA SLIKA PRIMARNIH GLOMERULONEFRITISA

Primarni glomerulonefritis se kod naših ispitanika iskazao jednim od sledećih sindroma:

- nefrotski sindrom $n = 41$; 68,33%,
- asimptomatska proteinurija i mikrohematurija $n = 12$; 20%,
- hronični nefritisni sindrom $n = 5$; 8,33%,
- rapidoprogresivni nefritisni sindrom $n = 2$; 3,33%.

Oboljenje se kod najvećeg broja ispitanika klinički ispoljilo nefrotskim sindromom 68,33% ($n=41$). Broj ispitanika sa nefrotskim sindromom se statistički značajno razlikuje od broja ispitanika sa ostalim kliničkim manifestacijama primarnog glomerulonefritisa. ($p = 0,000$)



Grafikon 15. Klinička slika primarnih glomerulonefritisa

Tabela 12. Nivo NGAL-a prema kliničkim manifestacijama glomerulonefritisa

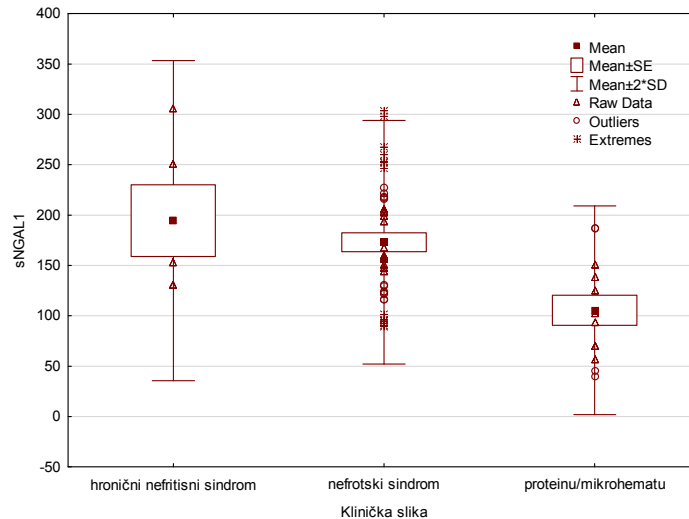
KLINIČKA MANIFESTACIJA	Variable	tačka 1 NGAL (ng/ml) uNGAL/kreatinin (ng/mg)				
		N	Mean	Minimum	Maximum	Std.Dev.
asimptomatska proteinerurija/mikrohematurnija	sNGAL	12	105,4958	40,26000	186,6900	51,85200
	uNGAL		10,4643	3,20900	15,5160	3,71256
	uNGAL/kr		13,5939	5,91100	37,07100	8,99026
nefrotski sindrom	sNGAL	41	173,0207	89,42000	303,8400	60,49846
	uNGAL		14,6156	5,75200	45,9800	5,54028
	uNGAL/kr		22,4487	4,82300	49,85800	12,81521
hronični nefritisni sindrom	sNGAL	5	194,4320	131,2600	305,7400	79,37627
	uNGAL		11,1408	2,4420	14,5260	4,93551
	uNGAL/kr		15,0562	1,43900	21,01700	8,32202
rapidoprogresivni sindrom	sNGAL	2	339,1300	328,5200	349,7400	15,00481
	uNGAL		15,4725	14,5930	16,3520	1,24380
	uNGAL/kr		30,3360	20,35900	40,31300	14,10960
KLINIČKA MANIFESTACIJA	Variable	tačka 2 NGAL (ng/ml) uNGAL/kreatinin (ng/mg)				
		N	Mean	Minimum	Maximum	Std.Dev.
asimptomatska proteinerurija/mikrohematurnija	sNGAL	12	145,3158	39,58000	249,4400	81,93918
	uNGAL		10,2507	2,60300	13,6740	3,70888
	uNGAL/kr		14,3055	3,90200	35,55200	8,24655
nefrotski sindrom	sNGAL	39	177,6441	63,66000	293,0800	61,42264
	uNGAL		11,5030	0,90800	14,9680	3,73989
	uNGAL/kr		21,2390	2,11200	56,82400	14,08340
hronični nefritisni sindrom	sNGAL	5	251,1340	233,8400	263,3800	11,54601
	uNGAL		8,0588	3,8230	14,1020	4,97048
	uNGAL/kr		9,7684	2,25300	22,66600	7,89740
rapidoprogresivni sindrom	sNGAL	1	271,0400	271,0400	271,0400	/
	uNGAL		13,3070	13,3070	13,3070	/
	uNGAL/kr		39,21100	39,21100	39,21100	/

U tabeli 12. su prikazani prosečni nivoi NGAL-a u serumu, NGAL-a u urinu i odnosa uNGAL/kreatinin, prema kliničkim manifestacijama oboljenja.

Iz ispitivanja je morala biti isključena grupa ispitanika sa rapidoprogresivnim nefritisnim sindromom, obzirom na statistički mali broj ispitanika u grupi (n = 2).

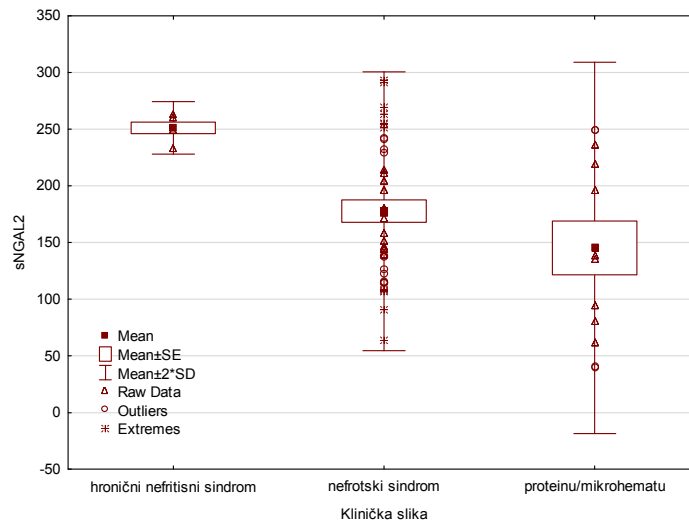
Na osnovu nalaza Kruskal-Wallis testa, zapažene su statistički značajne razlike u prosečnim nivoima NGAL-a u serumu izmedju grupa ispitanika sa različitim kliničkim manifestacijama primarnog glomerulonefritisa u tački 1 ($p = 0,005$) i tački 2 ($p = 0,013$).

Na osnovu Kruskal-Wallis analize, utvrđeno je da su u tački 1 ispitanici sa nefrotskim sindromom imali značajno veće nivoe NGAL-a u serumu u odnosu na ispitanike sa asiptomatskom mikrohematurijom/proteinurijom. ($p = 0,007$) Na osnovu iste analize je utvrđeno da su u tački 1 ispitanici sa hroničnim nefritisnim sindromom imali značajno veće nivoe NGAL-a u serumu u odnosu na ispitanike sa asiptomatskom mikrohematurijom/proteinurijom. ($p = 0,049$)



Grafikon 16. NGAL u serumu u tački 1 u odnosu na različite kliničke manifestacije

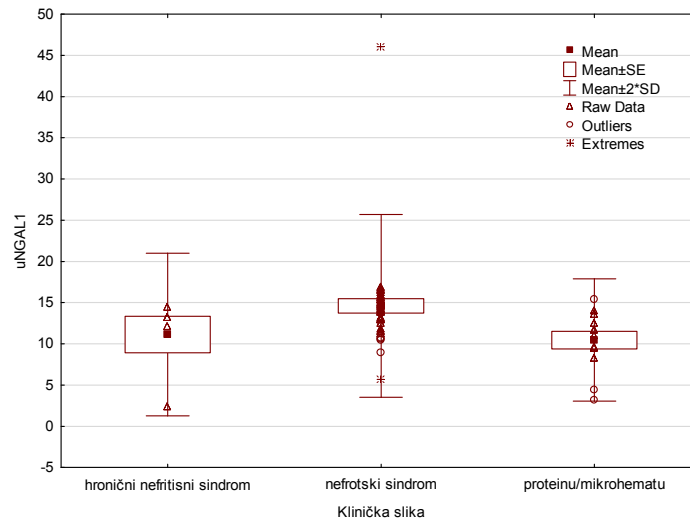
U tački 2 su Kruskal-Wallis testom, utvrđeni značajno veći nivoi NGAL-a u serumu kod ispitanika sa hroničnim nefritisnim sindromom u odnosu na grupu ispitanika sa asiptomatskom mikrohematurijom/proteinurijom ($p = 0,010$). Grafički prikaz je dat box dijagramom.



Grafikon 17. NGAL u serumu u tački 2 u odnosu na različite kliničke manifestacije

Metodom višestrukog poredjenja su utvrđene statistički značajne razlike u prosečnim nivoima NGAL-a u urinu, izmedju grupa ispitanika sa različitim kliničkim

manifestacijama primarnog glomerulonefritisa u tački 1 ($p = 0,004$). Statistički značajne razlike nisu utvrđene u tački 2. ($p = 0,245$)



Grafikon 18. NGAL u urinu u tački 1 u odnosu na različite kliničke manifestacije

Kruskal-Wallis testom su utvrđeni značajno veći nivoi NGAL-a u urinu u tački 1 u grupi ispitanika sa nefrotskim sindromom, u odnosu na ispitanike sa asiptomatskom mikrohematurijom/proteinurijom ($p = 0,005$), što je i prikazano na grafikonu broj 18.

Na osnovu metode višestrukog poredjenja, zapažene su statistički značajne razlike u prosečnim vrednostima odnosa uNGAL/kreatinin između grupa ispitanika sa različitim kliničkim manifestacijama primarnog glomerulonefritisa u tački 1 ($p = 0,033$). Statistički značajne razlike nisu utvrđene u tački 2. ($p = 0,066$)

Kruskal-Wallis-ovim testom je utvrđeno da ispitanici sa nefrotskim sindromom imaju značajno veće prosečne vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin u tački 1, u odnosu na ispitanike sa asiptomatskom mikrohematurijom/proteinurijom. ($p = 0,013$) Nisu utvrđene razlike u prosečnim vrednostima odnosa uNGAL/kreatinin između ispitanika sa hroničnim nefritisnim sindromom i nefrotskim sindromom ($p = 0,350$), niti između ispitanika sa hroničnim nefritisnim sindromom i asiptomatskom mikrohematurijom/proteinurijom ($p = 0,461$).

5.5.1. NIVO NGAL-A I POSTOJANJE ARTERIJSKE HIPERTENZIJE

Na osnovu postojanja arterijske hipertenzije pri postavljanju dijagnoze primarnog glomerulonefritisa, ispitanici su podeljeni u dve grupe:

- grupu ispitanika bez arterijske hipertenzije pri postavljanju dijagnoze, u kojoj se nalazi 28,33% ispitanika ($n=17$) i
- grupu ispitanika sa postojanjem arterijske hipertenzije pri postavljanju dijagnoze, u kojoj se nalazi 71,67% ispitanika ($n=43$).

Statistički značajno veći broj ispitanika je imao prisutnu arterijsku hipertenziju u tački 1 ispitivanja. ($p = 0,001$)

Metodom višestrukog poredjenja nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike između grupe ispitanika sa arterijskom hipertenzijom pri postavljanju dijagnoze i grupe bez arterijske hipertenzije u tački 1 u nivoima NGAL-a u serumu ($p = 0,346$), nivoima NGAL-a u urinu ($p = 0,628$), niti vrednostima odnosa uNGAL/kreatinin ($p = 0,812$).

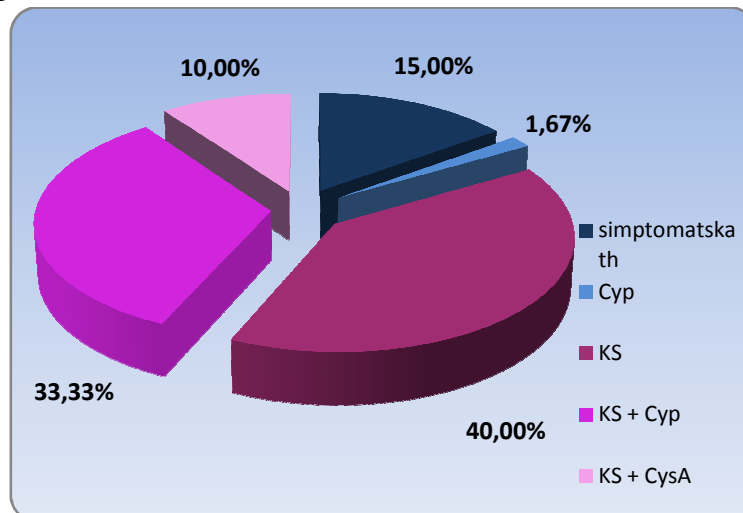
Tabela 13. Nivoi NGAL-a u tački 1 u odnosu na postojanje arterijske hipertenzije

ARTERIJSKA HIPERTENZIJA	Variable	tačka 1 NGAL (ng/ml) uNGAL/kreatinin (ng/mg)				
		N	Mean	Minimum	Maximum	Std.Dev.
BEZ HTA	sNGAL	17	152,2641	70,3200	268,1800	57,36432
	uNGAL		12,6550	4,48000	16,66800	3,54085
	uNGAL/kr		20,1765	5,65000	48,54500	10,99433
SA HTA	sNGAL	43	172,5984	40,26000	349,74000	91,82785
	uNGAL		13,8680	2,442000	45,98000	7,06435
	uNGAL/kr		20,3832	1,439000	49,858	15,54999

5.6. NIVO NGAL-A I TERAPIJA PRIMARNIH GLOMERULONEFRITISA

Na osnovu primenjene terapije, ispitanici su podeljeni u pet grupa:

- ispitanike lečene samo simptomatskom terapijom $n = 9$; 15%,
- ispitanike lečene monoterapijom kortikosteroidima (KS) $n = 24$; 40%,
- ispitanike lečene kombinacijom kortikosteroida i ciklofosfamida (KS + Cyp) $n = 20$; 33,33%,
- ispitanike lečene kombinacijom kortikosteroida i ciklosporina A (KS + CysA) $n = 6$; 10%
- ispitanike lečene monoterapijom ciklofosfamidom (Cyp) $n = 1$; 1,67%, što je prikazano na grafikonu 19.



Grafikon 19. Terapijski protokoli u lečenju primarnih glomerulonefritisa

Posmatrane su vrednosti NGAL-a u serumu, NGAL-a u urinu i odnosa uNGAL/kreatinin u tački 2 u odnosu na primenjivanu terapiju, kod 57 ispitanika. Od troje ispitanika kod kojih nisu radjena kliničko-laboratorijska ispitivanja u tački 2, ispitanik koji

je razvio terminalni stadijum bubrežne insuficijencije je lečen kombinacijom kortikosteroida i ciklofosfamida, a od preminulih ispitanika je jedan lečen monoterapijom kortikosteroidima, a drugi kombinacijom kortikosteroida i ciklofosfamida.

Tabela 14. Nivoi NGAL-a u tački 2 u odnosu na primenjene terapijske protokole

PRIMENJENA TERAPIJA		Variable	tačka 2 NGAL (ng/ml) uNGAL/kreatinin (ng/mg)				
			N	Mean	Minimum	Maximum	Std.Dev.
BEZ KORTIKOSTEROID A	simptomatska	sNGAL	9	127,4722	39,58000	259,9200	84,03068
		uNGAL		10,2001	2,60300	14,1020	4,43332
		uNGAL/kr		12,1162	2,253000	22,6660	7,34482
	Cyp	sNGAL	1	152,0200	152,0200	152,0200	-
		uNGAL		14,3490	14,3490	14,3490	-
		uNGAL/kr		18,3830	18,38300	18,38300	-
	ukupno	sNGAL	10	129,9270	39,58000	259,9200	79,60428
		uNGAL		10,6150	2,60300	14,3490	4,38085
		uNGAL/kr		12,7429	2,253000	22,6660	7,20279
SA KORTIKOSTEROIDIMA	KS	sNGAL	23 (24-1)	177,9139	90,46000	293,0800	62,30606
		uNGAL		10,6165	0,90800	14,6480	4,23889
		uNGAL/kr		19,2126	2,11200	56,82400	13,42681
	KS + Cyp	sNGAL	18 (20-2)	201,4650	63,66000	263,3800	62,81292
		uNGAL		11,4507	4,71800	14,9680	3,47316
		uNGAL/kr		21,4434	6,22500	47,49800	14,80774
	KS + CysA	sNGAL	6	196,8267	108,3000	268,9000	65,29584
		uNGAL		11,4638	5,0580	14,4670	3,57516
		uNGAL/kr		22,1232	4,197000	41,254000	14,89916
	ukupno	sNGAL	47	189,3479	63,66000	293,0800	62,51625
		uNGAL		11,0441	0,90800	14,9680	3,82360
		uNGAL/kr		20,4385	2,11200	56,82400	13,88885

Između grupa sa različitim terapijskim protokolima, upotrebom Mann-Whitney testa, nije uočena statistički značajna razlika u tački 2, u prosečnom nivou NGAL-a u serumu ($p = 0,084$), nivou NGAL-a u urinu ($p = 0,736$), niti vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin ($p = 0,425$).

Ispitanici su potom podeljeni u dve velike grupe:

- grupa ispitanika koja je primala kortikosteroide $n = 47$; 82,46% i
- grupa ispitanika koja nije lečena kortikosteroidima $n = 10$; 17,54%.

Upotrebom Mann-Whitney testa je dokazano da su ispitanici koji su u terapiji primali kortikosteroide imali značajno više nivoe NGAL-a u serumu (odredjene u tački 2), u odnosu na ispitanike koji nisu primali kortikosteroide. ($p = 0,027$) Nisu primećene statistički značajne razlike u vrednostima NGAL-a u urinu ($p = 0,992$), niti odnosa uNGAL/kreatinin ($p = 0,139$) između dve grupe ispitanika.

5.6.1. NIVO NGAL-A I PRIMENA ACE INHIBITORA U TERAPIJI

Na osnovu toga da li ispitanici u okviru u terapiji arterijske hipertenzije, imali ACE inhibitore, ispitanici su podeljeni u dve grupe:

- grupa ispitanika koji su uzimali ACE inhibitore n = 48; 80% i
- grupa ispitanika koji nisu uzimali ACE inhibitore n = 12; 20%.

Posmatrane su vrednosti NGAL-a u serumu, NGAL-a u urinu i odnosa uNGAL/kreatinin u tački 2 između navedene dve grupe, kao što je izneto u tabeli broj 15.

Sva tri ispitanika koji su nisu mogli biti uključeni u posmatranja u tački 2, su u terapiji imali i ACE inhibitore.

Tabela 15. Nivo NGAL-a u tački 2 u odnosu na prisustvo ACE inhibitora u terapiji

ACE INHIBITORI	Variable	tačka 2 NGAL (ng/ml) uNGAL/kreatinin (ng/mg)				
		N	Mean	Minimum	Maximum	Std.Dev.
BEZ ACE inhibitora	sNGAL	12	197,1517	95,000	271,04	58,87564
	uNGAL		9,7547	4,72000	14,5300	3,54817
	uNGAL/kr		16,74925	6,22500	45,58000	12,90126
SA ACE inhibitorima	sNGAL	45 (48-3)	174,0622	39,5800	293,0800	84,29576
	uNGAL		11,2926	0,91000	14,97000	4,78916
	uNGAL/kr		19,7122	2,11200	56,82400	13,42033

Statistički je značajno veći broj ispitanika koji su u terapiji uzimali ACE inhibitore (78,95%) u odnosu na ispitanike koji nisu imali ACE inhibitore u terapiji (21,05%). ($p = 0,002$)

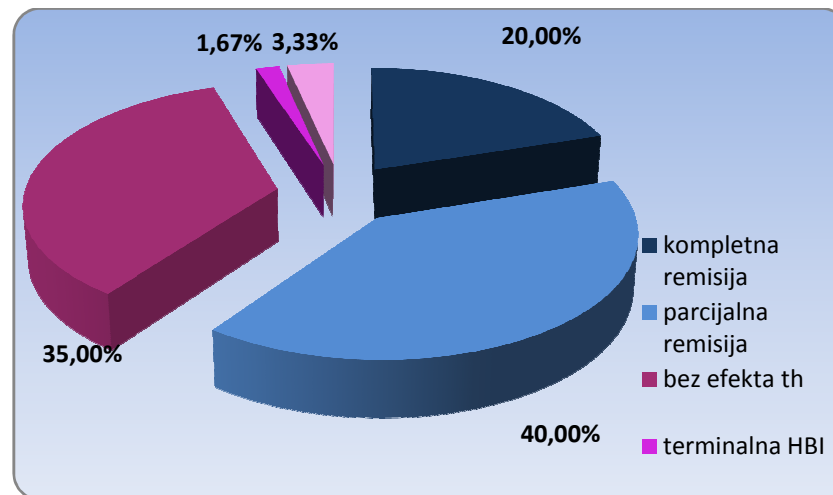
Primećuje se da ispitanici koji su u terapiji uzimali ACE inhibitore imaju manje prosečne nivoe NGAL-a u serumu u tački 2, ali razlika nije dostigla statističku značajnost. ($p = 0,368$) Nije utvrđena statistički značajna razlika u tački 2, između ispitanika koji su uzimali ACE inhibitore u terapiji i onih koji nisu, u prosečnom nivou NGAL-a u urinu ($p = 0,132$), niti u odnosu uNGAL/kreatinin ($p = 0,318$).

5.7. NIVO NGAL-A I ODGOVOR NA PRIMENJENU TERAPIJU

Na osnovu kliničko-laboratorijskih analiza uradjenih u tački 2, za ispitanike je utvrđen efekat primenjene terapije. Na osnovu dobijenog odgovora na terapiju, ispitanici su podeljeni u pet grupa:

- grupa ispitanika koja je razvila kompletnu remisiju n = 12; 20%,
- grupa ispitanika koja je razvila parcijalnu remisiju n = 24; 40%,
- grupa ispitanika kod koje nije primećen efekat terapije n = 21; 35%,
- grupa ispitanika koja je razvila terminalni stadijum bubrežne insuficijencije n = 1; 1,67%
- grupa ispitanika koja je preminula tokom perioda praćenja n = 2; 3,33%.

Ispitanici kod kojih je došlo do razvoja kompletne remisije ili parcijalne remisije su smatrani da imaju pozitivan efekat lečenja n = 36, 60%.



Grafikon 20. Krajnji efekat primenjene terapije

Ispitanici kod kojih nije verifikovano poboljšanje na primenjenu terapiju (odnosno terapije nije dovela do očekivanog efekta), ispitanici koji su tokom lečenja razvili terminalni stadijum bubrežne insuficijencije, kao i ispitanici koji su tokom praćenja preminuli, su smatrani da imaju negativan efekat lečenja $n = 24, 40\%$.

Prosečni nivoi NGAL-a u serumu i urinu, kao i vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin, u tački 1 i tački 2, u odnosu na verifikovani odgovor na primenjenu terapiju, su prikazani u tabeli 16.

Upotrebom Mann-Whitney testa je utvrđeno da nije bilo statistički značajne razlike u prosečnim nivoima NGAL-a u serumu ($p = 0,464$) niti urinu ($p = 0,994$), na početku ispitivanja, između grupe ispitanika koji su pokazali pozitivan efekat lečenja i grupe ispitanika koja je pokazala negativan efekat lečenja.

Iako su prosečne vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin bile veće u tački 1 kod ispitanika koji su kasnije imali negativan odgovor na terapiju u odnosu na ispitanike koji su razvili remisiju, razlika nije dostigla statističku značajnost. ($p=0,126$)

Ako ispitanike podelimo u dve grupe u odnosu na nivo NGAL-a u serumu u tački 1, a za granicu izmemo 140 ng/ml, dobijamo:

- grupu ispitanika sa vrednošću nivoa NGAL-a u serumu manjom od 140 ng/ml ($n = 25$), u kojoj se nalazi 11 ispitanika sa pozitivnim efektom lečenja (11/25 - 44%) i
- grupu ispitanika sa vrednošću nivoa NGAL-a u serumu većom od 140 ng/ml ($n = 35$), u kojoj se nalazi 25 ispitanika sa pozitivnim efektom lečenja (25/35 71,43%) .

Na osnovu Pearson Chi-kvadrat testa se zaključuje da postoji povezanost između pozitivnog odgovora na primenjenu terapiju i nivoa NGAL-a u serumu iznad 140ng/ml, na početku ispitivanja. Značajno veći broj ispitanika koji su imali pozitivan efekat terapije je u tački 1 imao nivo NGAL-a u serumu veći od 140ng/ml. ($p = 0,032$)

Tabela 16. Nivo NGAL-a u odnosu na krajnji efekat primenje terapije

EFEKAT TERAPIJE		Variable	tačka 1 NGAL (ng/ml) uNGAL/kreatinin (ng/mg)				
			N	Mean	Minimum	Maximum	Std.Dev.
POZITIVAN EFEKAT	kompletna remisija	sNGAL	12	194,9308	102,4200	268,1800	44,93000
		uNGAL		12,6663	8,9870	16,5480	2,15443
		uNGAL/kr		19,7195	7,69900	43,57800	11,36988
	parcijalna remisija	sNGAL	24	157,1767	40,26000	349,7400	81,14149
		uNGAL		13,3108	2,44200	16,9200	3,56759
		uNGAL/kr		18,4927	1,43900	49,85800	12,06259
	UKUPNO	sNGAL	36	169,7614	40,26000	349,7400	72,71066
		uNGAL		13,0960	2,44200	16,9200	3,14923
		uNGAL/kr		18,9016	1,43900	43,57800	11,68845
NEGATIVAN EFEKAT	bez efekta	sNGAL	21	161,2252	70,08000	305,7400	66,34228
		uNGAL		14,4582	3,20900	45,9800	7,85675
		uNGAL/kr		22,1174	7,06800	44,52800	12,38627
	terminalna HBI	sNGAL	1	328,5200	328,5200	328,5200	/
		uNGAL		16,3520	16,3520	16,3520	/
		uNGAL/kr		20,35900	20,35900	20,35900	/
	smrtni ishod	sNGAL	2	92,28000	90,12000	94,44000	3,054701
		uNGAL		10,01500	5,75200	14,27800	6,028792
		uNGAL/kr		27,0975	5,65000	48,54500	30,33134
	UKUPNO	sNGAL	24	162,4504	70,08000	328,5200	73,86642
		uNGAL		14,1669	3,20900	45,9800	7,55257
		uNGAL/kr		22,45917	5,65000	48,54500	13,25055
EFEKAT TERAPIJE		Variable	tačka 2 NGAL (ng/ml) uNGAL/kreatinin (ng/mg)				
			N	Mean	Minimum	Maximum	Std.Dev.
POZITIVAN EFEKAT	kompletna remisija	sNGAL	12	180,5192	107,4800	249,4400	51,01655
		uNGAL		10,0541	0,9080	14,6480	4,21217
		uNGAL/kr		20,5127	2,11200	45,5800	14,60977
	parcijalna remisija	sNGAL	24	154,8154	39,58000	291,7000	75,80353
		uNGAL		10,3704	1,01600	13,8750	3,91783
		uNGAL/kr		15,8246	2,25300	47,49800	11,27223
	UKUPNO	sNGAL	36	163,3833	39,58000	291,7000	68,88439
		uNGAL		10,2650	0,90800	14,6480	3,96053
		uNGAL/kr		17,3873	2,11200	45,5800	12,48562
NEGATIVAN EFEKAT	bez efekta	sNGAL	21	205,5629	81,00000	293,0800	61,74656
		uNGAL		12,1755	2,60300	14,9680	3,53089
		uNGAL/kr		22,0047	3,90200	56,82400	14,31734
	UKUPNO	sNGAL	21	205,5629	81,00000	293,0800	61,74656
		uNGAL		12,1755	2,60300	14,9680	3,53089
		uNGAL/kr		22,0047	3,90200	56,82400	14,31734

Primenom Mann-Whitney testa je utvrđeno da su ispitanici sa pozitivnim odgovorom na primenjenu terapiju u tački 2 imali značajno niže vrednosti NGAL-a u serumu u odnosu na grupu ispitanika sa negativnim odgovorom na primenjenu terapiju. (p = 0,014) Takodje je primećeno da ispitanici sa pozitivnim odgovorom na terapiju imali statistički značajno niže prosečne nivoe NGAL-a u urinu u tački 2, u odnosu na ispitanike sa negativnim odgovorom na primenjenu terapiju. (p = 0,007) Iako su prosečne vrednosti uNGAL/kreatinin odnosa bile niže u grupi ispitanika sa pozitivnim odgovorom na terapiju

u odnosu na ispitaniek sa negativnim odgovorom, razlika nije dostigla statističku značajnost. ($p = 0,234$)

5.8. NIVO NGAL-A I PROGNOŠTIČKI LOŠI OBLICI PRIMARNIH GLOMERULONEFRITISA

Kao što je ranije navedeno određeni oblici glomerulonefritisa imaju lošiju prognozu u odnosu na druge. U našem ispitivanju, rapidoprogresivni glomerulonefritis, membranoproliferativni glomerulonefriti i fokalno-segmentna skleroza su smatrani za glomerulonefritise sa lošom prognozom bolesti. Pod glomerulonefritisima sa boljom prognozom su smatrani mezangioproliferativni glomerulonefritis, membranska nefropatija, glomerulonefritis minimalnih promena i hronični glomerulonefritis.

Ispitanici su na osnovu prognostičkog oblika glomerulonefritisa podeljeni u dve grupe:

- grupa ispitanika sa glomerulonefritisom sa boljom prognozom $n = 46$; 76,67%,
- grupa ispitanika sa glomerulonefritisom sa lošijom prognozom $n = 14$; 23,33%.

Tabela 17. Nivo NGAL-a u odnosu na očekivanu prognozu glomerulonefritisa

OBLIK GLOMERULONEFRITISA	Variable	tačka 1 NGAL (ng/ml) uNGAL/kreatinin (ng/mg)				
		N	Mean	Min	Max	Std.Dev.
BOLJA PROGNOZA	sNGAL	46	157,9759	40,2600	303,8400	82,7050
	uNGAL		13,7367	2,4420	45,9800	7,2287
	uNGAL/kr		17,3087	1,4390	40,9730	18,1602
LOŠIJA PROGNOZA	sNGAL	14	195,9521	94,4400	349,7400	82,6456
	uNGAL		12,8266	3,2090	16,9200	3,2917
	uNGAL/kr		30,2341	8,3430	49,8580	15,2450
OBLIK GLOMERULONEFRITISA	Variable	tačka 2 NGAL (ng/ml) uNGAL/kreatinin (ng/mg)				
		N	Mean	Min	Max	Std.Dev.
BOLJA PROGNOZA	sNGAL	45	169,7184	39,5800	293,0800	84,8647
	uNGAL		10,9380	0,9100	14,9700	4,6980
	uNGAL/kr		17,6358	2,1120	56,8240	22,1830
LOŠIJA PROGNOZA	sNGAL	12	213,4408	107,4800	271,0400	50,9289
	uNGAL		11,0844	4,7200	14,4800	3,7417
	uNGAL/kr		24,5357	6,2250	47,4980	15,6644

Poredjene su prosečne vrednosti NGAL-a izmedju ispitanika sa glomerulonefritisom sa boljom i lošijom prognozom, upotrebom Kruskal-Wallis testa. Iako su ispitanici sa dijagnozom glomerulonefritisa sa lošijom prognozom imali veće nivoe NGAL-a u serumu na početku ispitivanja u odnosu na ispitanike sa boljom prognozom glomerulonefritisa, razlika nije dostigla statističku značajnost. ($p = 0,142$)

Prosečni nivoi NGAL-a u urinu ispitanika sa boljom i lošijom prognozom glomerulonefritisa se nisu razlikovali na početku ispitivanja. ($p = 0,650$) Nakon korekcije vrednosti NGAL-a u urinu sa vrednošću kreatinina u urinu, odnos uNGAL/kreatinin se značajno razlikovao izmedju ispitanika sa boljom i lošijom prognozom glomerulonefritisa.

($p = 0,005$) Ispitanici sa lošijom prognozom glomerulonefritisa su imali značajno veće vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin u odnosu na ispitanike sa boljom prognozom oboljenja.

Ispitanici sa lošijom prognozom glomerulonefritisa su nakon minimalno šest meseci lečenja imali veće nivoe NGAL-a u serumu u odnosu na ispitanike sa boljom prognozom oboljenja, a razlika se nalazi na samoj granici statističke značajnosti. ($p = 0,058$) Nije primećena razlika u nivoima NGAL-a u urinu između ispitanika sa boljom i lošijom prognozom glomerulonefritisa, nakon najmanje šest meseci praćenja i lečenja. ($p = 0,304$). Iako su vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin, u tački 2, bile veće kod ispitanika sa lošijom prognozom glomerulonefritisa u odnosu na ispitanike sa boljom prognozom, razlika nije dostigla statističku značajnost. ($p = 0,317$)

5.9. NIVO NGAL-A I PARAMETRI BUBREŽNE FUNKCIJE

Tokom našeg ispitivanja su praćeni sledeći parametri bubrežne funkcije:

- serumske koncentracije kreatinina,
- serumske koncentracije ureje,
- serumske koncentracije kiseline,
- vrednosti klirensa kreatinina izmerenog iz 24-časovne mokraće i
- vrednosti klirensa kreatinina izračunatog prema MDRD formuli.

Prosečne vrednosti navedenih parametara izmerenih u tački 1 i tački 2 su izneti u tabeli 18.

Tabela 18. Prosečne vrednosti parametara bubrežne funkcije u tački 1 i tački 2

VARIJABLA	Tačka 1 (N = 60)				Tačka 2 (N = 57)			
	Mean	Min	Max	Std.Dev.	Mean	Min	Max	Std.Dev.
kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	111,68	49,00	1058,00	137,567	109,23	42,00	460,00	68,399
urea (mmol/l)	7,86	2,50	44,40	6,128	8,0	2,96	25,50	4,155
mokraćna kiselina ($\mu\text{mol/l}$)	355,87	187,00	672,00	103,723	373,03	212,00	793,00	108,966
CrCl – izmereni (ml/min/1,73m^2)	97,96	7,00	194,00	43,653	88,82	9,00	160,00	38,857
CrCl – MDRD (ml/min/1,73m^2)	70,73	5,90	127,60	29,261	70,64	9,10	141,90	31,366

Legenda: CrCl – klirens kreatinina

Za sve parametre bubrežne funkcije je određen koeficijent korelacije za nivo NGAL-a u serumu i NGAL-a u urinu, za tačku 1 ($n = 60$), tačku 2 ($n = 57$), kao u zbirno, uzimajući u obzir vrednosti dobijene u oba merenja ($n = 117$).

Utvrđeno je postojanje pozitivne linearne korelacije između vrednosti NGAL u serumu i vrednosti kreatinina, kako u tački 1 ($p = 0,000$) i tački 2 ($p = 0,000$), tako i zbirno gledajući vrednosti dobijene u oba merenja. ($p = 0,000$)

Rezultati istraživanja

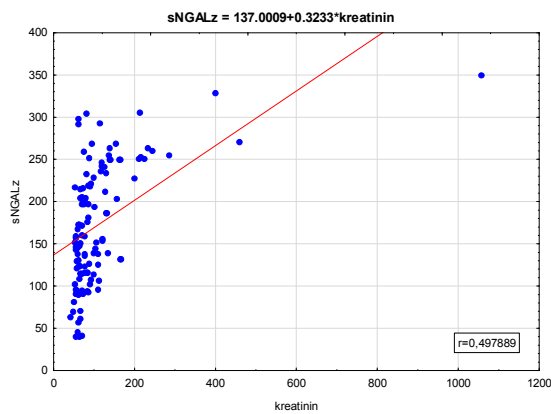
Utvrđeno je postojanje pozitivne linearne korelacije između vrednosti NGAL u serumu i vrednosti ureje, kako u tački 1 ($p = 0,000$) i tački 2 ($p = 0,000$), tako i zbirno gledajući vrednosti dobijene u oba merenja. ($p = 0,000$)

Tabela 19. Koeficijenti korelacije NGAL-a u serumu i parametara bubrežne funkcije

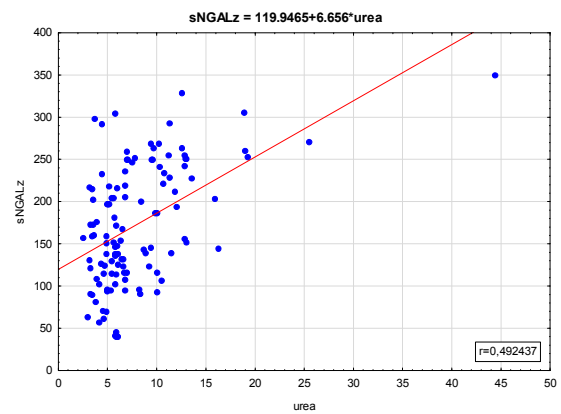
PARAMETAR BUBREŽNE FUNKCIJE	tačka 1		tačka 2		zbirno tačka 1 + tačka 2	
	Koeficijent korelacije za sNGAL	p-vrednost	Koeficijent korelacije za sNGAL	p-vrednost	Koeficijent korelacije za sNGAL	p-vrednost
kreatinin	0,510574	0,000031	0,551824	0,000009	0,497889	0,000000
urea	0,518521	0,000022	0,468924	0,000234	0,492437	0,000000
mokraćna kiselina	0,425000	0,000712	0,443051	0,000558	0,437149	0,000001
CrCl – izmereni	-0,444333	0,000376	-0,619926	0,000000	-0,526562	0,000000
CrCl – MDRD	-0,530593	0,000013	-0,586454	0,000002	-0,555064	0,000000

Legenda: CrCl – klirens kreatinina

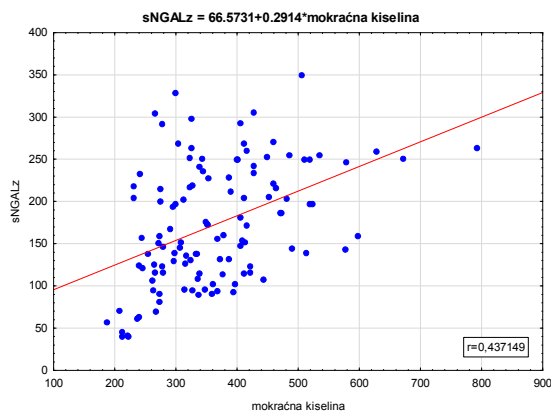
Utvrđeno je postojanje pozitivne linearne korelacije između vrednosti NGAL u serumu i vrednosti mokraćne kiseline, kako u tački 1 ($p = 0,001$) i tački 2 ($p = 0,001$), tako i zbirno gledajući vrednosti dobijene u oba merenja. ($p = 0,000$)



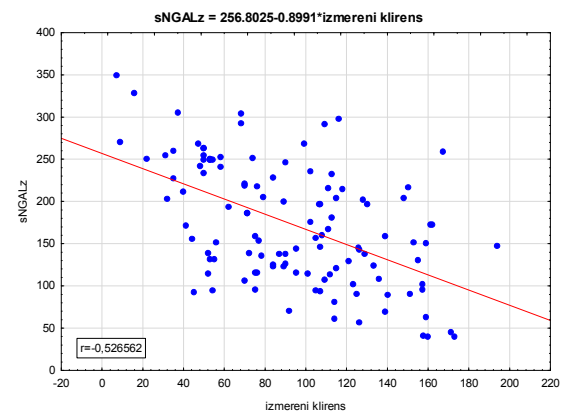
Grafikon 21. Korelacija NGAL u serumu i kreatinina



Grafikon 22. Korelacija NGAL u serumu i ureje



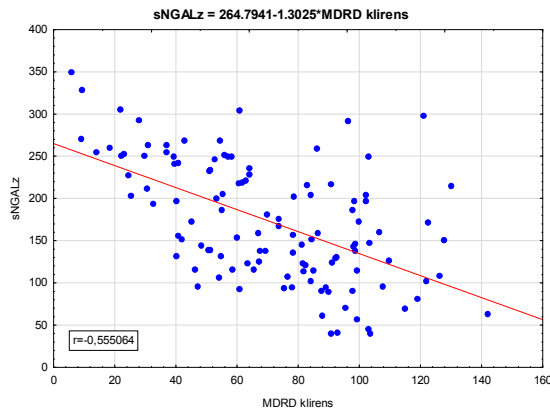
Grafikon 23. Korelacija NGAL-a u serumu i mokraćne kiseline



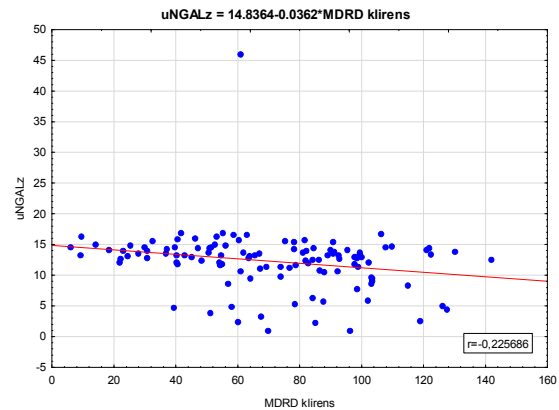
Grafikon 24. Korelacija NGAL-a u serumu i izmerenog klirensa kreatinina

Utvrđeno je postojanje negativne linearne korelacije između vrednosti NGAL u serumu i vrednosti klirensa kreatinina izmerenog iz 24-časovnog urina, kako u tački 1 ($p = 0,000$) i tački 2 ($p = 0,000$), tako i zbirno gledajući vrednosti dobijene u oba merenja. ($p = 0,000$)

Utvrđeno je postojanje negativne linearne korelacije između vrednosti NGAL u serumu i vrednosti klirensa kreatinina izračunatog MDRD formulom, kako u tački 1 ($p = 0,000$) i tački 2 ($p = 0,000$), tako i zbirno gledajući vrednosti dobijene u oba merenja. ($p = 0,000$)



Grafikon 25. Korelacija NGAL-a u serumu i MDRD klirensa



Grafikon 26. Korelacija NGAL-a u urinu i MDRD klirensa

Tabela 20. Koeficijenti korelacije NGAL-a u urinu i parametara bubrežne funkcije

PARAMETAR BUBREŽNE FUNKCIJE	tačka 1		tačka 2		zbirno	
	Koeficijent korelacije za uNGAL	p-vrednost	Koeficijent korelacije za uNGAL	p-vrednost	Koeficijent korelacije za uNGAL	p-vrednost
kreatinin	0,053733	0,683455	0,172535	0,199351	0,083009	0,373587
urea	0,071683	0,586255	0,269185	0,042886	0,126335	0,174689
mokraćna kiselina	-0,011205	0,932287	0,086139	0,524053	0,006647	0,943294
CrCl – izmereni	-0,249559	0,054485	-0,133432	0,322416	-0,166421	0,072922
CrCl – MDRD	-0,224586	0,084500	-0,257757	0,052897	-0,225686	0,014421

Legenda: CrCl – klirens kreatinina

Određivanjem koeficijenta korelacije je utvrđeno postojanje pozitivne linearne korelacije između vrednosti NGAL-a u urinu i vrednosti ureje, u tački 2. ($p = 0,043$)

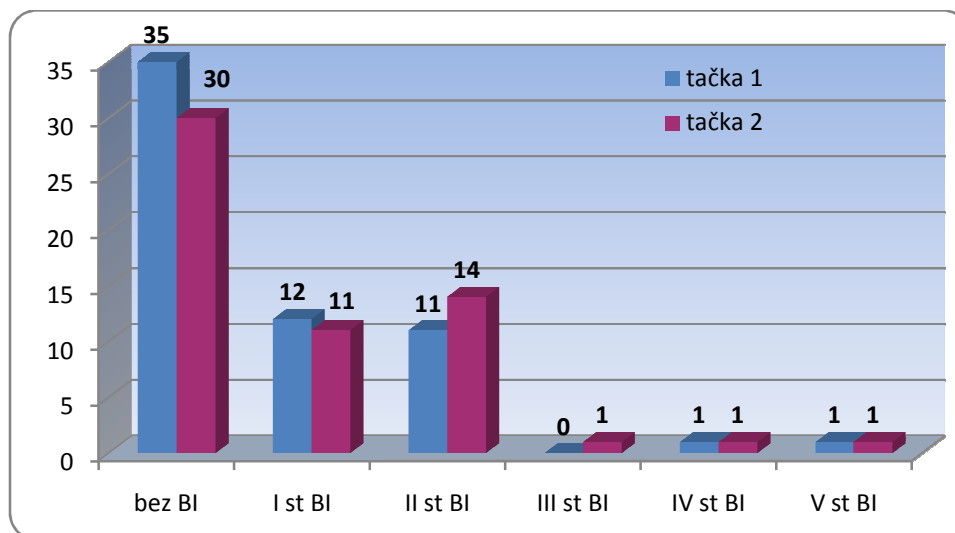
Određivanjem koeficijenta korelacije je utvrđeno postojanje negativne linearne korelacije između zbirnih vrednosti NGAL-a u urinu u tačkama 1 i 2 i vrednosti klirensa kreatinina izračunatog MDRD formulom. ($p = 0,014$)

5.9.1. NIVO NGAL-A I BUBREŽNA INSUFICIJENCIJA

Za sve ispitanike je, ukoliko je postojalo oštećenje bubrežne funkcije, određen stadijum bubrežne insuficijencije u tački 1 i u tački 2, što je prikazano sledećim dijagramom.

Grupe ispitanika sa bubrežnom insuficijencijom III, IV i V stadijuma nisu uzete u dalju analizu, pošto sadrže mali broj ispitanika (jedno ili nijedno očitavanje), te nemaju varijansu potrebnu za statističke analize.

U tački 1 nije bilo ispitanika sa trećim stadijumom bubrežne insuficijencije.



Grafikon 27. Stadijumi bubrežne insuficijencije u tački 1 i tački 2

Prosečni nivoi NGAL-a u serumu, NGAL-a u urinu i vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin prema stadijumima bubrežne insuficijencije u tački 1, su iznete u tabeli 21.

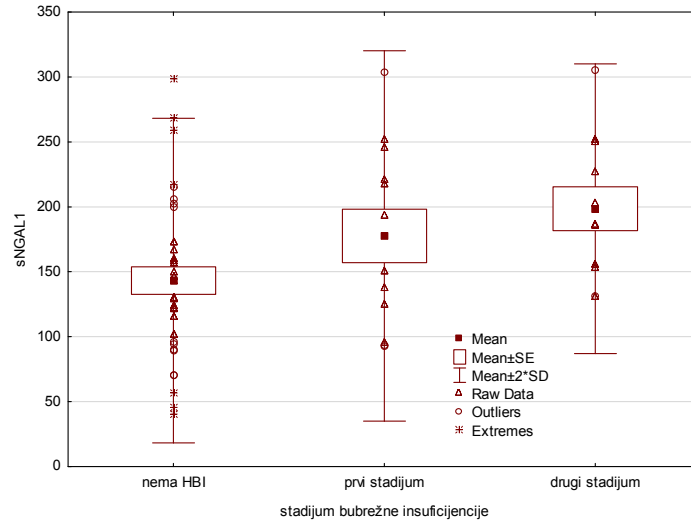
Tabela 21. Nivo NGAL-a u odnosu na stadijum bubrežne insuficijencije u tački 1

BUBREŽNA INSUFICIJENCIJA	Variable	tačka 1 NGAL (ng/ml) uNGAL/kreatinin (ng/mg)				
		N	Mean	Minimum	Maximum	Std.Dev.
bez bubrežne insuficijencije	sNGAL	35	143,2917	40,26000	298,1600	62,47982
	uNGAL		12,7987	4,48000	16,8300	2,94702
	uNGAL/kr		19,0615	4,82300	48,545	12,12429
I stadijum BI	sNGAL	12	177,6883	92,32000	303,8400	71,32040
	uNGAL		16,3018	3,20900	45,9800	10,09367
	uNGAL/kr		25,3041	7,69900	49,85800	13,74541
II stadijum BI	sNGAL	11	198,5900	131,2600	305,7400	55,78663
	uNGAL		12,4492	2,4420	15,8630	3,55993
	uNGAL/kr		17,0913	1,43900	43,57800	10,28618
IV stadijum BI	sNGAL	1	328,5200	328,5200	328,5200	/
	uNGAL		16,3520	16,3520	16,3520	/
	uNGAL/kr		2,3030	2,3030	2,3030	/
V stadijum BI	sNGAL	1	349,7400	349,7400	349,7400	/
	uNGAL		14,5930	14,5930	14,5930	/
	uNGAL/kr		4,5600	4,5600	4,5600	/

Na osnovu Kruskal-Wallis testa je utvrđeno da ispitanici sa postojanjem oštećenja bubrežne funkcije imaju značajno veće prosečne nivoe NGAL-a u serumu u odnosu na ispitanike bez oštećenja bubrežne funkcije, u tački 1. ($p = 0,004$)

Metodom višestrukog poredjenja je utvrđeno da postoji statistički značajna razlika u prosečnim nivoima NGAL-a u serumu u tački 1, u zavisnosti od stadijuma bubrežne insuficijencije. ($p = 0,028$)

Kruskal-Wallis-ov test je pokazao da su ispitanici u drugom stadijumu bubrežne insuficijencije imali značajno veće prosečne nivoe NGAL-a u serumu u poredjenju sa ispitanicima bez bubrežne insuficijencije ($p = 0,032$), što je grafički prikazano box dijagramom.



Grafikon 28. NGAL u serumu u tački 1 u odnosu na stadijume bubrežne insuficijencije

Izmedju ispitanika bez bubrežne insuficijencije i ispitanika sa I stadijumom BI nije uočena statistički značajna razlika u nivoima NGAL-a u serumu ($p = 0,475$), kao ni izmedju ispitanika u I stadijumu bubrežne insuficijencije i ispitanika u II stadijumu bubrežne insuficijencije. ($p = 0,981$)

Kruskal-Wallis-ovim testom nije utvrđena statistički značajna razlika u nivoima NGAL-a u urinu ($p = 0,141$) ili odnosa uNGAL/kreatinin ($p = 0,599$) u tački 1, u zavisnosti od stadijuma bubrežne insuficijencije.

Prosečni nivoi NGAL-a u serumu, NGAL-a u urinu i vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin prema stadijumima bubrežne insuficijencije u tački 2, su iznete u tabeli 22.

Na osnovu Kruskal-Wallis testa je utvrđeno da ispitanici sa postojanjem oštećenja bubrežne funkcije imaju značajno veće prosečne nivoe NGAL-a u serumu u odnosu na ispitanike bez oštećenja bubrežne funkcije, u tački 2. ($p = 0,000$)

Metodom višestrukog poredjenja je utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u nivoima NGAL-a u serumu u tački 2, u zavisnosti od stadijuma bubrežne insuficijencije. ($p = 0,000$)

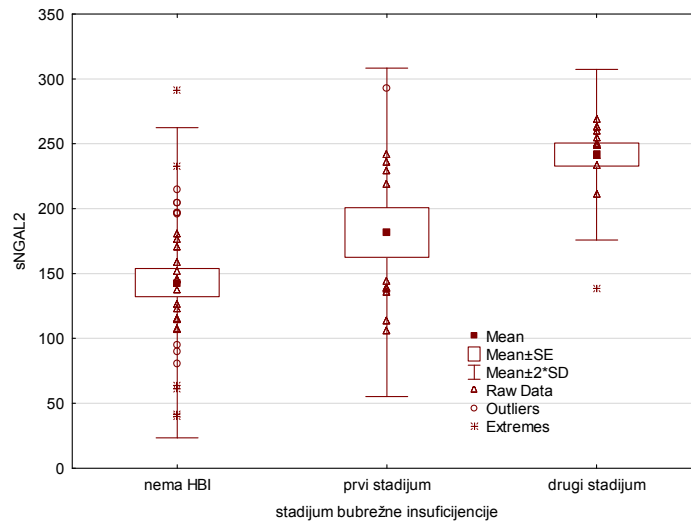
Ispitanici u drugom stadijumu bubrežne insuficijencije su imali značajno više prosečne nivoe NGAL-a u serumu u poredjenju sa ispitanicima bez bubrežne

insuficijencije, ($p = 0,000$), kao i u poredjenju sa ispitanicima sa prvim stadijumom bubrežne insuficijencije. ($p = 0,038$)

Tabela 22. Nivo NGAL-a u odnosu na stadijum bubrežne insuficijencije u tački 2

BUBREŽNA INSUFICIJENCIJA	Variable	tačka 2 NGAL (ng/ml) uNGAL/kreatinin (ng/mg)				
		N	Mean	Minimum	Maximum	Std.Dev.
bez bubrežne insuficijencije	sNGAL2	30	143,0027	39,58000	291,7000	59,76650
	uNGAL2		10,4683	0,90800	14,6480	4,30905
	uNGAL/kr		16,3672	2,11200	45,58000	11,27266
I stadijum BI	sNGAL2	11	181,7136	106,5500	293,0800	63,29927
	uNGAL2		11,7745	5,2490	14,5330	2,54405
	uNGAL/kr		23,7408	4,19700	56,82400	16,44773
II stadijum BI	sNGAL2	14	241,7279	138,7400	268,9000	32,88911
	uNGAL2		10,9558	3,8230	14,4830	3,99470
	uNGAL/kr		20,3756	2,25300	42,67700	13,84226
III stadijum BI	sNGAL2	1	254,4600	254,4600	254,4600	/
	uNGAL2		14,9680	14,9680	14,9680	/
	uNGAL/kr		11,4070	11,40700	11,40700	/
IV stadijum BI	sNGAL2	1	271,0400	271,0400	271,0400	/
	uNGAL2		13,3070	13,3070	13,3070	/
	uNGAL/kr		39,2110	39,21100	39,21100	/

Izmedju ispitanika bez bubrežne insuficijencije i ispitanika sa I stadijumom BI nije uočena statistički značajna razlika u prosečnim nivoima NGAL-a u serumu ($p = 0,445$). Prethodno se može ilustrovati box dijagramom 29.



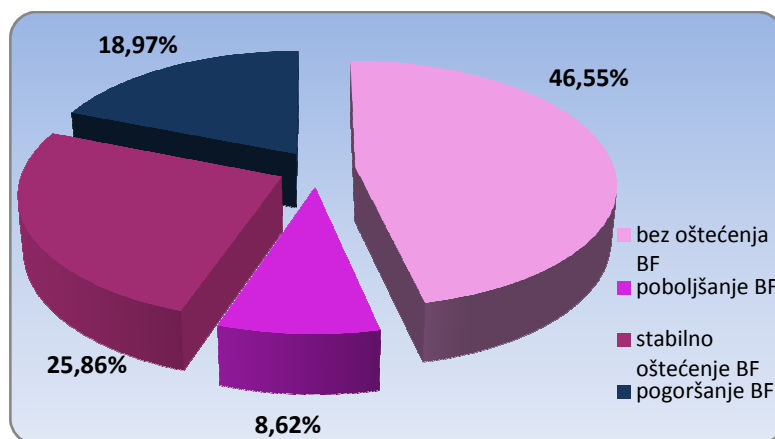
Grafikon 29. NGAL u serumu u tački 2 u odnosu na stadijume bubrežne insuficijencije

Kruskal-Wallis-ovim testom nije utvrđena statistički značajna razlika u prosečnim nivoima NGAL-a u urinu ($p = 0,732$) ili odnosa uNGAL/kreatinin ($p = 0,299$) u tački 2, u zavisnosti od stadijuma bubrežne insuficijencije.

5.9.2. NIVO NGAL-A I POGORŠANJE BUBREŽNE FUNKCIJE

Na osnovu parametara bubrežne funkcije pri postavljanju dijagnoze, u tački 1 i u tački preseka tokom praćenja ispitanika, tačka 2, ispitanici su podeljeni u četiri grupe:

- grupa ispitanika koji nisu imali oštećenje bubrežne funkcije pri postavljanju dijagnoze, a tokom perioda praćenja nije došlo do razvoja bubrežne insuficijencije n = 27; 46,55%,
- grupa ispitanika koji su imali oštećenje bubrežne funkcije pri postavljanju dijagnoze, a tokom perioda praćenja su popravili bubrežnu funkciju n = 5; 8,62%,
- grupa ispitanika koji su pri postavljanju dijagnoze imali bubrežno oštećenje koje se nije pogoršalo tokom perioda praćenja – stabilno oštećenje n = 15; 25,86%,
- grupa ispitanika koji su pogoršali bubrežnu funkciju, tokom perioda praćenja n = 11; 18,97%.



Grafikon 30. Efekat terapije na bubrežnu funkciju

Povoljnim efektom lečenja na bubrežnu funkciju se smatra poboljšanje bubrežne funkcije i održavanje uredne bubrežne funkcije ili početnih stadijuma (I i II stadijum) bubrežne insuficijencije. Pod nepovoljnim efektom lečenja na bubrežnu insuficijenciju se podrazumeva pogoršanje bubrežne funkcije

U našem ispitivanju nije bilo ispitanika koji su na početku oboljenja imali odmakli stadijum bubrežne insuficijencije (stadijum III i IV), a koji nisu tokom lečenja menjali svoju funkciju.

Povezanost pogoršanja bubrežne funkcije i nivoa NGAL-a je analizirana na 58 ispitanika, odnosno isključena su dva ispitanika koja se preminula tokom perioda praćenja.

Statistički je značajno veći broj ispitanika koji su imali povoljan efekat na bubrežnu funkciju tokom perioda praćenja (n = 47; 81,03%), u odnosu na broj ispitanika sa nepovoljnim efektom lečenja na bubrežnu funkciju (n = 11; 18,97%). (p = 0,001)

Prosečni nivoi NGAL-a u serumu, NGAL-a u urinu i odnosa uNGAL/kreatinin u tački 1, u odnosu sa efekte lečenja na bubrežnu funkciju su izneti u tabeli 23.

Tabela 23. Nivo NGAL-a u odnosu na efekte lečenja na bubrežnu funkciju

EFEKAT NA BUBREŽNU FUNKCIJU (BF)		Variable	tačka 1 NGAL (ng/ml) uNGAL/kreatinin (ng/mg)				
			N	Mean	Minimum	Maximum	Std.Dev.
POVOLJAN	bez oštećenja BF	sNGAL	27	152,9267	40,2600	349,7400	75,93446
		uNGAL		12,7251	4,48000	16,83000	2,80855
		uNGAL/kr		19,1922	5,91100	44,52800	10,9623
	poboljšanje BF	sNGAL	5	215,2200	156,1400	252,5600	40,9611
		uNGAL		15,3662	13,90900	16,54800	1,0088
		uNGAL/kr		14,9150	7,69900	23,08000	5,48054
	stabilno oštećenje BF	sNGAL	15	178,9433	93,78000	305,7400	67,87122
		uNGAL		14,2835	2,44200	45,98000	9,66411
		uNGAL/kr		22,0619	1,43900	49,85800	14,14270
	UKUPNO	sNGAL	47	167,8568	40,26000	349,7400	72,26130
		uNGAL		13,5034	2,44200	45,9800	5,82260
		uNGAL/kr		19,6530	1,43900	49,85800	11,65712
NEPOVOLJAN	pogoršanje BF	sNGAL	11	176,0354	92,3200	328,5200	76,81042
		uNGAL		14,2519	10,6650	16,6680	2,2190
		uNGAL/kr		21,9628	4,82300	43,67700	12,99575
	UKUPNO	sNGAL	11	176,0354	92,3200	328,5200	76,81042
		uNGAL		14,2519	10,6650	16,6680	2,2190
		uNGAL/kr		21,9628	4,82300	43,67700	12,99575

Upotrebom Mann-Whitney testa je utvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika između prosečnih nivoa NGAL-a u serumu između grupa ispitanika sa povoljnim i nepovoljnim odgovorom na bubrežnu funkciju u tački 1. ($p=0,777$)

Mann-Whitney-evim testom je utvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika između prosečnih nivoa NGAL-a u urinu između grupa ispitanika sa povoljnim i nepovoljnim odgovorom na bubrežnu funkciju u tački 1. ($p=0,407$)

Nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike između prosečnih vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin između grupa ispitanika sa povoljnim i nepovoljnim odgovorom na bubrežnu funkciju u tački 1. ($p=0,352$)

Ako ispitanike podelimo u dve grupe u odnosu na nivo NGAL-a u urinu u tački 1, a za granicu izmemo 16 ng/ml, dobijamo:

- grupa ispitanika sa vrednošću nivoa NGAL-a u urinu većom od 16 ng/ml ($n = 9$), u kojoj se nalaze 4 ispitanika sa nepovoljnim efektom lečenja na bubrežnu funkciju (4/9 - 44,44%) i
- grupa ispitanika sa vrednošću nivoa NGAL-a u urinu manjim od 16 ng/ml ($n = 49$), u kojoj se nalazi 7 ispitanika sa nepovoljnim efektom lečenja na bubrežnu funkciju (7/49 14,29%) .

Na osnovu Pearson Chi-kvadrat testa se zaključuje da postoji značajna razlika u distribuciji ispitanika u pomenute dve grupe. Veći procenat ispitanika sa pogoršanjem bubrežne funkcije je u grupi sa nivoom NGAL-a u urinu preko 16 ng/ml na početku ispitivanja. ($p = 0,034$) Ako kao graničnu vrednost za podelu na dve grupe ispitanika uzmemo nivo NGAL-a u urinu u tački 1 od 15,5ng/ml, primećujemo da povezanost između pogoršanja bubrežne funkcije i nivoa NGAL-a u urinu (15,5 ng/ml) u tački 1 i

dalje postoji ($p = 0,066$), ali za nivo značajnosti od $p = 0,1$. Ovo ukazuje na tendenciju da ispitanici sa nepovoljnim efektom lečenja na bubrežnu funkciju imaju nivo e NGAL-a u urinu veće od 16 ng/ml, na početku ispitivanja.

Ako ispitanike podelimo u dve grupe u odnosu na vrednost odnosa uNGAL/kreatinin u tački 1, a za granicu izmemo 22 ng/mg, dobijamo:

- grupa ispitanika sa vrednošću nivoa uNGAL/kreatinin većom od 22 ng/mg ($n = 17$), u kojoj se nalazi 6 ispitanika sa nepovoljnim efektom lečenja na bubrežnu funkciju (6/17 35,29%) i
- grupa ispitanika sa vrednošću nivoa uNGAL/kreatinin manjom od 22 ng/mg ($n = 41$), u kojoj se nalazi 5 ispitanika sa nepovoljnim efektom lečenja na bubrežnu funkciju (5/41 12,19%).

Na osnovu Pearson Chi-kvadrat testa se zaključuje da postoji povezanost između pogoršanja bubrežne funkcije i vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin preko 22 ng/mg na početku ispitivanja. ($p = 0,041$) Ovo ukazuje na tendenciju da ispitanici koji će imati loš efekat lečenja na bubrežnu funkciju imaju vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin veći od 22 ng/mg pri postavljanju dijagnoze.

U tabeli 24 su izneti prosečni nivoi NGAL u tački 2 u odnosu na efekte lečenja na bubrežnu funkciju.

Tabela 24. Nivo NGAL-a u odnosu na efekte lečenja na bubrežnu funkciju

EFEKAT NA BUBREŽNU FUNKCIJU (BF)		Variable	tačka 2 NGAL (ng/ml) uNGAL/kreatinin (ng/mg)				
			N	Mean	Minimum	Maximum	Std.Dev.
POVOLJAN	bez oštećenja BF	sNGAL	27	145,8596	39,5800	291,700	66,16554
		uNGAL		10,5027	0,90800	14,4700	4,38243
		uNGAL/kr		17,6850	2,11200	45,5800	12,45884
	poboljšanje BF	sNGAL	5	147,4380	114,2800	204,5600	40,81654
		uNGAL		11,235	5,92000	14,6480	3,46100
		uNGAL/kr		12,7374	9,18700	20,55400	4,68221
	stabilno oštećenje BF	sNGAL	15	221,7862	106,5500	263,3800	50,44006
		uNGAL		10,3285	3,82000	14,5300	3,96881
		uNGAL/kr		19,8778	2,25300	47,49800	14,45477
	UKUPNO	sNGAL	47	170,2596	39,58000	291,7000	68,30431
		uNGAL		10,5250	0,90800	14,6480	4,09373
		uNGAL/kr		17,8584	2,11200	47,49800	12,54709
NEPOVOLJAN	pogoršanje BF	sNGAL	10	219,6420	138,2200	293,0800	58,88454
		uNGAL		13,0549	9,4960	14,9680	1,60177
		uNGAL/kr		24,8694	4,19700	56,82400	15,56926
	UKUPNO	sNGAL	10	219,6420	138,2200	293,0800	58,88454
		uNGAL		13,0549	9,4960	14,9680	1,60177
		uNGAL/kr		24,8694	4,19700	56,82400	15,56926

Kruskal-Wallis-ovim testom je utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u nivoima NGAL-a u serumu u tački 2, u zavisnosti od efekta lečenja na bubrežnu funkciju. ($p = 0,001$)

Prosečan nivoa NGAL-a u serumu ispitanika koji su pogoršali bubrežnu funkciju, u tački 2, se značajno razlikovano od prosečnog nivoa NGAL-a u serumu u tački 2 ispitanika koji nemaju bubrežnu insuficijenciju ($p = 0,007$) i ispitanika koji su popravili bubrežnu funkciju. ($p = 0,020$) Značajna razlika nije primećena u odnosu na ispitanike sa stabilnim oštećenjem bubrežne fznkcije. ($p = 0,618$)

Prosečan nivoa NGAL-a u serumu ispitanika koji su imali stabilno oštećenje bubrežne funkcije, u tački 2, se značajno razlikovano od prosečnog nivoa NGAL-a u serumu u tački 2 ispitanika koji nemaju bubrežnu insuficijenciju ($p = 0,000$) i ispitanika koji su popravili bubrežnu funkciju. ($p = 0,000$)

Kruskal-Wallis-ovim testom je utvrđeno da su ispitanici koji su pogoršali bubrežnu funkciju imali značajno veće nivoe NGAL-a u urinu u tački 2 u odnosu na ispitanike koji su imali stabilno oštećenje bubrežbe funkcije ($p = 0,015$), ispitanike koji su popravili bubrežnu funkciju ($p = 0,032$) i ispitanike koji nisu imali oštećenje bubrežne funkcije ($0,020$).

Upotrebom Kruskal-Wallis-ovog testa je utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u prosečnoj vrednosti odnosa uNGAL/kreatininu tački 2, u zavisnosti od efekta lečenja na bubrežnu funkciju. ($p = 0,046$)

Ispitanici sa poboljšanjem bubrežne funkcije su imali statistički značajno niže vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin u tački 2 u odnosu na ispitanike koji nisu imali bubrežno oštećenje ($p = 0,001$) i ispitanike koji su pogoršali bubrežnu funkciju ($p = 0,003$) Razlika između ispitanika koji su poboljšali bubrežnu funkciju i koji su imali stabilno bubrežno oštećenje nije dostigla statističku značajnost. ($p = 0,064$)

Ispitanici bez bubrežnog oštećenja su imali statistički značajno niže vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin u tački 2 u odnosu na ispitanike koji su pogoršali bubrežnu funkciju. ($p = 0,025$) Ispitanici sa stabilnim bubrežnim oštećenjem su imali statistički značajno niže vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin u tački 2 u odnosu na ispitanike koji su pogoršali bubrežnu funkciju. ($p = 0,010$)

5.10. NIVO NGAL-A I 24-ČASOVNA PROTEINURIJA

Svim ispitanicima je kvantitativno određena proteinurija u 24-časovnom urinu, na početku ispitivanja i nakon minimalno šest meseci praćenja i lečenja glomerulonefritisa.

Prosečne vrednosti dnevne proteinurije su iznete u tabeli 25.

Tabela 25. Prosečne vrednosti dnevne proteinurije u tački 1 i tački 2

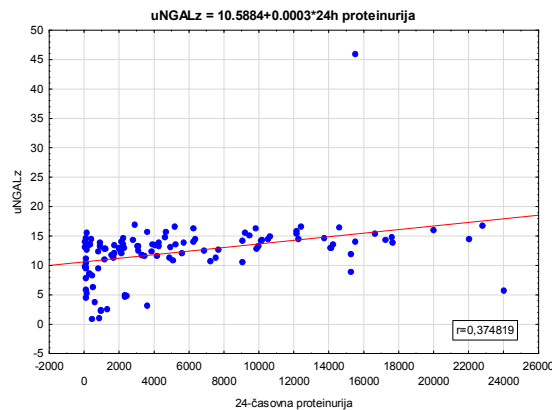
VARIJABLA	Tačka 1 (N = 60)				Tačka 2 (N = 57)			
	Mean	Min	Max	Std.Dev.	Mean	Min	Max	Std.Dev.
24h proteinurija (mg/dU)	7789,52	50,00	24000,00	6089,424	3139,78	50,00	22050,00	4721,301

Odredjivanjem koeficijenta korelacije nije utvrđeno postojanje korelacije između vrednosti 24-časovne proteinurije i nivoa NGAL-a u serumu. Koeficijent korelacije je određen za vrednosti u tački 1, tački 2, kao i za zbirne vrednosti dobije iz oba merenja.

Tabela 26. Koeficijenti korelacije za NGAL i 24h proteinuriju

VARIJABLA		sNGAL		uNGAL	
		Koeficijent korelacije	p-vrednost	Koeficijent korelacije	p-vrednost
24h proteinurija	tačka 1	0,156845	0,231390	0,283823	0,027975
	tačka 2	0,127870	0,343177	0,344815	0,008621
	zbirno	0,098284	0,291770	0,374819	0,000031

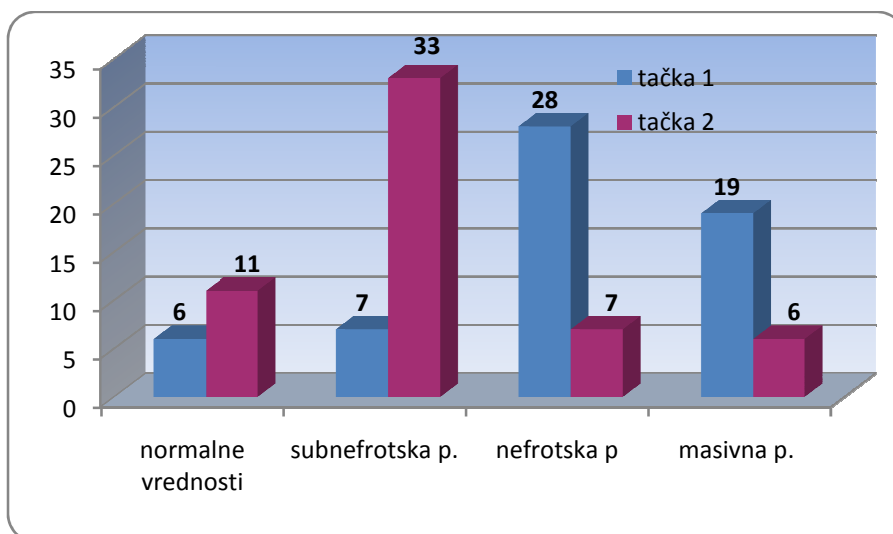
Utvrđeno je postojanje pozitivne linearne korelacije između vrednosti 24-časovne proteinurije i nivoa NGAL-a u urinu u tački 1 ($p = 0,028$), u tački 2 ($p = 0,008$), kao i ako se zbirno posmatraju vrednosti iz oba merenja ($p = 0,000$).



Grafikon 31. Korelacija između NGAL-a u urinu i 24h proteinurije

Na osnovu visine dnevne proteinurije, ispitanici su podeljeni u četiri grupe:

- grupa ispitanika sa normalnim vrednostima 24-časovne proteinurije (< 150 mg/dU)
- grupa ispitanika sa subnefrotskim vrednostima proteinurije (151 – 2999 mg/dU)
- grupa ispitanika sa nefrotskim vrednostima proteinurije (3000 – 9999 mg/dU)
- grupa ispitanika sa masivnom proteinurijom (> 10000 mg/dU)



Grafikon 32. Distribucija ispitanika prema proteinuriji u tački 1 i tački 2

Rezultati istraživanja

Prosečne vrednosti nivoa NGAL-a u serumu, NGAL-a u urinu i odnosa NGAL/kreatinin, u odnosu na vrednosti 24-časovne proteinurije su iznete u tabeli 27.

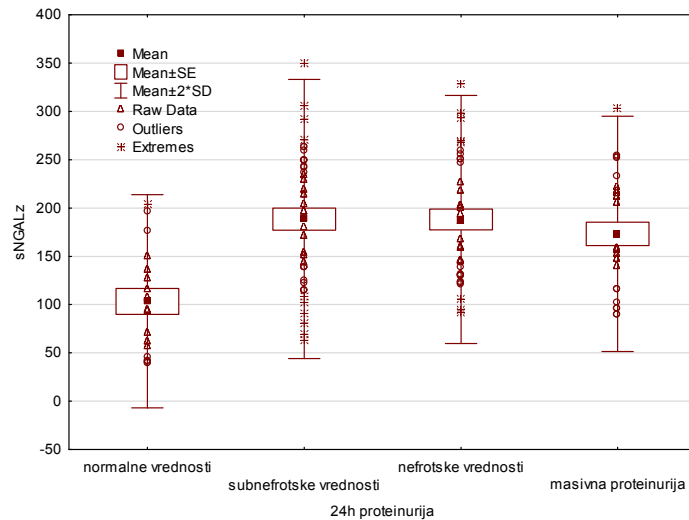
Tabela 27. Nivo NGAL-a u odnosu na 24h proteinuriju u tački 1 i tački 2

PRISUSTVO PROTEINURIJE		varijabla	tačka 1 NGAL (ng/ml) uNGAL/kreatinin (ng/mg)						
			N	%	Mean	Minimum	Maximum	Std.Dev.	
NORMALNA PROTEINURIJA		sNGAL	6	10	76,09667	40,26000	150,4400	41,20805	
		uNGAL			11,15733	4,48000	15,5160	4,08357	
		uNGAL/kr			16,4145	5,91100	37,07100	12,20979	
PATOLOŠKA PROTEINURIJA	subnephrotska proteinurija	sNGAL	7	11,67	179,7286	70,08000	349,7400	105,8565	
		uNGAL			11,1430	2,44200	16,9200	4,6911	
		uNGAL/kr			20,2961	1,43900	49,85800	18,09228	
	nephrotska proteinurija	sNGAL	28	46,67	182,7050	92,32000	328,5200	61,81910	
		uNGAL			13,1796	3,20900	16,6680	2,67294	
		uNGAL/kr			21,8724	4,82300	48,54500	12,34604	
	masivna proteinurija	sNGAL	19	31,67	167,3579	89,42000	303,8400	64,45237	
		uNGAL			15,6573	5,75200	45,9800	7,83220	
		uNGAL/kr			19,2890	5,6500	40,64600	10,53350	
	UKUPNO		sNGAL	54	90	176,9193	70,08000	349,7400	68,39401
			uNGAL			13,7874	2,44200	45,9800	5,41635
			uNGAL/kr			20,7591	1,43900	49,85800	12,40351
			tačka 2 NGAL (ng/ml) uNGAL/kreatinin (ng/mg)						
NORMALNA PROTEINURIJA		sNGAL	11	19,30	118,2382	39,58000	204,5600	57,75408	
		uNGAL			10,6993	5,24900	14,6480	3,19250	
		uNGAL/kr			16,0212	7,78400	39,64900	9,67560	
PATOLOŠKA PROTEINURIJA	subnephrotska proteinurija	sNGAL	33	57,90	190,4064	63,66000	291,7000	65,14782	
		uNGAL			10,0488	0,90800	14,4830	4,39467	
		uNGAL/kr			18,2761	2,1120	47,49800	13,55658	
	nephrotska proteinurija	sNGAL	7	12,28	209,3671	106,5500	293,0800	74,23783	
		uNGAL			12,8616	11,3720	13,6390	0,88172	
		uNGAL/kr			27,4607	9,27400	56,82400	16,83275	
	masivna proteinurija	sNGAL	6	10,53	191,5033	139,5600	254,4600	47,72782	
		uNGAL			14,3153	13,5700	14,9680	0,47944	
		uNGAL/kr			19,4118	7,05600	41,25400	11,87350	
	UKUPNO		sNGAL	46	80,70	193,4348	63,66000	293,0800	63,66139
			uNGAL			11,0333	0,90800	14,9680	4,06571
			uNGAL/kr			19,8219	2,1120	56,82400	13,96365

Pomoću Kruskal-Wallis-ovog testa je ispitano da li postoji statistički značajna razlika u prosečnim nivoima NGAL-a u serumu, između grupa ispitanika sa određenim stepenom dnevne proteinurije. Korišćene su zbirne vrednosti 24-h proteinurije i NGAL-a u serumu, dobijene u oba merenja (tačka 1 + tačka 2). Primećene su statistički značajne razlike u nivoima NGAL-a u serumu, između grupa ispitanika sa različitim vrednostima dnevne proteinurije. ($p = 0,000$) Na osnovu Kruskal-Wallis-ovog testa zaključujemo da vrednost NGAL-a u serumu zavisi od vrednosti 24-časovna proteinurije.

Metodom višestrukog poredjenja je utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u prosečnim nivoima NGAL-a u serumu između:

- grupe ispitanika sa normalnom proteinurijom i grupe sa subnefrotskom proteinurijom ($p = 0,000$),
- grupe ispitanika sa normalnom proteinurijom i grupe sa nefrotskom proteinurijom ($p = 0,000$),
- grupe ispitanika sa normalnom proteinurijom i grupe sa masivnom dnevnom proteinurijom ($p = 0,010$), što je i prikazano narednim dijagramom 33.



Grafikon 33. Nivo NGAL-a u serumu u odnosu na stepen 24h proteinurije

Nije primećena statistički značajna razlika u nivoima NGAL-a u serumu između grupa sa različitim stepenom patološke 24h proteinurije. ($p = 1,000$)

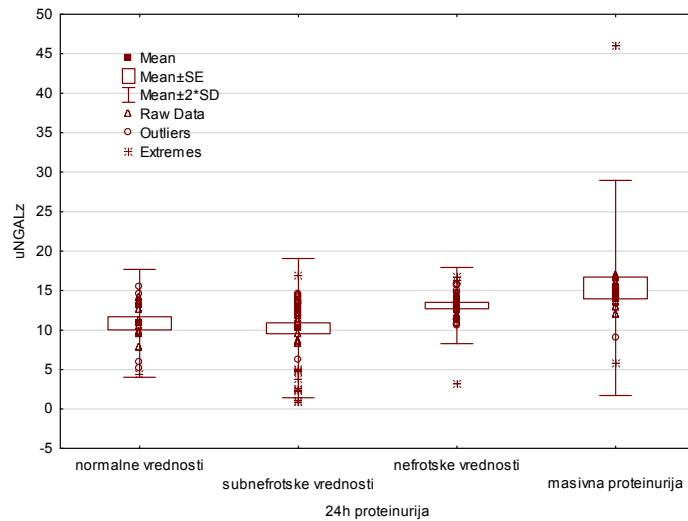
Poredjenjem nivoa NGAL-a u serumu između određenih grupa ispitanika u tački 1, odnosno tački 2 su dobijeni nivoi značajnosti izeti u tabeli 28.

Tabela 28. Nivoi značajnosti poredjenja nivoa NGAL-a u serumu prema 24h proteinuriji

NIVO PROTEINURIJE	normalna prot.	subnefrotska prot.	nefrotska prot.	masivna prot.
TAČKA 1	p – vrednost u odnosu na sNGAL			
normalna prot.	/	0,0000	0,0000	0,0012
subnefrotska prot.	0,0000	/	0,0004	0,1190
nefrotska prot.	0,0000	0,0004	/	0,0920
masivna prot.	0,0012	0,1190	0,0920	/
TAČKA 2	p – vrednost u odnosu na sNGAL			
normalna prot.	/	0,0000	0,0140	0,0002
subnefrotska prot.	0,0000	/	0,1010	0,0100
nefrotska prot.	0,0140	0,1010	/	0,0006
masivna prot.	0,0002	0,0100	0,0006	/

Pomoću Kruskal-Wallis-ovog testa je ispitano da li postoji statistički značajna razlika u prosečnim nivoima NGAL-a u urinu između grupa ispitanika sa određenim stepenom dnevne proteinurije. Korišćene su zbirno vrednosti 24-h proteinurije i NGAL-a u urinu, dobijene u oba merenja (tačka 1 + tačka 2).

Primećene su statistički značajne razlike u nivoima NGAL-a u urinu između grupa sa različitim visinama dnevne proteinurije. ($p = 0,000$) Na osnovu Kruskal-Wallis-ovog testa zaključujemo da vrednost NGAL-a u urinu zavise od vrednosti 24-časovna proteinurije.



Grafikon 34. Nivo NGAL-a u urinu i 24h proteinurija

Daljom analizom Kruskal-Wallis-ovim testom nivoa NGAL-a u urinu dobijamo statističke značajne razlike u nivoima NGAL-a u urinu između:

- grupe ispitanika bez postojanja proteinurije i grupe ispitanika sa masivnom proteinurijom ($p = 0,001$),
- grupe ispitanika sa subnefrotskom proteinurijom i grupe ispitanika sa nefrotskim stepenom proteinurije ($p = 0,026$),
- grupe ispitanika sa subnefrotskom proteinurijom i grupe ispitanika sa masivnom proteinurijom ($p = 0,000$).

Poredjenjem nivoa NGAL-a u urinu između određenih grupa ispitanika u tački 1, odnosno tački 2 su dobijeni nivoi značajnosti izeti u sledećoj tabeli.

Tabela 29. Nivoi značajnosti poredjenja nivoa NGAL-a u urinu prema 24h proteinuriji

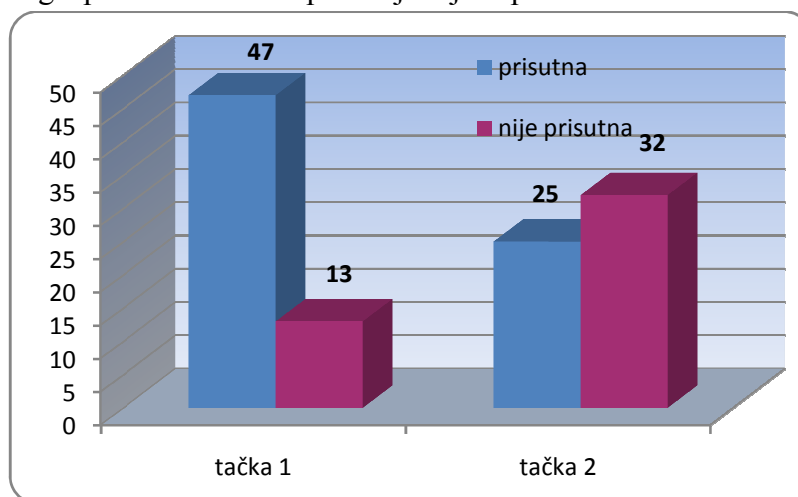
NIVO PROTEINURIJE	normalna prot.	subnefrotska prot.	nefrotska prot.	masivna prot.
TAČKA 1	p – vrednost u odnosu na uNGAL			
normalna prot.	/	0,0760	0,0290	0,0020
subnefrotska prot.	0,0760	/	0,0023	0,0008
nefrotska prot.	0,0290	0,0023	/	0,0004
masivna prot.	0,0020	0,0008	0,0004	/
TAČKA 2	p - vrednost u odnosu na uNGAL			
normalna prot.	/	0,8600	0,0940	0,0048
subnefrotska prot.	0,8600	/	0,1940	0,0006
nefrotska prot.	0,0940	0,1940	/	0,0066
masivna prot.	0,0048	0,0006	0,0066	/

Nije dokazano postojanje korelacije između dnevne proteinurije i odnosa uNGAL/kreatinin. ($p = 0,087$)

5.11. NIVO NGAL-A I MIKROHEMATURIJA

Na osnovu prisustva mikrohematurije u nalazu urina, ispitanici su podeljeni u dve grupe:

- grupa ispitanika kod kojih je mikrohematurija prisutna u nalazu urina,
 - grupa ispitanika kod kojih mikrohematurija nije prisutna u nalazu urina.
- Ni kod jednog ispitanika tokom ispitivanja nije zapažena makrohematurija.



Grafikon 35. Prisustvo mikrohematurije

Prosečne vrednosti nivoa NGAL-a u serumu, NGAL-a u urinu i odnosa NGAL/kreatinin, u odnosu na postojanje mikrohematurije su iznete u tabeli 30.

Tabela br. 30. Prosečni nivoi NGAL-a u odnosu na prisustvo mikrohematurije

POSTOJANJE MIKROHEMATURIJE	Variable	TAČKA 1 NGAL (ng/ml) uNGAL/kreatinin (ng/mg)					
		N	%	Prosek	Minimum	Maximum	Std.Dev.
mikrohematurija	sNGAL	47	78,33	171,2021	40,26000	349,7400	73,38616
	uNGAL			12,7474	2,44200	16,9200	3,45898
	uNGAL/kr			15,8684	1,43900	49,85800	14,09488
bez mikrohematurije	sNGAL	13	21,67	151,0554	92,32000	303,8400	70,37707
	uNGAL			16,3332	10,57800	45,9800	9,10254
	uNGAL/kr			20,5670	7,82100	44,528	11,02612
TAČKA 2 NGAL (ng/ml) uNGAL/kreatinin (ng/mg)							
mikrohematurija	sNGAL	25	43,86	183,6552	39,58000	293,0800	78,10770
	uNGAL			10,5786	0,90800	14,4670	4,03418
	uNGAL/kr			20,3979	2,11200	56,82400	14,70689
bez mikrohematurije	sNGAL	32	56,14	175,2263	63,66000	291,7000	61,82958
	uNGAL			11,2738	1,01600	14,9680	3,80740
	uNGAL/kr			10,1420	2,25300	45,58000	12,35383

Upotrebom Mann-Whitney testa nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u tački 1, u prosečnim nivoima NGAL-a u serumu ($p = 0,251$), NGAL-a u urinu (p

= 0,282), niti u prosečnim vrednostima odnosa uNGAL/kreatinin (0,462), između grupe ispitanika sa postojanjem mikrohematurije i grupe ispitanika bez postojanja mikrohematurije.

U tački 2 nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u prosečnim nivoima NGAL-a u serumu ($p = 0,590$), NGAL-a u urinu ($p = 0,484$), niti u prosečnim vrednostima odnosa uNGAL/kreatinin (0,658), između grupe ispitanika sa postojanjem mikrohematurije i grupe ispitanika bez postojanja mikrohematurije u nalazu urina.

5.12. NIVO NGAL-A, SERUMSKI ALBUMINI I UKUPNA KOLIČINA VODE U ORGANIZMU

Kod ispitanika su u tački 1 i tački 2 određene vrednosti albumina u serumu, a metodom električne bioimpedance je određena količina ukupne vode u organizmu (TBW – Total body water). Prosečne vrednosti navedenih parametara su iznešene u tabeli 31.

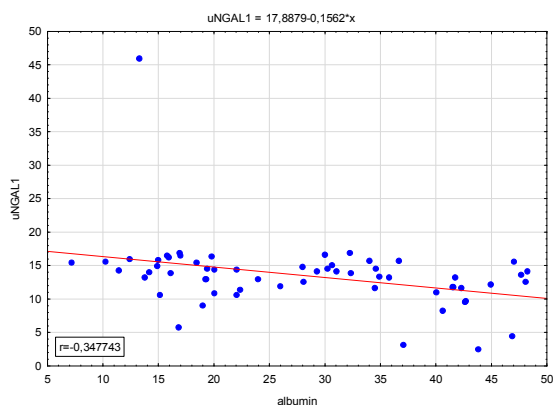
Za količinu albumina u serumu i ukupnu količinu vode u organizmu (TBW) je određen koeficijent korelacije za nivo NGAL-a u serumu i NGAL-a u urinu, za tačku 1 i tačku 2. Dobijeni koeficijenti korelacije su iznešeni u tabeli 32.

Tabela 31. Prosečne vrednosti serumskih albumina i ukupne vode u organizmu

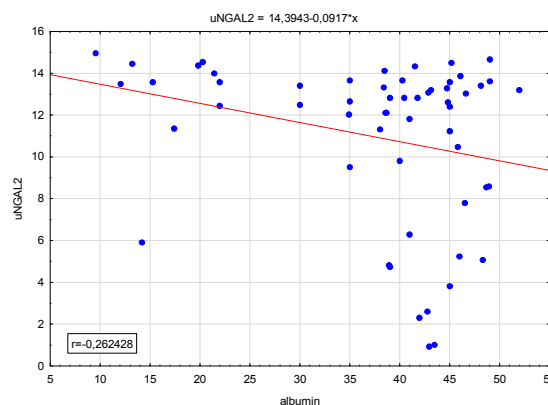
Varijabla		N	Mean	Median	Minimum	Maximum	Std.Dev.
albumini u serumu (g/l)	tačka 1	60	27,93933	28,05000	7,17000	48,20000	11,86573
	tačka 2	57	37,35411	41,00000	9,60000	52,00000	11,12818
TBW (%)	tačka 1	55	43,47455	42,30000	23,40000	60,30000	8,89261
	tačka 2	55	41,41091	41,10000	20,40000	60,30000	8,74462

Tabela 32. Koeficijenti korelacije za NGAL u odnosu na serumске albumine i TBW

	Varijabla	Koeficijent korelacije za NGAL u serumu	p-vrednost	Koeficijent korelacije za NGAL u urinu	p-vrednost
TAČKA 1	ser.albumini	-0,147677	0,260154	-0,347743	0,006480
	TBW	0,051628	0,708149	-0,012022	0,930582
TAČKA 2	ser.albumini	-0,189698	0,157559	-0,262428	0,048597
	TBW	0,070898	0,606995	0,100218	0,466614

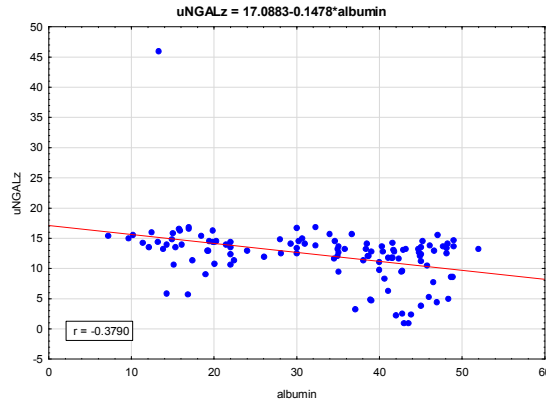


Grafikon 36. Korelacija između serumskih albumina i NGAL-a u urinu u tački 1



Grafikon 37. Korelacija između serumskih albumina i NGAL-a u urinu u tački 2

Utvrđeno je postojanje negativne linearne korelacije između vrednosti serumskih albumina i nivoa NGAL-a u urinu u tački 1 ($p = 0,006$) i u tački 2 ($p = 0,048$), kao i zbirno gledajući tačke 1 i 2, što je i prikazano na sledećim grafikonima.



Grafikon 38. Korelacija između serumskih albumina i NGAL-a u urinu (zbirno)

5.13. NIVO NGAL-A I PARAMETRI INFLAMACIJE

Tokom ispitivanja su praćeni sledeći parametri inflamacije:

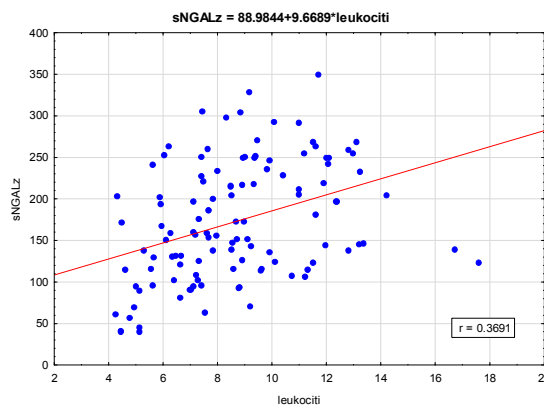
- broj leukocita,
- sedimentacija eritrocita SE,
- nivo C reaktivnog proteina CRP,
- nivo fibrinogena u serumu.

Prosečne vrednosti navedenih parametra u tački 1 i tački 2 su iznešeni u tabeli 33.

Tabela 33. Prosečne vrednosti parametara inflamacije

VARIJABLA	Tačka 1 (N = 60)				Tačka 2 (N = 57)			
	Mean	Min	Max	Std.Dev.	Mean	Min	Max	Std.Dev.
br.leukocita	7,68	4,30	12,80	1,878	9,69	4,26	17,60	3,052
SE (mm/h)	48,62	4,00	120,00	27,530	28,404	3,00	94,00	27,653
CRP (mg/l)	5,83	0,20	69,90	12,078	3,09	0,10	15,30	3,876
fibrinogen (g/l)	4,99	2,78	11,55	1,642	4,20	2,00	7,22	1,113

Modelom višestruke regresije i realizovanog uzorka, je ispitano postojanje uticaja parametara inflamacije na nivo NGAL-a u serumu, odnosno NGAL-a u urinu.



Grafikon 39. Korelacija između broja leukocita i nivoa NGAL-a u serumu

Utvrđeno je postojanje statistički značajne povezanosti broja leukocita sa nivoom NGAL-a u serumu u tački 1 ($p = 0,007$), u tački 2 ($p = 0,050$) i zbirno gledajući obe tačke ($p = 0,000$).

To potvrđuju i koeficijenti korelacije između broja leukocita i nivoa NGAL-a u serumu, koji su statistički različiti od nule, za vrednosti u tački 1 i u tački 2 i zbirno gledajući.

Nije utvrđeno postojanje statistički značajne povezanosti sedimentacije eritrocita, vrednosti C reaktivnog proteina ili fibrinogena u serumu sa nivoom NGAL-a u serumu.

U tački 1 nije utvrđeno postojanje statistički značajnog uticaja ni jednog posmatranog parametra inflamacije na nivo NGAL-a u urinu. To potvrđuju i koeficijenti korelacije, koji nisu statistički različiti od nule

U tački 2, uticaj sedimentacije eritrocita na nivo NGAL-a u urinu je na samoj granici značajnosti ($p = 0,054$). U prilog statističke značajnosti ide i koeficijent korelacije između vrednosti sedimentacije eritrocita i nivoa NGAL-a u urinu u tački 2, koji je statistički različit od nule.

Nije utvrđeno postojanje statistički značajnog uticaja broja leukocita, vrednosti C reaktivnog proteina ili fibrinogena u serumu na nivo NGAL-a u urinu u tački 2.

U odnosu na broj leukocita u perifernoj krvi, ispitanici su podeljeni u dve grupe:

- grupa ispitanika sa normalnim brojem leukocita $\leq 10 \times 10^9/l$,
- grupa ispitanika sa povišenim brojem leukocita $> 10 \times 10^9/l$.

U tački 1 je bilo 90% ispitanika ($n = 54$) sa normalnim brojem leukocita, dok je ispitanika sa povišenim brojem leukocita bilo 10% ($n = 6$). Ispitanika sa normalnim brojem leukocita je u tački 2 bilo 54,39% ($n = 31$), a ispitanika sa povišenim brojem leukocita je 45,61% ($n = 26$). Ispitanici sa povišenim brojem leukocita su imali značajno veće prosečne vrednosti NGAL-a u serumu (204,186ng/ml) u odnosu na grupu ispitanika sa normalnim brojem leukocita (160,881ng/ml). ($p = 0,004$) Metodom Kruskal Wallis nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike nivoa NGAL-a u urinu između ispitanika sa normalnim i povišenim brojem leukocita u perifernoj krvi. ($p = 0,287$)

U odnosu na vrednost sedimentacije eritrocita (SE) u prvom satu, ispitanici su podeljeni u dve grupe:

- grupa ispitanika sa normalnim vrednostima sedimentacije eritrocita $\leq 10\text{mm/h}$,
- grupa ispitanika sa povišenim vrednostima sedimentacije eritrocita $> 10\text{mm/h}$.

U tački 1 je bilo 6,67% ispitanika ($n = 4$) sa normalnim vrednostima SE, dok je u grupi ispitanika sa povišenim vrednostima SE bilo 93,33% ispitanika ($n = 56$). Ispitanika sa normalnim vrednostima SE je u tački 2 bilo 35,09% ($n = 20$), a ispitanika sa povišenim vrednostima SE je bilo 64,91% ispitanika ($n = 37$). Metodom Kruskal Wallis nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u nivoima NGAL-a u serumu između grupe ispitanika sa normalnim i grupe sa povišenim vrednostima SE. ($p = 0,671$) Ispitanici sa

povišenim vrednostima SE u prvom satu, su imali značajno veće nivoe NGAL-a u urinu (12,682 ng/ml) u odnosu na ispitanike sa normalnim vrednostima SE (10,720 ng/ml). ($p = 0,007$)

U odnosu na nivo C reaktivnog proteina (CRP) u serumu, ispitanici su podeljeni u dve grupe:

- grupa ispitanika sa normalnim nivoom C reaktivnog proteina $\leq 5\text{mg/l}$,
- grupa ispitanika sa povišenim nivoom C reaktivnog proteina $> 5\text{mg/l}$.

Na početku ispitivanja je bilo 76,67% ispitanika ($n = 46$) u grupi sa normalnim nivoom C reaktivnog proteina, dok je u grupi ispitanika sa povišenim nivoom C reaktivnog proteina bilo 23,33% ispitanika ($n = 14$). Ispitanika sa normalnim nivoom C reaktivnog proteina je u tački 2 bilo 82,46% ($n = 47$), a ispitanika sa povišenim nivoom C reaktivnog proteina je bilo 17,54% ($n = 10$). Medotom Kruskal Wallis nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u nivoima NGAL-a u serumu izmedju grupa ispitanika sa normalnim i povišenim nivoom C reaktivnog proteina. ($p = 0,141$) Nije utvrđena ni statistički značajna razlika u nivoima NGAL-a u urinu izmedju grupa ispitanika sa normalnim i povišenim nivoom C reaktivnog proteina. ($p = 0,104$)

U odnosu na nivo fibrinogena u serumu, ispitanici su podeljeni u dve grupe:

- grupa ispitanika sa normalnim nivoom fibrinogena u serumu $\leq 4\text{g/l}$,
- grupa ispitanika sa povišenim nivoom fibrinogena u serumu $> 4\text{mg/l}$.

U tački 1 je bilo 26,67% ispitanika ($n = 16$) sa normalnim nivoom fibrinogena u serumu, dok je u grupi ispitanika sa povišenim nivoom fibrinogena u serumu bilo 73,33% ispitanika ($n = 44$). Ispitanika sa normalnim nivoom fibrinogena u serumu je u tački 2 bilo 50,88% ispitanika ($n = 29$), a ispitanika sa povišenim nivoom fibrinogena u serumu je bilo 49,12% ispitanika ($n = 28$). Ispitanici sa povišenim nivoom fibrinogena u serumu su imali značajno veće prosečne nivoe NGAL-a u serumu (187,210 ng/ml) u odnosu na grupu ispitanika sa normalnim nivoom fibrinogena u serumu (149,549 ng/ml). ($p = 0,006$) Ispitanici sa povišenim nivoom fibrinogena u serumu su imali značajno veće prosečne nivoe NGAL-a u urinu (13,451 ng/ml) u odnosu na grupu ispitanika sa normalnim nivoom fibrinogena u serumu (10,404 ng/ml). ($p = 0,000$)

5.14. NIVO NGAL-A I PARAMETRI METABOLIZMA GVOŽDJA

Tokom ispitivanja su praćeni sledeći parametri metabolizma gvoždja:

- nivo gvoždja u serumu – feremija,
- vrednost hematokrita,
- feritin u serumu,
- transferin u serumu,
- saturacija transferina, izračunata pomoću vrednosti gvoždja u serumu i transferina u serumu.

Prosečne vrednosti navedenih parametra u tački 1 i tački 2 su iznešeni u tabeli 34.

Tabela 34. Prosečne vrednosti parametara metabolizma gvoždja

VARIJABLA	Tačka 1 (N = 60)				Tačka 2 (N = 57)			
	Mean	Min	Max	Std.Dev.	Mean	Min	Max	Std.Dev.
feremija (µmol/l)	14,44	3,10	26,20	5,956	13,86	1,90	27,40	6,319
hematokrit	0,40	0,28	0,49	0,049	0,40	0,26	0,49	0,058
feritin (µg/l)	124,02	10,00	461,00	110,555	122,17	5,20	794,50	131,052
transferin (g/l)	1,67	0,51	3,14	0,591	2,11	1,00	4,10	0,615
saturacija trans. (%)	37,89	6,40	90,74	17,618	27,71	3,30	62,35	13,661

Na osnovu modela višestruke regresije i realizovanog uzorka, može se zaključiti da u tački 1 za NGAL u serumu nema koeficijenata modela koji su statistički značajno različiti od nule, odnosno nema statistički značajnog uticaja nivoa gvoždja u serumu, vrednosti hematokrita, nivoa feritina u serumu, nivoa transferina u serumu niti saturacije transferina na nivo NGAL-a u serumu.

Nije utvrđeno postojanje statistički značajnog uticaja nivoa gvoždja u serumu, vrednosti hematokrita, nivoa feritina u serumu, nivoa transferina u serumu niti saturacije transferina na nivo NGAL-a u serumu u tački 2.

Na osnovu modela višestruke regresije i realizovanog uzorka, može se zaključiti da u tački 1 za NGAL u urinu nema koeficijenata modela koji su statistički značajno različiti od nule, odnosno nema statistički značajnog uticaja nivoa gvoždja u serumu, vrednosti hematokrita, nivoa feritina u serumu, nivoa transferina u serumu niti saturacije transferina na nivo NGAL-a u urinu.

Modelom višestruke regresije i realizovanog uzorka je zaključeno da je uticaj nivoa transferina u serumu na nivo NGAL-a u urinu, u tački 2 statistički značajan ($p = 0,001$).

U odnosu na nivo gvoždja u serumu, ispitanici su podeljeni u dve grupe:

- grupa ispitanika sa normalnim nivoom gvoždja u serumu $\geq 9 \mu\text{mol/l}$,
- grupa ispitanika sa sniženim nivoom gvoždja u serumu $< 9 \mu\text{mol/l}$.

Posmatranjem nivoa gvoždja u serumu, zapaženo je da je u tački 1 bilo 80% ispitanika ($n = 48$) sa normalnim vrednostima gvoždja serumu i 20% ispitanika ($n = 12$) sa sniženim vrednostima gvoždja u serumu. U tački 2 je bilo 75,44% ispitanika ($n = 43$) sa normalnim vrednostima gvoždja serumu i 24,56% ispitanika ($n = 14$) sa sniženim vrednostima gvoždja u serumu. Metodom Kruskal Wallis nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike između nivoa NGAL-a u serumu ($p = 0,916$), niti nivoa NGAL-a u urinu ($p = 0,880$) između grupe ispitanika sa normalnim vrednostima gvoždja u serumu i grupe sa smanjenim vrednostima gvoždja u serumu.

U odnosu na vrednost hematokrita, ispitanici su podeljeni u dve grupe:

- grupa ispitanika sa normalnim vrednostima hematokrita, što bi za osobe ženskog pola iznosilo $\geq 35\%$, a za osobe muškog pola $\geq 40\%$,
- grupa ispitanika sa sniženim vrednostima hematokrita, što bi za osobe ženskog pola iznosilo $< 35\%$, a za osobe muškog pola $< 40\%$.

U tački 1 je bilo 70% ispitanika (n = 42) sa normalnim vrednostima hematokrita i 30% ispitanika (n = 18) sa sniženim vrednostima hematokrita. U tački 2 je zapaženo 75,44% ispitanika (n = 43) sa normalnim vrednostima hematokrita i 24,56% ispitanika (n = 14) sa sniženim vrednostima hematokrita. Metodom Kruskal Wallis utvrđeno je da grupa ispitanika sa smanjenim vrednostima hematokrita ima značajno veće nivoe NGAL-a u serumu (197,510 ng/ml) u odnosu na grupu ispitanika sa normalnim vrednostima hematokrita (163,394 ng/ml). (p = 0,038) Grupa ispitanika sa smanjenim vrednostima hematokrita takodje ima značajno veće nivoe NGAL-a u urinu (14,097 ng/ml) u odnosu na grupu ispitanika sa normalnim vrednostima hematokrita (11,595 ng/ml). (p = 0,038)

Samo jedan ispitanik u našoj studiji je tokom ispitivanja imao snižene vrednosti feritina, zbog čega poredjenja nivoa NGAL-a nisu radjena izmedju ispitanika sa normalnim i sniženim vrednostima feritina u serumu.

U odnosu na vrednosti transferina u serumu, ispitanici su podeljeni u dve grupe:

- grupa ispitanika sa normalnim nivoom transferina u serumu $\geq 1,8\text{g/l}$,
- grupa ispitanika sa sniženim nivoom transferina u serumu $< 1,8\text{g/l}$.

U tački 1 je bilo 43,33% ispitanika (n = 26) sa normalnim vrednostima transferina serumu i 56,67% ispitanika (n = 34) sa sniženim vrednostima transferina u serumu. U tački 2 je zapaženo 70,18% ispitanika (n = 40) sa normalnim vrednostima transferina serumu i 29,82% ispitanika (n = 17) sa sniženim vrednostima transferina u serumu. Metodom Kruskal Wallis nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike izmedju nivoa NGAL-a u serumu (p = 0,152), izmedju grupe ispitanika sa normalnim vrednostima transferina u serumu i grupe sa smanjenim vrednostima transferina u serumu. Grupa ispitanika sa normalnim vrednostima transferina u serumu je imala značajno manji prosečan nivo NGAL-a u urinu (10,756 ng/ml) u odnosu na grupu ispitanika sa sniženim vrednostima transferina u serumu (13,999 ng/ml). (p = 0,000)

U odnosu na vrednosti saturacije transferina, ispitanici su podeljeni u dve grupe:

- grupa ispitanika sa normalnim vrednostima saturacije transferina, što bi za muškarce predstavljalo $\geq 20\%$, a za žene $\geq 15\%$,
- grupa ispitanika sa sniženim vrednostima saturacije transferina, što bi za muškarce predstavljalo $< 20\%$, a za žene $< 15\%$.

Posmatranjem vrednosti saturacije transferina, zapaženo je da je u tački 1 bilo 91,67% ispitanika (n = 55) sa normalnim vrednostima saturacije transferina i 8,33% ispitanika (n = 5) sa sniženim vrednostima saturacije transferina. U tački 2 je zapaženo 77,19% (n = 44) sa normalnim vrednostima saturacije transferina i 22,81% ispitanika (n = 13) sa sniženim vrednostima saturacije transferina. Metodom Kruskal Wallis nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u nivoima NGAL-a u serumu (p = 0,398), niti nivoima NGAL-a u urinu (p = 0,156) izmedju grupe ispitanika sa normalnim vrednostima saturacije transferina i grupe sa smanjenim vrednostima saturacije transferina.

5.15. NIVO NGAL-A I STEPEN UHRANJENOSTI

Tokom ispitivanja su praćeni sledeći parametri stepena uhranjenosti ispitanika:

- telesna težina,
- indeks telesne mase – BMI, izračunat na osnovu telesne težine i telesne visine ispitanika,
- procenat masnog tkiva u organizmu izmeren metodom električne bioimpedance,
- ukupna masa masnog tkiva u organizmu izmerena metodom električne bioimpedance.

Pregled metodom bioelektrične impedance sa određivanjem ukupne količine vode u organizmu, procenta masnog tkiva i ukupne mase masnog tkiva, je na početku ispitivanja urađen kod 91,67% ispitanika (55/60). Kod preostalih 8,33% ispitanika (5/60) pregled nije mogao biti urađen iz tehničkih razloga (teško opšte stanje bolesnika, nemogućnost ustajanja i hodanja i sl.) Iz istih razloga, pregled metodom bioimpedance, nakon minimalno 6 meseci lečenja nije urađen kod 3,51% ispitanika (2/57).

Prosečne vrednosti navedenih parametara u tački 1 i tački 2 su izneti u tabeli 35.

Tabela 35. Prosečne vrednosti parametara uhranjenosti

STEPEN UHRANJENOSTI		Descriptive Statistics (deo11)					
		N	Mean	Median	Minimum	Maximum	Std.Dev.
telesna masa (kg)	tačka 1	60	79,18167	77,00000	47,00000	131,0000	17,36057
	tačka 2	57	78,17544	75,70000	54,00000	125,0000	15,57107
BMI (kg/m ²)	tačka 1	60	27,86700	27,45500	17,26000	47,7500	5,29051
	tačka 2	57	27,45474	26,78000	20,72000	38,8700	4,66789
% masnog tkiva	tačka 1	55	25,21091	24,70000	4,40000	48,2000	9,97175
	tačka 2	55	25,77818	26,50000	3,30000	49,1000	10,30948
ukupna masa masnog tkiva (kg)	tačka 1	55	21,11818	20,40000	3,10000	46,5000	9,59054
	tačka 2	55	21,69091	21,60000	2,50000	48,0000	9,78544

Na osnovu modela višestruke regresije i realizovanog uzorka, može se zaključiti da u tački 1 za NGAL u serumu nema koeficijena modela koji su statistički značajno različiti od nule, odnosno nema statistički značajnog uticaja telesne mase, BMI, procenta masnog tkiva niti ukupne mase masnog tkiva na nivo NGAL-a u serumu.

Nije utvrđeno postojanje statistički značajnog uticaja telesne mase, BMI, procenta masnog tkiva niti ukupne mase masnog tkiva na nivo NGAL-a u serumu u tački 2.

Na osnovu modela višestruke regresije i realizovanog uzorka, nije utvrđeno postojanje statistički značajnog uticaja telesne mase, BMI, procenta masnog tkiva niti ukupne mase masnog tkiva na nivo NGAL-a u urinu u tački 1.

Nije utvrđeno postojanje statistički značajnog uticaja telesne mase, BMI, procenta masnog tkiva niti ukupne mase masnog tkiva na nivo NGAL-a u urinu u tački 2.

U odnosu na vrednosti indeksa telesne mase (BMI), ispitanici su podeljeni u dve grupe:

- grupa pothranjenih i normalno uhranjenih ispitanika, odnosno ispitanici sa BMI \leq 25,
- grupa previše uhranjenih i gojaznih ispitanika, odnosno ispitanici sa BMI $>$ 25.

U tački 1 je bilo 26,67% ispitanika (n = 16) u grupi sa BMI \leq 25, dok je u grupi ispitanika sa BMI $>$ 25 bilo 73,33% ispitanika (n = 44). Ispitanika sa BMI \leq 25 je u tački 2 bilo 36,84% ispitanika (n = 21), a ispitanika sa BMI $>$ 25 je bilo 63,16% (n = 36). Previše uhranjeni i gojazni ispitanici su imali značajno veće vrednosti NGAL-a u serumu (182,464 ng/ml) u odnosu na grupu pothranjenih i normalno uhranjenih ispitanika (151,674 ng/ml). (p = 0,026) Metodom Kruskal Wallis nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike između nivoa NGAL-a u urinu između grupe ispitanika sa BMI \leq 25 (12,291 ng/ml) i grupe ispitanika sa BMI $>$ 25 (12,274 ng/ml). (p = 0,273)

U odnosu na procenat masnog tkiva u organizmu ispitanici su podeljeni u dve grupe:

- grupa ispitanika sa malom i normalnom količinom masnog tkiva, što bi za osobe ženskog pola bilo \leq 35% masnog tkiva, a za osobe muškog pola \leq 22% masnog tkiva,
- grupa ispitanika sa povećanom i prekomernom količinom masnog tkiva, što bi za osobe ženskog pola bilo $>$ 35% masnog tkiva, a za osobe muškog pola $>$ 22% masnog tkiva.

U tački 1 je bilo 61,82% ispitanika (n = 34) sa malom i normalnom količinom masnog tkiva i 38,18% ispitanika (n = 21) sa povećanom i prekomernom količinom masnog tkiva u organizmu. U tački 2 je bilo 58,18% ispitanika (n = 32) sa malom i normalnom količinom masnog tkiva i 41,82% ispitanika (n = 23) sa povećanom i prekomernom količinom masnog tkiva u organizmu. Ispitanici sa povećanom i prekomernom količinom masnog tkiva u organizmu se imali značajno veće nivoe NGAL-a u serumu (196,136 ng/ml) u odnosu na ispitanike sa malom i normalnom količinom masnog tkiva (157,875 ng/ml). (p = 0,004) Metodom Kruskal Wallis nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike između nivoa NGAL-a u urinu između grupe ispitanika sa malom i normalnom količinom masnog tkiva (12,072 ng/ml) i grupe ispitanika sa povećanom i prekomernom količinom masnog tkiva (12,703 ng/ml). (p = 0,393)

6. DISKUSIJA

Glomerulonefritisi predstavljaju heterogenu grupu oboljenja u kojima je inflamatornim procesom predominantno oštećena struktura ili funkcija glomerulusa. Prvi opisi glomerulonefritisa potiču od Hipokrata, koji je opisao oboljenje sa bolovima u leđima i pojavom krvi u mokraći, koja u daljem toku dovodi do oligoanurije. U drugoj polovini XVIII veka je opisano oboljenje povezano sa šarlahom koje je dobilo naziv „vodena bolest“, a od 1827. godine Bright-ova bolest, po Richardu Brightu, koji je najdetaljnije opisao oboljenje, koje odgovara akutnom glomerulonefritisu. Razvojem mikroskopa se opisuju i patofiziološke promene na glomerulima u toku glomerulonefritisa. Početkom XX veka se započinje sa otvorenim biopsijama bubrega radi dobijanja i ispitivanja bubrežnog parenhima, a posle II svetskog rata i sa perkutanom biopsijama bubrega, koje sada predstavljaju uobičajenu proceduru u dijagnostici glomerulonefritisa.

Glomerulonefritisi se razlikuju prema etiopatogenezi, kliničkoj slici i morfološkim promenama bubrežnih struktura. U zavisnosti da li se glomerulonefritis javlja kao jedina manifestacija oboljenja ili je samo deo kliničke slike oboljenja koje zahvata više organskih sistema, glomerulonefritisi se dele na primarne i sekundarne. Ekstrarenalni poremećaji se, kod primarnih glomerulonefritisa, javljaju sekundarno, kao posledica oštećenja bubrežnog parenhima. Na osnovu morfoloških promena u bubrežnom parenhimu, glomerulonefritisi se dele na proliferativne i neproliferativne oblike. Neproliferativni glomerulonefritisi se odlikuju promenama glomerularne bazalne membrane i procesima skleroze. Proliferativni glomerulonefritisi se odlikuju umnožavanjem mezangijalnih, endotelnih ili epitelnih ćelija Bowman-ove kapsule glomerulusa.

Naše ispitivanje je obuhvatilo 60 bolesnika sa dijagnozom primarnog glomerulonefritisa, koji su lečeni na Klinici za nefrologiju i kliničku imunologiju Kliničkog centra Vojvodine u Novom Sadu, u periodu od januara 2012. godine do februara 2016. godine. Sekundarni uzroci glomerulonefritisa su isključeni na osnovu kliničkog nalaza i laboratorijskih analiza. Urinokulturom je isključeno prisustvo urinarne infekcije u momentu pregleda, koja bi mogla značajno uticati na vrednosti parametara inflamacije i NGAL-a. Kako u ispitivanje ne bi bili uključeni bolesnici kod kojih postoji oštećenje bubrežne funkcije uzrokovano višegodišnjom hipertenzijom, dijabetesom ili opstrukcijom urinarnog trakta, svim bolesnicima je urađen pregled očnog dna i ultrazvučni pregled bubrega.

Polna struktura naših bolesnika je bila homogena, odnosno uključeno je 51,67% muškaraca (31/60) i 48,33% žena (29/60). Bolesnici su pri postavljanju dijagnoze imali od 18 do 75 godina, sa prosečnom starošću od 50,88 godina. Najveći broj ispitanika je bio u starosnoj grupi od 50 - 59 godina, ali nije zapažena statistički značajna razlika u distribuciji bolesnika u određenim starosnim grupama, odnosno, može se smatrati da je uključena grupa bolesnika bila homogena po pitanju starosti na početku ispitivanja.

Kliničko-laboratorijski parametri, koji su praćeni u našem ispitivanju su određeni u dve tačke preseka. Prvu predstavlja period postavljanja dijagnoze, kada je svim bolesnicima, uz kliničko-laboratorijska ispitivanja urađena i perkutana biopsija bubrega pod kontrolom ultrazvuka. Druga tačka preseka je urađena u daljem toku praćenja i lečenja bolesnika, ali minimalno 6 meseci, a maksimalno 25 meseci nakon postavljanja

dijagnoze i uvođenja terapije primarnog glomerulonefritisa. Kod najvećeg broja bolesnika je kontrolni pregled urađen nakon 6 meseci, a prosečno vreme proteklo od postavljanja dijagnoze primarnog glomerulonefritisa do kontrolnog pregleda je iznosilo 11,42 meseca. Praćeni kliničko-laboratorijski parametri su pri postavljanju dijagnoze određeni kod 60 uključenih bolesnika, a pri kontrolnom pregledu kod 57 bolesnika (95%). Dvoje uključenih bolesnika je preminulo u periodu kraćem od šest meseci nakon postavljanja dijagnoze primarnog glomerulonefritisa, a jedan uključen bolesnik je u navedenom periodu razvio terminalni stadijum bubrežne insuficijencije, sa započinjanjem hroničnog hemodijaliznog programa. Dosadašnja ispitivanja lipokalina 2 su pokazala da bolesnici na hroničnoj hemodijalizi imaju značajno povišene nivoe lipokalina 2 u serumu, u odnosu na zdrave osobe, zbog postojanja oštećenja bubrežne funkcije, mikroinflamacije, oksidativnog stresa i poremećaja metabolizma gvoždja koji su prisutni kod ovih bolesnika, a neki autori povećane nivoe lipokalina 2 povezuju i sa samom procedurom hemodijalize. (80,91,119-121) Obzirom da se očekuje da će hemodijaliza značajno uticati na nivo NGAL-a u serumu, sa jedne strane, kao i činjenice da ovi bolesnici, kao posledica hemodijalize, razvijaju oligoanuriju što onemogućava adekvatno određivanje nivoa NGAL-a u urinu, bolesnik koji je nakon šest meseci lečenja bio na hroničnom dijaliznom programu, nije uključen u dalju statističku obradu.

Primarni glomerulonefritisi, iako veoma različiti prema etiologiji, imunopatogenezi i morfološkim promenama u bubrezima, klinički se ispoljavaju relativno ograničenim brojem sindroma, koji se razlikuju po prisustvu određenih kliničkih znakova oboljenja i laboratorijskih poremećaja. Sledećih pet kliničkih sindroma glomerulonefritisa se najčešće koriste u kliničkoj praksi: 1. Akutni nefritisni sindrom, 2. Brzo progresivni nefritisni sindrom, 3. Rekurentna ili perzistentna hematurija, 4. Hronični nefritisni sindrom, 5. Nefrotski sindrom.

Kod najvećeg procenta bolesnika u našoj studiji (68,33%), primarni glomerulonefritis se iskazao nefrotskim sindromom (41/60), što se značajno razlikuje u odnosu na procenat zastupljenosti ostalih kliničkih sindroma. Potom slede bolesnici sa kliničkom slikom asimptomatske, perzistentne proteinurije i mikrohematurije u 20% slučajeva (12/60). U značajno manjem procentu su uključeni bolesnici sa hroničnim nefritisnim sindromom 8,33% (5/60). Kod bolesnika sa procenjenim dužim trajanjem oboljenja do postavljanja dijagnoze, često se odustaje od perkutane biopsije bubrega, posebno u slučaju ultrasonografski verifikovanih smanjenih dimenzija bubrega ili uznapredovalih promena na očnom dnu, usled čega je procenat ovih bolesnika medju bioptiranima obično mali. Najmanje je bolesnika sa rapidoprogresivnim tokom oboljenja 3,33% (2/60), što odgovara relativno maloj incidenci ovog oboljenja u opštoj populaciji. (3-5)

Najveća zastupljenost nefrotskog sindroma medju kliničkim manifestacijama primarnih glomerulonefritisa, kod naših bolesnika odgovara podacima da nefrotski sindrom predstavlja najčešću indikaciju za perkutanu biopsiju bubrega. (3-5) Nefrotski sindrom je česta i ozbiljna klinička manifestacija primarnih glomerulonefritisa, koji karakteriše postojanje obilne proteinurije, testastih edema, hipoproteinemije i hiperlipidemije. Nefrotskom proteinurijom se smatraju dnevne vrednosti veće od

3gr/1,73m²/24h, iako se i manje vrednosti proteinurije, ako dovode po razvoja hipoalbuminemije i edema, mogu smatrati nefrotskim.

Arterijska hipertenzija se veoma često javlja u kliničkoj slici primarnih glomerulonefritisa i drugih oboljenja bubrega. Dužim trajanjem dovodi do razvoja nefroangioskleroze, sa sledstvenim oštećenjem bubrežne funkcije. Ponekad je veoma teško utvrditi da li je primarno bubrežna bolest dovela do razvoja arterijske hipertenzije ili su promene u bubrežnom parenhimu uzrokovane esencijalnom arterijskom hipertenzijom. Postojanje uznapredovalih angiosklerotskih promena na bubrežima takodje utiče na odluku o potrebi perkutane biopsije bubrega, kao i na izbor najadekvatnije terapije za bolesnika. U našem ispitivanju, arterijska hipertenzija je verifikovana kod 71,67% bolesnika (43/60) na početku ispitivanja. Na osnovu pregleda očnog dna i prisustva značajnih promena na krvnim sudovima svojstvenih hipertenzivnoj retinopatiji, uz anamnestičke podatke o postojanju i dužini trajanja arterijske hipertenzije, kao i ultrazvučni nalaz veličine bubrega i izgleda bubrežnog parenhima, je približno utvrđena dužina trajanja oboljenja pre postavljanja dijagnoze primarnog glomerulonefritisa, te u ispitivanje nisu uzeti bolesnici kod kojih se očekivalo da je ranije postojeća arterijska hipertenzija već dovela do značajnih promena na bubrežima i oštećenja bubrežne funkcije.

Dijagnoza primarnih glomerulonefritisa se postavlja na osnovu postojanja simptoma i kliničkih znakova glomerulonefritisa, uz laboratorijske nalaze proteinurije, hematurije, cilindara u sedimentu urina i oštećenja bubrežne funkcije. Radi potvrde dijagnoze i klasifikacije patohistološkog tipa glomerulonefritisa neophodna je perkutana biopsija bubrega sa analizom dobijenog uzorka bubrežnog tkiva svetlosnom, imunofluorescentnom i elektronskom mikroskopijom. Na osnovu morfoloških promena u bubrežnom parenhimu glomerulonefritisi se dele na proliferativne i neproliferativne oblike. U neproliferativni oblike spadaju glomerulonefritis minimalnih promena, fokalno-segmentna skleroza/hijalinoza i membranska nefropatija. U proliferativne oblike spadaju mezangioproliferativni glomerulonefritis, membranoproliferativni glomerulonefritis i ekstrakapilarni glomerulonefritis sa stvaranjem polumeseca (rapidoprogresivni-krescentni glomerulonefritis). Kod odredjenih bolesnika su promene na bubrežnom parenhimu posledica dugotrajnog procesa u bubrežima, te se ne vidjaju promene karakteristične za odredjeni oblik glomerulonefritisa, već samo znaci glomeruloskleroze, intersticijalne fibroze i atrofije tubula, te se kod ovih bolesnika postavlja dijagnoza hroničnog glomerulonefritisa. Bolesnici sa dijagnozom hroničnog glomerulonefritisa, su u našoj studiji svrstani u grupu neproliferativnih glomerulonefritisa, obzirom da u momentu perkutane biopsije bubrega nije verifikovano prisustvo značajne proliferacije ćelija u biopata bubrega.

Kod svih bolesnika uključenih u naše ispitivanje, dijagnoza primarnog glomerulonefritisa je potvrđena analizom tkiva dobijenog perkutanom biopsijom bubrega, pod kontrolom ultrazvuka. Dobijeni materijal je analiziran svetlosnom i imunofluorescentnom mikroskopijom, na osnovu čega je, uz kliničku sliku i nalaze laboratorijskih analiza, postavljena dijagnoza odredjenog tipa glomerulonefritisa. Kod najvećeg broja naših bolesnika je postavljena dijagnoza mezangioproliferativnog glomerulonefritisa - 40% (24/60), što se slaže sa podacima Axelsen i sar. koji u svom radu iznose da je mezangioproliferativni glomerulonefritis najčešći tip primarnih

glomerulonefritisa u Danskoj, odnosno Brauna i sar. gde je mezangioproliferativni glomerulonefritis najzastupljeniji u grupi od 200 ispitivanih bolesnika sa primarnim glomerulonefritisom. (122-124) Takodje, IgA nefropatija, podtip mezangioproliferativnih glomerulonefritisa, se smatra najčešćim tipom glomerulonefritisa, što su u svojim ispitivanja izneli i Briganti i sar., Hu i sar. i Naira i sar., koji iznose podatke da je IgA nefropatija najzastupljeniji vid glomerulonefritisa medju bioptiranim bolesnicima sa primarnim glomerulonefritisom u Australiji i medju belcima u Americi. (5,125-127) Posle mezangioproliferativnog glomerulonefritisa, sledeći po učestalosti u našoj studiji je hronični glomerulonefritis sa 16,67% bolesnika (10/60). Na trećem mestu po učestalosti se nalazi membranska nefropatija sa 15% bolesnika (9/60), potom ide membranoproliferativni glomerulonefritis sa 11,67% bolesnika (7/60), dok su u manjem procentu zastupljeni fokalno-segmentalna skleroza i hijalinoze sa 6,67% bolesnika (4/60) i rapidoprogresivni glomerulonefritis i glomerulonefritis minimalnih promena sa po 5% bolesnika (3/60). Prema podeli glomerulonefritisa u odnosu na postojanje ćelijske proliferacije u bubrežima, medju našim bolesnicima je bilo 56,67% bolesnika sa proliferativnim oblikom glomerulonefritisa (34/60) i 43,33% bolesnika sa neproliferativnim oblikom glomerulonefritisa (26/60), što se ne razlikuje značajno.

Terapija primarnih glomerulonefritisa se može podeliti na simptomatsku i imunosupresivnu terapiju. Simptomatska terapija na prvom mestu podrazumeva mere za smanjenje proteinurije i edema i lečenje arterijske hipertenzije, za čega se najčešće koriste ACE inhibitori i AT blokatori zbog kombinovanog antihipertenzivnog i hipoproteinuričnog efekta. Imunosupresivni lekovi su efikasniji u suzbijanju imunološki uslovljene inflamacije i usporavanju propradanja bubrežne funkcije. Kortikosteroidi predstavljaju lekove prvog izbora u terapiji glomerulonefritisa, a kada je njihova primena kontraindikovana ili nije dovoljna da se postigne kontrola bolesti, neophodno je uvođenje imunosupresora poput ciklofosfamida, ciklosporina, mikofenolat mofetila, azatioprina, hlorambucila ili drugih lekova.

U našem ispitivanju, samo simptomatska terapija je primenjivana kod 15% bolesnika (9/60). Medju ovim bolesnicima je veliki procenat 77,78% (7/9) bolesnika sa kliničkom manifestacijom perzistentne mikrohematurije, kod koje se očekuje dobra prognoza oboljenja, te se za većinu bolesnika ni ne preporučuje primena imunosupresiva. Kod preostalih 22,22% bolesnika (2/9) lečenih isključivo simptomatskom terapijom, bolest se iskazala hroničnim nefritisnim sindromom, ali bez izražene proteinurije ili brzog oštećenja bubrežne funkcije, te nisu zahtevali primenu imunosupresivne terapije. Ako bolesnike posmatramo prema patohistološkom tipu glomerulonefritisa, 66,67% bolesnika (6/9) lečenih samo simptomatskom terapijom je bilo sa dijagnozom mezangioproliferativnog glomerulonefritisa. Poznato je da se kod bolesnika sa mezangioproliferativnim glomerulonefritisom, posebno ako se klinički ne manifestuju nefrotskim sindromom, može očekivati blag i povoljan tok. (128,129) Obzirom da se kod ovih bolesnika ne očekuje brz razvoj bubrežne insuficijencije, u većini slučajeva se ne uvodi imunosupresivna terapija.

U terapiji glomerulonefritisa, neki od imunosupresivnih protokola je primenjivan kod 85% naših bolesnika (51/60). Monoterapijom kortikosteroidima je lečeno 40% bolesnika (24/60), kombinacijom kortikosteroida i ciklofosfamida 33,33% bolesnika

(20/60), kombinacijom kortikosteroida i ciklosporina A 10% bolesnika (6/60), dok je kod 1,67% bolesnika (1/60) primenjivana monoterapija ciklofosfamidom. Zbog svog poznatog i dokazanog antihipertenzivnog i hipoproteinurijskog efekta, inhibitori konvertaze angiotenzina (ACE inhibitori) su primenjivani kod 80% naših bolesnika (48/60).

Primarni glomerulonefritisi kod nekih bolesnika imaju blag tok i spontano se povlače uz minimalnu simptomatsku terapiju, a kod drugih veoma brzo dolazi do značajnog oštećenja bubrežne funkcije. Brojni faktori utiču na tok i prognozu primarnih glomerulonefritisa, od kojih je bitno navesti patohistološki tip glomerulonefritisa i pravovremeno postavljanje dijagnoze i započinjanje terapije. Ozbiljan tok bolesti sa lošom prognozom obično imaju glomerulonefritisi sa ekstrakapilarnim proliferacijama, membranoproliferativni glomerulonefritisi i fokalno-segmentna skleroza i hijalinoza. (15,124,127) Kod bolesnika sa hroničnim glomerulonefritsom se može očekivati brža progresija bubrežne insuficijencije, obzirom na već postojeće fibrosklerotične promene u bubrežima, na koje imunosupresivna terapija nema adekvatan efekat. Nešto bolju prognozu imaju glomerulonefritisi minimalnih promena i mezangioproliferativni glomerulonefritisi, uključujući i IgA nefropatiju. (15,124,127) U naše ispitivanje je uključeno 23,33% bolesnika (14/60) sa dijagnozama kod kojih se očekuje lošija prognoza oboljenja i uključuju krescentni GN, membranoproliferativni GN i fokalno segmentnu sklerozu i hijalinozu. Bolesnika sa dijagnozom kod koje se na osnovu dosadašnjih ispitivanja očekuje bolja prognoza oboljenja, što uključuje mezangioproliferativni GN, GN minimalnih promena, membransku nefropatiju i hronični GN je bilo 76,67% (46/60).

Tokom našeg ispitivanja, od ukupno 60 bolesnika, 20% je tokom perioda praćenja razvilo kompletnu remisiju (12/60). Parcijalna remisija je verifikovana kod 40% bolesnika (24/60). Kod 35% bolesnika (21/60) nije došlo do značajne promene u kliničkom statusu bolesnika. Jedan bolesnik (1,67%), da dijagnozom krescentnog glomerulonefritisa je pogoršao bubrežnu funkciju do terminalnog stadijuma, a dvoje bolesnika (3,33%) je preminulo. Poredjenjem podataka o ishodu lečenja primarnih glomerulonefritisa, dobijenih u našem ispitivanju, sa podacima Braun i sar. čije ispitivanje je sprovedeno na 200 bioptiranih bolesnika u četiri centra u Nemačkoj, gde je utvrđeno 19% kompletnih remisija, 14% parcijalnih remisija, 37% bolesnika kod kojih nije zapažen povoljan efekat terapije, 17% sa progresijom bolesti i bubrežnog oštećenja i smrtni ishod kod 13% bolesnika, tokom praćenja bolesnika prosečno 2,8 godina, zapažamo da je, u odnosu na ovo ispitivanje, kod većeg procenta naših bolesnika došlo do razvoja parcijalne remisije, a manje bolesnika je preminulo i imalo progresiju oboljenja. (123) Ove razlike se bar donekle mogu objasniti kraćim vremenom praćenja u našoj studiji. Tokom praćenja od godinu dana, Haef i sar. su kod bolesnika sa glomerulonefritisom u Danskoj imali značajno veći procenat smtnih ishoda (10%), kao i bolesnika koji zahtevaju započinjanje metoda zamene bubrežne funkcije ili pripremu za iste (14%), u odnosu na naše bolesnike. (124) Potrebno je istaći da su u ovom ispitivanju praćeni bolesnici sa primarnim i sekundarnim glomerulonefritisima, što utiče i na krajnji ishod lečenja, te da je broj praćenih bolesnika od preko 2.000 značajno veći od našeg.

Kao što je već pomenuto, jedan od najznačajnijih faktora rizika za loš ishod primarnih glomerulonefritisa predstavlja patohistološki tip glomerulonefritisa. Uz promene na glomerulusima u vidu mezangijalne, endokapilarne ili ekstrakapilarne proliferacija i

zadebljanja ili duplikatura glomerularne bazalne membrane, veoma je značajno postojanje promena na tubulima, intersticijumu i krvnim sudovima bubrega. Mnogobrojna ispitivanja su dokazala povezanost atrofije tubula i intersticijalne fibroze sa progresijom bubrežne insuficijencije. (14-19,123) Najizraženije promene u vidu ćelijske infiltracije i fibroze intersticijuma i tubularne atrofije, se zapažaju kod glomerulonefritisa za koje se zna da imaju lošiju prognozu, ekstrakapilarnog glomerulonefritisa, fokalno segmentne glomeruloskleroze i membranoproliferativnog glomerulonefritisa. (15) Na osnovu patohistološkog nalaza bioptata bubrega, kod 95% naših bolesnika (57/60) je semikvantitativno odredjen stepen intersticijalne fibroze i tubulske atrofije. Kod 5% bolesnika (3/60), dobijeni uzorak bubrežnog tkiva nije bio adekvatan za patohistološku analizu. Od ukupno 57 bolesnika, kod 36,84% (21/57) nije utvrđeno postojanje intersticijalne fibroze. Od preostalih 63,16% (36/57), blaga intersticijalna fibroza je verifikovana kod 36,84% bolesnika (21/57), umerene promene su pronadjene kod 21,05% bolesnika (12/57), dok je 5,26% bolesnika (3/57) imalo intenzivne promene po tipu intersticijalne fibroze. Postojanje atrofije tubula nije verifikovano kod 47,37% bolesnika (27/57), dok je tubulska atrofija bila prisutna kod 52,63% bolesnika (30/57). Blage promene su nadjene kod 29,82% bolesnika (17/57), umerena atrofija tubula je verifikovana kod 15,79% bolesnika (9/57), dok je 7,02% bolesnika (4/57) imalo intenzivne promene na tubulima.

Do sada izneto ukazuje na značaj perkutane biopsije bubrega i mikroskopskih pregleda dobijenog materijala, u postavljanju dijagnoze tipa primarnog glomerulonefritisa, što je neophodno za uključivanje adekvatne terapije, kao i verifikovanje postojanja faktora rizika za ozbiljan tok oboljenja i brzu progresiju bubrežnog oštećenja. Medjutim, problem se javlja kod bolesnika sa postojanjem kontraindikacija za perkutanu biopsiju bubrega. Iako je metoda široko rasprostranjena u dijagnostici bubrežnih oboljenja, procedura perkutane biopsije bubrega ili neke od potrebnih analiza uzoraka bubrežnog tkiva i dalje nisu dostupne svim zdravstvenim centrima. Takodje, materijal dobijen biopsijom bubrega nije uvek reprezentativan za dalju analizu. Sa druge strane, biopsija bubrega predstavlja invazivnu dijagnostičku proceduru, sa rizikom za razvoj komplikacija, od kojih su najčešća krvarenja u vidu hematurije ili formiranja perirealnog hematoma. (2,12) Sve navedeno ukazuje na potrebu pronalaženja i razvoja neinvazivnih metoda u dijagnostici glomerulonefritisa. Poslednjih godina se najviše ispitivanja radi u pravcu pronalaženja adekvatnog biomarkera, koji bi bar delimično dao uvid o tipu glomerulonefritisa i opsežnosti bubrežnih lezija, što bi pomoglo u izboru terapije i proceni toka oboljenja, a bez postojanja ranije navedenih prepreka u dijagnostici glomerulomefritisa. Potencijalni biomarker bi takodje pomogao u praćenju efekata primenjene terapije, kao i progresije oboljenja.

Termin biomarker je nastao skraćanjem izraza biološki marker, a predstavlja široku kategoriju medicinskih znakova, odnosno parametara, koje zapaža i meri stručno lice, po čemu se razlikuje od medicinskih simptoma, koje zapaža sam pacijent. (20) Sve veća pažnja koja se posvećuje biološkim markerima uslovljava pojavu različitih definicija ovog pojma. Svetska zdravstvena organizacija daje definiciju biomarkera kao bilo kojeg merenja, koje odražava interakciju između biološkog sistema i potencijalne opasnosti na njega, koje može biti hemijsko, fizičko ili biološko. Biomarker bi predstavljao medicinski

znak, koji se lako i jednostavno meri, sa stabilnim vrednostima u ponovljenim merenjima. Mora dobro korelisati sa postojanjem oboljenja i njegovom težinom, a odredjivati se u biološkim materijalima koji su lako dostupni. Potrebno je da ima dokumentovane referentne vrednosti, a da je cena procesa odredjivanja široko pristupačna. U biomarkere spadaju različiti molekuli koji su prisutni u biološkom uzorku u kojem se odredjuju (metaboliti, proteini, geni i sl. u uzorcima urina, krvi ili tkiva), fiziološki parametri (krvni pritisak, diureza i sl.) ili podaci dobijeni radiološkim tehnikama (kompjuterizovana tomografija, magnetna rezonanca i sl.)

Biomarkeri koji se razvijaju u nefrologiji se mogu odredjivati iz seruma ili plazme, urina ili u preparatu bubrežnog tkiva dobijeg perkutanom biopsijom bubrega. Serumski biomarkeri posebnu ulogu imaju kod anuričnih bolesnika. Neki od urinarnih biomarkera se i u fiziološkim uslovima nalaze u bubrezima, a oslobadjaju se tokom razvoja lezije, dok je stvaranje drugih indukovano tubularnim oštećenjem, te je za njihovu pojavu u urinu potrebno odredjeno vreme. U ovu grupu spada i NGAL. (21)

Lipokalin 2 je glikoprotein male molekulske mase (25kDa), član superfamilije lipokalina, koja sadrži preko 30 solubilnih glikoproteina. Sekundarna i tercijarna struktura svih lipokalina je kompleksna i karakteriše je prisustvo osam β lanaca, koji formiraju bačvastu strukturu kaliks, mesto za vezivanje liganda. (22-24,26-28) NGAL se sastoji od 198 aminokiselina, a gen za sintezu NGAL-a je lociran na hromozomskom lokusu 9q34.11. (23,24) U literaturi se lipokalin 2 prvi put pominje 1961.god., dok je prvi put izolovan 1989.god. iz bubrega miševa zaraženih majmunskim virusom. (23,24,27,31) Cabece i sar. su prvi lokalizovali NGAL u ljudskom organizmu, kao komponentu sekundarnih granula neutrofila. (23,30-36)

Zahvaljujući svojoj strukturi, molekul NGAL-a nije podložan fragmentaciji. Veoma dugo je stabilan u uzorcima zamrznutim na -80°C , a na temperaturi od 4°C je 7 dana stabilan u urinu. (130) Smatra se da ne dolazi do degradacije NGAL-a pri odmrzavanju i ponovnom zamrzavanju uzoraka. Ovo ga čini veoma pogodnim za laboratorijsko analiziranje.

NGAL se u organizmu javlja u tri molekularne izoforme: kao monomer, homodimer i heterodimer gde je monomer kovalentno vezan za neutrofilnu gelatinazu (MMP-9) disulfidnim mostom. (22,27,30,31,38,41) Odredjene izoforme NGAL-a su specifični za pojedine ćelije ili oboljenja.

Najvažniji ligandi NGAL-a su siderofori, jedinjenja koja luči veliki broj mikroorganizama, radi lakšeg preuzimanja gvoždja iz okoline. (23,31,37,58,59) Prisustvo bakterija dovodi do aktivacije toll-like receptora što stimuliše imuni odgovor. Aktivacija TLR za posledicu ima povećano oslobadjanje NGAL-a, koji vezuje bakterijske siderofore, čime sprečava ulazak siderofora i gvoždja u bakterijsku ćeliju. (26,28,31,38) Na ovom mehanizmu se zasniva bakteriostatsko dejstvo NGAL-a. Kada se NGAL u cirkulaciji nalazi kao samostalan protein, naziva se apo-NGAL, a po formiranju kompleksa NGAL:siderofor:Fe, naziva se holo-NGAL. (24,34,58,60) I sisari stvaraju jedinjenje veoma slično sideroforima, koje se naziva 2,5 – dihidroksi benzoična kiselina. (23,59)

Drugi značajan ligand lipokalina 2 je matriks mijeloperoksidaza 9, za koji se NGAL vezuje kovalentnim, sulfidnim vezama. NGAL dovodi do stabilizacije MMP-9, sprečava degradaciju i stimuliše njegovu proteolitičku aktivnost. (23,58,62,63) Iako je osnovna

funkcija MMP-9 razgradnja ekstraćelijskog matriksa, dokazano je da tokom bubrežnog oštećenja ima profibrotički efekat. (61,64) MMP-9 može indukovati prelaz epitelnih ćelija tubula u miofibroblaste, koji su odgovorni za povećanu proizvodnju ekstraćelijskog matriksa i na taj način pospešiti razvoj fibroze. (64)

Dokazano je postojanje dva tipa receptora za NGAL. Jedan je membranski receptor 24p3R čija je koncentracija najveća na apikalnim membrana distalnih tubula i sabirnih kanalića bubrega. (29,36,38,59,63,66-68) Drugi ćelijski receptor za NGAL je megalin-kubulin, koji se nalazi na četkastoj površini proksimalnih tubula. (26,28,29,36,38,39,49,58,60,65) Ovi receptori su detektovani i u glomerulusima, a njihovu ekspresiju može indukovati IL-1 β , koji se oslobadja tokom inflamacije. (34)

Funkcije NGAL-a su mnogobrojne i veoma kompleksne, a povezane su sa prirodom tkiva od kojeg NGAL potiče. (31) Osnovna funkcija NGAL-a je transport gvoždja, čime utiče na brojne biološke funkcije zavisne od gvoždja. Smanjenjem koncentracije ekstracelularnog gvoždja, NGAL ima antioksidativno dejstvo. (24,31) Usled bakteriostatskog efekta, NGAL ima značajnu ulogu u primarnom imunitetu. (22,27,28,30,34,36,51,58,63,71) Za oboljenja koja nisu direktno povezana sa infekcijom, poput glomerulonefritisa, je značajan imunomodulatorni efekat NGAL-a dejstvom na T regulatnorne ćelija i povećanjem klirensa medijatora inflamacije. (30,33) Lipokalin 2 u organizmu može imati pro-apoptotičku i anti-apoptotičku aktivnost, a krajnji efekat na preživljavanje ćelija zavisi od mnogobrojnih faktora, na prvom mestu intraćelijskog metabolizma gvoždja. (22,26,31,58,65,80) NGAL može regulisati broj leukocita, indukujući apoptozu granulocita i limfocita, nakon receptor-posredovane signalizacije. (39,53,77)

Adipociti produkuju mnogobrojne citokine, medju kojima je i NGAL. (29,36,40,49,63,77,81) Smatra se da NGAL ima ulogu u razvoju gojaznosti, insulinske rezistencije i dijabetes melitusa (24,40,63,77,81,86,87) Ekspresija NGAL-a je značajno povećana tokom razvoja različitih maligniteta. (22,24,26,30,38,50,85-87) Gvoždje, a samim tim i NGAL, su veoma bitni za proliferaciju i diferencijaciju različitih ćelija. (28,30,38) Posebnu važnost ima uloga NGAL-a u organogenezi bubrega. (24,28,31,38,39,51,54,58,65,71,72,88)

Dokazani su brojni mehanizmi regulacije NGAL-a. Različita oboljenja i stanja utiču na nivo NGAL-a, medju kojima je bitno pomenuti inflamaciju, ishemiju i neoplazije. Bubrežna oboljenja, posebno akutna bubrežna lezija dovode do povećane ekspresije NGAL-a. Različiti hormoni, faktori rasta poput TGF- β 1, vitamini, minerali i lekovi mogu uticati na nivo NGAL-a. Proinflamatorni citokini, poput IL-1, TNF- α i interferona γ stimulišu ekspresiju gena za NGAL. (24,25,31,34,36,40,63,77,81,87) Medju lekovima, je potrebno pomenuti uticaj deksametazona, ACE inhibitora, sartana, insulina i kalcijuma. (23,24,36,52,77,81,105,120)

Normalne koncentracije NGAL-a u organizmu još uvek nisu sa sigurnošću ustanovljene. Za sada ne postoje zvanične preporuke niti smernice o referentnim vrednostima NGAL-a. Smatra se da biološke tečnosti čoveka, u fiziološkim uslovima sadrže veoma male količine lipokalina 2. Za sada se informacije o nivou NGAL-a kod zdravih osoba, mogu dobiti iz podataka o vrednostima dobijenim kod kontrola u okviru

različitih ispitivanja. Vrednosti nivoa NGAL-a u serumu dobijenih tokom različitih ispitivanja su iznete u tabeli 36. (16,19,44-46,65,73,80,91-98,121,130)

Tabela 36. Prosečni objavljeni nivoi NGAL-a u serumu

STUDIJA	NGAL u serumu (ng/ml)		
	zdrave kontrole	ispitanici bez bubrežnog oboljenja	ispitanici sa bubrežnim oboljenjem
Rhee (16)	/	/	81,83 (53,6-133,3) (IgAN)
Bolignano (19)	19-46,5	/	59-1405,5 (HBI)
Chen (44)	17,6	67,1 (ANCA)	96,7-430,3 (ANCA+)
Wang (45)	17,6	/	569,3(ANCA+) 940,8 (ANCA-)
Ohlsson (46)	54	/	54-620 (ANCA+)
Paragas (65)	20	/	/
Milić (73)	102	/	109-226 (LN)
Xiang (80)	90	/	125-575 (HBI)
Bolignano (91)	42	/	473,61 (HBI-HD)
Auguet (92)	70	80 (gojazni)	/
Moreno-Navarrete (93)	61,1	99,04 (DM tip2)	/
Choi (94)	43,8	82,6 (KBS)	/
Panidis (95)	/	54,5 (PCOS) 76,2 (gojazni)	/
Makros (96)	8	/	155,5 (AKI)
Wasilewska (97)	7,8		7,3-46,9 (NS)
Tawfik (98)	20	25 (SLE)	/
Ismail (121)	40,1	/	442-445 (HD)
Clerico (130)	86,3-88,9	/	/

Legenda: HBI – hronična bubrežna insuficijencije, HD – hemodijaliza, LN – lupus nefritis, IgAN – IgA nefropatija, DM – dijabetes melitus, KBS – koronarna bolest srca, PCOS – policistični jajnici, AKI – akutna bubrežna lezija, SLE – sistemski eritemski lupus, ANCA – vaskulitisi (ANCA pozitivni ili negativni)

Objavljene vrednosti nivoa NGAL-a u serumu zdravih kontrola variraju u rasponu od 7,8 ng/ml, koliko su dobili Wasilewska i sar., do 102 ng/ml, koliko je u svom ispitivanju dobila Milić. (73,97) Dobijeni nivoi NGAL-a u serumu ispitanika sa različitim oboljenjima, ali bez zahvatanja bubrega, su ispod 100 ng/ml, dok kod bubrežnih bolesnika, posebno sa postojanjem bubrežne insuficijencije nivoi značajno rastu i u nekim studijama prelaze 1000 ng/ml.

U našoj studiji vrednosti nivoa izmerenog NGAL-a u serumu su se kretale u rasponu od 39,58 - 349,74 ng/ml, sa prosečnom vrednošću od 166,84 ng/ml na početku ispitivanja i 178,92 ng/ml nakon minimalno 6 meseci lečenja. Prosečna vrednost nivoa NGAL-a u celom ispitivanju je iznosila 172,72 ng/ml. Vrednosti dobijene u našoj studiji su uporedjene sa vrednostima nivoa NGAL-a u serumu zdravih kontrola objavljenih u šesnaest drugih studija, koje su iznete u tabeli broj 36, čija je srednja vrednost nivoa NGAL-a u serumu iznosila 46,37 ng/ml. Utvrđeno je da su nivoi NGAL-a u serumu dobijeni kod naših bolesnika značajno veći u odnosu na nivoa NGAL-a u serumu koje su drugi ispitači dobili kod svojih zdravih kontrola i to poredjenjem sa našim vrednostima dobijenim na početku ispitivanja, nakon minimalno šest meseci lečenja, kao i ako se vrednosti posmatraju zbirno,

iz oba merenja. Iz ovoga bi se moglo zaključiti da bolesnici sa dijagnozom primarnog glomerulonefritisa imaju značajno veće nivoe NGAL-a u serumu u odnosu na zdrave osobe.

Po pitanju referentnih vrednosti NGAL-a u urinu zdravih osoba se takodje možemo osloniti samo na objavljene podatke o nivou NGAL-a u urinu zdravih kontrola u različitim ispitivanjima. U tabeli 37 su izneti neki od objavljenih podataka o nivoima NGAL-a u urinu. (19,47,65,79,80,88,91,97-103)

Tabela 37. Prosečni objavljeni nivoi NGAL-a u urinu

STUDIJE	NGAL u urinu (ng/ml)		
	zdrave kontrole	ispitanici bez bubrežnog oboljenja	ispitanici sa bubrežnim oboljenjem
Bolignano (19)	6,6	/	17-619,5 (HBI)
Ding (47)	1,5	/	4,1-21,3 (IgAN)
Paragas (65)	5-20	/	/
Milić (73)	13	/	15-38 (LN)
Rubinstein (79)	/	/	13,6-55,4 (SLE)
Xiang (80)	19	/	17-619,5 (HBI)
Susianti (88)	0,340	/	1,177-2,281 (LN)
Bolignano (91)	/	/	185-325 (NS)
Wasilewska (97)	4,2	/	4,74-19,2 (NS)
Tawfik (98)	2	19 (SLE)	/
Bennett (99)	6,5	/	6,3-172,3 (NS)
Torres-Salido (100)	20,41	/	52,11 (LN)
Li (101)	7,44	/	71,5-114,19 (AKI)
Jorgensen (102)	10	/	203-5323 (AKI)
Bennett (103)	/	11,2-53 (CPB)	53,2-1113,4 (AKI)

Legenda: IgAN – IgA nefropatija, NS – nefrotski sindrom, CPB – kardiopulmonarni bypass, AKI – akutna bubrežna lezija, HBI – hronična bubrežna insuficijencije, LN – lupus nefritis, SLE – sistemski eritemski lupus

Kod zdravih kontrola, nivoi NGAL-a u urinu su varirali od 0,34 ng/ml koliko su objavili Susianti i sar, do 20,41 ng/ml u ispitivanju Torres-Salido i sar. (88,100) Kod bubrežnih bolesnika nivoi NGAL-a u urinu značajno variraju i kreću se od 4,1 ng/ml tokom primarnih glomerulonefritisa, do nivoa od nekoliko hiljada ng/ml tokom akutne bubrežne lezije.

U našem ispitivanju, vrednosti koncentracija NGAL-a u urinu su se kretale u rasponu od 0,91 - 45,98 ng/ml. Prosečna vrednost NGAL-a u urinu dobijena pri postavljanju dijagnoze je iznosila 13,52 ng/ml, nakon minimalno šest meseci lečenja 10,97 ng/ml, dok je prosečna vrednost svih izmerenih nivoa NGAL-a u urinu tokom ispitivanja iznosila 12,28 ng/ml. Podaci dobijeni u našem ispitivanju su poredjeni sa vrednostima nivoa NGAL-a u urinu zdravih kontrola iz studija navedenih u tabeli broj 37. Uzeti su podaci iz 12 studija, u kojima su se dobijeni nivoi NGAL u urinu, za zdrave kontrole, kretale od 0,34-20,41 ng/ml, sa srednjom vrednosti od 8,92 ng/ml. Utvrđeno je da su nivoi NGAL-a u urinu naših ispitanika, pri postavljanju dijagnoze i zbirno gledana sva merenja, značajno veći u odnosu na nivoe NGAL-a u urinu zdravih kontrola u drugim studijama. Nivoi NGAL-a u urinu naših ispitanika nakon perioda praćenja od najmanje šest meseci, su

takodje veći u poredjenju sa objavljenim podacima, ali razlika nije dostigla statističku značajnost.

Ispitivanje NGAL-a u urinu ima najveći značaj kod bubrežnih bolesnika. Značajan procenat bubrežnih bolesnika ima određeni stepen bubrežne insuficijencije, čime se menja i metabolizam NGAL-a u bubrežima, što utiče na njegov nivo u urinu. Zbog toga dosta autora smatra da je umesto „apsolutne“ vrednosti NGAL-a u urinu, bolje koristiti odnos NGAL u urinu/kreatinin u urinu, odnosno nivo NGAL u urinu korigovan prema vrednostima kreatinina u urinu. Smatra se da odnos uNGAL/kreatinin smanjuje intraindividualne varijacije, koje se zapažaju kod bolesnika. (131) Vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin, dobijene u ranije objavljenim studijama su iznešene u tabeli 38. (16,35,47,56,97,103,116) Nažalost, veoma mali broj autora je izračunavao vrednost odnosa uNGAL/kreatinin za zdrave kontrole. Medjutim, ako uporedimo prosečnu vrednost odnosa uNGAL/kreatinin dobijenu tokom našeg ispitivanja (19,72ng/mg), sa podacima za zdrave kontrole, koje su objavili Wasilewska i sar. (4,2ng/mg) i možemo zaključiti da su vrednosti dobijene u našem ispitivanju značajno veće.

Tabela 38. Prosečne objavljene vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin

STUDIJE	uNGAL/uKreatinin (ng/mg)		
	zdrave kontrole	ispitanici bez bubrežnog oboljenja	ispitanici sa bubrežnim oboljenjem
Rhee (16)	/	/	6,21(2,98-13,61) (IgAN)
Bolignano (35)	/	/	6,8-147,3 (NS+HBI)
Ding (47)	/	/	5,2-25,9 (IgAN)
Hinze (56)	/	/	10,1-17,2 (LN)
Wasilewska (97)	4,2	/	5,12-18,03 (NS)
Bennett (103)	/	19,7-128,2(CPB)	173,9-3578,2(AKI)
Sharifipour (116)	/	1,16 (SLE)	2,99 (LN)

Legenda: IgAN – IgA nefropatija, NS – nefrotski sindrom, CPB – kardiopulmonarni bypass, AKI – akutna bubrežna lezija, HBI – hronična bubrežna insuficijencije, LN – lupus nefritis, SLE – sistemski eritemski lupus

Carnero i sar. i Kuwabara i sar. su u svojim studijama, kod bolesnika sa dijagnozom primarnog glomerulonefritisa, utvrdili postojanje pozitivne korelacije izmedju nivoa NGAL-a u serumu i urinu. (37,89) U našem ispitivanju nije utvrđeno postojanje korelacije izmedju nivoa NGAL-a u serumu i nivoa NGAL-a u urinu. Doduše, utvrđeno je postojanje pozitivne linearne korelacije izmedju nivoa NGAL-a u serumu i NGAL-a u urinu izmerenih na početku ispitavanja, ali je na korelaciju uticalo jedno očitavanje NGAL-a u urinu, koje je značajno veće od ostalih i čijim isključivanjem se korelacija izgubila.

Kod bolesnika sa sistemskim eritemskim lupusom su primećene razlike u koncentracijama NGAL-a u urinu u zavisnosti od klase lupus nefritisa. Veći nivoi NGAL-a u urinu su utvrđeni kod bolesnika sa difuznim proliferativnim formama lupus nefritisa, u odnosu na bolesnike sa membranskim oblicima oboljenja, što je potvrđeno i kod bolesnika u pedijatrijskom uzrastu. (34,71,116,117) Milić je u svom radu utvrdila da koncentracije NGAL-a u serumu i urinu bolesnika sa lupus nefritisom mogu ukazati na proliferativni tip sekundarnog glomerulonefritisa. (73) Podaci o sličnim poredjenjima kod bolesnika sa primarnim glomerulonefritisom, za sada, nisu dostupni u objavljenoj literaturi. Mao i sar. su

primetili povećenu ekspresiju receptora za NGAL u biopsijskom materijalu bubrega bolesnika sa dijagnozom akutnog proliferativnog glomerulonefritisa u poredjenju sa biopatima obolelih od drugih bubrežnih oboljenja ili zdravih osoba. (34)

Mi smo u svom ispitivanju pokušali utvrditi da li postoji razlika u nivoima NGAL-a izmedju bolesnika sa proliferativnim formama primarnih glomerulonefritisa i bolesnika sa neproliferativnim glomerulonefritisima. Naši bolesnici sa proliferativnim oblicima primarnog glomerulonefritisa su imali veće prosečne nivoe NGAL-a u serumu (173,72 ng/ml) u odnosu na bolesnike sa neproliferativnim oblicima glomerulonefritisa (157,84 ng/ml), ali razlika nije dostigla statističku značajnost. Prosečan nivo NGAL-a u urinu je bio gotovo jednak u obe grupe bolesnika (proliferativni 13,28 ng/ml, neproliferativni 13,85 ng/ml), ali se nakon korekcije vrednostima kreatinina u urinu, dobijena vrednost odnosa uNGAL/kreatinin razlikuje izmedju grupa. Bolesnici sa proliferativnim formama glomerulonefritisa su imali veće prosečne vrednosti uNGAL/kreatinin odnosa (21,40 ng/mg) u odnosu na bolesnike sa neproliferativnim formama primarnih glomerulonefritisa (18,91 ng/mg), ali razlika nije dostigla statističku značajnost. Poredjenjem sa iznetim iskustvima drugih autora u ispitivanjima na sekundarnim glomerulonefritisima da bolesnici sa proliferativnim oblicima glomerulonefritisa imaju veće vrednosti NGAL-a, mogli bismo reći se da naši rezultati bar donekle uklapaju u već objavljene podatke. Postoji mogućnost da je relativno mali broj ispitanika u našoj studiji uticao da primećena razlika ne dostigne statističku značajnost. Ipak, postoji mogućnost, da kod sekundarnih glomerulonefritisa postoji još neki faktor, koji utiče na porast vrednosti NGAL-a, koji nije prisutan kod bolesnika sa primarnim glomerulonefritisima, što ukazuje na potrebu daljih, ponovljenih i većih ispitivanja na bolesnicima sa primarnim glomerulonefritsom, kako bi se definitivno utvrdilo postojanje povezanosti izmedju nivoa NGAL-a i proliferativnih oblika primarnih glomerulonefritisa. Razlika u prosečnim vrednostima odnosa uNGAL/kreatinin, a bez uočene razlike u nivoima NGAL-a u urinu, bi samo potkrepila ranije izneto mišljenje pojedinih autora, da kod bolesnika sa bubrežnim bolestima i postojanjem oštećenja bubrežne funkcije odnos uNGAL/kreatinin daje tačnije i pouzdanije podatke u odnosu na apsolutne, izmerene vrednosti NGAL-a u urinu. (131)

Posmatranjem posebnih patohistoloških dijagnoza primarnih glomerulonefritisa, najveći nivo NGAL-a u serumu, pri postavljanju dijagnoze je zapažen kod bolesnika sa krescentnim glomerulonefritsom (293,85 ng/ml). Nivo NGAL-a u serumu ovih bolesnika se značajno razlikuje od nivoa NGAL-a u serumu, na početku ispitivanja, bolesnika sa dijagnozom membranske nefropatije i mezangioproliferativnog glomerulonefritisa. Na drugom mestu po vrednostima NGAL-a u serumu na početku ispitivanja se nalaze bolesnici sa dijagnozom membranoproliferativnog glomerulonefritisa (170,97 ng/ml), potom slede bolesnici sa hroničnim glomerulonefritsom (170,69 ng/ml) i fokalno segmentnom sklerozom (166,25 ng/ml). Bolesnici sa najučestalijim tipom glomerulonefritisa u našem ispitivanju, mezangioproliferativnim glomerulonefritsom, su na početku ispitivanja imali prosečnu vrednost NGAL-a u serumu 159,50 ng/ml, a bolesnici sa glomerulonefritsom minimalnih promena 156,82 ng/ml. Najniži nivoi NGAL-a u serumu pri postavljanju dijagnoze su izmereni kod bolesnika sa membranskom nefropatijom (140,17 ng/ml). Možemo primetiti da su najviše koncentracije NGAL-a u serumu, na početku ispitivanja izmerene kod bolesnika sa krescentnim i

membranoproliferativnim glomerulonefritisima, koji uz fokalno segmentnu sklerozu, koja se u našem ispitivanju nalazi na četvrtom mestu po visini prosečnog nivoa NGAL-a u serumu, čine glomerulonefritise sa najvećom očekivanom infiltracijom inflatornih ćelija, koje značajno povećavaju lokalne i cirkulišuće koncentracije NGAL-a. Najniže vrednosti serumskog NGAL-a kod bolesnika sa membranskom nefropatijom se mogu objasniti odsustvom proliferacije ćelija tokom ovog glomerulonefritisa, kao i manjom infiltracijom inflamatornim ćelijama, odnosno prisustvu promena koje su prevashodno lokalizovane na glomerularnoj bazalnoj membrani.

Najviši nivoi NGAL-a u urinu su zapaženi kod bolesnika sa membranskom nefropatijom (16,42 ng/ml) i krescentnim glomerulonefritisom (15,24 ng/ml). Dosta ujednačene prosečne nivoe su imali bolesnici sa mezangioproliferativnim GN (12,97 ng/ml), membranoproliferativnim GN (13,49 ng/ml), hroničnim GN (13,29 ng/ml) i glomerulonefritisom minimalnih promena (13,30 ng/ml). Najniže prosečne nivoe NGAL-a u urinu su imali bolesnici sa fokalnom segmentnom sklerozom i hijalinozom (9,85 ng/ml). Statistički značajna razlika u nivoima NGAL-a u urinu je zapažena jedino između grupe bolesnika sa krescentnim glomerulonefritisom u odnosu na grupu sa fokalno segmentnom sklerozom/hijalinozom. Nakon normalizovanja NGAL-a u urinu prema vrednostima kreatinina u urinu, može se primetiti da najveće vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin imaju bolesnici sa dijagnozom krescentnog glomerulonefritisa (34,75 ng/mg). Potom slede bolesnici sa dijagnozom membranoproliferativnog GN (31,35 ng/mg), fokalnosegmentne skleroze (24,90 ng/mg) i membranske nefropatije (19,57 ng/mg). Najniže vrednosti su imali bolesnici sa mezangioproliferativnim GN (16,83 ng/mg), hroničnim GN (16,75 ng/mg) i GN minimalnih promena (16,21 ng/mg).

Disproporcija koja je uočena između nivoa NGAL-a u urinu i odnosa uNGAL/kreatinin bi ponovo mogla upućivati da je pouzdanija upotreba kreatininom u urinu korigovanih vrednosti NGAL-a u odnosu na apsolutne vrednosti NGAL-a u urinu. Možemo primetiti da bolesnike sa krescentnim, membranoproliferativnim glomerulonefritisom i fokalno segmentnom sklerozom možemo naći među prvih četiri tipa glomerulonefritisa po visini nivoa cirkulišućeg NGAL-a, kao i odnosa uNGAL/kreatinin. Bolesnici sa rapidoprogresivnim glomerulonefritisom sa razvojem polumesečastih formacija, su imali značajno veće vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin, na početku ispitivanja, u odnosu na bolesnike sa mezangioproliferativnim i hroničnim glomerulonefritisom. Ispitivanja na glodarima su ukazala na povezanost visokih nivoa lipokalina 2 u urinu, sa razvojem krescentnih formacija tokom lupus nefritisa, s tim da su najviše vrednosti izmerene u fazi razvoja celularnih krescenata. (115) Poznato je da tokom brzo progresivnih glomerulonefritisa dolazi do oslobađanja velikih količina citokina poput IL-1, TNF- α , interferona γ i osteopontina, koji povećavaju proliferaciju mezangijalnih ćelija, produkciju ekstracelularnog matriksa i infiltraciju intersticijuma makrofagima, a takođe dovode i do povećane sinteze i oslobađanja NGAL-a u bubrezima. (14)

Potom smo bolesnike podelili u grupe prema izmerenom nivou NGAL-a u serumu pri postavljanju dijagnoze i posmatrali procenat proliferativnih i neproliferativnih oblika glomerulonefritisa u pomenutim grupama. Primećeno je da sa porastom koncentracije cirkulišućeg NGAL-a raste i procenat bolesnika sa proliferativnim tipom glomerulonefritisa u tim grupama. Iako porast procenta bolesnika sa proliferativnim

glomerulonefritisima prati porast nivoa NGAL-a u serumu, navedena povezanost nije dostigla statističku značajnost. Treba pomenuti da je utvrđeno i postojanje statistički značajne razlike u distribuciji posebnih tipova glomerulonefritisa prema različitim nivoima NGAL-a u serumu na početku ispitivanja, ali bez jasnog izdvajanja tipa glomerulonefritisa koji utiče na ovu razliku, što se može objasniti malim brojem bolesnika sa posebnim tipovima glomerulonefritisa.

Posmatranjem procenta bolesnika sa proliferativnim i neproliferativnim oblicima primarnog glomerulonefritisa, u odnosu na nivo NGAL-a u urinu na početku ispitivanja nije uočena značajna razlika u zastupljenosti određenog tipa glomerulonefritisa. U odnosu na normalizovane vrednosti NGAL-a u urinu, bolesnike smo podelili u dve grupe, sa granicom od 25 ng/mg kreatinina. U grupi sa odnosom uNGAL/kreatinin preko 25 ng/mg se nalazilo čak 71,43% bolesnika sa proliferativnim glomerulonefritisom (10/14), dok je bolesnika sa neproliferativnim glomerulonefritisom bilo 28,57% (4/14), ali razlika nije dostigla statističku značajnost.

Naše ispitivanje ukazuje da bi povišene vrednosti NGAL-a u serumu, kao i odnosa uNGAL/kreatinin preko 25 ng/ml, mogle upućivati na bolesnike koji imaju proliferativni oblik glomerulonefritisa, obzirom na uočene razlike, koje nisu potvrđene statističkom značajnošću. Nivo NGAL-a u urinu, bez korekcije vrednostima kreatinina u urinu, nije pokazao prognostički značaj za predikciju tipa glomerulonefritisa.

Kao što je već ranije istaknuto, iako etiološki uzročnik koji dovodi do glomerulonefritisa primarno oštećuje glomeruluse, postojanje atrofije tubula i intersticijalne fibroze, ima veliki značaj i uticaj na tok primarnih glomerulonefritisa i progresiju bubrežne insuficijencije. (14-19,123) Studije na ispitanicima sa lupus nefritisom su ukazale na postojanje korelacije između ekspresije NGAL-a u tubulointersticijumu i indeksa aktivnosti i indeksa hroniciteta lupus nefritisa. (32,58) U okviru primarnih glomerulonefritisa, kod bolesnika sa IgA nefropatijom je primećena pozitivna korelacija nivoa NGAL-a sa intenzitetom tubulointersticijalnog oštećenja, odnosno stepenom intersticijalne fibroze i tubulske atrofije. (48,87) Kod naših bolesnika je, na osnovu nalaza bioptata bubrega, utvrđeno postojanje intersticijalne fibroze kod 61,16% bolesnika (36/57), koji su dalje klasifikovani prema intenzitetu verifikovanih promena. Već na početku ispitivanja je primećen veći nivo NGAL-a u serumu kod bolesnika sa postojanjem intersticijalne fibroze (172,60 ng/ml) u odnosu na bolesnike bez fibroze intersticijuma (150,49 ng/ml), ali je razlika postigla statističku značajnost tek nakon minimalno šest meseci lečenja, kada su prosečne vrednosti nivoa NGAL-a u serumu bolesnika bez intersticijalne fibroze ostale skoro neizmenjene (150,04 ng/ml), dok je kod bolesnika sa postojanjem intersticijalne fibroze došlo do daljeg porasta nivoa (191,04 ng/ml). Ovo se može objasniti vremenom proteklom između dva merenja NGAL-a, tokom kojeg je i pored primenjenog terapije, došlo do određene progresije intersticijalne fibroze, koja je već bila prisutna u vreme postavljanja dijagnoze. Sa druge strane, porast vrednosti NGAL-a u serumu, tokom praćenja bolesnika, bi mogao ukazati na intenziviranje hroničnih ireverzibilnih promena, po tipu fibroze intersticijuma. Nije primećena statistički značajna razlika u nivoima NGAL-a u urinu, između bolesnika bez intersticijalne fibroze i sa postojanjem intersticijalne fibroze, kako na početku ispitivanja (bez 13,45 ng/ml, sa 13,56 ng/ml), tako ni nakon minimalno šest meseci lečenja (bez 10,41 ng/ml, sa 11,19 ng/ml).

Razlika takodje nije primećena ni u vrednostima odnosa uNGAL/kreatinin između bolesnika bez intersticijalne fibroze i onih sa fibrozom intersticijuma, ni na početku ispitivanja (bez 19,06 ng/mg, sa 20,59 ng/mg), ni nakon najmanje šest meseci primene terapije (bez 18,45 ng/mg, sa 18,70 ng/mg). Ostaje nejasan razlog povezanosti prisustva intersticijalne fibroze sa cirkulišućim nivoima NGAL-a, ali ne i sa njegovim vrednostima u urinu. Da li prisustvo fibroze intersticijuma nekim, za sada nepoznatim, mehanizmima dovodi do značajnije stimulacije udaljenih organa, poput jetre i pluća, da produkuju NGAL, ili je za porast NGAL-a u serumu, značajnija aktivacija endotela krvnih sudova bubrega, gde bi se novosintetisani NGAL izlučivao direktno u cirkulaciju. Poznato je da tokom glomerulonefritisa dolazi do razvoja relativne hipoksije i ishemije intersticijuma, zbog dejstva na krvne sudove različitih medijatora inflamacije stvorenih u glomerulima, kao i prenosa povećanog krvnog pritiska na peritubularne kapilare. (2) Dužim trajanjem oboljenja dolazi do fibrointimalnog zadebljanja zida krvnog suda i hijaline i hiperplastične arterioloskleroze. U ispitivanjima na bolesnicima nakon akutnog infarkta miokarda je zapaženo prisustvo NGAL-a kako u ćelijama aterosklerotskog plaka, tako i u samom srčanom mišiću. (29) Oštećenje miokarda dovodi do povećanog oslobađanja NGAL-a iz endotela i intime krvnih sudova, u cilju regulisanja remodelovanja krvnih sudova u zahvaćenom području. (31,37,43) Postoji mogućnost da i u bubrezima dolazi do povećanog oslobađanja NGAL-a iz ćelija endotela krvnih sudova, kao odgovora na prisustvo patološke lezije, a u cilju regulacije neovaskularizacije.

Postojanje atrofije tubula je dokazano kod 52,63% naših bolesnika (30/57), koji su dalje klasifikovani prema intenzitetu verifikovanih promena. Bolesnici sa postojanjem atrofije tubula su već na početku ispitivanja imali značajno veće nivoe NGAL-a u serumu (177,74 ng/ml) u odnosu na bolesnike bez verifikovane atrofije tubula (149,70 ng/ml). Ova značajna razlika u nivoima se održala i nakon minimalno šest meseci praćenja (bez 161,17 ng/ml, sa 189,49 ng/ml). Potrebno je istaći da su vrednosti prosečnih nivoa NGAL-a u serumu linearno rasle sa povećanjem intenziteta promena na tubulima, tako da su najveći nivoi NGAL-a u serumu izmereni kod bolesnika sa intenzivnom tubulskom atrofijom.

Kao što je iznešeno, na koncentraciju NGAL-a u serumu kod naših bolesnika, pri postavljanju dijagnoze je veći uticaj imalo postojanje tubulske atrofije na bioptatu bubrega, u odnosu na postojanje intersticijalne fibroze. Ovaj podatak odgovara činjenici da su tubuli primarno mesto sinteze NGAL-a tokom bubrežnih oboljenja, uključujući i glomerulonefritise. Iako i mezangijalne ćelije, pod uticajem različitih citokina pokazuju povećanu ekspresiju NGAL-a, njihov uticaj na ukupnu količinu oslobodjenog NGAL-a je značajno manji. (56,71,87)

Nije primećena statistički značajna razlika u nivoima NGAL-a u urinu, između bolesnika sa postojanjem tubulske atrofije na bioptatu bubrega i bolesnika bez atrofije tubula, pri postavljanju dijagnoze (bez 13,78 ng/ml, sa 13,28 ng/ml), kao ni nakon najmanje šest meseci praćenja (bez 10,33 ng/ml, sa 11,42 ng/ml). Takodje, nije primećena ni značajna razlika u vrednostima odnosa uNGAL/kreatinin između bolesnika bez postojanja tubulske atrofije i sa njom, kako na početku ispitivanja (bez 20,18 ng/mg, sa 19,90 ng/mg), tako ni u kontrolnom pregledu nakon najmanje šest meseci lečenja (bez 19,97 ng/mg, sa 17,34 ng/mg). U obe grupe se može zapaziti smanjenje, kako apsolutne vrednosti NGAL-a u urinu, tako i odnosa uNGAL/kreatinin, nakon perioda lečenja, što u

grupi bolesnika bez postojanja atrifije tubula može ukazivati na smirenje procesa u bubrezima, a kod bolesnika sa postojanjem tubularne atrofije na dalju progresiju procesa, sa smanjenjem broja funkcionalnih tubulskih ćelija koje su u mogućnosti da produkuju NGAL. Naši rezultati se razlikuju od ispitivanja Rhee i sar., koji su kod bolesnika sa IgA nefropatijom, zapazili povezanost postojanja oštećenja tubulointersticijuma, sa nivoom NGAL-a u urinu. Njihovo ispitivanje ukazuje da NGAL u urinu reflektuje rano oštećenje tubula, dok se kod uznapredovalih promena očekuje smanjenje vrednosti. (16) Iako naši rezultati ne podupiru podatke dobijene od Rhee i sar., slažu se sa ispitivanjem Park i sar. u kojem je utvrđeno postojanje korelacije između atrofije tubula i nivoa NGAL-a u plazmi, kod bolesnika sa IgA nefropatijom. (132) Poznato je da tubulske ćelije otpuštaju NGAL, kao odgovor na patološku leziju. Možemo pretpostaviti da tokom blažih oštećenja tubulskih ćelija, dolazi i do povećane reapsorpcije sekretovanog NGAL-a, što dovodi do povećanja NGAL-a u cirkulaciji, bez značajnijeg povećanja urinarnih nivoa. Daljom progresijom tubularnih oštećenja, smanjenjem broja ćelija sposobnih za reapsorpciju, veća količina NGAL-a zaostaje u lumenu tubula i biva izlučena urinom. Procenat bolesnika sa umerenom i intenzivnom atrofijom tubula, kod kojih bi se u ovom slučaju očekivali najviši nivoi NGAL-a u urinu, je u našem ispitivanju relativno mali i iznosi 22,81%, što može uticati na podatak da nije primećena povezanost intenziteta atrofije tubula i nivoa NGAL-a u urinu.

I pored postojanja velike raznolikosti u patomorfološkim promenama bubrežnog parenhima, broj kliničkih manifestacija primarnih glomerulonefritisa je relativno mali. U našem ispitivanju smo pokušali da utvrdimo da li postoji povezanost između pojedinih kliničkih manifestacija primarnog glomerulonefritisa i nivoa lipokalina 2. Poredjenjem grupa bolesnika sa različitim kliničkim iskazivanjem oboljenja, zapažene su statistički značajne razlike u prosečnim nivoima NGAL-a u serumu. Pri postavljanju dijagnoze, najviše nivoe NGAL-a u serumu su imali bolesnici sa rapidoprogresivnim tokom glomerulonefritisa (339,13 ng/ml), ali je ova grupa bolesnika morala biti isključena iz daljeg posmatranja pošto je šest meseci nakon postavljanja dijagnoze sadržala samo dva bolesnika, što je ispod statističkog minimuma. Bolesnici sa asimptomatskom mikrohematurijom/proteinurijom su imali značajno niže nivoe NGAL-a u serumu (105,49 ng/ml) u odnosu na bolesnike sa nefrotskim sindromom (173,02 ng/ml) i bolesnike sa hroničnim nefritisnim sindromom (194,43 ng/ml). Najviši nivoi NGAL-a u urinu su takodje primećeni kod bolesnika sa rapidoprogresivnim tokom glomerulonefritisa (15,47 ng/ml). Sledeći su bili bolesnici sa nefrotskim sindromom (14,62 ng/ml), čiji nivoi NGAL-a u urinu su bili značajno viši u odnosu na one kod bolesnika sa asimptomatskom mikrohematurijom/proteinurijom (10,46 ng/ml). I nakon korekcije NGAL-a u urinu sa vrednostima kreatinina u urinu, najveće vrednosti su imali bolesnici sa rapidoprogresivnim tokom glomerulonefritisa (30,34 ng/mg), sledili su bolesnici sa nefrotskim sindromom (22,45 ng/mg), koji su se statistički značajno razlikovali od bolesnika sa asimptomatskom mikrohematurijom/proteinurijom (13,59 ng/m), kod kojih su primećene najmanje vrednosti. Podaci iz više ranije objavljenih studija ukazuju da bolesnici sa nefrotskim sindromom, imaju povišene vrednosti NGAL-a u urinu, što je potvrđeno kako kod odraslih, tako i kod pedijatrijskih bolesnika. (35,89,99,105) Najveće vrednosti svih poredjenih parametara kod bolesnika sa glomerulonefritisom rapidoprogresivnog toka se

može objasniti postojanjem značajnih oštećenja u bubrezima tokom razvoja ovog glomerulonefritisa, kao i često prisutnih polumesečastih formacija, koje su, kao što je već navedeno, povezane sa većim oslobađanjem NGAL-a. Sa druge strane, najniže vrednosti svih praćenih parametara su vidjene kod bolesnika sa asimptomatskom mikrohematurijom/proteinurijom, kliničkom manifestacijom glomerulonefritisa koja obično ima blag tok, bez brzog pogoršanja bubrežne funkcije i često bez potrebe za uvođenjem intenzivne imunosupresivne terapije, što je primećeno i kod naših bolesnika. U do sada objavljenim studijama nema podataka da su radjena ispitivanja povezanosti kliničke manifestacije glomerulonefritisa i nivoa NGAL-a, sa kojima bismo mogli porediti podatke dobijene u našoj studiji.

Medju mnogobrojnim faktorima koji utiču na nivo NGAL-a se nalazi i uticaj višegodišnje hipertenzije. (48,57,97) U našem ispitivanju smo izvršili poredjenje nivoa NGAL-a izmedju bolesnika sa postojanjem arterijske hipertenzije pri postavljanju dijagnoze (71,67%) i bolesnika sa normalnim vrednostima krvnog pritiska (28,33%). Nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike izmedju bolesnika sa postojanjem arterijske hipertenzije pri postavljanju dijagnoze i bolesnika sa urednim vrednostima krvnog pritiska, u nivoima NGAL-a u serumu (bez 152,26 ng/ml, sa 172,60 ng/ml), nivoima NGAL-a u urinu (bez 12,65 ng/ml, sa 13,87 ng/ml), niti vrednostima odnosa uNGAL/kreatinin (bez 20,18 ng/mg, sa 20,38 ng/mg). Ovo bi moglo ukazivati da je arterijska hipertenzija prisutna pri postavljanju dijagnoze oboljenja, najverovatnije posledica razvoja primarnog glomerulonefritisa, te da nije bila prisutna godinama unazad.

Inhibitori angiotenzin konvertujućeg enzima zauzimaju značajno mesto u lečenju bolesnika sa primarnim glomerulonefritsom. Kao što je već pomenuto, arterijska hipertenzija je deo kliničke slike značajnog broja bolesnika sa glomerulonefritsom, a za njeno lečenje se na prvom mestu preporučuju ACE inhibitori i AT blokatori, koji osim antihipertenzivnog imaju i hipoproteinurični efekat. I u našem ispitivanju je značajan procenat bolesnika od 80% (48/60) koristio ACE inhibitore u terapiji. Smatra se da terapija ACE inhibitorima smanjuje vrednosti NGAL-a u serumu. (52,105,120) Posmatranjem nivoa NGAL-a, kod naših bolesnika, nakon minimalno šest meseci lečenja u odnosu na primenu ACE inhibitora, primećeno je da bolesnici koji su u terapiji uzimali ACE inhibitore imaju manje prosečne nivoe NGAL-a u serumu (174,06 ng/ml), u odnosu na bolesnike koji nisu koristili ACE inhibitore (197,15 ng/ml), ali razlika nije dostigla statističku značajnost. Nije utvrđena značajna razlika u prosečnom nivou NGAL-a u urinu (bez 9,75 ng/ml, sa 11,29 ng/ml), niti u vrednostima odnosa uNGAL/kreatinin (bez 16,75 ng/mg, sa 19,71 ng/mg) izmedju pomenutih grupa bolesnika. Postoji mogućnost da je relativno mali broj bolesnika, posebno u grupi bolesnika bez ACE inhibitora u terapiji, uzrokovao da primećena razlika u nivoima cirkulišućeg NGAL-a nije bila statistički značajna.

Pored simptomatske terapije koja može biti dovoljna samo za lečenje bolesnika sa asimptomatskom mikrohematurijom/proteinurijom i blaže oblike nefritisnog sindroma, kod većine bolesnika je neophodno uvođenje imunomodulatorne terapije. Kortikosteroidi predstavljaju lekove prvog izbora u specifičnom lečenju glomerulonefritisa. U našoj studiji, kod 15% bolesnika (9/60) nije bilo potrebe za uvođenjem imunosupresiva, dok je 40% bolesnika lečeno monoterapijom steroidima (24/60). Kod bolesnika kod kojih

primena steroida nije dala željene efekte lečenja, u terapiju su uključeni drugi imunosupresivi, ciklofosfamid ili ciklosporin. Kombinovanom terapijom steroidima i pulsним dozama intravenskog ciklofosfamida je u našem ispitivanju lečeno 33,33% bolesnika (20/60), kod 10% su steroidi kombinovani sa ciklosporinom (6/60), dok je 1,67% bolesnika lečeno monoterapijom ciklofosfamidom (1/60), zbog postojanja kontraindikacije za primenu steroida. Poređenjem nivoa NGAL-a nakon najmanje 6 meseci lečenja, kod bolesnika sa različitim terapijskim protokolima nije uočena statistički značajna razlika u prosečnom nivou NGAL-a u serumu, prosečnom nivou NGAL-a u urinu, niti vrednostima odnosa uNGAL/kreatinin.

U objavljenim studijama se nalazi mali broj podataka o uticaju lekova na nivo NGAL-a, ali većina autora se slaže da primena steroida povećava nivo cirkulišućeg NGAL-a. (23,24,36,77,81) U našoj studiji je utvrđeno da bolesnici koji su u terapiji primali kortikosteroide (82,46%; 47/57) imaju značajno više nivoe NGAL-a u serumu nakon minimalno šest meseci primene kortikosteroida (189,35 ng/ml), u odnosu na bolesnike koji nisu primali kortikosteroide (17,54%; 10/57) (129,93 ng/ml). Nisu primećene statistički značajne razlike u nivoima NGAL-a u urinu između dve navedene grupe bolesnika (bez 10,61 ng/ml, sa 11,04 ng/ml). Bolesnici koji su u terapiji glomerulonefritisa primali kortikosteroide, su imali veće vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin (20,44 ng/mg) u odnosu na bolesnike bez steroidne terapije (12,74 ng/mg), ali razlika nije dostigla statističku značajnost, najverovatnije zbog velike razlike u broju ispitanika u različitim grupama. Razlika u nivoima NGAL-a u serumu između bolesnika koji su primali steroide i bolesnika bez steroida u terapiji se sa jedne strane može objasniti uticajem kortikosteroida na nivo lipokalina 2, a sa druge činjenicom da je primena imunosupresivne terapije indicovana kod bolesnika sa težom kliničkom slikom glomerulonefritisa i postojanjem većeg parenhimskog oštećenja bubrega, koje samo po sebi može dovesti do većeg oslobađanja NGAL-a. Poznato je da kortikosteroidi dovode do povećanja broja neutrofila u cirkulaciji, koji su glavni izvor NGAL-a. Porast broja neutrofila je rezultat povećanog oslobađanja iz kosne srži i smanjenja njihove migracije iz krvnih sudova u periferna tkiva. Ovo predstavlja jedan od efekata glikokortikoida na smanjenje inflamacije u bubrezima. Oni također inhibiraju delovanje tkivnih makrofaga i drugih antigen prezentujućih ćelija. Makrofagna infiltracija tokom glomerulonefritisa je povezana sa razvojem rane inflamacije, patogeneom arterioneofroskleroze i povećane intersticijalne fibroze. (87) Aktivisani makrofagi također dovode i do povećanja ekspresije NGAL-a, kako na samim makrofagima, tako i na mezigijalnim ćelijama glomerula. (23) Smatra se da lipokalin 2 dovodi do deaktivacije makrofaga, čime se smanjuje produkcija proinflamatornih citokina i ublažava rani inflamatorni odgovor. (111) Osim deaktivacije, NGAL indukuje apoptozu lokalnih makrofaga, čime smanjuje njegove gore pomenute efekte. (73)

Kortikosteroidi smanjuju makrofagnu sposobnost fagocitovanja kao i stvaranja citokina poput TNF- α , IL-1, IL-12, interferona- γ i metaloproteinaza, čije mesto u razvoju glomerulonefritisa je dobro poznato. TNF- α , interferon γ i različiti interleukini povećavaju ekspresiju gena za NGAL u mezigijalnim ćelijama, odnosno mononuklearima iz krvi, dok IL-1 β indukuje ekspresiju receptora za NGAL na tubulskim ćelijama i u glomerulusima. (14,34,87) Smanjenjem oslobađanja pomenutih citokina, kortikosteroidi smanjuju lokalni nivo NGAL-a u bubrezima. Poznato je da lipokalin 2 modifikuje

inflamatorni odgovor u masnom tkivu, sa stimulacijom adipocita na sekreciju TNF- α . (40) Iako sličan efekat nije dokazan u bubrežnom parenhimu, postoji mogućnost da NGAL i u bubrežima utiče na povećano oslobađanje TNF- α , čime stimuliše i lokalnu inflamaciju. Wu i sar. u svom radu ukazuju na povišene vrednosti NGAL-a i TNF- α u tkivu obolelog bubrega, ali su potrebna dalja ispitivanja da se definitivno utvrdi njihova povezanost. (112) Za razliku od glikokortikoida, u do sada objavljenim ispitivanjima, nema podataka o uticaju drugih imunosupresiva koji se koriste u terapiji primarnih glomerulonefritisa, na nivo NGAL-a.

Takodje, do sada postoji veoma malo objavljenih podataka o povezanosti nivoa NGAL-a sa krajnjim efektima lečenja primarnih glomerulonefritisa. Gheissari i sar. su u svom ispitivanju na deci sa nefrotskim sindromom, primetili povezanost razvoja remisije sa nivoom NGAL-a. (105) U našoj studiji, pod pozitivnim efektom lečenja je podrazumevan razvoj kompletne remisije (20% bolesnika 12/60) i parcijalne remisije (40% bolesnika 24/60) oboljenja. Za bolesnike koji su bili refrakterni na terapiju (35% bolesnika 21/60), bolesnike koji su razvili terminalni stadijum bubrežne insuficijencije (1,67% bolesnika 1/60) i koji su preminuli (3,33% bolesnika 2/60) je smatrano da imaju negativan efekat lečenja. Nije primećena razlika u nivoma NGAL-a u serumu na početku ispitivanja izmedju bolesnika koji su razvili remisiju glomerulonefritisa (169,76 ng/ml) i bolesnika sa nepovoljnim efektom lečenja (162,45 ng/ml). Takodje nije zapažena razlika ni u nivoima NGAL-a u urinu pri postavljanju dijagnoze izmedju bolesnika sa pozitivnim efektom lečenja (13,09 ng/ml) i bolesnika sa negativnim efektom terapije (14,17 ng/ml). Iako su vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin na početku ispitivanja, bile veće kod bolesnika koji su kasnije imali negativan odgovor na terapiju (22,46 ng/mg) u odnosu na bolesnike koji su razvili remisiju (18,90 ng/mg), razlika nije dostigla statističku značajnost.

Sa druge strane, ako bolesnike podelimo u odnosu na nivo NGAL-a u serumu na početku ispitivanja, a za granicu uzmemo 140 ng/ml, zapažamo da je značajno veći procenat bolesnika sa pozitivnim efektom lečenja imalo vrednosti NGAL-a u serumu veće od 140 ng/ml pri postavljanju dijagnoze. Tačan uzrok ove uočene povezanosti razvoja remisije i većih nivoa NGAL-a u serumu nije potpuno jasan. Može ukazivati da je protektivni efekat NGAL-a, tokom razvoja primarnog glomerulonefritisa značajniji u odnosu na efekat stimulacije inflamacije u bubrežima. Takodje postoji mogućnost da na razvoj remisije veći uticaj ima nivo cirkulišućeg NGAL-a, u odnosu na lokalno oslobodjeni NGAL u bubrežima. U potpunoj suprotnosti sa našim rezultatima je studija koju su objavili Flo i sar. u kojoj je utvrđeno da se viši nivoi NGAL-a u serumu mogu smatrati faktorom rizika za loš ishod bolesti, s tim da je potrebno naglasiti da je ispitivanje radjeno samo na bolesnicima sa dijagnozom glomerulonefritisa minimalnih promena i fokalno segmentnom sklerozom. (89)

Poredjenjem nivoa NGAL-a u serumu nakon minimalno šest meseci lečenja, primećeno je da su bolesnici koji su razvili remisiju, imali značajno niže nivoe NGAL-a u serumu (163,38 ng/ml), u odnosu na bolesnike bez očekivanog efekta lečenja (205,56 ng/ml). Bolesnici u parcijalnoj ili kompletnoj remisiji su takodje imali i značajno niže nivoe NGAL-a u urinu (10,26 ng/ml), u odnosu na bolesnike sa nepovoljnim efektom lečenja (12,18 ng/ml). Razlika je primećena i u odnosu uNGAL/kreatinin (remisija 17,38 ng/mg, bez efekta 22,00 ng/mg), ali nije dostigla statističku značajnost. Kuwabara i sar.

iznose podatak o smanjenju nivoa NGAL-a tokom remisije nefrotskog sindroma. (89) Interesantno je primetiti da bolesnici u našoj studiji, koji su razvili remisiju primarnog glomerulonefritisa nisu značajno promenili prosečan nivo NGAL-a u serumu, već je kod bolesnika bez odgovarajućeg odgovora na terapiju došlo do porasta prosečnih nivoa, kao rezultat perzistiranja i progresije aktivnog procesa u bubrezima.

Potom su poredjeni bolesnici sa potencijalno lošijom prognozom primarnog glomerulonefritisa (rapidoprogresivni GN, membranoproliferativni GN i fokalno segmenta skleroza 14/60) i bolesnici sa potencijalno boljom prognozom glomerulonefritisa (mezangioproliferativni GN, membranska nefropatija, GN minimalnih promena i hronični GN 46/60). Iako su bolesnici sa dijagnozom glomerulonefritisa sa lošijom prognozom imali veće nivoe NGAL-a u serumu na početku ispitivanja (195,95 ng/ml) u odnosu na bolesnike sa boljom očekivanom prognozom glomerulonefritisa (157,95 ng/ml), razlika nije dostigla statističku značajnost. Prosečni nivoi NGAL-a u urinu pri postavljanju dijagnoze, se nisu značajno razlikovali između bolesnika sa očekivanom lošijom prognozom GN-a (12,83 ng/ml) i bolesnika sa očekivanom boljom prognozom GN-a (13,74 ng/ml). Međutim, nakon korekcije, primećeno je da bolesnici sa prognostički lošijim tipom glomerulonefritisa imaju značajno veće vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin (30,23 ng/mg) u odnosu na bolesnike sa prognostički boljim oblikom GN-a (17,31 ng/mg). Iz ovoga zaključujemo da visoke vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin pri postavljanju dijagnoze, mogu ukazivati da bolesnik ima prognostički lošiji oblik glomerulonefritisa. Već je navedeno da se u bubrezima bolesnika sa glomerulonefritisima sa očekivanom lošijom prognozom nalazi veći ćelijski inflamatorni infiltrat, koji dovode do lokalnog oslobadjanja veće količine NGAL-a. (15)

Mnogobrojne dosadašnje studije na bolesnicima sa lupus nefritisom i primarnim glomerulonefritisima su utvrdile postojanje povezanosti između nivoa NGAL-a i bubrežne funkcije. (32,35,43,51,55,58,105) Postojanje korelacije između nivoa NGAL-a i vrednosti kreatinina, odnosno jačine glomerulske filtracije je zapaženo i kod oštećenja bubrežne funkcije druge etiologije. (19,44,48,56,60,71,80,87,89,107) Osim NGAL-a izmerenog u telesnim tečnostima, primećena je i korelacija između ekspresije NGAL-a u ćelijama tubula i intersticijuma na biopsijskom materijalu bolesnika sa lupus nefritisom, sa parametrima bubrežne funkcije. (32,58) Kod bolesnika sa primarnim glomerulonefritisom je primećena direktna korelacija nivoa NGAL-a sa vrednostima serumskog kreatinina. (35,43,51,55,105) I u našoj studiji je potvrđeno postojanje pozitivne linearne korelacije između vrednosti kreatinina u serumu i nivoa cirkulišućeg NGAL-a. Osim sa vrednostima serumskog kreatinina, kod naših bolesnika je utvrđeno i postojanje pozitivne linearne korelacije između nivoa NGAL-a u serumu i vrednosti ureje i mokraćne kiseline. Sa nivoom NGAL-a u urinu je utvrđeno samo postojanje pozitivne korelacije sa vrednostima ureje izmerenim nakon primene terapije tokom najmanje šest meseci. Kao što je potvrđeno i u ranije objavljenim ispitivanjima i mi smo utvrdili postojanje inverzne korelacije nivoa NGAL-a u serumu sa rezidualnom bubrežnom funkcijom, odnosno sa vrednostima klirensa kreatinina, kako izmerenog u dnevnom urinu, tako i izračunatog MDRD formulom. Za vrednosti klirensa kreatinina izračunatog MDRD formulom je utvrđeno i postojanje negativne korelacije sa nivoom NGAL-a u urinu. Postojanje korelacije cirkulišućeg NGAL-a i bubrežne funkcije se potvrđuje i posmatranjem nivoa

NGAL-a u određenim stadijumima bubrežne insuficijencije. U nultoj tački ispitivanja i nakon minimalno šest meseci lečenja, primećuje se da bolesnici bez oštećenja bubrežne funkcije imaju najniže prosečne nivoe NGAL-a u serumu, koje se postepeno povećavaju sa svakim sledećim stadijumom bubrežne insuficijencije, da bi najvišu izmerenu vrednost imao bolesnik koji je u tom trenutku zahtevao zamenu bubrežne funkcije hemodijalizom. Nije utvrđeno postojanje povezanosti prosečnog nivoa NGAL-a u urinu, kao ni odnosa uNGAL/kreatinin sa stepenom oštećenja bubrežne funkcije.

U nekoliko objavljenih studija je zapaženo da bolesnici sa većim vrednostima NGAL-a u urinu i serumu pri postavljanju dijagnoze oboljenja, češće progrediraju do terminalnog stadijuma bubrežne insuficijencije, odnosno da veći nivoi NGAL-a predstavljaju faktor rizika za progresiju bubrežnog oštećenja. (19,42,99,106) Smatra se da u drugom i trećem stadijumu bubrežne insuficijencije, nivoi serumskog NGAL-a imaju veću prognostičku vrednost u odnosu na nivoe urinarnog NGAL-a, dok im značaj postaje jednak u kasnijim stadijumima bubrežne insuficijencije. Takodje je primećeno da bolesnici sa većim vrednostima NGAL-a u urinu, brže dostižu terminalni, dijalizno zavisni, stadijum bubrežne insuficijencije. (80) Kako bismo utvrdili postojanje povezanosti nivoa NGAL-a i progresije bubrežne insuficijencije, bolesnici u našoj studiji su podeljeni u dve grupe. Prvu grupu su činili bolesnici sa povoljnim efektom lečenja na bubrežnu funkciju (81,03% bolesnika 47/58), što je definisano održavanjem uredne bubrežne funkcije (46,55% bolesnika 27/58), poboljšanjem bubrežne funkcije (8,62% bolesnika 5/58) i održavanjem početnih oštećenja bubrežne funkcije (I i II stadijum) bez daljeg pogoršanja (25,86% bolesnika 15/58). Drugu grupu su činili bolesnici sa progresijom bubrežne insuficijencije (18,97% bolesnika 11/58). Potrebno je istaći da je u našem ispitivanju statistički značajno veći procenat bolesnika imao povoljan efekat lečenja na bubrežnu funkciju. Nije utvrđeno postojanje značajne razlike u prosečnim nivoima NGAL-a u serumu pri postavljanju dijagnoze, izmedju bolesnika sa povoljnim (167,86 ng/ml) i nepovoljnim efektom lečenja na bubrežnu funkciju (176,03 ng/ml). Prosečni nivoi NGAL-a u urinu se nisu značajno razlikovali izmedju bolesnika koji su imali željeni efekat lečenja na bubrežnu funkciju (13,50 ng/ml) i bolesnika koji su pogoršali bubrežnu funkciju (14,25 ng/ml). Iako su bolesnici sa povoljnim efektom terapije na bubrežnu funkciju imali manje vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin (19,65 ng/mg) u odnosu na bolesnike sa progresijom bubrežne insuficijencije (21,96 ng/mg) razlika nije dostigla statističku značajnost. Na naše rezultate je sigurno uticala činjenica da je značajno veći procenat bolesnika imao povoljan efekat lečenja na bubrežnu insuficijenciju, kao i činjenica da je izrazito mali procenat bolesnika u obe tačke praćenja imao unapredovale stadijume bubrežne insuficijencije (III, IV i V stadijum), te nisu mogli biti uključeni u statističku obradu. Samim tim se može reći da su na rezultate uticali samo nivoi NGAL-a kod bolesnika bez bubrežne insuficijencije i sa I i II stadijumom oštećenja bubrežne funkcije, odnosno da nije bilo bolesnika sa brzom i značajnom progresijom oštećenja funkcije bubrega.

Medjutim, ako bolesnike posmatramo u odnosu na izmerene vrednosti NGAL-a u urinu na početku ispitivanja, a za granicu uzmemo 16 ng/ml, zapažamo da je značajno veći procenat bolesnika koji su imali nepovoljan efekat lečenja na bubrežnu funkciju u grupi sa NGAL-om u urinu većim od 16 ng/ml. Takodje, ako posmatramo bolesnike u odnosu na vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin, sa granicom od 22 ng/mg, uočavamo da je značajno

veći procenat bolesnika sa lošim ishodom po bubrežnu funkciju u grupi sa vrednostima uNGAL/kreatinin većim od 22 ng/mg. Ovo ukazuje da bolesnici koji pri postavljanju dijagnoze imaju nivoe NGAL-a u urinu veće od 16 ng/ml i vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin veće od 22 ng/mg, mogu imati povećan rizik da tokom oboljenja pogoršaju bubrežnu funkciju. Obzirom da je u našem ispitivanju samo jedna osoba sa dijagnozom rapidoprogresivnog glomerulonefritisa, progredirala u terminalni stadijum bubrežne insuficijencije, nismo mogli odrediti da li postoji povezanost između nivoa NGAL-a i povećanog rizika za razvoj terminalnog oštećenja bubrežne funkcije.

Posmatranjem bolesnika nakon najmanje šest meseci lečenja, uočeno je da bolesnici koji su imali povoljan efekat lečenja na bubrežnu funkciju imaju značajno niži nivo NGAL-a u serumu (170,26 ng/ml) u odnosu na bolesnike koji su pogoršali bubrežnu funkciju (219,64 ng/ml). Bolesnici sa povoljnim efektom lečenja na bubrežnu funkciju su takodje imali značajno niže nivoe NGAL-a u urinu (10,52 ng/ml), kao i odnosa uNGAL/kreatinin (17,86 ng/mg) u odnosu na bolesnike sa nepovoljnim efektom lečenja na bubrežnu funkciju (uNGAL 13,05 ng/ml; uNGAL/kreatinin 24,87 ng/mg). Ova oučena statistički značajna razlika u sva tri parametra, samo potvrđuje ranije iznešena zapažanja drugih autora, koja su potvrđena i u našoj studiji, da stepen oštećenja bubrežne funkcije značajno utiče na nivo NGAL-a.

Mnoga do sada objavljena istraživanja ukazuju na povezanost NGAL-a i proteinurije. Kod bolesnika sa lupus nefritisom je utvrđeno postojanje korelacije između vrednosti proteinurije i ekspresije NGAL-a na ćelijama intersticijuma i tubula. (32,58) Korelacija proteinurije je kod bolesnika sa lupus nefritisom utvrđena i sa urinarnim i serumskim nivoom NGAL-a. (32,58,113,115) Značajna korelacija NGAL-a sa vrednostima proteinurije je dokazana i kod bolesnika sa različitim tipovima primarnih glomerulonefritisa. (35,37,43,47,51,55,58,89) Kod bolesnika u našoj studiji nije utvrđeno postojanje korelacije između 24-časovne proteinurije i nivoa NGAL-a u serumu. Utvrđeno je postojanje linearne, pozitivne korelacije između nivoa NGAL-a u urinu i proteinurije. Korelacija je prisutna kako posmatranjem izmerenih vrednosti na početku ispitivanja, vrednosti nakon minimalno šest meseci praćenja, tako i posmatranjem svim izmerenih vrednosti tokom ispitivanja. Nije dokazano postojanje korelacije između proteinurije i odnosa uNGAL/kreatinin.

Potom su bolesnici posmatrani u zavisnosti da li postoje patološke vrednosti proteinurije, odnosno, ako postoje, da li su one subnephrotskog, nephrotskog ranga ili je u pitanju masivna proteinurija. Primećene su statistički značajne razlike u nivoima NGAL-a u serumu, između grupa bolesnika sa različitim vrednostima proteinurije, na osnovu čega se može zaključiti da nivo NGAL-a u serumu zavisi od vrednosti 24-časovna proteinurije. Nivo NGAL-a u serumu u grupi bolesnika sa normalnim vrednostima proteinurije (92,63 ng/ml) se značajno razlikovao u odnosu na nivoe kod bolesnika sa patološkom proteinurijom (184,96 ng/ml). Razlika između grupa bolesnika sa različitim vrednostima patološke proteinurije je primećena, ali nije statistički značajna. Primećene su i statistički značajne razlike u nivoima NGAL-a u urinu, između grupa bolesnika sa različitim vrednostima dnevne proteinurije, na osnovu čega se može zaključiti da i nivo NGAL-a u urinu zavisi od vrednosti dnevne proteinurije.

Kao posledica patološke proteinurije, dolazi do gubitka različitih serumskih proteina. Zbog svoje male molekulske mase, albumini lako prolaze kroz oštećenja glomerularne bazalne membrane i gube se urinom. Smanjenje nivoa albumina u cirkulaciji dovodi do smanjenja onkotskog pritiska, što za posledicu ima povećan izlazak cirkulišuće tečnosti u periferna tkiva, sa razvojem edema. Stoga je kod bolesnika sa masivnom proteinurijom često prisutna velika količina slobodne tečnosti u tercijarnim prostorima, koju mala količina cirkulišućih albumina ne može vratiti u krvne sudove. U našem ispitivanju smo posmatrali da li postoji povezanost izmedju nivoa NGAL-a i vrednosti serumskih albumina, odnosno ukupne količine vode u organizmu izmerene metodom bioimpedance. Prosečne vrednosti serumskih albumina kod naših bolesnika, su značajno porasle (27,94 g/l) nakon lečenja u dužini od minimalno šest meseci (37,35 g/l). Utvrđeno je postojanje negativne linearne korelacije izmedju vrednosti serumskih albumina i nivoa NGAL-a u urinu. Smanjenje serumske koncentracije albumina prati povećanje nivoa NGAL-a u serumu. Postojanje ove korelacije je najverovatnije indirektni pokazatelj značajne linearne korelacije izmedju proteinurije i nivoa NGAL-a u urinu, posebno obzirom da nije uočeno postojanje korelacije izmedju nivoa cirkulišućeg NGAL-a i vrednosti serumskog albumina. Prosečne vrednosti ukupne telesne vode se nisu značajnije razlikovale na početku ispitivanja (43,47%) i nakon primenjene terapije (41,41%). Nije utvrđeno postojanje korelacije izmedju nivoa NGAL-a u serumu ili urinu i količine ukupne vode u organizmu. Dehghan i sar. ukazuju da različita stanja i oboljenja koja dovode po poremećaja preraspodele vode u organizmu, poput nefrotskog sindroma, ciroze jetre ili kardijalne dekompenzacije, imaju značajan uticaj na očitavanja bioimpedance, koja u tim slučajevima postaju nepouzdana. (82) Zbog ovoga se smatra da BIA najveću specifičnost i senzitivnost ima kod zdravih euvolemičnih osoba. Obzirom da je veliki procenat naših bolesnika imao nefrotski sindrom, ili bar značajnu patološku proteinuriju, postoji mogućnost da je ovo uticalo na sama očitavanja metodom bioimpedance, kao i na dalja poredjenja.

Tokom istraživanja smo, kod naših bolesnika takodje pratili i postojanje hematurije. Nije utvrđeno prisustvo makrohematurije, tokom perioda praćenja, ni kod jednog od naših bolesnika. Na početku ispitivanja je prisustvo mikrohematurije verifikovano kod 78,33% bolesnika (47/60), a nakon minimalno šest meseci lečenja kod 43,86% bolesnika (25/57). Bolesnici sa prisutnom mikrohematurijom su imali veće nivoe NGAL-a u serumu, kako na početku ispitivanja (sa 171,20 ng/ml, bez 151,05 ng/ml), tako i tokom lečenja (sa 183,66 ng/ml, bez 175,23 ng/ml), ali ni u jednom momentu razlika nije dostigla statističku značajnost. Nije primećena razlika u nivoima NGAL-a u urinu, niti odnosa uNGAL/kreatinin izmedju grupa bolesnika sa i bez prisustva mikrohematurije, ni u jednoj tački posmatranja.

Poslednjih godina se ističe značaj postojanja glomerularne hematurije i razvoja oštećenja bubrežnih tubula i razvoja bubrežne insuficijencije. (10) U glomerulonefritisima tokom kojih dolazi do infiltracije glomerulusa leukocitima, defekti bazalne membrane se objašnjavaju dejstvom leukocita koji produkuju različite proinflamatorne citokine i metaloproteinaze, uključujući i MMP-9. (10,11,133) Ovi produkti inflamatornih ćelija dovode po promena strukture bazalne membrane. Infiltrisani leukociti oslobadaju NGAL, koji stabilizuje MMP-9, čime favorizuje njegovu aktivnost, a može indirektno uticati na

povećanje oštećenja GBM i prolazak većeg broja eritrocita u urin. U lumenu tubula, produkti raspada eritrocita poput hemoglobina, hema i gvoždja dovode do oštećenja tubula. (10) Pomoću transportnog sistema megalin-kubulin, slobodni hemoglobin ulazi u ćelije tubula, gde pokreće mehanizme ćelijske apoptoze. Kompeticijom za ćelijske receptore, NGAL smanjuje ulazak hemoglobina u tubulske ćelije. Raspadom hemoglobina u tubulskim ćelijama dolazi do oslobadjanja slobodnog gvoždja, koje je takodje toksično za ćeliju. Resorbovani NGAL iz tubularnog lumena oslobadja ćelije novonastalog gvoždja, čime sprečava dalja oštećenja. Sa druge strane, NGAL stimuliše oslobadjanje enzima hem oksigenaza 1, koji smanjuje oksidativni stres i sprečava apoptozu tubularnih ćelija. (20,23,28,39,58,68)

NGAL ne utiče na metabolizam gvoždja samo u bubrezima. Glavna uloga u organizmu mu je transport gvoždja vezanog za siderofore, što predstavlja alternativni put prenosa gvoždja. Mi smo u našem ispitivanju pokušali da utvrdimo postojanje direktne veze izmedju nivoa NGAL-a i parametara metabolizma gvoždja. Modelom višestruke regresije nije dokazan značajan uticaj vrednosti feremije, feritina u serumu, transferina u serumu, niti saturacije transferina na nivo NGAL-a u serumu ili urinu. Takodje, nije utvrđena razlika u prosečnim vrednostima NGAL-a u serumu, niti urinu bolesnika sa normalnim i sniženim vrednostima gvoždja u krvi.

Posmatrajući vrednosti hematokrita, utvrđeno je da grupa bolesnika sa smanjenim vrednostima hematokrita ima značajno veće nivoe NGAL-a u serumu (197,51 ng/ml) u odnosu na grupu bolesnika sa normalnim vrednostima hematokrita (163,39 ng/ml). Grupa bolesnika sa smanjenim vrednostima hematokrita takodje ima značajno veće nivoe NGAL-a u urinu (14,10 ng/ml) u odnosu na grupu bolesnika sa normalnim vrednostima hematokrita (11,59 ng/ml). Ovo bi moglo ukazivati da nizak hematokrit, odnosno smanjeno dopremanje gvoždja perifernim tkivima indukuje povećano oslobadjanje NGAL-a iz bubrega i drugih organa, sa posledičnim porastom njegove koncentracije u krvi, odnosno dovodi do intenziviranja dopremanja gvoždja alternativnim putevima prenosa. U nekoliko do sada objavljenih radova se pominje uticaj anemije na nivo NGAL-a ali bez jasnog definisanja ove povezanosti. (48,57,97) Sa druge strane, poznata je povezanost bubrežne insuficijencije i anemije kompleksne geneze. Kao što smo ranije izneli, oštećenje bubrežne funkcije je povezano sa povećanjem koncentracije NGAL-a u serumu, kao i sa smanjenjem hematokrita u okviru anemijskog sindroma, te i ovo može biti uzrok uočene povezanosti sniženih vrednosti hematokrita i povećanih koncentracija NGAL-a u serumu.

Nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike izmedju nivoa NGAL-a u serumu izmedju grupe bolesnika sa normalnim vrednostima transferina u serumu i grupe sa smanjenim vrednostima transferina u serumu, ali je razlika uočena u nivou NGAL-a u urinu, gde je grupa bolesnika sa normalnim vrednostima transferina u serumu imala značajno manji prosečan nivo NGAL-a u urinu (10,76 ng/ml) u odnosu na grupu bolesnika sa sniženim vrednostima transferina u serumu (14,00 ng/ml). Proteinurijom, tokom glomerulonefritisa, dolazi do gubitka različitih proteina, uključujući i transferina. Već je rečeno da NGAL predstavlja alternativni put prenošenja gvoždja, koji najznačajniju ulogu ima tokom perioda povećane potrebe za gvoždjem. Procesi regeneracije oštećenja bubrežnog tkiva, tokom glomerulonefritisa, iziskuju povećanu količinu gvoždja, koje u bubrege ne može biti dopremljeno u ovim uslovima, obzirom na smanjenu količinu

transferina. Postoji mogućnost da usled ovoga dolazi do povećanja nivoa NGAL-a u bubrezima, kao pokušaja organizma da kompenzuje nedostatak transferina, a samim tim i isporuke gvoždja oštećenim bubrezima. Zasićenost transferina gvoždjem u fiziološkim uslovima iznosi 20-40% za muškarce, odnosno 15-40% za žene. (30) Kod naših bolesnika nije primećena razlika u nivou cirkulišućeg NGAL-a, niti NGAL-a u urinu, između bolesnika sa normalnim vrednostima saturacije transferina i bolesnika sa smanjenom saturacijom transferina. Za razliku od našeg ispitivanja, Bolignano i sar. su kod svojih ispitanika na hemodijalizi utvrdili postojanje korelacije između nivoa NGAL-a i vrednosti serumskog feritina i saturacije transferina. (91) Primećeno je da bolesnici na hroničnom hemodijaliznom programu, sa saturacijom transferina manjom od 20%, imaju manji nivo NGAL-a.

Bez obzira na primarnu leziju koja dovodi do razvoja primarnog glomerulonefritisa, kao odgovor na oštećenje bubrežnih struktura, dolazi do razvoja lokalne inflamacije. Različiti pro-inflamatorni stimuli, dovode do značajne stimulacije transkripcije mRNA za NGAL i povećanja sinteze samog glikoproteina. (23) Infiltracija leukocita i interakcija leukocita i endotela su veoma značajni za razvoj inflamacije tokom glomerulonefritisa. Degranulacijom granulocita se oslobadja preformirani NGAL iz sekundarnih granula, koji dalje može regulisati broj leukocita, indukujući njihovu apoptozu, koja predstavlja snažan anti-inflamatorni signal za ostale ćelije imunog sistema. (22,39,53,77) Tokom glomerulonefritisa dolazi do oslobađanja velikog broja faktora rasta i citokina, među kojima mnogobrojni utiču na nivo NGAL-a. Potrebno je pomenuti uticaj TGF- β , TNF- α , IL-1 i interferona γ na koncentracije NGAL-a u bubrezima. (14,34,40,87) Ekspresija receptora za NGAL na tubulskim i ćelijama glomerulusa je indukovana IL-1 β . (34) Osim što različiti citokini dovode do povećane sinteze NGAL-a, on stimuliše oslobađanje različitih citokina, ali i povećava klirens lipofilnih medijatora inflamacije. (30,72) Iako definitivna uloga NGAL-a u inflamaciji koja je prisutna u bubrezima tokom glomerulonefritisa, nije do kraja razjašnjena, nema sumnje da veza između NGAL-a i inflamacije postoji. Mi smo u našoj studiji želeli da ispitamo da li postoji povezanost između nivoa NGAL-a i parametara sistemske inflamacije, koju su predstavljali leukociti, sedimentacija eritrocita, C reaktivni protein i fibrinogen u serumu. Utvrdili smo postojanje statistički značajnog uticaja broja leukocita na nivo NGAL-a u serumu. Ova korelacija je i očekivana, obzirom da leukociti predstavljaju glavni izvor cirkulišućeg NGAL-a, koji se smatra markerom degranulacije neutrofila. (22,23,43-46) Bolesnici sa povišenim brojem leukocita u krvi su imali značajno veće prosečne vrednosti NGAL-a u serumu (204,19 ng/ml) u odnosu na grupu bolesnika sa normalnim brojem leukocita (160,88 ng/ml). I bolesnici sa povišenim nivoom fibrinogena u serumu su imali značajno veće prosečne nivoe NGAL-a u serumu (187,21 ng/ml) u odnosu na bolesnike sa normalnim nivoom fibrinogena (149,55 ng/ml). Primećen je uticaj sedimentacije eritrocita na nivo NGAL-a u urinu, nakon najmanje šest meseci lečenja, dok nije zapažen uticaj drugih parametara inflamacije na nivo NGAL-a u urinu. Bolesnici sa povišenim vrednostima SE u prvom satu, su imali značajno veće nivoe NGAL-a u urinu (12,68 ng/ml) u odnosu na bolesnike sa normalnim vrednostima SE (10,72 ng/ml). Osim u serumu, bolesnici sa povišenim nivoom fibrinogena u serumu su imali i značajno veće prosečne nivoe NGAL-a u urinu (13,45 ng/ml) u odnosu na bolesnike sa normalnim nivoom fibrinogena u serumu (10,40 ng/ml).

Catalán i sar. su u svom ispitivanju na gojaznim osobama utvrdili postojanje korelacije između nivoa NGAL-a i C reaktivnog proteina, odnosno serumskog fibrinogena. (36) U našem radu nije utvrđeno postojanje korelacije nivoa NGAL-a ni sa jednim od ova dva parametara inflamacije, ali je primećeno da bolesnici sa patološkim vrednostima serumskog fibrinogena imaju povišen nivo NGAL-a, kako u serumu, tako i u urinu. Moguće je da je relativno mali broj bolesnika uticao na pomenute razlike, ali bez jasne korelacije nivoa NGAL-a i fibrinogena u serumu. U našem ispitivanju nije primećena nikakva povezanost vrednosti C reaktivnog proteina i nivoa NGAL-a.

Poznato je da lipokalin 2 modifikuje inflamatorni odgovor u masnom tkivu. (40,49) Masno tkivo je veoma aktivan metabolički i endokrini organ, koji produkuje različite adipokine, među kojima je i lipokalin 2. (29,36,40,49,63,77,81) Nije u potpunosti jasna uloga NGAL-a u razvoju inflamacije u masnom tkivu. Zhang i sar. smatraju da NGAL deluje kao antagonist efekta inflamatornih molekula. (49) Law i sar. iznose da NGAL aktivira metabolički put 12-lipoksigenaze, čime stimuliše adipocite na sekreciju TNF- α , što dovodi do lokalne inflamacije. (40) Osim TNF- α i drugi citokini koji se oslobađaju u masnom tkivu gojaznih osoba mogu podstaći povećano oslobađanje NGAL-a. (49,77,86) Ekspresija NGAL-a, kao i mRNA za NGAL su značajno povišeni u masnom tkivu i jetri gojaznih osoba. (24,36,40,49,77) NGAL se smatra nezavisnim faktorom rizika za razvoj insulinske rezistencije i dijabetesa. (40,63,77,81,87)

Za procenu uhranjenosti i količine masnog tkiva u organizmu se koriste različite metode, koje uključuju merenje telesne mase, indeks telesne mase – BMI, bioelektričnu impedancu i druge. Analiza bioelektričnom impedancom (BIA) je široko rasporistanjena metoda određivanja telesne kompozicije, stepena uhranjenosti i stepena hidracije organizma. (82,83) BIA je brza, neinvazivna i relativno jeftina metoda procene telesnog sastava, tokom koje se električna struja male jačine propušta kroz telo ispitanika, a BIA analizatorom se meri otpor tkiva toku struje kroz njega. Tečnost u mišićima i drugim telesnim tkivima lako provodi električnu struju, dok masno tkivo pravi otpor protoku električne struje. Što su otpor, odnosno impedanca veći i količina masnog tkiva je veća. (82-84)

Tokom našeg ispitivanja, metodom bioelektrične impedance su mereni procenat masnog tkiva u organizmu, ukupna masa masnog tkiva u organizmu i ranije pomenuta ukupna količina vode u organizmu. Takodje su mereni telesna masa i visina, na osnovu kojih je izračunavan indeks telesne mase. Na osnovu modela višestruke regresije nije utvrđeno postojanje statistički značajnog uticaja telesne mase, BMI, procenta masnog tkiva niti ukupne mase masnog tkiva na nivo NGAL-a u serumu, niti nivo NGAL-a u urinu. Medjutim, kada smo na osnovu vrednosti BMI bolesnike podelili na grupu pothranjenih i normalno uhranjenih bolesnika ($BMI \leq 25$) i grupu previše uhranjenih i gojaznih bolesnika ($BMI > 25$), zapaženi su značano veći nivoi NGAL-a u serumu osoba sa $BMI > 25$ (182,46 ng/ml) u odnosu na ispitanike sa $BMI \leq 25$ (151,67 ng/ml). Nije primećena razlika u nivoma NGAL-a u urinu između bolesnika sa $BMI \leq 25$ (12,29 ng/ml) i bolesnika sa $BMI > 25$ (12,27 ng/ml). Takodje, kada smo bolesnike, na osnovu procenta masnog tkiva u organizmu, podelili na grupu sa malom i normalnom količinom masnog tkiva (žene $\leq 35\%$, muškarci $\leq 22\%$ masnog tkiva) i grupu sa povećanom i prekomernom količinom masnog tkiva (žene $> 35\%$, muškarci $> 22\%$ masnog tkiva),

zapaženo je da bolesnici sa povećanom i prekomernom količinom masnog tkiva u organizmu imaju značajno veće nivoe NGAL-a u serumu (196,14 ng/ml) u odnosu na bolesnike sa malom i normalnom količinom masnog tkiva (157,87 ng/ml). Nije primećena značajna razlika u nivoima NGAL-a u urinu između bolesnika sa različitim procentom masnog tkiva u organizmu (12,07 ng/ml; 12,70 ng/ml).

Nedostaci naše studije su u relativno malom broju ispitanika i relativno kratkom periodu praćenja. Obzirom da je u studiju uključeno samo 60 ispitanika, pri podeli na različite grupe se dešavalo da grupu sačinjava samo jedan ili dva ispitanika, što je ispod statističkog minimuma, te su te grupe morale biti isključene iz daljeg posmatranja, što je imalo uticaja na krajnje rezultate i zaključke. U više posmatranja je primećeno da postoji razlika između određenih vrednosti, ali vidjena razlika nije dostigla statističku značajnost. Ispitivanja na većem broju ispitanika bi možda dala odgovor u smislu potvrde primećene zakonitosti ili bi ukazala da je primećena razlika slučajnost. Kod najvećeg broja ispitanika u našoj studiji je kontrolni pregled urađen nakon šest meseci, kada je određen i efekat lečenja, kao i stanje bubrežne funkcije, odnosno postojanje progresije bubrežne insuficijencije. Postoji mogućnost da bi pri dužem praćenju, a samim tim i lečenju, veći broj ispitanika razvio remisiju. Takođe, duže praćenje bi moglo uticati da veći broj ispitanika pogorša bubrežnu funkciju ili razvije terminalni stadijum bubrežne insuficijencije. Sve ove iznete mogućnosti bi mogle značajno uticati na zaključke o postojanju povezanosti između nivoa NGAL-a i krajnjih efekata lečenja.

Iz svega iznesenog se može zaključiti da je NGAL već zauzeo značajno mesto među biomarkerima koji se koriste u nefrologiji. On je predstavnik nove grupe nefroloških biomarkera, čije je stvaranje indukovano oštećenjima u bubregu, posebno tubularnim, što znači da je za njegovu pojavu u urinu potrebno određeno vreme. (21) Od renalnih biomarkera se očekuje da, u kliničkom radu, daju precizniju i bržu procenu o stepenu bubrežnog oštećenja, bolju korelaciju sa bubrežnom funkcijom i njenim promenama tokom vremena, posebno kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom, upute na anatomske lokalizacije ozlede, ukažu na uzrok pojave bubrežne lezije, omogućće preciznije praćenje efikasnosti lečenja i ukažu na potencijalni tok i prognozu bubrežne lezije. (21) Mi smo u svom ispitivanju pokušali da damo odgovor na neka od ovih pitanja, za NGAL kao biomarker u primarnim glomerulonefritisima. Kao što je ranije izneto, primarni glomerulonefritisi su grupa oboljenja sa veoma varijabilnim histološkim promenama, kliničkim tokom i težinom oboljenja, a samim tim i potrebom za primenom imunosupresivne terapije, kao i velikim razlikama u toku i prognozi bolesti, što već na samom početku predstavlja prepreku da jedan biomarker da odgovore na sva gore postavljena pitanja. Samim tim što postoje tipovi oboljenja sa izrazito brzim tokom i lošom prognozom, postoji jasna potreba za identifikacijom biomarkera koji bi omogućio brže postavljanje dijagnoze radi započinjanja terapije. Postavlja se pitanje da li upotreba jednog biomarkera može dati odgovor na sva pitanja koja se pojavljuju pri postavljanju dijagnoze primarnih glomerulonefritisa, ili je realnije očekivati da će kombinovana upotreba više biomarkera dati adekvatnije odgovore. Kao što znamo, koncentracije biomarkera se mogu određivati iz različitih telesnih tečnosti, poput seruma, plazme, urina i sl., kao i njihova ekspresija u samom biopsatu tkiva, gde nivoi različitih biomarkera značajno variraju u zavisnosti u kojem biološkom uzorku se određuju, te isti biomarker može dati značajne

odgovore merenjem u jednom biološkom uzorku, a da određivanje u drugom nema nikakvu značajnost.

Mnogobrojna dosadašnja ispitivanja su dokazala da je NGAL višestruko uključen u mrežu patofizioloških procesa tokom razvoja i sanacije primarnih glomerulonefritisa, iako njegova tačna uloga još uvek nije do kraja razjašnjena. Ovo ukazuje da bi NGAL mogao dati potencijalno korisne informacije o nastanku toku i prognozi primarnih glomerulonefritisa. Na osnovu rezultata naše studije i ranije objavljenih ispitivanja, može se zaključiti da uloga NGAL-a u dijagnostici primarnih glomerulonefritisa, svakodnevno dobija na značaju. Ali, kako bi njegova upotreba ušla u svakodnevnu kliničku praksu, neophodna su dalja, prospektivna ispitivanja, na većim uzorcima ispitanika, koja bi omogućila brže postavljanje dijagnoze i uvođenje odgovarajućih terapija, ukazala na potencijalno loš tok oboljenja ili povećan rizik od nastanka relapsa primarnog glomerulonefritisa.

7. ZAKLJUČCI:

1. Bolesnici sa primarnim glomerulonefritisima imaju značajno veće nivoe lipokalina 2 u serumu i lipokalina 2 u urinu, pri postavljanju dijagnoze, u odnosu na zdrave osobe.
2. Bolesnici sa proliferativnim formama primarnog glomerulonefritisa imaju veće nivoe lipokalina 2 u serumu i vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin pri postavljanju dijagnoze, u odnosu na bolesnike sa neproliferativnim oblicima primarnog glomerulonefritisa, ali razlika nije statistički značajna. Vrednosti nivoa lipokalina 2 u urinu pri postavljanju dijagnoze, se ne razlikuju između bolesnika sa proliferativnim i neproliferativnim oblicima primarnog glomerulonefritisa.
3. Kod bolesnika sa primarnim glomerulonefritisima postoji pozitivna linearna korelacija između nivoa lipokalina 2 u serumu i vrednosti serumskog kreatinina, vrednosti ureje, mokraćne kiseline i broja leukocita. Kod bolesnika sa primarnim glomerulonefritisima postoji negativna linearna korelacija između nivoa lipokalina 2 u serumu i vrednosti klirensa kreatinina izmerenog u 24-časovnom urinu i klirensa kreatinina izračunatog MDRD formulom. Kod bolesnika sa primarnim glomerulonefritisima postoji negativna linearna korelacija između nivoa lipokalina 2 u urinu i vrednosti klirensa kreatinina izračunatog MDRD formulom.
4. Među bolesnicima sa primarnim glomerulonefritisima, bolesnici sa oštećenjem bubrežne funkcije imaju značajno veće nivoe lipokalina 2 u serumu u odnosu na bolesnike sa urednom bubrežnom funkcijom. Nema značajne razlike u nivoima lipokalina 2 u urinu, kao ni u prosečnim vrednostima odnosa uNGAL/kreatinin između bolesnika sa oštećenom i urednom bubrežnom funkcijom, tokom primarnih glomerulonefritisa.
5. Bolesnici sa primarnim glomerulonefritisima koji nemaju pozitivan odgovor na primenjenu terapiju, imaju veće vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin pri postavljanju dijagnoze, u odnosu na bolesnike sa pozitivnim odgovorom na primenjenu terapiju, ali razlika nije statistički značajna. Kod bolesnika sa primarnim glomerulonefritisima ne postoji razlika u vrednostima nivoa lipokalina 2 u serumu ili urinu pri postavljanju dijagnoze, između bolesnika koji pozitivno i negativno reaguju na terapiju.
6. Bolesnici sa primarnim glomerulonefritisima, koji pri postavljanju dijagnoze imaju nivo lipokalina 2 u urinu veći od 16 ng/ml i vrednost odnosa uNGAL/kreatinin veću od 22 ng/mg, imaju povećan rizik od pogoršanje bubrežne funkcije. Kod bolesnika sa primarnim glomerulonefritisima vrednosti nivoa lipokalina 2 u serumu pri postavljanju dijagnoze, se ne razlikuju značajno između bolesnika koji imaju povoljan i nepovoljan efekat lečenja na bubrežnu funkciju.

7. Bolesnici sa primarnim glomerulonefritisima i postojanjem intersticijalne fibroze na bioptatu bubrega, imaju značajno veće nivoe lipokalina 2 u serumu, u odnosu na bolesnike bez postojanja fibroze intersticijuma na nalazu bioptata bubrega. Bolesnici sa primarnim glomerulonefritisima i postojanjem atrofije tubula na bioptatu bubrega, imaju značajno veće nivoe lipokalina 2 u serumu, u odnosu na bolesnike bez postojanja tubulske atrofije na nalazu bioptata bubrega.
8. Kod bolesnika sa primarnim glomerulonefritisima postoji pozitivna linearna korelacija između nivoa lipokalina 2 u urinu i vrednosti dnevne proteinurije. Bolesnici sa primarnim glomerulonefritisima i postojanjem patološke proteinurije imaju značajno veće nivoe lipokalina 2 u serumu u odnosu na bolesnike sa normalnom proteinurijom.
9. Bolesnici sa primarnim glomerulonefritisima, koji u okviru terapije osnovne bolesti primaju kortikosteroide imaju značajno veće nivoe lipokalina 2 u serumu, u odnosu na bolesnike bez kortikosteroida u terapiju. Vrednosti odnosa uNGAL/kreatinin su veće kod bolesnika koji primaju kortikosteroide, u odnosu na bolesnike bez kortikosteroidne terapije, ali razlika nije statistički značajna.
10. Bolesnici sa primarnim glomerulonefritisima i sniženim vrednostima hematokrita imaju značajno veće nivoe lipokalina 2 u serumu i urinu, u odnosu na bolesnike sa normalnim vrednostima hematokrita. Bolesnici sa primarnim glomerulonefritisima i sniženim vrednostima transferina u serumu imaju značajno veće nivoe lipokalina 2 u urinu, u odnosu na bolesnike sa normalnim vrednostima transferina u serumu.
11. Bolesnici sa primarnim glomerulonefritisima i povišenim vrednostima fibrinogena u serumu imaju značajno veće nivoe lipokalina 2 u serumu i urinu, u odnosu na bolesnike sa normalnim vrednostima fibrinogena u serumu.
12. Bolesnici sa primarnim glomerulonefritisom, koji su prekomerno uhranjeni (BMI > 25), odnosno imaju prekomernu količinu masnog tkiva u organizmu, imaju značajno veće nivoe lipokalina 2 u serumu, u odnosu na normalno uhranjene bolesnike, odnosno bolesnike sa urednom količinom masnog tkiva u organizmu.

8. LITERATURA

1. Grundmann E. Current topics in pathology Volume 61 Glomerulonephritis. 1st ed. Verlag Berlin: Springer 1976.
2. Galešić K, editor. Bolesti glomerula primarne i sekundarne. 1 st ed. Zagreb: Medicinska naklada 2014.
3. Donadio C. Dialysis with high-flux membranes significantly affects plasma levels of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *Critical Care* 2016; 20: 20 (doi: 10.1186/s13054-016-1198-4)
4. Das U, Dakshinamurthy KV, Prayaga A. Pattern of biopsy-proven renal disease in a single center of south India: 19 years experience. *Indian J Nephrol.* 2011 Oct-Dec; 21(4): 250–257. (doi: 10.4103/0971-4065.85482)
5. Mardanpour K, Rahbar M. Histopathologic patterns of adult renal disease in Kermanshah, Iran: A 6-year review of two referral centers. *Caspian J Intern Med* 2013; 4: 3: 717-721
6. Fiorentino M, Bolignano D, Tesar V, Pisano A, Van Biesen W, D'Arrigo G et al. On behalf of the ERA-EDTA Immunonephrology Working Group Renal Biopsy in 2015 – From Epidemiology to Evidence-Based Indications. *Am J Nephrol* 2016; 43: 1–19 (doi: 10.1159/000444026)
7. Lennon R, Randles MJ, Humphries MJ. The importance of podocyte adhesion for a healthy glomerulus. *Front. Endocrinol* 2014; 5: 160 (doi.org/10.3389/fendo.2014.00160)
8. Satchell SC, Braet F. Glomerular endothelial cell fenestrations: an integral component of the glomerular filtration barrier. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296: 5: 947–956 (doi: 10.1152/ajprenal.90601.2008)
9. Farquhar MG. The glomerular basement membrane: not gone, just forgotten. *J Clin Invest* 2006; 116: 2090–2093 (doi:10.1172/JCI29488)
10. Park GY, Yu CH, Kim JS, Kang YJ, Kwon O, Choi JY et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a potential predictor of adverse renal outcomes in immunoglobulin A nephropathy. *Korean J Intern Med* 2015; 30 : 345-353 (doi.org/10.3904/kjim.2015.30.3.345)
11. Moreno JA, Martin-Cleary C, Gutierrez E, Rubio-Navarro A, Ortiz A, Praga M et al. Haematuria: the forgotten CKD factor? *NDT* 2012; 27: 28–34 (doi: 10.1093/ndt/gfr749)
12. Manno C, Strippoli GFM, Arnesano L, Bonifati C, Campobasso N, Gesualdo L et al. Predictors of bleeding complications in percutaneous ultrasound-guided renal biopsy. *Kidney International* 2004; 66: 4: 1570-1577
13. De Seigneux S, Martin PY. Management of patients with nephrotic syndrome *SWISS MED WKLY* 2009; 139 (29–30): 416–422
14. Ortega LM, Fornoni A. Role of cytokines in the pathogenesis of acute and chronic kidney disease, glomerulonephritis, and end-stage kidney disease. *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research* 2010; 2: 49–62
15. Božić D. Značaj intersticijskih promena za prognozu i tok primarnih glomerulonefritisa. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu. 2007.
16. Rhee H, Shin N, Shin MJ, Yang BY, Kim IY, Song SH et al. High serum and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels are independent predictors of renal

- progression in patients with immunoglobulin A nephropathy. *Korean J Intern Med* 2015; 30: 354-361 (doi.org/10.3904/kjim.2015.30.3.354)
17. Okon K, Sulowicz W, Smolenski O, Sydor A, Chrusciel B, Kirker-Nowak A et al. Interstitial, tubular and vascular factors in progression of primary glomerulonephritis. *Pol J Pathol* 2007; 58: 2: 73-78
18. Moroni G, Pozzi C, Quaglini S, Segagni S, Banfi G, Baroli A et al. Long-term prognosis of diffuse proliferative glomerulonephritis associated with infections in adults. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 1204-1211
19. Bolignano D, Lacquaniti A, Coppolino G, Donato V, Campo S, Fazio MR et al. Neutrophil gelatinase - associated lipocalin (NGAL) and progression of chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4: 337-344
20. Strimbu K, Tavel JA. What are Biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS* 2010; 5: 6: 463–466. (doi:10.1097/COH.0b013e32833ed177)
21. McMahon GM, Waikar SS. Biomarkers in Nephrology. *Am J Kidney Dis* 2013; 62: 1: 165–178 (doi:10.1053/j.ajkd.2012.12.022)
22. Kowsalya R, Jagatheesh K, Padarathi PK, Elangovan N. A functional approach on neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) – lipocalin family. *International Journal of Bioassays* 2013; 2: 2: 483-487
23. Chakraborty S, Kaur S, Guha S, Batra SK. The Multifaceted Roles of Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL) In Inflammation and Cancer. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1826: 1: 129–169 (doi:10.1016/j.bbcan.2012.03.008)
24. Chakraborty S, Kaur S, Tong Z, Batra SK, Guha S. Neutrophil gelatinase associated lipocalin: structure, function and role in human pathogenesis. In: *Acute phase proteins – Regulation and function of acute phase proteins*. Prof. Francisco Veas (Ed.), ISBN: 978-953-307-252-4, InTech, 2011.
25. Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J* 1996; 318: 1-14.
26. Hvidberg V, Jacobsen C, Strong RK, Cowland JB, Moestrup SK, Borregaard N. The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Letters* 2005; 579: 773-777
27. Noto A, Cibecchini F, Fanos V, Mussap M. NGAL and metabolomics: The single biomarker to reveal the metabolome alternations in kidney injury. *BioMed Research International* 2013; 7: A612032 (doi.org/10.1155/2013/612032)
28. Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY, Kalandadze A, Cohen DJ, Devarajan P et al. Dual action of neutrophil gelatinase – associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 407-413
29. Xu G, Ahn JH, Chang SY, Eguchi M, Ogier A, Han SL et al. Lipocalin-2 Induces Cardiomyocyte Apoptosis by Increasing Intracellular Iron Accumulation. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 2012; 287: 7: 4808–4817 (doi 10.1074/jbc.M111.275719)
30. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Stong RK. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore - mediated iron acquisition. *Molecular Cell* 2002;10:1033-1043

31. Mårtensson J, Bellomo R. The rise and fall of NGAL in Acute kidney injury. *Blood Purif* 2014; 37: 304-310
32. Lu J, Kwan BCH, Lai FMM, Choi PCL, Tam LS, Li EKM et al. The gene expression of NGAL and TLR9 in glomerulus and tubulo – interstitium of patients with lupus nephritis. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 2011; 2: 33-39
33. Simonazzi G, Capelli I, Curti A, Comai G, Rizzo N, La Manna G. Serum and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin monitoring in normal pregnancy versus pregnancies complicated by pre-eclampsia. *In Vivo* 2015; 29: 117-122
34. Mao S, Jiang T, Shang G, Wu Z, Zhang M. Increased expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin receptor by interleukin - 1 β in human mesangial cells via MAPK/ERK activation. *International Journal of Molecular Medicine* 2011; 27: 555-560
35. Bolignano D, Coppolino G, Lacquaniti A, Nicocia G, Buemi M. Pathological and prognostic value of urinary neutrophil gelatinase – associated lipocalin in macroproteinuric patients with worsening renal function. *Kidney Blood Press Res* 2008; 31: 274-279
36. Catalán V, Gomez-Ambrosi J, Rodríguez A, Ramírez B, Silva C, Rotellar F et al. Increased adipose tissue expression of lipocalin-2 in obesity is related to inflammation and matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 activity in humans. *J Mol med (Bere)* 2009; 87: 8: 803-813
37. Carnero V, Bolignano D, Donato V, Lacquaniti A, Buemi A, Crasci E et al. NGAL is a precocious marker of therapeutic response. *Current Pharmaceutical Design* 2011; 17: 844-849
38. Clifton MC, Corrent C, Strong RK. Siderocalins: siderophore-binding proteins of the innate immune system. *Biometals* 2009; 22: 557-564
39. Mori K, Lee T, Rapoport D, Drexler IR, Foster K, Yang J et al. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischaemia-reperfusion injury. *The Journal of Clinical Investigation* 2005; 115; 3: 610-621
40. Law IKM, Xu A, Lam KSL, Berger T, Mak TW, Vanhoutte PM et al. Lipocalin-2 deficiency attenuates insulin resistance associated with aging and obesity. *Diabetes* 2010; 59: 872-882
41. Cai L, Rubin J, Han W, Venge P, Xu S. The origin of multiple molecular forms in urine of HNL/NGAL. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5: 2229-2235 (doi: 10.2215/CJN.00980110)
42. Fassett RG, Venuthurupalli SK, Gobe GC, Coombes JS, Cooper MA. Biomarkers in chronic kidney disease: a review. *Kidney International* 2011; 80: 806-821
- 43 Bolignano D, Coppolino G, Aloisi C, Romeo A, Nicocia G, Buemi M. Effect of a single intravenous immunoglobulin infusion on neutrophil gelatinase – associated lipocalin levels in proteinuric patients with normal renal function. *Journal of Investigative Medicine* 2008; 56; 8: 997-1003
44. Chen M, Wang F, Zhao MH. Circulating neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a useful biomarker for assessing disease activity of ANCA-associated vasculitis. *Rheumatology* 2009; 48: 355-358
45. Wang F, Chen M, Zhao MH. Neutrophil degranulation in antineutrophil cytoplasmic antibody-negative pauci-immune crescent glomerulonephritis. *JNephrol* 2009; 22: 491-496

46. Ohlsson S, Wieslander J, Segelmark M. Increased circulating levels of proteinase 3 in patients with anti-neutrophilic cytoplasmatic autoantibodies-associated systemic vasculitis in remission. *Clin Exp Immunol* 2003; 131: 528-535
47. Ding H, He Y, Li K, Yang J, Li X, Lu R et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is an early biomarker for renal tubulointerstitial injury in IgA nephropathy. *Clinical Immunology* 2007; 123: 227-234
48. Edelstein CL, editor. *Biomarkers in kidney disease*. 1st ed. London: Academic Press, Elsevier; 2011
49. Zhang J, Wu YJ, Zhang Y, LeRoith D, Bernlohr DA, Chen X. The role of lipocalin 2 in the regulation of inflammation in adipocytes and macrophages. *Molecular Endocrinology* 2008; 22: 1416-1426
50. Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV. Biomarkers of akute kidney injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008; 48: 463-493
51. Soni SS, Cruz D, Bobek I, Chionh CY, Nalesso F, Lentini P et al. NGAL: a biomarker of acute kidney injury and other systemic conditions. *Int Urol Nephrol* 2010; 42: 141-150
52. Devarajan P. The use of targeted biomarkers for chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 2010; 17; 6: 469-479
53. Miharada K, Hiroyama T, Sudo K, Nagasawa T, nakamura Y. Lipocalin 2 functions as a negative regulator of red blood cell production in an autocrine fashion. *The FASEB Journal* 2005; 19: 13: 1881-1883 (doi: 10.1096/fj.05-3809fje)
54. Yang J, Goetz D, Li JY, Wang W, Mori K, Setlik D et al. An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Molecular Cell* 2002; 10: 1045-1056
55. Bolignano D, Coppolino G, Campo S, Aloisi C, Nicocia G, Frisina N et al. Urinary neutrophil gelatinase - associated lipocalin (NGAL) is associated with severity of renal disease in proteinuric patients. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 414-416
56. Hinze CH, Suzuki M, Klein-Gitelman M, Passo MH, Olson J, Singer NG et al. Neutrophil gelatinase – associated lipocalin is a predictor of the course of global and renal childhood – onset systemic lupus erythematosus disease activity. *Arthritis & Rheumatism* 2009; 60: 9: 2772-2791
57. Devarajan P. Emerging biomarkers for acute kidney injury. *Contrib Nephrol* 2007; 156: 203-212
58. Bolignano D, Donato V, Coppolino G, Campo S, Buemi A, Lacquaniti A et al. Neutrophil gelatinase – associated lipocalin (NGAL) as a marker of kidney damage. *American Journal of Kidney Diseases* 2008; 52: 3: 595-605
59. Miethke M, Skerra A. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin expresses antimicrobial activity by interfering with L-norepinephrine-mediated bacterial iron acquisition. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010; 54: 4: 1580-1589 (doi: 10.1128/AAC.01158-09)
60. Gharishvandi F, Kazerouni F, Ghanei E, Rahimpour A, Amirrouli H, Nasiri M. Assesment of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as an early biomarker for detection of renal impairment in hypertensive patients. *JPS* 2014; 5: 1: 63-66
61. Giannandrea M, Parks WC. Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *Disease Models & Mechanisms* 2014; 7: 193-203 (doi:10.1242/dmm.012062)

62. Korzeniecka-Kozerska A, Wasilewska A, Tenderenda E, Sulik A, Cybulski K. Urinary MMP-9/NGAL ratio as a potential marker of FSGS in nephrotic children. *Disease markers* 2013; 34: 357-362
63. Zhao P, Elks CM, Stephens JM. The induction of lipocalin-2 expression in vivo et in vitro. *J Biol Chem* 2014; 289: 5960-5969 (doi: 10.1074/jbc.M113.532234)
64. Tan TK, Zheng G, Hsu TT, Lee SR, Zhang J, Zhao Y ET et al. Matrix Metalloproteinase-9 of Tubular and Macrophage Origin Contributes to the Pathogenesis of Renal Fibrosis Via Macrophage Recruitment Through Osteopontin Cleavage. *Lab Invest* 2013; 93: 4: 434-449
65. Paragas N, Qiu A, Hollmen M, Nicolas TL, Devarajan P, Barasch J. NGAL – Siderocalin in kidney disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012; 1823: 1451-1458
66. Bao G, Clifton M, Hoette TM, Mori K, Deng SX, Qiu A et al. Iron traffics in circulation bound to a siderocalin (Ngal) – catechol complex. *Nat Chem Biol.* 2010; 6: 8: 602-609
67. Srinivasan G, Aitken JD, Zhang B, Carvalho FA, Chassaing B, Shashidharamurthy R et al. Lipocalin 2 deficiency dysregulates iron homeostasis and exacerbates endotoxin – induced sepsis. *The Journal of Immunology* 2012; 189: 1911-1919
68. Langelueddecke C, Roussa E, Fenton RA, Wolf NA, Lee WK, Thevenod F. Lipocalin-2 (24p3/Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)) receptor is expressed in distal nephron and mediates protein endocytosis. *J Biol Chem* 2012; 287; 1: 159-169
69. Popović P, Žunić G, Dinčić E. Savremena saznanja o molekulskim mehanizmima regulacije homeostaze gvožđa. *Vojnosanit Pregl* 2002; 59: 6: A653
70. Nath KA. Heme oxygenase-1 and acute kidney injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2014; 23: 1: 17–24 (doi:10.1097/01.mnh.0000437613.88158.d3)
71. Mok CC. Biomarkers for lupus nephritis: A critical appraisal. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010; article ID 638413, 11 pages (doi:10.1155/2010/638413)
72. Pawar RD, Pitashny M, Gindea S, Tieng AT, Levine B, Goilav B et al. Neutrophil gelatinase – associated lipocalin is instrumental in the pathogenesis of antibody – mediated nephritis in mice. *Arthritis & Rheumatism* 2012; 64; 5: 1620-1631
73. Milić B. Biomarkeri u lupus nefritisu. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu. 2013.
74. Liu Z, Reba S, Chen WD, Porwal SK, Boom WH, Petersen RB et al. Regulation of mammalian siderophore 2,5-DHBA in the innate immune response to infection *J Exp Med* 2014; 2: 211: 6: 1197-1213 (doi: 10.1084/jem.20132629)
75. Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron *NATURE* 2004; 432: 917-921
76. Löffek S, Schilling O, Franzke CW. Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Respir J* 2011; 38: 191-208 (doi: 10.1183/09031936.00146510)
77. Yan QW, Yung Q, Mody N, Graham TE, Hsu CH, Xu Z et al. The adipokine lipocalin 2 is regulated by obesity and promotes insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56: 2533-2540
78. Miao Y, Abraham SN. Kidney α – intercalated cells and lipocalin 2: defending the urinary tract. *The Journal of Clinical Investigation* 2014; 124; 7: 2844-2846

79. Rubinstein T, Pitashny M, Levine B, Schwartz N, Schwatzman J, Weinstein E et al. Urinary neutrophil gelatinase – associated lipocalin as a novel biomarker for disease activity in lupus nephritis. *Rheumatology* 2010; 49: 5: 960-971
80. Xiang D, Zhang H, Bai J, Ma J, Li M, Wang C. Clinical application of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in the revised chronic kidney disease classification. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7: 10:7172-7181
81. Tan BK, Adya R, Shan X, Syrd F, Lewandowski KC, O’Hare JP et al. Ex vivo and in vivo regulation of Lipocalin – 2, a novel adipokine, by insuline. *Diabetes Care* 2009; 32: 1: 129-131
82. Dehghan M, Merchant AT. Is bioelectrical impedance accurate for use in large epidemiological studies? *Nutrition Journal* 2008; 7: A26 (doi 10.1186/1475-2891-7-26)
83. Di Somma S, Lukaski HC, Codognotto M, Peacock WF, Fiorini F, Aspromonte N et al. Consensus paper on the use of BIVA (Bioelectrical Impedance Vector Analysis) in medicine for the management of body hydration. *Emergency care Journal* 2011; 4: 6-14
84. Hlubik J, Hlubik P, Lhotska L. Bioimpedance in medicine: measuring hydration influence. *Journal of Physics: Conference Series* 2010; 224: A012135 (doi:10.1088/1742-6596/224/1/012135)
85. Gallagher D, Heymsfield SB, Heo M, Jebb SA, Murgatroyd PR, Sakamoto Y. Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 694–701
86. Ahmed HH, Hameed ERA, Shalby AB, El-Nady HG. Potent role of lipocalin in childhood obesity. *World Journal of Medical Sciences* 2012; 7: 2: 100-104
87. Hashikata A, Yamashita A, Suzuki S, Nagayasu S, Shinjo T, Taniguchi A et al. The inflammation – lipocalin 2 axis may contribute to the development of chronic kidney disease. *NDT* 2013; 0: 1-10
88. Susianti H, Iriane VM, Dharmanata S, Handono K, Widijanti A, Gunawan A et al. Analysis of urinary TGF- β 1, MCP-1, NGAL and IL-17 as biomarkers for lupus nephritis. *Pathophysiology* 2015; 22: 65-71 (doi.org/10.1016/j.pathophys.2014.12.003)
89. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Saito Y et al. Urinary neutrophil gelatinase – associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules and distal nephrons. *Kidney International* 2009; 75: 285-294
90. Dihazi GH, Jahn O, Tampe B, Zeisberg M, Müller C, Müller GA et al. Proteomic analysis of embryonic kidney development: Heterochromatin proteins as epigenetic regulators of nephrogenesis. *Sci Rep* 2015; 5: A13951 (doi: 10.1038/srep13951)
91. Bolignano D, Coppolino G, Romeo A, De Paola L, Buemi A, Lacquaniti A et al. Neutrophil gelatinase – associated lipocalin (NGAL) reflects iron status in haemodialysis patients. *NDT* 2009; 24: 3398-3403
92. Auguet T, Quintero Y, Terra X, Martinez S, Lucas A, Pellitero S et al. Upregulation of lipocalin 2 in adipose tissues of severely obese women: positive relationship with proinflammatory cytokines. *Obesity* 2011; 19: 2295-2300
93. Moreno-Navarrete JM, Manco M, Ibáñez J, García-Fuentes E, Ortega F, Gorostiaga E et al. Metabolic endotoxemia and saturated fat contribute to circulating NGAL concentrations in subjects with insulin resistance. *International Journal of Obesity* 2009; 34: 2: 1–10 (doi:10.1038/ijo.2009.242)

94. Choi KM, Lee JS, Kim EJ, Baik SH, Seo HS, Choi DS et al. Implication of lipocalin-2 and visfatin levels in patients with coronary heart disease. *European Journal of Endocrinology* 2008; 158: 203–207
95. Panidis D, Tziomalos K, Koioy E, Kandarakis EA, Tsourdi E, Delkos D et al. The effects of obesity and polycystic ovary syndrome on serum lipocalin-2 levels: a cross-sectional study. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2010; 8: A151 (doi: 10.1186/1477-7827-8-151)
96. Makris K, Markou N, Evodia E, Dimopoulou E, Drakopoulos I, Ntetsika K et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as an early marker of acute kidney injury in critically ill multiple trauma patients. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47: 1: 79–82
97. Wasilewska A, Zoch-Zwierz W, Taranta-Janusz K, Michaluk-skutnik J. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a new marker of cyclosporine nephrotoxicity? *Pediatr Nephrol* 2010; 25: 889-897 (doi 10.1007/s00467-009-1397-1)
98. Tawfik Y, Shaat RM, El-Bassiony SR, Hawas S, Effat N. Urinary and serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker in Egyptian systemic lupus erythematosus patients: Relation to lupus nephritis and disease activity. *The Egyptian Rheumatologist* 2015; 37: 25–31
99. Bennet MR, Piaphance N, Czech K, Mitsnefes M, Devarajan P. NGAL – distinguishes steroid sensitivity in idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2012; 27: 807-812
100. Torres-Salido MT, Cortés-Hernández J, Vidal X, Pedrosa A, Vilardell-Tarrés M, Ordi-Ros J. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker for lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2014; 0: 1–10 (doi: 10.1093/ndt/gfu062)
101. Li W, Li D, Xu T, Zhang Y, Zhu H, Han F. The value of urinary NGAL on the early intervention patients undergoing percutaneous coronary in diagnosis of contrast-induced nephropathy. *Heart* 2011; 97: A150 (doi:10.1136/heartjnl-2011-300867.438)
102. Jørgensen HK, Bisgaard J, Gilsaa T. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker of dialysis-dependent acute kidney injury following infrarenal aortic surgery. doi.org/10.7243/2049-9752-2-16
103. Bennett M, Dent CL, Ma Q, Dastala S, Grenier F, Workman R et al. Urine NGAL predicts severity of acute kidney injury after cardiac surgery: a prospective study. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3: 665-673 (doi; 10.2215/CJN.04010907)
104. Mori K, Igarashi T, Inoue K, Suzuki T, Morisaki H, Takeda J. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin/lipocalin2, derived from gut crypt cells, exerts intestinal antimicrobial effect via bacterial stimulation of Toll-like receptor 4 and 9. *Crit Care* 2013; 17: 2: A14 (doi: 10.1186/cc11952)
105. Gheissari A, Rezali Z, Merrikhi A, Madihi Y, Kelishadi R. Association of neutrophil gelatinase associated lipocalin and cystatin C with kidney function in children with nephrotic syndrome. *Int J Prev Med* 2013; 4: 8: 956-963
106. Viau A, Karoui KE, Laouari D, Burtin M, Nguyen C, Mori K et al. Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans. *J Clin Invest* 2010; 120: 11: 4065-4076
107. Rauen T, Weiskirchen R, Floege J. In search of early events in the development of chronic kidney disease: the emerging role for lipocalin-2/NGAL. *Nephrol Dial Transplant*

2011; 26: 2: 445-447

108. Smith KD. Toll-like receptors in kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2009; 18: 3: 189–196 (doi:10.1097/MNH.0b013e32832a1d5f)

109. Machida H, Ito S, Hirose T, Takeshita F, Oshiro H, Nakamura T et al. Expression of Toll-like receptor 9 in renal podocytes in childhood-onset active and inactive lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25: 2530–2537

110. Karkar A. Cytokines and Glomerulonephritis. *Saudi J Kidney Dis Transplant* 2004; 15: 4: 473-485

111. Warszawska JM, Gawish R, Sharif O, Sigel S, Doninger B, Lakovits K et al. Lipocalin 2 deactivates macrophages and worsens pneumococcal pneumonia outcomes. *J Clin Invest* 2013; 123: 8: 3363–3372 (doi:10.1172/JCI67911)

112. Wu J, Ding Y, Zhu C, Shao X, Xie X, Lu K et al. Urinary TNF- α and NGAL are correlated with the progression of nephropathy in patients with type 2 diabetes. *EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE* 2013; 6: 1482-1488

113. Zeinab HES, Amia TA, Amany KM, Nagwa AM, Zeinab AY, Waganat EES. Predictive role of plasma neutrophil gelatinase – associated lipocalin and IL – 18 in Lupus nephritis. *International Journal of Advanced Research* 2015; 3; 3: 912-922

114. Devarajan P. Neutrophil gelatinase – associated lipocalin (NGAL): A new marker of kidney disease. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 2008; 241: 89-94

115. Pitashny M, Schwartz N, Qing X, Hojaili B, Aranow C, Mackay M et al. Urinary lipocalin-2 is associated with renal disease activity in human lupus nephritis. *Arthritis & Rheumatism* 2007; 56: 6: 1894-1903

116. Sharifipour F, Zeraati A, Sahebari M, Hatef M, Naghibi M, Rezaieyazdi Z et al. Association of urinary Lipocalin – 2 with Lupus nephritis. *Iran J Basic Med Sci* 2013; 16: 1011-1015

117. Bertsias GK, Balow JE. Monitoring strategies in lupus nephritis. *US nephrology* 2011; 6: 2: 116-121

118. Rawayje OO, Kusztal M, Klinger M. The kidney and ANCA associated vasculitis: from pathogenesis to diagnosis. *Clin Kidney J* 2015; 8: 343-350

119. Imamaki H, Ishii A, Yokoi H, Kasahara M, Kuwabara T, Mori KP et al. Low Serum Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin Level as a Marker of Malnutrition in Maintenance Hemodialysis Patients. *PLoS One* 2015; 10; 10: 7: e0132539 (doi: doi:10.1371/journal.pone.0132539)

120. Bolignano D, Coppolino G, Romeo A, Lacquaniti A, Buemi M. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels in chronic haemodialysis patients. *Nephrology* 2010; 15: 23–26

121. Ismail MI, Fouad M, Ramadan A, Fathy H, Zidan A, Mostafa E. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) as a Biomarker of Iron Deficiency in Hemodialysis Patients. *Austin J Nephrol Hypertens* 2015; 2: 2: 1036.

122. Hu YC, Feng YX, Lv XA, Wang R. A Clinical and Pathological Analysis of 3722 Renal Biopsy Specimens from Adults with Primary Glomerular Disease in Shandong Province, China. *WIMJ Open* 2014; 1: 2: 57-62 (doi: 10.7727/wimjopen.2014.114)

123. Axelsen M, Smith Pedersen R, Goya Heaf J, Ellingsen T. Mesangioproliferative Glomerulonephritis: A 30-Year Prognosis Study *Nephron Extra* 2014; 4: 26–32 (doi: 10.1159/000360364)
124. Braun N, Schweisfurth A, Gröne HJ, Kundt G. Evidence-Based Therapy May Improve Outcome in Glomerulonephritis—A Prospective Field Survey. *Open Journal of Nephrology* 2012; 2: 49-59 (doi.org/10.4236/ojneph.2012.24009)
125. Heaf J, Lokkegaard H, Larsen S. The epidemiology and prognosis of glomerulonephritis in Denmark 1985-1997. *NDT* 1999; 14: 1889-1897
126. Nair R, Walker PD. Is IgA nephropathy the commonest primary glomerulopathy among young adults in the USA? *Kidney International* 2006; 69: 1455–1458 (doi:10.1038/sj.ki.5000292)
127. Briganti EM, Dowling J, Finlay M, Hill PA, Jones CL, Kincaid-Smith PS et al. The incidence of biopsy-proven glomerulonephritis in Australia. *NDT* 2001; 16: 1364-1367
128. Hisada A, Shimamoto M, Ohsawa I, Honda D, Nagamachi S, Suzuki H et al. Clinical and Histological Characteristics in Patients with Non-IgA Mesangioproliferative Glomerulonephritis. *Juntendo Medical Journal* 2015; 61: 1: 41-48
129. Owada K, Suzuki H, Katoh T, Watanabe T: Genetical, histological, and clinical characteristics of IgA-negative mesangioproliferative glomerulopathy. *Clin Exp Nephrol* 2010; 14: 56-62.
130. Moranne O, Watier L, Rossert J, Stengel B and the GN-progress study group. Primary glomerulonephritis: an update on renal survival and determinants of progression. *Q J Med* 2008; 101: 215–224 (doi: 10.1093/qjmed/hcm142)
131. Clerico A, Galli C, Fortunato A, Ronco C. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as biomarker of acute kidney injury: a review of the laboratory characteristics and clinical evidences. *Clin Chem Lab Med* 2012; 50: 9: 1505–1517 (doi: 10.1515/cclm-2011-0814)
132. Delanaye P, Rozet E, Krzesinski JM, Cavalier E. Urinary NGAL measurement: Biological variation and ratio to creatinine *Clin Chim Acta* 2011; 412: 390: 3-4 (doi: 10.1016/j.cca.2010.10.011. Epub 2010 Oct 14.)
133. Jalalah SM, Alzahrani IH, Furness PN. Glomerular changes in microscopic haematuria, studied by quantitative immunoelectron microscopy and in situ zymography. *NDT* 2002; 17: 1586–1593

9. PRILOZI

9.1. SPISAK SKRAĆENICA

- 2,5 – DHBA - *2,5-dihydroxy benzoic acid* - 2,5 – dihidroksi benzoična kiselina
24p3 - lipokalin 2
24p3R – receptor za lipokalin 2
ACE inhibitori - inhibitori konvertaze angiotenzina
A-Ics - *alfa intercalated cells* - alfa umetnute ćelije
AKI – *Acute kidney injury* – akutna bubrežna lezija
ANCA – antineutrofilna citoplazmatska antitela
AT blokatori - blokatori angiotenzinskih receptora
BIA – bioelektrična impedanca
BMI – *Body mass index* – indeks telesne mase
Chr GN – hronični (nespecifični) glomerulonefritis
CrCl – *Creatinine clearance* – klirens kreatinina
DNK – dezoksiribonukleinska kiselina
EGF - *Epidermal growth factor* - epidermalni faktor rasta
Fe – gvoždje
FeEnt – enterohelini – siderofori
FGF – *Fibroblast growth factor* - fibrocitni faktor rasta
FSSH – fokalno segmentna skleroza i hijalinoza
GBM – glomerularna bazalna membrana
GFR – *Glomerular filtration rate* - glomerulska filtracija
GN – glomerulonefritis
gp330 – megalin-kubulin receptor
H₂O₂ - hidrogen peroksid
HBI – hronična bubrežna insuficijencija
HGF - *Hepatocyte growth factor* – hepatocitni faktor rasta
HO-1 - enzim hem oksigenaza 1
HTA – arterijska hipertenzija
HUS – hemolizno uremijski sindrom
IL - interleukin
IRPs - *Iron-regulatory protein* – regulatorni protein gvoždja
KIM 1 - *Kidney Injury Molecule-1* – molekul oštećenja bubrega 1
LN – lupus nefritis
LT-B4 - leukotrien B4
MC GN – glomerulonefritis minimalnih promena (*Minimal change*)
MCP 1 - *Monocyte chemotactic protein 1* - monocitnog hemotaksičnog proteina 1
MDRD formula - *Modification of diet in renal disease group* (MDRD) formula za izračunavanje klirensa kreatinina
Mem GN – membranski glomerulonefritis
MMP-9 - matriks metaloproteinaza 9 - gelatinaza B
MP GN – membranoproliferativni glomerulonefritis

mRNA - *Messenger RNA* - informacijska ribonukleinska kiselina
MZGP GN – mezangioproliferativni glomerulonefritis
NF- κ B - *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* - nuklearni faktor za kapa-laki-lanac pojačivač odgovora aktiviranih B ćelija
NGAL - *Neutrophil gelatinase - associated lipocalin* – lipokalin vezan za neutrofilnu gelatinazu
OH⁻ - hidrogen jon
PAF - *Platelet activating factor* - faktora aktivacije trombocita
PBB – perkutana biopsija bubrega
RP GN – rapidoprogresivni (krescentni) glomerulonefritis
SLE – sistemski eritemski lupus
sNGAL – serumski NGAL
TGF- β 1 - *Transforming growth factor β 1* - transformišućeg faktora rasta β 1
TLR – *Toll like receptors* – toll-like receptori
TNF- α - *Tumor necrosis factor α* - faktor nekroze tumora
T_{REG} limfociti – regulišući limfociti
uNGAL – urinarni NGAL
uNGAL/kr – odnos uNGAL/kreatinin

9.2. TEKST INFORMATIVNOG PRISTANKA BOLESNIKA

TEKST INFORMATIVNOG PRISTANKA BOLESNIKA

Pročitao/la sam tekst o svrsi i načinu ispitivanja koje se izvodi na Klinici za nefrologiju i kliničku imunologiju, Kliničkog centra Vojvodine - Novi Sad.

Pošto sam detaljno razgovarao/la sa doktorom koji sprovodji ispitivanje, smatram da sam dobila sve podatke koji me zanimaju i da mogu da potvrdim sledeće:

- rečeno mi je da je moje ispitivanje dobrovoljno i da ukoliko odlučim da učestvujem u istraživanju, to neće imati nikakav uticaj na odnos lekara prema meni, niti će uticati na moje lečenje,
- rečeno mi je da ne očekujem nikakvu materijalnu niti drugu korist, osim eventualne zdravstvene,
- rečeno mi je da će svi podaci dobijeni u istraživanju biti anonimni i da moj identitet neće biti otkriven,
- rečeno mi je da iz ispitivanja mogu dobrovoljno da istupim u svakom trenutku bez ikakvih posledica po moje dalje lečenje,
- u potpunosti sam razumeo/la predočene podatke i slažem se da učestvujem u istraživanju.

Potpis ispitanika/ce _____

Adresa _____

Broj telefona _____

Potvrđujem da sam bolesniku/ci predočila sve podatke o ispitivanju.

Asis mr sci dr Gordana Stražmešter-Majstorović

U Novom Sadu,
datum:

9.3. INFORMACIJA ZA BOLESNIKA O UČEŠĆU U ISPITIVANJU

INFORMACIJA ZA BOLESNIKA O UČEŠĆU U ISPITIVANJU

Poštovani/a,

u toku je istraživanje koje se odnosi na ispitivanje efikasnosti primene biomarkera lipokalina 2 u dijagnostici primarnih glomerulonefritisa. Kako je kod Vas postavljena gore navedena dijagnoza, a takodje ispunjavate i druge uslove za učešće u ispitivanju, molim Vas da pažljivo pročitate naredni tekst koji sadrži opis analiza koje je potrebno da izvršimo:

- * koristiće se imunofluorescentni i patohistološki nalaz bioptata bubrega. Biopsija bubrega će se raditi u okviru rutinske dijagnostike primarnog glomerulonefritisa, radi postavljanja adekvatne dijagnoze.
- * pri svakoj kontroli biće Vam uradjen internistički pregled, sa merenjem krvnog pritiska i telesne težine radi određivanja stanja uhranjenosti (Body mass indexa – BMI),
- * koristiće se laboratorijski nalazi krvi i mokraće, koji će se raditi u okviru praćenja toka bolesti,
- * pri postavljanju dijagnoze primarnog glomerulonefritisa i nakon šest meseci ćete biti zamoljeni za jedan dodatni uzorak urina, kao i za dodatni uzorak krvi, koji će biti uziman tokom vadenja krvi za rutinske krvne analize. Dodatni uzorci urina i krvi će biti korišćeni za određivanje urinarnog i serumskog nivoa biomarkera lipokalina 2.
- * pri postavljanju dijagnoze i na kontroli nakon šest meseci lečenja će Vam biti uradjen pregled metodom bioelektrične impedance.

Vaše učešće u ispitivanju je dobrovoljno, a ukoliko odlučite da ne učestvujete, to neće imati uticaj na Vaše lečenje. Za učešće u ispitivanju Vam ne nudimo nikakvu materijalnu, niti bilo kakvu drugu nadoknadu, a sve analize koje ćemo izvesti biće besplatne.

Podaci koje ćemo dobiti ostaće anonimni, sačuvani u tajnosti od drugih lica i biće objavljeni samo u naučnim publikacijama, bez navodjenja Vašeg imena.

Ukoliko se uključite u ispitivanje, u svakom momentu možete iz njega dobrovoljno istupiti, bez ikakvog objašnjenja.

Ispitivanje sprovodi Asis mr sci dr Gordana Stražmešter-Majstorović, magistar medicinskih nauka, internista-nefrolog, zaposlena na Klinici za nefrologiju i kliničku imunologiju, Kliničkog centra Vojvodine u Novom Sadu, od koje možete dobiti sve informacije vezane za istraživanje.

dr Gordana Stražmešter Majstorović

9.4. PROTOKOL ISTRAŽIVANJA

IME I PREZIME _____
godišće _____

Dijagnoza: _____

PK broj _____
MB ist.boj _____
Datum biopsije _____

Biopsija bubrega: IF: _____

PH: _____

USG bubrega: _____

Fundus: _____

	urea	kreatinin	a.c. uricum	klirens kreat. izmeren	klirens kreat. MDRD	24h proteinurija	mikro hematurija	urino kultura	kreatinin u urinu	albumini u serumu
1.										
2.										

	ŠUK	SE	fibrinogen	CRP	lkci	hct	feremija	transferin u serumu	feritin
1.									
2.									

	Masno tkivo % (BIA)	Masno tkivo kg (BIA)	Ukupna voda (BIA)	TV	TM	BMI	lipokalin 2 u serumu	lipokalin 2 u urinu	uNGAL/kreatinin
1.									
2.									