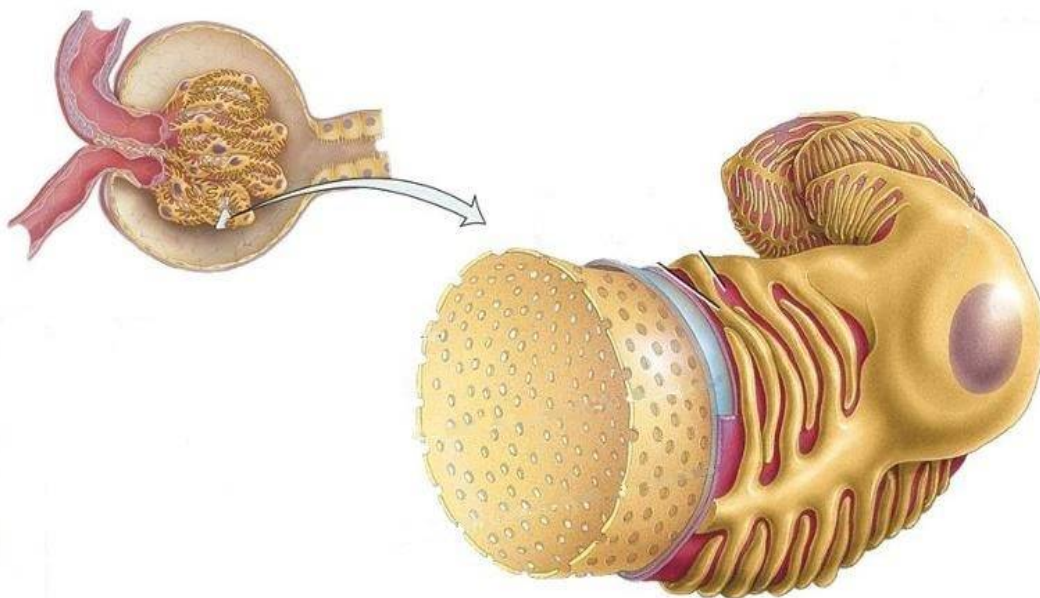


РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА  
Универзитет „Свети Кирил и Методиј“ – Скопје  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Д-р Ирена Љ. Костовска

**УЛОГА НА ПОДОЦИТНИТЕ ПРОТЕИНИ - НЕФРИН И  
ПОДОКАЛИКСИН ВО РАНА ДИЈАГНОЗА НА СЕКУНДАРНИ  
НЕФРОПАТИИ**

- докторска дисертација -



Скопје, 2017



РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА  
Универзитет „Свети Кирил и Методиј“ – Скопје  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ  
Институт за медицинска и експериментална биохемија

---



Д-р Ирена Љ. Костовска  
специјалист по медицинска биохемија

**УЛОГА НА ПОДОЦИТНИТЕ ПРОТЕИНИ - НЕФРИН И  
ПОДОКАЛИКСИН ВО РАНА ДИЈАГНОЗА НА СЕКУНДАРНИ  
НЕФРОПАТИИ**

- докторска дисертација -

Скопје, 2017

---

*Докторската дисертација ја посветувам на  
моите деца,  
Сирма и Андреј*

*„ Мора да бидете промената што сакате да ја видите во светот “*

*– Ганди*

## БЛАГОДАРНОСТ

Докторската дисертација се работеше на Институтот за медицинска и експериментална биохемија, во соработка со Универзитетската клиника за нефрологија, Центарот за дијабет, при Универзитетската клиника за ендокринологија и метаболни болести, Универзитетската клиника за гинекологија и акушерство, Приватната здравствена установа Д-р Ружа, Приватната здравствена установа за гинекологија и акушерство Д-р Емилија Трајковска и Приватната здравствена установа за гинекологија и акушерство Д-р Гордана АН-ВИ, Скопје.

Огромна благодарност упатувам на мојот ментор **Проф. д-р Даница Лабудовиќ**, за успешната соработка во текот на докторските студии, за активното учество во текот на изработката и пишувањето на дисертацијата, како и за конструктивните забелешки и критики во текот на работата. Соработката со неа за мене претставува голема чест и непроценливо искуство.

Благодарност изразувам кон членовите на Комисијата за одбрана на докторската дисертација: **Проф. д-р Соња Топузовска, Проф. д-р Гоце Спасовски, Проф. Светлана Цековска и Проф. д-р Милка Здравковска**, за несебичната поддршка и стручната соработка во текот на изработката на дисертацијата.

Благодарност изразувам до целокупниот персонал на Институтот за медицинска и експериментална биохемија.

Посебно им се заблагодарувам на:

- **Доц. д-р Катерина Тошеска Трајковска** - чиј несебичен интерес, разбирање и безрезервна поддршка, во голем дел, ми помогна да ја изработам докторската дисертација. Особено и се заблагодарувам и за секој интересен и инспиративен момент кој го поминуваме заедно.
- **Асс. Гордана Босилкова** - за огромната морална поддршка и стручната соработка.
- **Марјонета Јованова, Маре Новковска и Русе Јамандиловски** - за техничката соработка во текот на изработката на докторската дисертација.
- **Проф. Жанета Попеска** од Факултетот за информатички науки и компјутерско инженерство - Скопје, која статистички ги обработи добиените резултати од спроведеното истражување во докторската студија.

И на крај, но не помалку важно, огромна благодарност до членовите на моето семејство, моите родители **Љупчо и Лиле**, мојата сестра **Оливера**, сопругот **Огнен**, ќерката **Сирма** и синот **Андреј**, за поддршката и разбирањето во текот на целиот процес на изработка на докторскиот труд. Само со нивна поддршка, секоја моја цел и идеја стануваат реалност.

*И. Костикова*

***Ментор:***

Ред. проф. д-р Даница Лабудовиќ  
Медицински факултет - Скопје

***Членови на комисијата за одбрана на докторската дисертација:***

Ред. проф. д-р Соња Топузовска Медицински факултет - Скопје  
Ред. проф. д-р Даница Лабудовиќ Медицински факултет - Скопје  
Вон. проф. Светлана Цековска Медицински факултет - Скопје  
Ред. проф. д-р Гоце Спасовски Медицински факултет - Скопје  
Проф. д-р Милка Здравковска Универзитет "Гоце Делчев" - Штип

***Членови на комисијата за оценка на докторската дисертација:***

Ред. проф. д-р Даница Лабудовиќ - Медицински факултет - Скопје  
Ред. проф. д-р Гоце Спасовски - Медицински факултет - Скопје  
Доц. д-р Катерина Тошеска Трајковска - Медицински факултет - Скопје

## АПСТРАКТ

### УЛОГА НА ПОДОЦИТНИТЕ ПРОТЕИНИ - НЕФРИН И ПОДОКАЛИКСИН ВО РАНА ДИЈАГНОЗА НА СЕКУНДАРНИ НЕФРОПАТИИ

**Вовед:** Нефринот и подокаликсинот се специфични протеини за подоцитните клетки и имаат важна улога во обезбедување на селективната пропустливост на гломеруларната филтрациска бариера. При оштетување на подоцитите, подоцитопатии, овие протеини се појавуваат во урината, каде можат да се определуваат со едноставни методи. Подоцитопатиите се значајни во патогенезата на секундарните нефропатии. Досега златен стандард за рано откривање на секундарните нефропатии особено на дијабетската нефропатија беше микроалбуминот, но фактот дека микроалбуминуријата е неспецифичен и несензитивен маркер ја наметна идејата за воведување на нови маркери во секојдневната лабораториска пракса за рано откривање и предикција на секундарните нефропатии. Главна **цел** на докторската студија е да се утврди значењето на нефринот и подокаликсинот во раната дијагноза на дијабетската и хипертензивната нефропатија и во предикција на прееклампсијата.

**Материјал и методи:** Во студијата беа вклучени вкупно 305 испитаници поделени во четири групи: пациенти со шеќерна болест тип 2 (30 со нефропатија и 60 без нефропатија), пациенти со хронична хипертензија (30 со нефропатија и 54 без нефропатија), трудници (41 високо-ризични трудници и 30 со прееклампсија) и контролна група (30 здрави испитаници и 30 здрави трудници). Кај сите испитаници беа определени: нефрин и подокаликсин во урина со имуноензимски метод, микроалбумин и креатинин во урина со стандардни биохемиски методи, кај испитаниците со макро- и микроалбуминурија беше направена и електрофоретска сепарација на уринарните протеини на полиакриламиден гел. Неколку стандардни биохемиски параметри кои се од интерес за студијата беа одредени во серум.

**Резултати:** ROC анализите покажаа дека нефринот и подокаликсинот имаат висока дискриминаторска моќ помеѓу здравите испитаници и оние со нефропатија/прееклампсија. Процентот на испитаници со покачени вредности за уринарен нефрин беше значаен кај сите испитувани групи, но особено е значајно што тој процент е висок кај нормоалбуминуричните испитаници, и тоа кај групата испитаниците со шеќерна болест тип 2, 82% од нормолабуминуричните испитаници имаа покачени вредности за уринарен нефрин, додека кај

испитаниците со хронична хипертензија тој процент изнесува 66,7. Кај 96% од трудниците со прееклампсија најдовме покачени вредности за уринарен нефрин. Подокаликсинот беше покачен кај сите трудни со прееклампсија (100%), кај 63,4% од трудниците со високо-ризична бременост, кај 25% од испитаниците со нормоалбуминурија и хронична хипертензија и кај 21 % од испитаниците со нормоалбуминурија и шеќерна болест тип 2. Статистички значајна разлика во концентрацијата на уринарниот нефрин односно подокаликсин постоеше помеѓу сите тестирани подгрупи во рамките на одделните групи и здравите испитаници ( $p < 0.05$ ). Кај групата испитаници со шеќерна болест тип 2 и хронична хипертензија беше најдена статистички значајна негативна корелација помеѓу стапката на гломеруларна филтрација и концентрацијата на нефрин односно подокаликсин. Кај трудниците со прееклампсија беше утврдено дека концентрацијата на нефринот односно подокаликсинот се во статистички значајна, позитивна корелација со гестациската старост на бременоста. Електрофорезата на уринарните протеини покажа дека најчест тип на протеинурија кај испитаниците со шеќерна болест тип 2 и макроалбуминурија е тубуларната протеинурија, додека кај сите останати испитувани групи најчест тип на протеинурија беше мешаниот тип, односно гломеруларна и тубуларна протеинурија.

**Заклучок:** Високиот процент на нормоалбуминурични испитаници со шеќерна болест тип 2 и со хронична хипертензија, кои имаат покачени вредности на нефрин и подокаликсин како и докажаната негативната корелација помеѓу нивната концентрација и стапката на гломеруларна филтрација, укажуваат дека нефринот и подокаликсинот, поединечно или заедно можат да се користат како маркери за рано откривање на дијабетската и хипертензивната нефропатија. Статистички значајната разлика во концентрацијата на нефрин односно подокаликсин помеѓу трудните со прееклампсија и со ризик за развој на истата, во однос на здравите трудници, како и позитивната корелација помеѓу концентрацијата на двата маркери и гестациската старост на бременоста, води кон заклучок за важноста од примена на овие маркери во следење на бременоста кај ризичните трудници и во предикција на прееклампсијата.

**Клучни зборови:** нефрин, подокаликсин, подоцити, дијабет, прееклампсија, хипертензија

## ABSTRACT

### ROLE OF NEPHRIN AND PODOCALYXIN IN EARLY DETECTION OF SECONDARY NEPHROPATHIES

**Background:** Nephryn and podocalyxin are specific podocyte proteins, they have an important role in selective permeability of the glomerular filtration barrier. Damage of podocytes - podocytopathies, result in presence of podocyte proteins in urine, where they can be measured with relatively cheap and simplify methods. Podocytopathies are important in pathogenesis of secondary nephropathies. Previously, microalbuminuria was considered as a golden standard in early detection of secondary nephropathies, particularly in early detection of diabetic nephropathy, but the fact that microalbuminuria is nonspecific and nonsensitive marker, motivate us to find a novel markers in early detection and prediction of secondary nephropathies. The main **aim** of the PhD study is to test the significance of nephryn and podocalyxin in early detection of diabetic and hypertensive nephropathy and in prediction of preeclampsia.

**Material and methods:** In this PhD study were included 305 subjects, divided into four groups: subjects with diabetes mellitus type 2 (30 with nephropathy and 60 without nephropathy), subjects with chronic hypertension (30 with nephropathy and 54 without nephropathy), pregnant women (41 women with high risk pregnancy and 30 with preeclampsia) and healthy subjects (30 healthy subjects and 30 healthy pregnant women). In all subjects we measured: nephryn and podocalyxin in urine with immunoenzyme assay, microalbumin and creatinine in urine with standard biochemical methods, in patients with macro- and microalbuminuria we performed electrophoretic separation of urinary proteins by polyacrylamide gel. In blood sera, we measured a few standard biochemical parameters, which were on interest of the study.

**Results:** In all three major groups, ROC analyses showed that nephryn and podocalyxin have high discriminatory power between healthy subjects and subjects with diabetic nephropathy, hypertensive nephropathy and preeclampsia. The percent of subjects with elevated levels of urinary nephryn and podocalyxin was significant in all tested groups, but particularly is significant the fact that this percent is high in normoalbuminuric group of subjects with diabetes mellitus type 2 (82%), normoalbuminuric subjects with chronic hypertension (66,7%) and in group of women with preeclampsia (96%). Podocalyxin was elevated in all women with preeclampsia, in 63% of women with high-risk pregnancy, in 25% of hypertensive normoalbuminuric subjects and in 21% of



normoalbuminuric subjects with diabetes mellitus type 2. The concentration of urinary nephrin and podocalyxin showed statistically significant differences between all groups of patients and healthy subjects ( $p < 0.05$ ). In group with diabetes mellitus type 2 and group with chronic hypertension we found statistically significant negative correlation between concentration of urinary nephrin, respectively podocalyxin and estimated rate of glomerular filtration. In group of pregnant women with preeclampsia and group of pregnant women with risk for development of preeclampsia we found statistically significant positive correlation between concentration of urinary nephrin, respectively podocalyxin and gestational age. Electrophoretic separation of urinary proteins showed that in patient with diabetes mellitus type 2 and macroalbuminuria the most frequent type of proteinuria was tubular proteinuria, while in all other examined groups, the most frequent type of proteinuria was mixed proteinuria, glomerular and tubular proteinuria.

**Conclusion:** High percent of normoalbuminuric subjects with diabetes and hypertension with elevated levels of nephrin and podocalyxin and negative correlation between concentration of nephrin and podocalyxin in urine and glomerular filtration rate, indicate that these markers, separately or together, can be a useful markers for early detection of diabetic and hypertensive nephropathy. We found statistically significant differences in urinary concentration of both markers between the pregnant women with preeclampsia, pregnant women with risk for development of preeclampsia and healthy pregnant women. Also we found statistically significant positive correlation between concentration of urinary nephrin, respectively podocalyxin and gestational age. These findings in pregnant women indicate that nephrin and podocalyxin can be useful markers in follow-up of high risk pregnant women and in prediction of preeclampsia.

**Key words:** nephrin, podocalyxin, podocyte, diabetes, preeclampsia, hypertension

## СОДРЖИНА

<b>1. ВОВЕД</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Подоцити - структура и функција</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Нефрин - структура и функција</b> .....	<b>6</b>
<b>1.3 Подокаликсин - структура и функција</b> .....	<b>8</b>
<b>1.4 Подоцитопатии - оштетување на подоцитите</b> .....	<b>10</b>
<b>1.5 Дијагностичко значење на нефрин и подокаликсин кај секундарните нефропатии</b> .....	<b>14</b>
1.5.1 Нефринурија и подокаликсурија кај дијабетска нефропатија .....	<b>15</b>
1.5.2 Нефринурија и подокаликсурија кај хипертензивна нефропатија .....	<b>16</b>
1.5.3 Нефринурија и подокаликсурија кај прееклампија .....	<b>16</b>
<b>2. МОТИВ ЗА ИЗРАБОТКА НА ДОКТОРСКАТА СТУДИЈА</b> .....	<b>18</b>
<b>3. ЦЕЛИ НА ДОКТОРСКАТА СТУДИЈА</b> .....	<b>20</b>
<b>4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ</b> .....	<b>22</b>
<b>4.1 Испитаници</b> .....	<b>22</b>
<b>4.2 Материјал-урина</b> .....	<b>24</b>
<b>4.3 Материјал-венска крв</b> .....	<b>25</b>
<b>4.4 Методи</b> .....	<b>25</b>
4.4.1 ЕЛИСА метод за одредување на концентрација на нефрин во урина .....	<b>25</b>
4.4.2 ЕЛИСА метод за одредување на концентрација на подокаликсин во урина ....	<b>30</b>
4.4.3 Имунотурбидиметриска метода за одредување на концентрација на микроалбумин во урина .....	<b>34</b>
4.4.4 Одредување на концентрација на креатинин во серум и урина со фотометриска метода .....	<b>34</b>
4.4.5 Одредување на стапка на гломеруларна филтрација по формулата на Cockcroft и Gault .....	<b>34</b>
4.4.6 Одредување на уринарен микроалбумин/креатинин однос .....	<b>35</b>
4.4.7 Хемиски преглед на урината .....	<b>36</b>
4.4.8 Одредување на концентрација на вкупни протеини, албумини, триацилглицероли, вкупен холестерол, уреа, креатинин, глюкоза, ХДЛ, ЛДЛ во серум .....	<b>36</b>
4.4.9 Определување на БМИ - индекс на телесна маса .....	<b>37</b>
4.4.10 Сепарација на уринарни протеини со градиентна SDS – PAGE според методот на Görg .....	<b>38</b>
<b>4.5 Статистичка анализа</b> .....	<b>42</b>
<b>5. РЕЗУЛТАТИ</b> .....	<b>43</b>
<b>5.1 Резултати кај групата испитаници со шеќерна болест тип 2</b> .....	<b>43</b>
5.1.1 Клинички карактеристики на испитаниците.....	<b>43</b>
5.1.2 Концентрација на нефрин и подокаликсин во урина кај сите испитаници со	

шеќерна болест тип 2 и здравите испитаници .....	46
5.1.3 Референтни вредности за нефрин и подокаликсин во урина и определување на процент на испитаници со покачени вредности за уринарен нефрин и подокаликсин во подгрупите испитаници поделени според М/К однос .....	48
5.1.4 Концентрација на уринарен нефрин и подокаликсин кај подгрупите испитаници поделени според М/К однос .....	50
5.1.5 Концентрација на уринарен нефрин и подокаликсин кај подгрупите испитаници со и без дијагностицирана нефропатија .....	52
5.1.6 Корелација помеѓу концентрацијата на уринарен нефрин односно подокаликсин и стапката на гломеруларна филтрација .....	53
5.1.7 Непараметриска ROC анализа на уринарен нефрин и подокаликсин кај испитаници со дијабетска нефропатија .....	55
5.1.8 Резултати од сепарација на уринарните протеини со градиентна SDS-PAG електрофореза .....	56
<b>5.2 Резултати кај групата испитаници со хронична хипертензија .....</b>	<b>58</b>
5.2.1 Клинички карактеристики на испитаниците .....	58
5.2.2 Концентрација на нефрин и подокаликсин во урина кај сите испитаници со хронична хипертензија и здравите испитаници .....	61
5.2.3 Референтни вредности за нефрин и подокаликсин во урина и определување на процент на испитаници со покачени вредности за уринарен нефрин и подокаликсин во подгрупите испитаници поделени според М/К однос .....	63
5.2.4 Концентрација на уринарен нефрин и подокаликсин кај подгрупите испитаници поделени според М/К однос .....	64
5.2.5 Концентрација на уринарен нефрин и подокаликсин кај подгрупите испитаници со и без дијагностицирана нефропатија .....	66
5.2.6 Корелација помеѓу концентрацијата на уринарен нефрин односно подокаликсин и стапката на гломеруларна филтрација .....	67
5.2.7 Непараметриска ROC анализа на уринарен нефрин и подокаликсин кај испитаници со хипертензивна нефропатија .....	69
5.2.8 Резултати од сепарација на уринарните протеини со градиентна SDS-PAG електрофореза .....	70
<b>5.3 Резултати кај групата трудници .....</b>	<b>72</b>
5.3.1 Клинички карактеристики кај трудниците .....	72
5.3.2 Концентрација на уринарен нефрин и подокаликсин кај подгрупите трудници .....	74
5.3.3 Референтни вредности за нефрин и подокаликсин во урина и определување на процент на трудници со покачени вредности за уринарен нефрин и подокаликсин во подгрупите .....	76
5.3.4 Концентрација на уринарен нефрин и подокаликсин кај	

подгрупите трудници поделени според гестациската старост на бременоста	77
5.3.5 Корелација помеѓу концентрацијата на нефрин односно подокаликсин во урина и стапката на гломеруларна филтрација кај трудниците .....	79
5.3.6 Корелација помеѓу концентрацијата на уринарен нефрин односно подокаликсин во урина и гестациската старост на бременоста .....	80
5.3.7 Непараметриска ROC анализа на уринарен нефрин и подокаликсин кај трудници со прееклампија .....	82
5.3.8 Резултати од сепарација на уринарните протеини со градиентна SDS-PAG електрофореза .....	83
<b>6. ДИСКУСИЈА .....</b>	<b>85</b>
<b>7. ЗАКЛУЧОЦИ .....</b>	<b>100</b>
<b>8. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА .....</b>	<b>102</b>

#### **ПРИЛОЗИ**

**ПРИЛОГ 1 - ПЕЧАТЕН ТРУД - Nephrin and Podocalyxin - New markers for early detection of secondary nephropathies – review article**

**ПРИЛОГ 2 - ПЕЧАТЕН ТРУД - Role of nephrin and podocalyxin in early detection of diabetic nephropathy - original article**

**ПРИЛОГ 3 - ОДОБРЕНИЕ ОД ЕТИЧКА КОМИСИЈА**

**ПРИЛОГ 4 - ФОРМУЛАР ЗА ИНФОРМИРАНА СОГЛАСНОСТ**

**ПРИЛОГ 5, 6, 7 - АНКЕТНИ ЛИСТИ КАЈ ИСПИТАНИЦИТЕ**

**ПРИЛОГ 8 - УПАТСТВО ЗА СОБИРАЊЕ УРИНА**

## ЛИСТА НА КОРИСТЕНИ КРАТЕНКИ

- **NPHN** - Nephrin - нефрин
- **PODXL** - Podocalyxin - подокаликсин
- **ELISA** - Enzyme-linked immunosorbent assay - Ензимски врзана имуноадсорбирачка метода
- **CNF** - Congenital nephrotic syndrome of the Finnish type - Фински тип на конгенитален нефротски синдром
- **IgCAM** - Immunoglobulin Cell Adhesion Molecule
- **MM** - Molecular mass - молекуларна маса
- **HPLP** - Human podocalyxin-like protein
- **CD34** - Cluster of Differentiation 34
- **NHERF1 and NHERF2** - Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factors 1 and 2
- **RT - PCR** - Reverse transcription - polymerase chain reaction - реверзна транскрипција - полимераза верижна реакција
- **ХДЛ - HDL** - high density lipoproteins - липопротеини со висока густина
- **ЛДЛ - LDL** - low density lipoproteins - липопротеини со ниска густина
- **SDS - PAGE** - sodium dodecyl sulfate - polyacrilamide gel electrophoresis,
- **СДС - ПАГЕ** - Содиум (натриум) додецил сулфат - полиакриламид гел електрофореза
- **HbA1c** - Glycosylated Haemoglobin type A1c - гликозилиран хемоглобин тип А1ц
- **SD** - slit diaphragm - филтрациска дијафрагма
- **ESRD** - end-stage renal disease - терминална бубрежна слабост
- **ГБМ** - гломеруларна базална мембрана
- **ACE inhibitors** - angiotensin converting enzyme inhibitors - ангиотензин - конвертирачки ензим инхибитори
- **KDIGO** - Kidney Disease: Improving Global Outcomes
- **М/К О** - Микроалбумин / Креатинин однос
- **ГФР** - гломеруларна филтарциска рата
- **mRNA** - (messenger ribonucleic acid)
- **ROC** - receive operating characteristic curve
- **MCN** - minimal-change nephropathy
- **ХН** - хипертензивна нефропатија
- **ДН** - дијабетска нефропатија
- **РААС** - ренин-ангиотензин-алдостерон-систем
- **BMI** - body mass index- индекс на телесна маса
- **СКП** - систолен крвен притисок
- **ДКП** - дијастолен крвен притисок
- **TGF-β** - tumor growth factor -β - туморски фактор на раст - бета
- **CV** - color developer
- **HRP** - horseradish peroxidase
- **TLR4** - Toll-like рецептор 4
- **CD2AP** - CD2-поврзан протеин
- **LMW** - low molecular weight - ниска молекуларна маса
- **HMW** - high molecular weight - висока молекуларна маса
- **IQR** - Interquartile range - интерквартален ранг
- **MM** - молекуларна маса

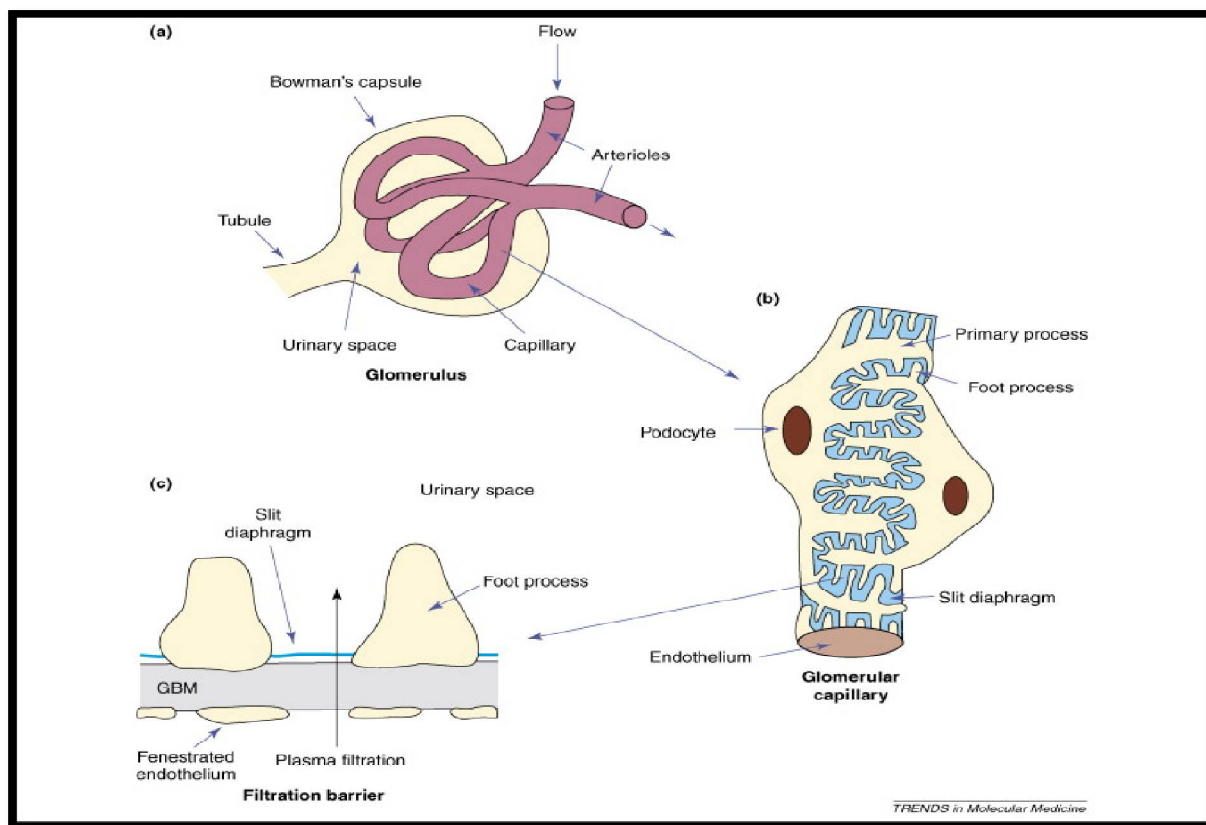
## 1. ВОВЕД

### 1.1 Подоцити - структура и функција

Основна структурна и функционална единица на бубрезите се нефроните. Во бубрезите има околу 2 милиони нефрони, изградени од гломерули и тубули. Гломерулите претставуваат мрежа од капилари опкружени со Бовманова капсула. Во гломерулите започнува процесот на создавање на урина преку филтрација на крвта, при што дневно се создаваат околу 180 литри ултрафилтрат а само околу 10% или 1,5-1,8 литри од ултрафилтратот се излучува од организмот преку бубрезите како дефинитивна урина. Крвта се филтрира низ гломеруларната филтрациска бариера изградена од три слоја: фенестриран ендотел, гломеруларната базална мембрана и слој од висцерални гломеруларни епителни клетки наречени **подоцити** [1]. Гломеруларната филтрациска бариера покажува селективна пропустливост во однос на големината, полнежот и формата на материите кои циркулираат заедно со крвта низ гломеруларните капилари. Главна нејзина задача е да ги пропушти малите молекули и јони а да ги задржи во крвта оформените елементи и плазмените протеини [2].

Подоцитите биле игнорирани од страна на нефролозите се до 1990 година, кога започнува ерата на интензивно истражување на нивната структура, функција и улога во патогенезата на гломеруло-нефропатиите. Подоцитите се терминално, високо-диференцирани епителни клетки. Имаат уникатна и високо-специјализирана структура, функција и локализација. Изградени се од три дела: 1) волуминозно клеточно тело кое е испупчено кон уринарниот односно Бовмановиот простор, 2) главни продолжетоци кои се протегаат долж капиларните ѕидови и 3) споредни продолжетоци налик на прсти, кои тргнуваат од главните продолжетоци и се припојуваат за гломеруларната базална мембрана. Прстестите продолжетоци од соседните подоцити меѓу себе се испреплетуваат, формирајќи простори налик на пукнатини, наречени филтрациски пори со пречник од 30-40 нм, премостени со **филтрациска дијафрагма** [3].

На **Слика 1** прикажана е градба на гломерулус, градба на гломеруларна филтрациска бариера и филтрациската дијафрагма.

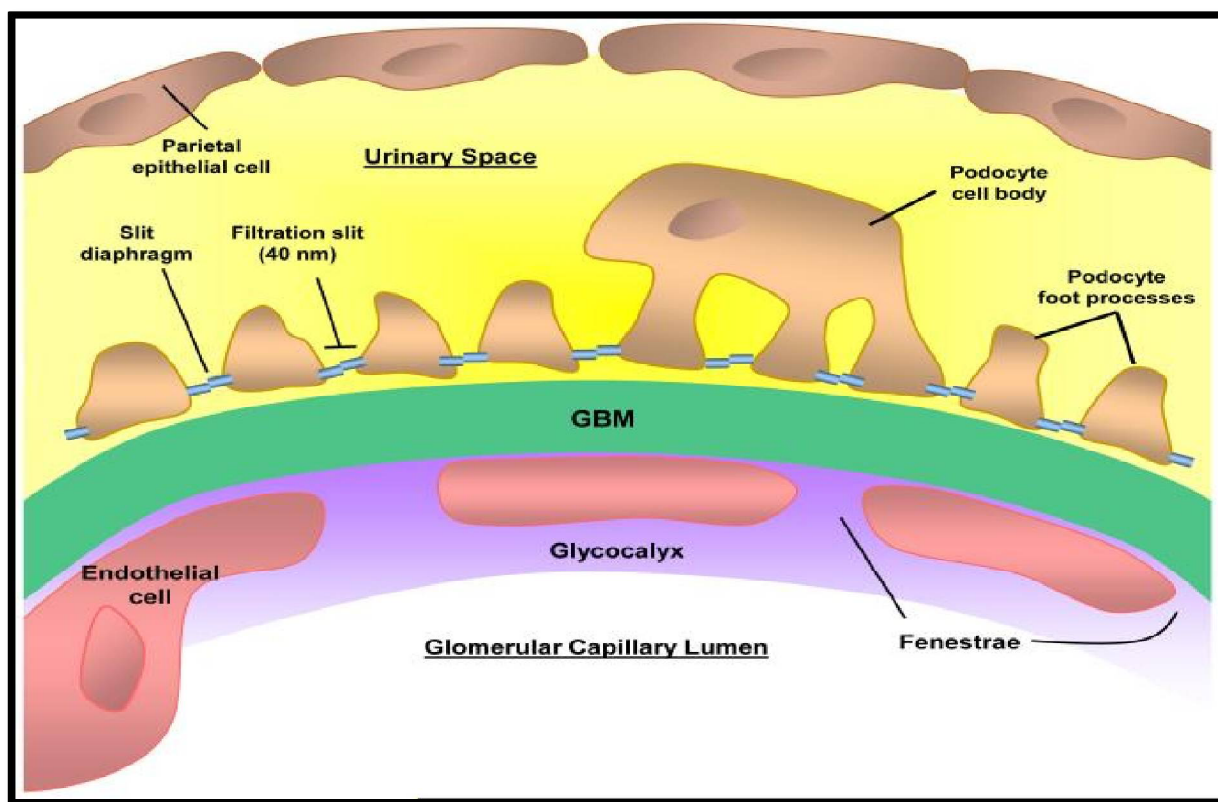


*Слика 1. а) Градба на гломерулус б) градба на гломеруларната филтрациска бариера ц) градба на филтрациската дијафрагма*

Прстестите продолжетоци имаат три површини: апикална, латерална и базална. Секоја површина има посебни структурни и функционални карактеристики. На апикалната површина се наоѓа подокаликсинот, сијалогликопротеин кој и обезбедува на гломеруларната филтрациска бариера негативен полнеж, а со тоа обезбедува непропустливост за анјонските молекули какви што се плазмените протеини.

Негативниот полнеж е важен и за нормално одвивање на процесот на гломеруларна филтрација, ги држи филтрациските пори отворени и спречува слепување на париеталниот со висцералниот епителен слој на Бовмановата капсула [4].

На **Слика 2** прикажан е шематски приказ на пресек на сид на гломеруларен капилар со ендотелни клетки, гломеруларна базална мембрана (ГБМ), подоцити со филтрациски пори помеѓу прстестите подоцитни продолжетоци, премостени со филтрациска дијафрагма.



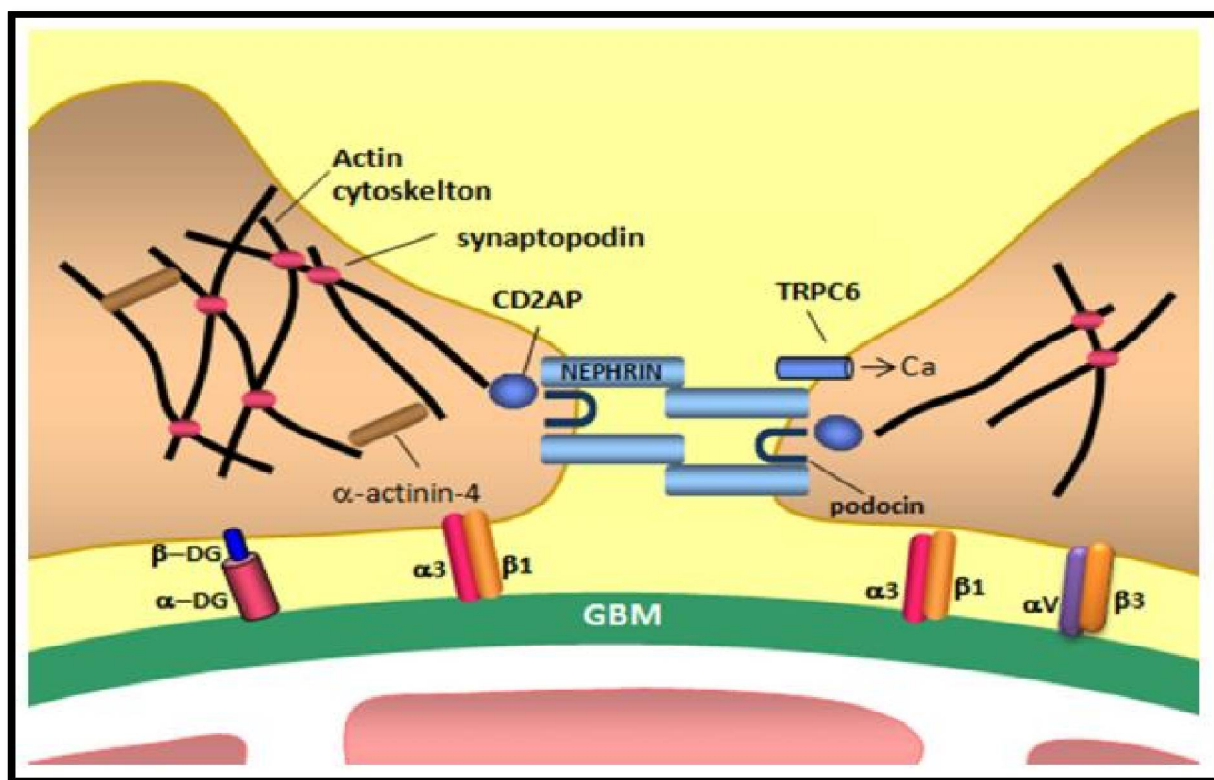
*Слика 2. Шематски приказ на пресек на ѕид на гломеруларен капилар со ендотелни клетки, гломеруларна базална мембрана (ГБМ), подоцити со филтрациските пори премостени со филтрациска дијафрагма помеѓу прстестите продолжетоци на подоцитите*

Базалната површина од прстестите продолжетоци е прицврстена за гломеруларната базална мембрана преку  $\alpha 3\beta 1$  интегрини,  $\alpha$  и  $\beta$  дистрогликани и тетраспанини, **Слика 3** [5,6,7]. Латералната површина од прстестите продолжетоци е дел од филтрациската дијафрагма (SD - slit diafragm). Филтрациската дијафрагма е изградена од многубројни протеини како што се: mFAt1, Neph1 (хомолог на нефринот), нефрин, CD2 - поврзан протеин (CD2AP) и подоциот [8]. Од наброените протеини најзастапен е трансмембранскиот протеин, нефрин. Филтрациската дијафрагма претставува специјализирана клетка - клетка врска и се опишува како „патент“ интеракција помеѓу мембранските (нефринските) протеини од соседните подоцитни прстести продолжетоци. Филтрациската дијафрагма има улога на крајна физичка бариера за плазмените протеини,



ги задржува во крвта сите супстанции со молекуларна маса  $\geq 70$  кДа како што е албуминот и поголемите плазмени протеини [9,10].

Високо специјализираната структура и функција на подоцитите се базира на богатата цитоскелетна машинерија составена од: актин, миозин, синаптоподин, талин, винкулин итн. Богатиот цитоскелет ја регулира адхезијата на подоцитите за гломеруларната базална мембрана, нивниот мотилитет и динамиката на филтрациската дијафрагма [11]. Нефринот преку сите три површини е директно поврзан со актинскиот цитоскелет кој е изграден од високоорганизирани паралелни филаментски снопови. Сигналните патишта кои потекнуваат од структурните компоненти на филтрациската дијафрагма ја регулираат динамиката на актинот и овозможуваат подоцитите, особено нивните прстести продолжетоци активно да го менуваат својот облик [12,13].



*Слика 3. Прстести продолжетоци и филтрациска дијафрагма. Прстестите продолжетоци се поврзани со гломеруларна мембрана со  $\alpha3\beta1$ -,  $\alphaV\beta3$ - интегрини и  $\alpha$ - и  $\beta$ -дистрогликани. Нефринот е главен протеин на филтрациската мембрана која ги премостува филтрациските пори и е тесно поврзан со други протеини како што се подоцин и CD2AP*

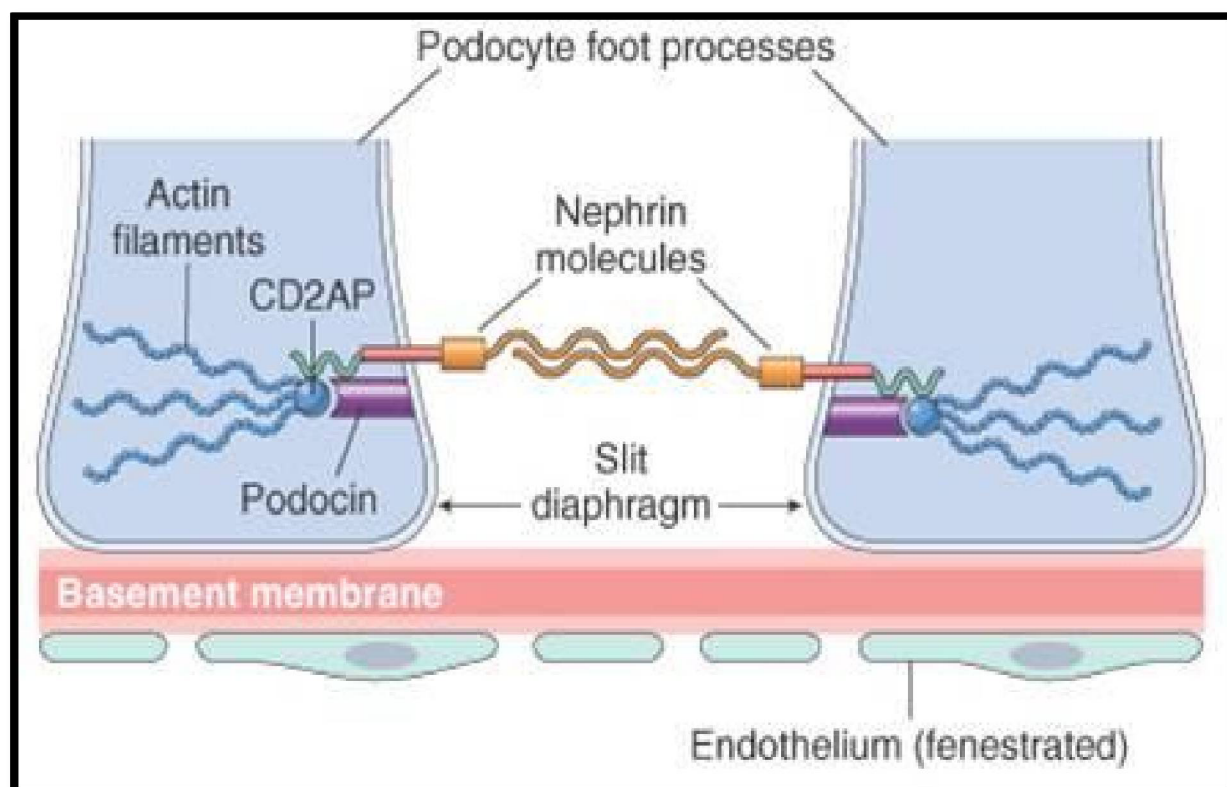
Високо-специјализираната функција на подоцитите се состои од:

- Структурна потпора на капиларната мрежа. Богатиот актински цитоскелет на подоцитите им овозможува да делуваат како перицити, односно ги опкружуваат гломеруларните капилари со што се спротивставуваат физички на гломеруларниот капиларен притисок и го одржуваат нормален (околу 60mmHg);
- Улога во градбата на гломеруларната филтрациска бариера. Подоцитите заедно со гломеруларните ендотелни клетки покриени со гликокаликс и гломеруларната базална мембрана, учествуваат во градбата на гломеруларната филтрациска бариера. Подоцитите учествуваат во процесот на гломеруларна филтрација така што преку филтрациската дијафрагма формираат физичка бариера за протеините, додека преку негативно наелектризирана површина формираат електростатска бариера за ањонските молекули;
- Синтеза и учество во поправка на гломеруларната базалната мембрана, подоцитите синтетизираат тип IV колаген кој е составен дел од ГБМ;
- Конекција со другите гломеруларни клетки (гломеруларните ендотелни и мезенгијалните клетки) со што се овозможува нивна нормална функција. Така на пример, подоцитите синтетизираат васкуларен ендотелен фактор на раст (vascular endothelial growth factor - VEGF), кој патува преку базалната мембрана до рецепторите за VEGF, локализирани на ендотелните клетки со што се одржува нормален интегритет и функција на фенестрираниот ендотел;
- Имунолошка функција - подоцитите се дел од вродениот имун систем, вршат надзор врз патогените протеини во Бовмановиот простор и се смета дека стимулираат синтеза на хемокини преку тн. Toll-like рецептор 4 (TLR4) [12,14].

Досега се идентификувани бројни специфични протеини за подоцитите, важни во одржувањето на нивната високо-специјализирана структура и функција, како што се: подоцитинот, нефринот, фосфолипаза C, CD2AP, синаптоподин, подокаликсин, миозин IЕ итн. Најзначајни се нефринот и подокаликсинот [1].

## 1.2 Нефрин (NPHN) - структура и функција

Нефринот е откриен во 1998 година од страна на Karl Tryggvason и неговите соработници како мутациски продукт на NPHS1 генот кај деца со фински тип на конгенитален нефротски синдром - (Congenital nephrotic syndrome of the Finnish type- CNF). CNF е автозомно рецесивно заболување кое се карактеризира со масивна протеинурија ин утеро и класични симптоми на нефротски синдром: хипоалбуминемија, хиперлипидемија и едеми кои се јавуваат во првите денови по раѓањето. Патохистолошкиот наод од бубрежната биопсија кај овие деца покажува збришување на подоцитните прстести продолжетоци и отсуство на филтрациска дијафрагма [15]. NPHS1 генот е лоциран на хромозом 19 (19q13.1) организиран во 29 егзони [16]. Кај глумци инактивација на NPHS1 генот предизвикува масивна протеинурија и смрт во првите 24 часа по раѓањето [17]. Ова укажува на важноста на нефринот во процесот на гломеруларна филтрација како структурна компонента на филтрациската дијафрагма.



Слика 4. Локализација на нефринските молекули во филтрациската дијафрагма

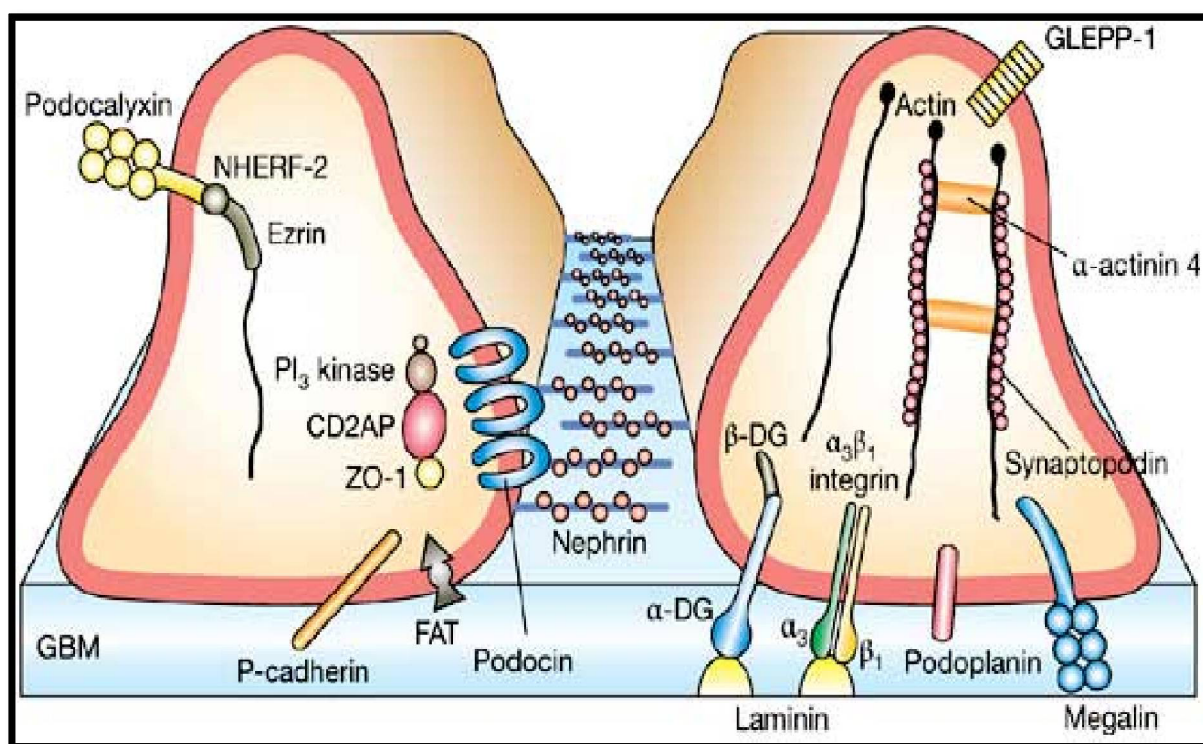
Нефринот главно е локализиран во подоцитите, но го има и во мозочното ткиво,  $\beta$ -клетките од Лангерхансовите островца на панкреасот, черепен и рбетен мозок како и лимфоидно ткиво [18]. Нефринот кој уште се вика и бубрежен гломеруло-специфичен клеточен адхезивен рецептор, изграден е од 1241 аминокиселински остаток и има молекуларна маса (ММ) од 135 кДа. Нефринот е интегрален трансмембрански гликопротеин член на имуноглобулинската суперфамилија на клеточни адхезивни молекули (Immunoglobulin Cell Adhesion Molecule - IgCAM). Локализиран е на надворешната страна од прстестите продолжетоци и е главна компонента на филтрациската дијафрагма. Локализацијата на нефринските молекули е прикажана на **Слика 4**. Нефринот е составен од еден екстраклеточен домен кој содржи: 8 домени слични на IgG (IgG - like modules), еден домен сличен на фибронектин тип III, еден трансмембрански домен и краток интраклеточен (цитоплазматски) домен кој содржи девет тирозински остатоци [19]. IgG - like домени се од C2 тип кој типично се наоѓа во протеините кои учествуваат во клетка - клетка и клетка - матрикс интеракции [20, 21].

Тирозинските остатоци од цитоплазматскиот домен се фосфорилираат при интеракцијата на нефринските молекули и се важни во процесот на интраклеточна сигнализација. Посттранслациската модификација која вклучува N-гликозилација е важна за сместување на нефринот во плазма мембраната [22].

Нефринот има три слободни цистеински остатоци во екстраклеточниот сегмент важни во интеракција помеѓу самите нефрински молекули, но се важни и за интеракција и со соседните протеински молекули во филтрациската дијафрагма. Интеракцијата помеѓу соседните нефрински молекули се опишува како патент интеракција на екстраклеточните домени од нефринските молекули од соседните прстести продолжетоци во центарот на филтрациската дијафрагма [23]. Нефринот е важен за организирање и одржување на интегритетот на подоцитниот цитоскелет [24]. Нефринот е важен и како сигнална молекула за подоцитите, вклучувајќи се во неколку сигнални патишта преку кои ја регулира градбата, формата и структурата на подоцитите и филтрациската дијафрагма како и процесот на гломеруларна филтрација [25].

### 1.3 Подокаликсин (PODXL) - структура и функција

Подокаликсинот е анјонски трансмембрански протеин локализиран на апикалната површина на подоцитите, **Слика 5**. Освен во бубрезите се експресира и на површината на хематопоетските прогениторски клетки, васкуларните ендотелни клетки, неврните и голем број туморски клетки [26]. Подокаликсинот е главен сијалогликопротеин на подоцитниот гликокаликс, кој примарно бил идентификуван кај глувци, а подоцна и кај човекот од страна на Kerjaschki и соработниците во 80-тите години на минатиот век [27,28,29,30].



*Слика 5. Локализација на подокаликсинот на апикалната површина од прстестите продолжетоци на подоцитите*

Со SDS- PAGE, Kerjaschki и соработниците утврдиле дека подокаликсинот изолиран од глувци има молекуларна маса (ММ) од 140 кДа, додека подокаликсинот изолиран од човекот има ММ меѓу 165 и 170 кДа [29,30]. Со молекуларно клонирање и секвенционирање на протеинот сличен на човековиот подокаликсин (human podocalyxin - like protein - HPLP) е откриено дека екстрацелуларниот дел на подокаликсинот содржи

пролин, но е особено богат и со серин и треонин кои се потенцијални места за O - врзана и N - врзана гликозилација, содржи и четири цистеински остатоци за создавање на потенцијални дисулфидни врски. Се смета дека екстрацелуларниот дел на подокаликсинот дава поддршка на големиот број негативно наелектризиран и јагледрихидратни остатоци кои дополнително го зголемуваат негативниот полнеж на подоцитниот гликокаликс [28]. Подокаликсинот, припаѓа на голема фамилија на сијаломуцини лоцирани на клетчината површина и е најсроден со 2 молекули: CD34 (Cluster of Differentiation 34) и ендогликани [31]. Подокаликсинот поседува карбокситерминален ПДЗ врзувачки домен (протеин интеракциски домен чије име PDZ доаѓа од првите букви на првите три протеини кај кои се идентификувани овие домени **P**SD - 95 - 95 kDa post - synaptic density protein, **D**LG - *Drosophila melanogaster* Discs Large protein and **Z**O - 1 - zonula occludens - 1 protein), кој посредува во интеракцијата со  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  изменувачкиот регулаторен фактор 1 и 2 ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger regulatory factors 1 and 2 - NHERF1 and NHERF2). Овие протеински комплекси влијаат врз протеинскиот метаболизам, јонскиот транспорт и сигнализацијата во подоцитните клетки [28,32].

Подокаликсинот стапува во интеракција со езринот - протеин кој врзува актин, со што се поврзува со цитоскелетот на подоцитите [27,33]. Подокаликсинот е важен и во развојот на гломерулите и најдено е дека кај глумци кај кои не се експресира подокаликсин има нарушена архитектура на подоцитите со отсуство на прстести продолжетоци и филтрациска дијафрагма [34]. Како сијаломуцин има клетка - клетка антиадхезивно дејство, тоа ги држи филтрациските пори отворени и спречува слепување на висцералниот со париеталниот епителен слој на Бовмановата капсула, процеси важни за нормално одвивање на гломеруларната филтрација [4,28].

Поновите истражувања укажуваат на важната улога на подокаликсинот во морфогенезата на подоцитите и одржување на нивниот структурен интегритет [35]. Подокаликсинот е главен фенотипски белег на подоцитите и е најчесто користен протеински маркер за детекција и идентификација на подоцитите со имунофлуоресцентна техника во биоптичен материјал и урина.

## 1.4 Подоцитопатии - оштетување на подоцитите

Во последните години вниманието на научниците, особено на нефролозите и патолозите е насочено кон улогата на подоцитите во патогенезата на гломеруло-нефропатиите односно нефротскиот синдром. При тоа е направен голем напредок во изучувањето на биологијата на подоцитите, нивната функција и механизмите на нивно оштетување. Подоцитопатиите се група на гломеруларни болести пратени со протеинурија која се јавува како последица на оштетување или дисфункција на подоцитите [36]. Подоцитите како крајно диференцирани клетки не реагираат типично на повреда и кога еднаш ќе оштетат подоцитопенијата прогредира кон гломерулосклероза [3]. Етиолошките фактори на подоцитопатиите можат да бидат: идиопатски, имунолошки, механички, инфективни, метаболни, токсични, генетски итн. Подоцитите реагираат на етиолошките фактори на неколку начини: 1) фенотипски промени со израмнување на прстестите продолжетоци без промени во бројот на подоцитите (minimal - change nephropathy - MCN), 2) апоптоза и загуба на подоцитите, 3) развојни нарушувања на подоцитите пратени со низок пролиферативен индекс на подоцитите, 4) де-диференцијација и висока пролиферација на подоцитите. Врз основа на хистолошките промени постојат 4 типа на подоцитопатии: 1) нефропатија со минимални промени и со нормален број на подоцити, 2) фокална сегментална гломерулосклероза со подоцитопенија на гломеруларно ниво, 3) дифузна мезангијална склероза пратени со низок пролиферативен индекс на подоцитите, 4) колабирачка гломерулопатија пратена со висок пролиферативен индекс на подоцитите [37]. Дијагнозата кај подоцитопатите се поставува со: морфолошко-патохистолошки преглед со светлосен и електронски микроскоп на биоптичен материјал на бубрег, имунохистохемиски - идентификација на специфични протеини за подоцитите во биоптичен материјал, детекција и квантификација на циркулирачки биомаркери, детекција и квантификација на уринарни биомаркери и генетски анализи кај херидитарните подоцитопатии. Детекција и квантификација на циркулирачки и уринарни биомаркери може да се прави со следниве методи: ELISA - enzyme linked immunosorbent assay, Western blot техника, имунофлуоресценција, флоу-цитометрија, масена спектрометрија и RT- PCR - Reverse transcription - polymerase chain

reaction за детекција на mRNA (messenger ribonucleic acid) на специфичните подоцитни протеини [38].

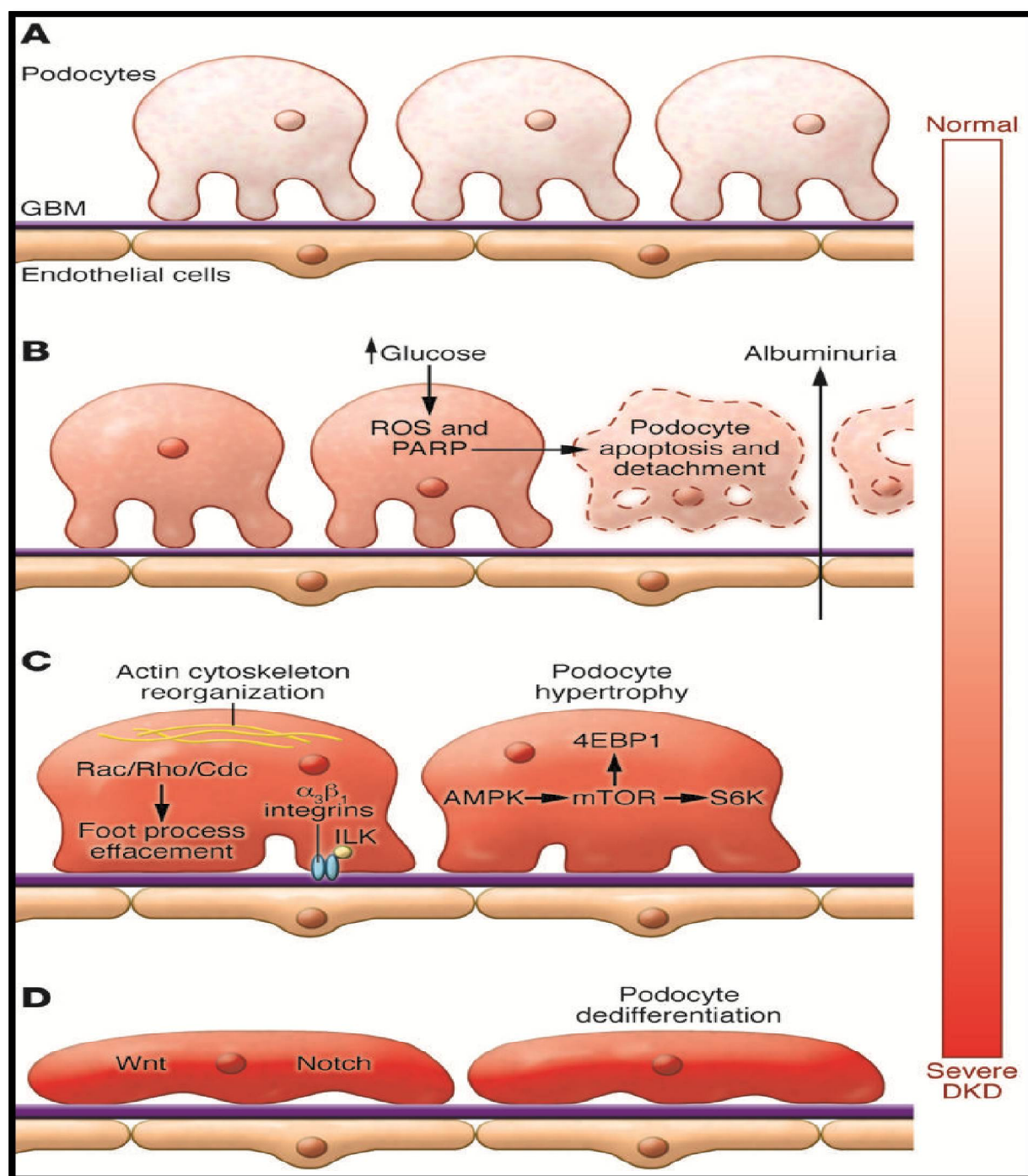
Подоцитопатиите имаат значајна улога во патогенезата и прогресијата не само кај примарните, туку и кај секундарните нефропатии како што се: дијабетската, лупусната, хипертензивната нефропатија, прееклампсијата итн.

**Дијабетската нефропатија** - (ДН) е водечка причина за развој терминалната бубрежна болест (end-stage renal disease-ESRD) во развиените држави. Главни патохистолошки наоди се мезенгиелна експанзија, задебелување на гломеруларната мембрана и гломерулосклероза [39]. Новите истражувања укажуваат на улогата на подоцитопатиите во раната фаза од патогенезата на дијабетската нефропатија која ги вклучува следниве патохистолошки промени на подоцитните клетки: фенотипски промени од типот израмнување на прстестите продолжетоци, загуба на подоцитите, развојни нарушувања на подоцитите и нарушување на нивна пролиферација како и повреда на филтрациската дијафрагма [40]. Во бројни студии е докажано дека патогенезата на дијабетската нефропатија е тесно поврзана со подоцитното оштетување [41,42].

Почетокот на албуминуријата е поврзан со патохистолошките промени во подоцитите особено со епителомезенхијалната транзиција. За време на овој процес, епителните клетки ги губат меѓуклеткините контакти и се подвргнуваат на реорганизација на актинскиот скелет. Така, подоците се враќаат кон незрелиот, недиференциран фенотип, додека TGF- $\beta$  цитокинет станува силен индуктор на транс-диференцијацијата. Според тоа, новиот подоцитен фенотип, за време на развојот на бубрежната дијабетична болест, резултира со одвојување од гломеруларната мембрана, подоцитурија и подоцитопенија на гломеруларно ниво [40,43].

Дијабетската нефропатија започнува со хипертрофија на подоцитите и нивна хиперактивност која води до оштетување на филтрациската дијафрагма, во напреднат стадиум се јавува атрофија на подоцитите, со стеснување на примарните продолжетоци и исчезнување на секундарните прстести продолжетоци. Присутна е фрагментација и одлепување/откачување на подоцитите од ГБМ и нивна загуба преку урината. Сите овие промени водат кон појава на протеинурија [43]. Збирно, главните патохистолошки промени во развојот на дијабетската нефропатија се прикажани на **Слика 6**.





**Слика 6.** Патохистолошки промени на подоцитите кај дијабетската нефропатија  
 А) нормални подоцити В) апоптоза и одкачување на подоцитите од ГБМ С) хипертрофија и цитоскелетна реорганизација на подоцитните клетки со скратување на прстестите продолжетоци и Д) подоцитна дедиференцијација со целосно збришување на прстестите продолжетоци и оштетување на филтрацискта дијафрагма

Со морфометрична метода, забележано е значајно зголемување на просторот помеѓу прстестите продолжетоци кај 28 испитаници со шеќерна болест тип 1 и со албуминурија, во споредба со морфометричниот наод на подоцитите во бубрези од здрави донори [44]. Извештаите од биопсија кај пациенти со шеќерна болест покажуваат директна поврзаност помеѓу редукцијата на бројот на подоцитите и степенот на протеинурија и покажуваат дека бројот на гломеруларни подоцити е најдобар показател за гломеруларното оштетување кај пациентите со шеќерна болест [45]. Во друга студија е најдено е дека постои статистички значајна негативна корелација помеѓу протеинуријата и бројот на подоцитите [46]. Во студија на Vestra и неговите соработници најдена е значајна редукција во бројот на подоцити на гломеруларно ниво кај пациенти со шеќерна болест тип 2, дури и кај оние со нормоалбуминурија во споредба со контролната група [47]. Во една јапонска студија спроведена кај заболени од шеќерна болест тип 2 најдено е дека кај 53% од пациентите со микроалбуминурија и кај 80% од пациентите со макроалбуминурија постои подоцитурија. Во истата студија е докажано дека третман со ACE (Angiotensin converting enzyme) инхибитори води кон редукција на бројот на подоцити во урината [48]. Сите овие студии укажуваат дека морфолошки промени кај подоцитите се присутни пред појавата на протеинурија.

Подоцитното оштетување е важно и во патогенезата на **хипертензивната нефропатија**, но литературните податоци за механизмите на подоцитно оштетување кај хипертензијата се оскудни. Се претпоставува дека механичко оштетување на подоцитниот цитоскелет е клучно во патогенезата на хипертензивната подоцитопатија [49]. Во ревијалната студија на Seccia и нејзините соработници се истакнува значењето на подоцитното оштетување во развојот на хипертензивната нефропатија и улогата на подоцитите и подоцитните протеини во раното откривање на хипертензивната нефропатија [50]. Патохистолошкиот преглед на биоптичниот материјал кај хипертензивни возрасни африканци покажал дека кај 13% од нив присутни се типични фокално-сегментални гломерулосклеротични лезии со патолошки промени и на ниво на подоцитите [51]. Во студијата на Wang и соработниците докажано е присуство на подоцитопенија на гломеруларно ниво кај пациенти со хипертензивна нефропатија [52]. Kretzler и соработниците докажале дека кај дезоксикортикостерон - хипертензивни глувци

присутни се ултраструктурни алтерации кај подоцитите кои понатаму тригерираат гломерулосклероза [53].

**Прееклампсијата** е секундарна гломерулопатија која вклучува подоцитно оштетување и нивна загуба на гломеруларно ниво што води кон протеинурија. Во една лонгитудинална студија најдено е дека подоцитуријата е присутна кај преекламптичните бремени жени пред појавата на протеинурија и хипертензија што укажува дека подоцитуријата е ран дијагностички маркер за прееклампсија. Во истата студија најдена е и позитивна корелација помеѓу бројот на присутни подоцити во урината и степенот на протеинурија. Како заклучок од истата студија е наведено дека подоцитуријата е посензитивен и поспецифичен маркер за рана детекција на прееклампсијата од ангиогените маркери и дека детекцијата на подоцитуријата кај бремени во втор триместар може да служи како скрининг тест за прееклампсијата [54].

Во студијата на Garovic и соработниците најдено е дека подоцитуријата има 100% сензитивност и 100% специфичност во дијагностицирањето на прееклампсијата [55].

## 1.5 Дијагностичко значење на нефрин и подокаликсин кај секундарните гломерулопатии

Специфичните подоцитни протеини нефрин и подокаликсин се релативно нови уринарни маркери вклучени во дијагностиката на нефропатиите. Дијагностичка предност на овие маркери во однос на другите користени маркери се должи на: високата специфичност, можноста неинвазивно да се откриваат и следат нефропатиите кои вклучуваат подоцитното оштетување (“Urine is the liquid biopsy of the kidney“ - Walter Piering MD) и можноста да се мерат во урината со релативно едноставни и сензитивни методи како ELISA. Овие маркери служат како помошни дијагностички алатки кај примарните и секундарните нефропатии, во диференцијална дијагноза на примарните гломеруло-нефропатии, можат да ја заменат скапата и инвазивна бубрежна биопсија, можат да се користат како маркери за следење на текот на болеста, за следење на терапискиот ефект и како прогностички маркери кај нефропатиите. Значењето како рани дијагностички маркери е резервирано за секундарните нефропатии кои се јавуваат кај шеќерна болест тип 2, хронична хипертензија, лупус еритематозус, прееклампсија итн.

Раното откривање на овие нефропатии ќе овозможи навремен третман и значително намалување на смртноста и компликациите кај овие пациенти.

### 1.5.1 Нефринурија и подокаликсурија кај дијабетска нефропатија

Дијабетската нефропатија е една од најчестите компликации кај шеќерната болест тип 2 и е водечка причина за развој на терминална бубрежна слабост. Дијабетската нефропатија има хроничен тек и се карактеризира со перзистентна протеинурија, покачен крвен притисок и нарушена бубрежна функција. Во студијата на Pătări и соработниците утврдено е дека нефринуријата е присутна кај 30% од пациентите со шеќерна болест тип 1 кои имаат нормоалбуминурија, кај 17% од пациентите со микроалбуминурија и 28% од пациентите со макроалбуминурија, додека кај ниту еден здрав субјект немало нефрин во урината [56]. Во студијата на Jim B и нејзините соработници утврдено е излучување на нефрин во урината кај висок процент (54%) од пациентите со шеќерна болест тип 2 кои имаат нормоалбуминурија, што укажува дека нефринот е посензитивен маркер за дијабетска нефропатија од микроалбуминот [57].

Во студијата на Shoji најдено е сигнификантно повисоко ниво на уринарен подокаликсин кај пациентите со микроалбуминурија во споредба со оние со нормоалбуминурија и изведен е заклучок дека подокаликсинот не само што може да биде корисен маркер за рано откривање на дијабетска нефропатија, туку може да биде и потенцијален таргет во третман на ДН [58].

Во студијата на Hui Ye и соработниците, докажано е дека подокаликсин позитивни елементи се појавуваат во урината во ран стадиум од дијабетската нефропатија (кај нормоалбуминурични испитаници) и дека истите можат да се користат како маркери за нејзино рано откривање [59]. Во студијата на Nara и нејзините соработници докажано е дека подокаликсинот мерен во урина со ЕЛИСА метод може да се користи како ран маркер за подоцитно оштетување кај пациентите со шеќерна болест тип 2 [60].

### 1.5.2 Нефринурија и подокаликсурија кај хипертензивна нефропатија

Хипертензивната нефропатија е честа компликација кај пациенти со хронично покачен крвен притисок и е втор по ред најчеста причина за развој на бубрежна слабост, веднаш по дијабетската нефропатија [52]. Литературните податоци за нефринуријата и подокаликсуријата кај хипертензивната нефропатија се оскудни, иако подоцитно оштетување кај хипертензивна нефропатија е документирано во повеќе студии. Во студијата Perez-Hernandez и неговите соработници, објавена 2017 година, најдено е дека нивото на протеинските молекули асоцирани со подоцитите како што се нефринот и подокалинот е повисоко во урината кај хипертензивни испитаници со микроалбуминурија и дека истите значајно корелираат со клиничките параметри кај испитаниците [61].

### 1.5.3 Нефринурија и подокаликсурија кај прееклампсија

Прееклампсијата е специфичен синдром, кој се јавува кај бремени жени и се карактеризира со протеинурија, едеми и хипертензија. Прееклампсијата е водечка причина за матернален и фетален морталитет и морбидитет. Преекламптичните жени имаат сигнификантно повисоки вредности на уринарен нефрин во споредба со здравите бремени жени [62]. Голем број студии укажуваат на значењето на нефринот и подокалинот во предикција на прееклампсијата.

Во студијата на Son и соработниците најдена е позитивна корелација помеѓу уринарниот нефрин и протеинуријата, креатинуријата и дијастолниот крвен притисок кај преекламптичните жени што укажува на значењето на нефринот во патогенезата на протеинуријата кај прееклампсијата и можноста да биде добар индикатор за степенот на ренално оштетување [63]. Jim и соработниците докажале дека нефринуријата има сензитивност од 57% и специфичност од 58% во дијагностицирањето на прееклампсијата [64]. Во студијата на Jung YJ и соработниците потврдено е дека уринарниот нефрин е значаен маркер за предикција на прееклампсијата [65].

Во една студија спроведена кај бремени жени со прееклампсија и еклампсија од Парагвај најдена е покачена концентрација на подокалин во урина, независно од

протеинуријата. Концентрацијата на подокаликсин во урината позитивно корелирала со степенот на подоцитно оштетување. Во истиот труд квантификацијата на уринарен подокаликсин е правена со ЕЛИСА метод како релативно ефтин, едноставен метод за детекција на подоцитно оштетување во споредба со другите методи за детекција на подоцити и методите за детекција и квантификација на ангиогените маркери кај овие патолошки состојби [66].

Barratt и Torham исто така докажале дека подокаликсинот може да се користи како маркер за дијагноза на прееклампсијата и дека нивото на подокаликсин е повисоко кај преекламптичните бремена во споредба со жените со нормална бременост [67].

## 2. МОТИВ ЗА ИЗРАБОТКА НА ДОКТОРСКАТА СТУДИЈА

Од досегашните литературни податоци постојат одредени сознанија за улогата на нефринот и подокаликсинот во раната дијагноза, следењето на текот на болеста, следењето на терапискиот ефект, како и во прогнозата кај пациентите со примарни и секундарни нефропатии.

Досега во Република Македонија не е спроведена студија која вклучува одредување на двата подоцитни маркери - нефрин и подокаликсин, одделно или заедно во урината кај пациентите со различни типови секундарни нефропатии. Истовременото одредување на двата маркери во урината ја зголемува специфичноста во дијагностицирањето на подоцито-нефропатиите.

Нефринот и подокаликсинот во докторската студија се одредуваа кај најчестите секундарни нефропатии, дијабетската и хипертензивната како најчести причинители за терминална бубрежна слабост. Нефринот и подокаликсинот се одредуваа и кај високо-ризични трудници (трудници со ризик од појава на прееклампсија) и трудници со прееклампсија како најчеста причина за мајчина и фетална смртност. Лекувањето на терминалната бубрежна слабост вклучува дијализа и трансплантација што претставува огромен финансиски трошок за здравствениот систем и целокупното општество со оглед на високиот инвалидитет кај овие пациенти. Раното дијагностицирање на овие секундарни нефропатии е од огромно значење заради можноста за навремен третман, спречување на компликациите и намалување на инвалидноста и смртноста кај пациентите.

Оттука произлезе и главниот мотив за изработка на оваа студија, потребата да се воведат нови маркери во раната дијагноза и предикцијата на најчестите секундарни нефропатии како што се: дијабетската, хипертензивната нефропатија и прееклампсијата.

Во Р. Македонија за првпат се вовеле ефтина, неинвазивна метода за детекција и квантификација на нефрин и подокаликсин во урина како маркери за подоцитно оштетување. Користа од одредувањето на овие маркери би била огромна, не само за рано откривање на секундарните нефропатии туку и за дијагноза, диференцијална-дијагноза и прогноза како кај примарните така и кај секундарните нефропатии. Овие маркери воедно се и потенцијално нови терапевтски предизвици. Со воведување на оваа метода ќе се

замени комплицираниот и скап метод на имунофлуоресцентно боење и броење на подоцитни клетки во урина како начин за детекција на подоцитопатии и ќе се намали бројот на индикации за ренална биопсија. Раното откривање на секундарните нефропатии ќе овозможи навремен третман, намалување на компликациите и смртноста кај пациентите што како крајна цел би имало огромна општествена корист.



### 3. ЦЕЛИ НА ДОКТОРСКАТА СТУДИЈА

За да се утврди улогата и значењето на нефринот и подокаликсинот во раната дијагноза и предикција на секундарните нефропатии и за да може истите да се воведат во рутинската лабораториска пракса како маркери за рано откривање на секундарните нефропатии, поставени се следниве цели:

- 1) да се воведи ЕЛИСА метод за одредување на нефрин и подокаликсин во урина, да се одреди концентрацијата на нефрин и подокаликсин во урината кај сите испитаници и да се одредат референтни вредности за нефрин и подокаликсин во урина;
- 2) да се одреди концентрацијата на микроалбумин и креатинин во урината и врз основа на уринарен микроалбумин/креатинин однос (М/К Однос) да се поделат сите испитаниците со шеќерна болест тип 2 односно хронична хипертензија на три подгрупи: макро-, микро- и нормолбуминурични испитаници;
- 3) да се спореди концентрацијата на нефрин односно подокаликсин во урината помеѓу подгрупите испитаници со шеќерна болест тип 2 односно хронична хипертензија;
- 4) да се спореди концентрацијата на нефрин односно подокаликсин во урината помеѓу подгрупите трудници: со прееклампија, со ризик од појава на прееклампија и здрави трудници, и да се направи корелација помеѓу концентрацијата на уринарен нефрин односно подокаликсин и гестациската старост на бременоста;
- 5) да се одреди стапката на гломеруларна филтрација со цел да се утврди степенот на оштетување на бубрежната функција и да се направи корелација помеѓу стапката на гломеруларна филтрација и концентрацијата на уринарен нефрин односно подокаликсин кај групите испитаници;

6) да се направи сепарација на уринарните протеини со градиентна 4-22% SDS-PAGE - електрофореза кај групите и подгрупите испитаници со цел да се утврди типот на протеинурија и степенот на бубрежно оштетување;

7) да се утврди дискриминаторската моќ на уринарниот нефрин односно подокаликсин помеѓу здравите испитаници и оние со дијабетска, хипертензивна нефропатија и прееклампсија.

## 4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

Докторската студија се работеше на Институтот за медицинска и експериментална биохемија при Медицинскиот факултет во Скопје во соработка со Универзитетската клиника за нефрологија, Центарот за дијабет, при Универзитетската клиника за ендокринологија и метаболни болести, Универзитетската клиника за гинекологија и акушерство како и три приватни здравствени установи. Селекцијата на испитаниците и собирањето на материјалот се одвиваше во период од 2015-2017 година. Студијата е одобрена од страна на Етичката комисија за истражување на луѓе при Медицински факултет - Скопје (број на одобрение 03-5515/8 од 09.12.2015 – **Прилог 3**). Дизајнот на студијата е студија во пресек.

### 4.1 Испитаници

Во студијата беа вклучени 305 испитаници поделени во следниве групи:

1. **Прва група** - 90 испитаници со шеќерна болест тип 2
  - **Прва подгрупа** - 60 испитаници со шеќерна болест тип 2, дијагностицирани од страна на Центарот за дијабетес но без дијагностицирана дијабетска нефропатија. Критериуми за вклучување кај оваа подгрупа испитаници се: шеќерна болест тип 2, траење на болеста од 1 до 5 години, возраст од 40-60 години;
  - **Втора подгрупа** - 30 испитаници со шеќерна болест тип 2 со дијагностицирана нефропатија (перзистентна албуминурија  $>300$  mg/d или  $>200$   $\mu$ g/min потврдена најмалку 2 пати во период од 3-6 месеци, прогресивен пад на стапката на гломеруларна филтрација и постепен пораст на крвниот притисок). За испитаниците од оваа подгрупа критериуми за вклучување се шеќерна болест тип 2 и дијагностицирана нефропатија.

Критериуми за исклучување во двете подгрупи е историја за претходна бубрежна болест. Не постоеја критериуми за исклучување врз основа на полот и националната припадност.

2. **Втора група** - 84 испитаници со хронична хипертензија

- **Прва подгрупа** - 54 испитаници со хронична хипертензија без дијагностицирана нефропатија. Критериуми за вклучување во оваа група се: дијагностицирана хронична хипертензија, траење на болеста до 5 години, возраст 40-60 години;
- **Втора подгрупа** - 30 пациенти со дијагностицирана хипертензивна нефропатија - (влошување на крвниот притисок, протеинурија, хипопротеинемија, едеми, ноктурија, хематурија, хиперлипидемија и пад на стапката на гломеруларна филтрација). За испитаниците од оваа подгрупа критериуми за вклучување се хронична хипертензија и дијагностицирана хипертензивна нефропатија.

Критериуми за исклучување за сите испитаници од двете подгрупи се историја за претходна бубрежна болест и присуство на шеќерна болест. Не постоеја критериуми за исклучување врз основа на полот и националната припадност.

3. **Трета група** - 71 трудница

- **Прва подгрупа** - 41 трудница со високо-ризична бременост. Во оваа група, 18 трудници беа во втор триместар од бременоста (гестациска старост од 15-26 недели), додека 23 трудници беа во трет триместар (гестациска старост од 27-38 недели).

Критериуми за вклучување за оваа група испитаници беа: гестациска старост на бременоста > 15 недели, претходна историја за прееклампсија, гестациски дијабет, бремени со претходно постоечка шеќерна болест тип 1 или 2 (откриен најмалку 20 недели пред почетокот на бременоста), бремени со преегзистирачка хипертензија (крвен притисок >140/90 mmHg откриен 20 недели пред почетокот на бременоста), бремени со

хипертензија индуцирана од бременост, близначка бременост, прекумерна телесна тежина (БМИ >30 kg/m<sup>2</sup>).

- **Втора подгрупа** - 30 трудници со прееклампсија (*de novo* хипертензија > 140/90 mmHg, протеинурија > 300 mg/24-h и присуство на едеми, после 20 гестациска недела). Во оваа група, 10 трудници беа во втор триместар од бременоста (гестациска старост од 15-26 недели), додека 20 трудници беа во трет триместар (гестациска старост од 27-38 недели).

Критериуми за исклучување во двете подгрупи се историја за претходна бубрежна болест и трудници помлади од 18 години.

4. **Четврта група** - 60 здрави испитаници кои служат како контролна група

- **Прва подгрупа** - 30 здрави лица на возраст од 40-60 години без позитивна анамнеза за дијабет, хипертензија, бубрежна болест и други болести.
- **Втора подгрупа** - 30 здрави трудници со гестациска старост на бременост > 15 недели. Во оваа група 15 трудници беа во втор триместар од бременоста (гестациска старост од 15-26 недели), 15 трудници беа во трет триместар (гестациска старост од 27-38 недели).

За сите испитаници беше пополнет анкетен лист со податоци од интерес за студијата, во присуство на медицинско лице. Во студијата беа вклучени само испитаниците кои доброволно потпишаа формулар за информираност и согласност за учество во научно-истражувачката студија.

## 4.2. Материјал - урина

Како материјал користевме поединечен примерок прва утринска урина во количина од 10 ml земен во хемиски чист и сув сад. Сите пациенти добија писмено упатство за

начинот за правилно земање на урина. Во свежите примероци урина ја одредивме концентрацијата на микроалбумин, креатинин и направивме хемиски преглед на урината.

На свежите примероци урина од испитаниците со макро и микроалбуминурија и кај сите трудници со исклучок на здравите, им направивме сепарација на уринарните протеини со содиум додецил сулфат - полиакриламид гел електрофореза - СДС-ПАГЕ. Остатокот од урината од сите испитаници по центрифугирање (10000 вртежи во мин, 10 минути на +4°C) ја замрзнувавме во стерилни пластични епендорфи со волумен од 1,5 ml, на -70°C, се до одредување на концентрацијата на нефрин и подокаликсин.

### 4.3 Материјал - венска крв

Примероците венска крв се земаа со вакутајнери без антикоагуланс (BD Vacutainer - Plimont, UK). Крвта по отстојување на сталак во период од 10 минути, ја центрифугиравме на 3000 вртежи во минута, во текот на 10 минути, па потоа издвојувавме серум во стерилни пластични епендорфи за еднократна употреба со волумен од 1,5 ml. Кај сите испитаници во свежиот примерок серум ја одредувавме концентрацијата на: глукоза, креатинин, уреа, холестерол, триацилглицероли, ХДЛ, ЛДЛ, албумин и вкупни протеини. Податоците за гликемичната контрола добивавме од самите испитаници со шеќерна болест тип 2 преку приложување на лабораториски извештај за измерени вредности за гликозилиран хемоглобин HbA1c при последна контрола направена во Центарот за дијабетес при Клиниката за ендокринологија и метаболни болести, Скопје.

### 4.4 Методи

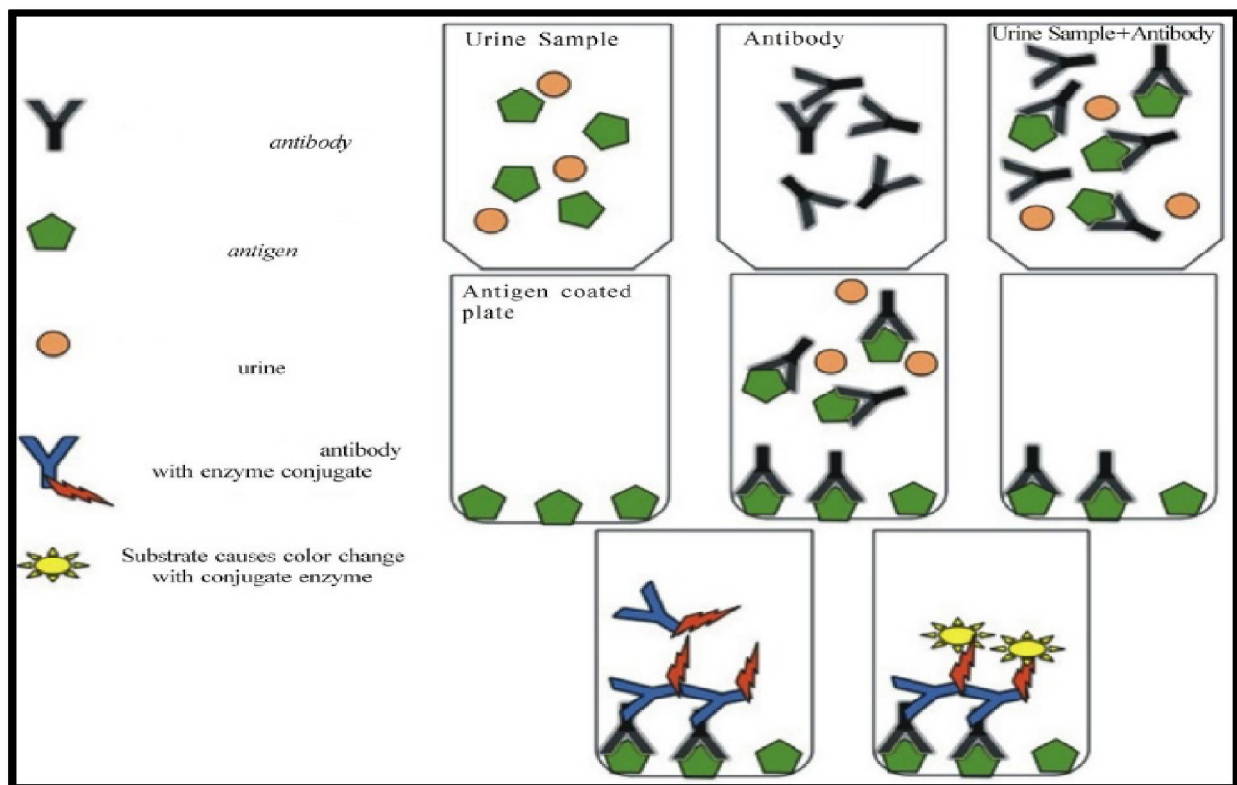
#### 4.4.1 Одредување на концентрација на нефрин во урина со ЕЛИСА метод

Користевме комерцијален ЕЛИСА тест специјално наменет за мерење на нефрин во урина од америчката фирма Exocell (Philadelphia, PA, USA). Работевме според инструкциите дадени од страна на производителот за мануелна процедура. Методата е

индиректна компетитивна ЕЛИСА при што се користат поликлонални антитела против екстрацелуларниот домен на нефринот.

**Принцип на методата:** Антигенот (нефринот) од примерокот урина и имобилизираните нефрински антигени (на дното од полистиренските плочи) се натпреваруваат за анти-нефрински зајачки антитела. Антизајачки ХРП (HRP- horseradish peroxidase) конјугат се користи за детекција на имобилизираните поликлонални антитела, додека оние кои се врзани за нефринските антигени од урината на испитаниците се отстрануваат со плакнење. На крајот се мери апсорбанцијата на целата ЕЛИСА плочка односно на сите 96 бунарчиња на бранова должина од 450 nm и од измерените апсорбанции се пресметува концентрацијата на нефрин во урина откако претходно ќе се конструира стандардна крива, користејќи комерцијални стандарди. Интензитетот на обојувањето (апсорбанцијата) е обратнопропорционален со концентрацијата на нефринот во примерокот урина. Резултатите се изразуваат во ng/ml.

На **Слика 7** е прикажан општ принцип на индиректна компетитивна ЕЛИСА метода.



Слика 7. Општ принцип на индиректна компетитивна ЕЛИСА метода

Постапката за одредување на концентрација на нефрин во урина со имуноензимска метода се состои од повеќе етапи:

### 1) Подготовка на стандардите и примероците

Стандардите за нефрин се подготвуваат така што се одбележуваат 9 пластични епендорфи за еднакратна употреба и во сите се става по 120  $\mu\text{l}$  волумен од комерцијалниот разредувач. Во епендорфот одбележан со број 1 се ставаат 120  $\mu\text{l}$  волумен од комерцијалниот стандард, се промешува по пат на аспирирање и испуштање на земениот волумен 5 пати или со користење на мешалка. Потоа се земаат од првиот епендорф 120  $\mu\text{l}$  волумен и се префрлаат во епендорфот одбележан со број 2. Се повторува постапката на мешање исто како кај првиот епендорф и се префрлаат 120  $\mu\text{l}$  волумен во третиот епендорф. Целата постапка се повторува на идентичен начин се до деветтиот епендорф од кој 120  $\mu\text{l}$  волумен се исфрлаат. На тој начин со серија на разредувања добиваме 9 стандарди и тоа со следниве концентрации: 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,1; 1,6; 0,8 ng/ml.

Замрзнатите примероците урина се оставаат на собна температура 2 - 3 часа да се одмрзнат. Примероците урина се разредуваат во однос 1:10, односно на еден дел урина се додават 9 дела комерцијален разредувач. Разредувањето на примероците го правевме во пластични епендорфи за еднакратна употреба така што земавме 20  $\mu\text{L}$  волумен од урината и 180  $\mu\text{L}$  волумен од комерцијалниот разредувач. Подготовката на примероците е прикажана на **Слика 8**.

### 2) Аплицирање на стандардите и примероците во бунарчињата од ЕЛИСА плочката

Полистиренската ЕЛИСА плочка има 96 бунарчиња, во бунарчето А1 се става негативна контрола (разредувач 100  $\mu\text{L}$ ), а во бунарчето А2 позитивна контрола (50  $\mu\text{L}$  разредувач). Во останатите бунарчиња се ставаат стандардите и примероците од пациентите (по 50  $\mu\text{L}$ ) по редослед кој сами го одредувавме за што претходно подготвувавме шема на ЕЛИСА хартиен шаблон. Апликацијата се вршеше мануелно со автоматски пипетор од 50  $\mu\text{L}$  со што за секоја апликација користевме нов пластичен продолжеток за еднакратна употреба.

### 3) Додавање на анти - нефринско антитело

Волумен од 50  $\mu\text{L}$  од анти-нефринското антитело се додаваше во сите бунарчиња со исклучок на бунарчето А1.





*Слика 8. Подготовка на примероците урина од испитаниците*

**4) Примарна инкубација** - преку ноќ на собна температура.

**5) Плакнење на бунарчињата**

Плакнењето се правеше со комерцијален пуфер на апарат ChemWell® 2910 (Awareness Technology, Inc, USA) и вклучуваше 10 циклуси на плакнење на сите бунарчиња со по 300  $\mu\text{L}$  пуфер. Пуферот е составен од: 0.15 M NaCl, 0.01 M triethanolamine (pH 6.8), 0.05% Tween 20 и 0.05 % Proclin 300.

**6) Додавање на анти - зајачки ХРП конјугат**

Со мултисканален пипетор се додаваше по 100  $\mu\text{L}$  волумен од конјугатот во секое бунарче.

**7) Секундарна инкубација** - во траење од 90 минути на собна температура.

**8) Плакнење на бунарчињата**

Плакнењето се правеше со комерцијален пуфер на апарат ChemWell® 2910 (Awareness Technology, Inc, USA) и вклучуваше 10 циклуси на плакнење на сите бунарчиња со по 300  $\mu\text{L}$  пуфер.

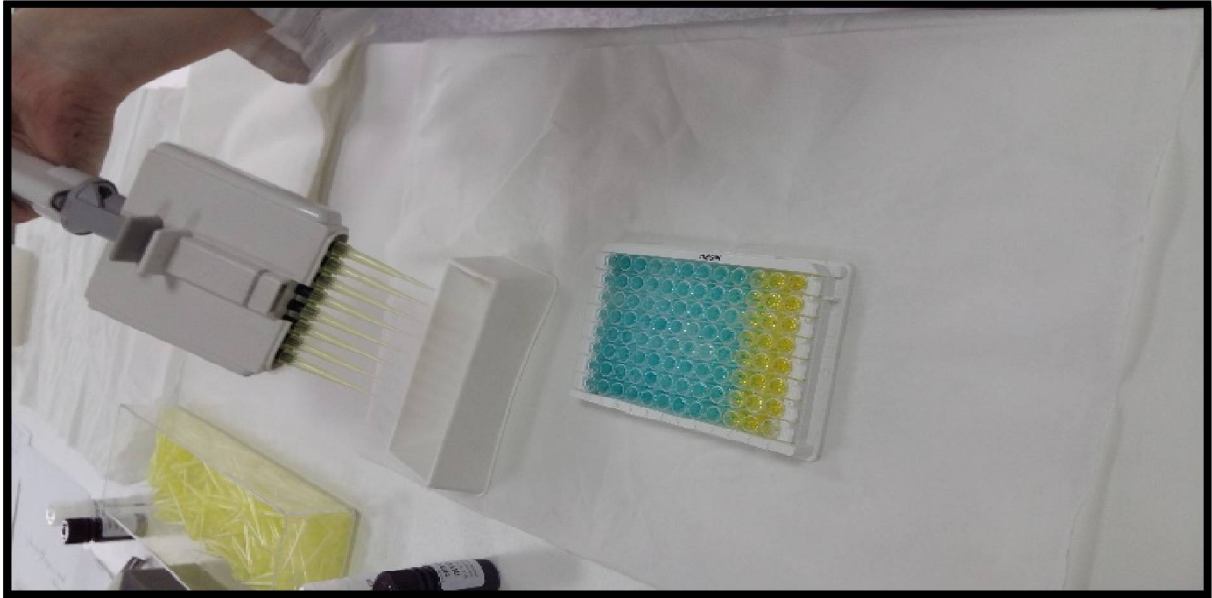
**9) Додавање на развивач на боја (Color developer - CV)**

По 100  $\mu\text{L}$  волумен од развивачот на боја се додаваше во секое бунарче со помош на мултисканален пипетор.

**10) Инкубација од 5 до 20 минути**, во зависност од брзината на развивање на боја.

**11) Додавање на раствор кој го запира процесот на развивање на боја (Stop solution)**

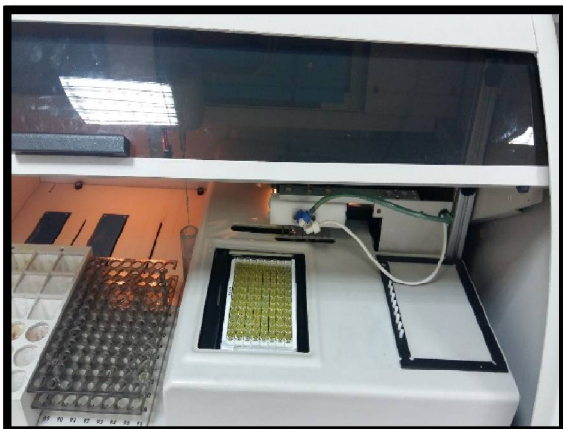
Со мултиканален пипетор се додаваше по 100  $\mu\text{L}$  волумен од растворот за запирање на процесот на бојење во секое бунарче, **Слика 9**.



*Слика 9. Додавање на средство кое го запира процесот на развивање на боја*

**12) Мерење на апсорбанца на примероците**

На крајот од постапката се мереше апсорбанцата на примероците на апарат биохемиски анализатор ChemWell® 2910 (Awareness Technology, Inc, USA) користејќи филтер со бранова должина од 450 nm, **Слика 10**.

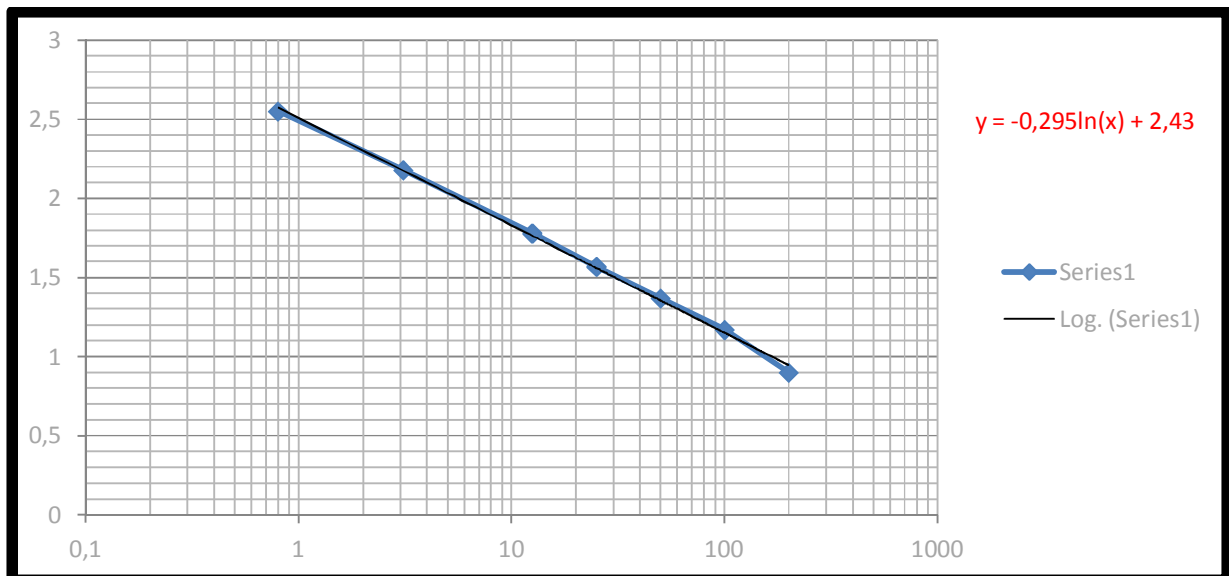


*Слика 10. Мерење апсорбанца на примероците на биохемиски анализатор ChemWell® 2910 (Awareness Technology, Inc, USA)*

## 12) Пресметување на концентрацијата на нефрин во примероците урина од стандардна крива

Стандардната крива, **График 1**, се конструираше во Excel компјутерска програма. Се работи за семи - логаритамска крива која се добива така што на апсцисата се внесуваат концентрации на стандардите за нефрин, а на ординатата измерените апсорбации на истите.

Од податоците внесени во графикот се добива математичка формула која понатаму ја користевме за да ја пресметаме концентрацијата на нефринот во примероците со анти-логоритам во Excel документ. Концентрацијата на нефринот во примероците ја изразувавме во ng/ml.



*График 1. Стандардна крива на нефрин*

### 4.4.2 Одредување на концентрација на подокаликсин во урина со ЕЛИСА метод

Користевме комерцијален ЕЛИСА тест специјално наменет за мерење на подокаликсин во урина од америчката фирма Exocell (Philadelphia, PA). Работевме според инструкциите дадени од страна на производителот за мануелна процедура. Методата е

индиректна компетитивна ЕЛИСА при што се користат поликлонални антитела против подокаликсинот.

**Принцип на методата:** Антигенот (подокаликсинот) од примерокот урина и имобилизираните подокаликсински антигени (на дното од полистиренските плочи) се натпреваруваат за анти-подокаликсинските зајачки антитела. Антизајачки ХРП (HRP - horseradish peroxidase) конјугат се користи за детекција на имобилизираните поликлонални антитела, додека оние кои се врзани за подокаликсинските антигени од урината на испитаниците се отстрануваат со плакнење. На крајот се мери апсорбанцијата на целата ЕЛИСА плочка односно на сите 96 бунарчиња на бранова должина од 450 nm и од измерените апсорбации се пресметува концентрацијата на подокаликсин во урина откако претходно ќе се конструира стандардна крива, користејќи комерцијални стандарди. Интензитетот на обојувањето е обратнопропорционален со концентрацијата на подокаликсинот во примерокот урина. Резултатите се изразуваат во ng/ml.

Постапката за одредување на концентрација на подокаликсин во урина со имуноензимска метода се состои од повеќе етапи:

### 1) Подготовка на стандардите и примероците

Стандардите за нефрин се подготвуваат така што се одбележуваат 7 пластични епендорфи за еднократна употреба и во сите се става по 120  $\mu$ l од комерцијалниот разредувач. Во епендорфот одбележан со број 1 се става 120  $\mu$ l од комерцијалниот стандард, се промешува по пат на аспирирање и испуштање на земениот волумен 5 пати или со користење на мешалка. Потоа се земаат од првиот епендорф 120  $\mu$ l волумен и се префрлаат во епендорфот одбележан со број 2. Се повторува постапката на мешање исто како кај првиот епендорф и се префрлаат 120  $\mu$ l волумен во третиот епендорф. Целата постапка се повторува на ист начин се до седмиот епендорф, од кој 120  $\mu$ l волумен се исфрлаат. На тој начин со серија на разредувања добиваме 7 стандарди со следниве концентрации 25; 12,5; 6,25; 3,1; 1,6; 0,8; 0,4 ng/ml.

Замрзнатите примероци урина се оставаат на собна температура 2-3 часа да се одмрзнат. Примероците урина се разредуваат во однос 1:2, односно на еден дел урина се додава 1 дел комерцијален разредувач. Разредувањето на примероците го правевме во пластични епендорфи за еднократна употреба така што земавме 100  $\mu$ L од урината и 100  $\mu$ L од разредувачот, **Слика 8**.

**2) Аплицирање на стандардите и примероците во бунарчињата од ЕЛИСА плочката**  
Полистиренската ЕЛИСА плочка има 96 бунарчиња, во бунарчето А1 се става негативна контрола (разредувач 100  $\mu\text{L}$ ) која ни служеше како слепа проба, а во бунарчето А2 позитивна контрола (50  $\mu\text{L}$  разредувач). Во останатите бунарчиња се ставаа стандардите и примероците од пациентите (по 50  $\mu\text{L}$ ) по редослед кој сами го одредувавме за што претходно подготвувавме шема на ЕЛИСА хартиен шаблон. Апликацијата се вршеше мануелно со автоматски пипетор од 50  $\mu\text{L}$  со што за секоја апликација користевме нов пластичен продолжеток за еднократна употреба.

**3) Додавање на анти - подокаликсинско антитело**

По 50  $\mu\text{L}$  анти-подокаликсинско антитело се додаваше во сите бунарчиња со исклучок на бунарчето А1.

**4) Примарна инкубација** - преку ноќ на собна температура.

**5) Плакнење на бунарчињата**

Плакнењето на бунарчињата се правеше со комерцијален пуфер на апарат ChemWell<sup>®</sup> 2910 (Awareness Technology, Inc, USA) и вклучуваше 10 циклуси на плакнење на сите бунарчиња со по 300  $\mu\text{L}$  пуфер. Состав на пуферот: 0.15 М NaCl, 0.01 М triethanolamine (pH 6.8), 0.05% Tween 20 и 0.05 % Proclin 300.

**6) Додавање на анти - зајачки ХРП конјугат**

По 100  $\mu\text{L}$  анти-зајачки ХРП конјугат се додаваше со мултиканален пипетор во секое бунарче.

**7) Секундарна инкубација** - во траење од 90 минути на собна температура.

**8) Плакнење на бунарчињата**

Плакнењето се правеше со комерцијален пуфер на апарат ChemWell<sup>®</sup> 2910 (Awareness Technology, Inc, USA) и вклучуваше 10 циклуси на плакнење на сите бунарчиња со по 300  $\mu\text{L}$  пуфер.

**9) Додавање на развивач на боја (Color developer - CV)**

По 100  $\mu\text{L}$  од развивачот на боја се додаваше во секое бунарче со помош на мултиканален пипетор.

**10) Инкубација 5-20 минути** - во зависност од брзината на развивање на боја.

11) Додавање на средство кое го запира процесот на развивање на боја (Stop solution) Средството кое го запира процесот на развивање на боја се додаваше во волумен од 100  $\mu\text{L}$  во секое бунарче, Слика 9.

### 12) Мерење на апсорбанца на примероците

Апсорбанцата на примероците ја меревме на апарат биохемиски анализатор ChemWell<sup>®</sup> 2910 (Awareness Technology, Inc, USA) користејќи филтер со бранова должина од 450 nm, Слика 10.

### 13) Пресметување на концентрацијата на подокаликсин во примероците урина од стандардна крива

Стандардната крива, График 2, се конструираше во Excel компјутерска програма. Се работи за семи - логаритамска крива која се добива така што на апсцисата се внесуваа концентрациите на стандардите за подокаликсин а на ординатата измерените апсорбенции за истите.

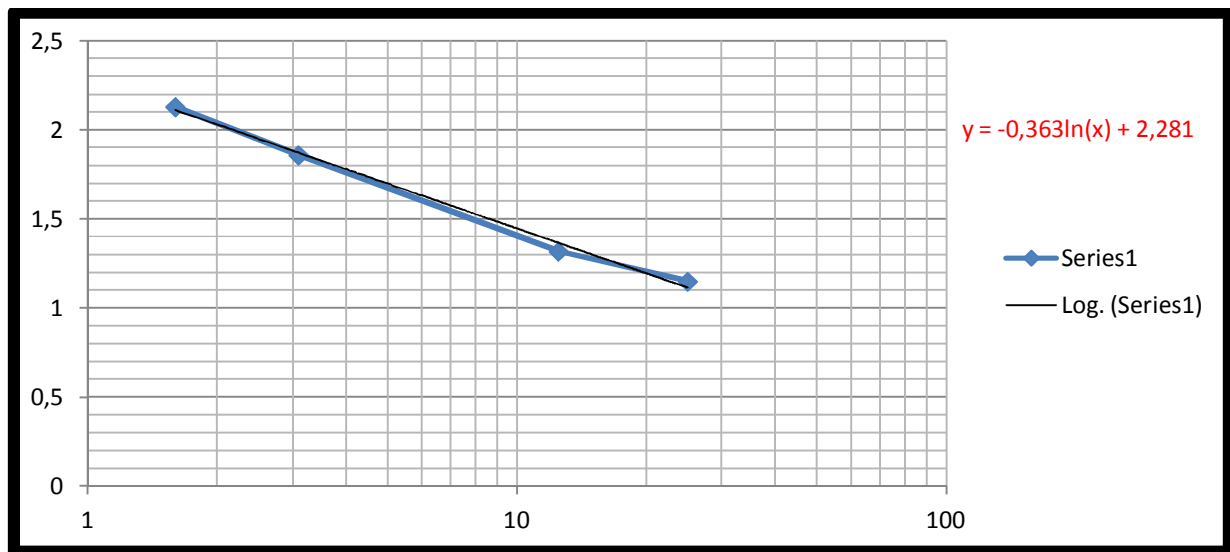


График 2. Стандардна крива на подокаликсин.

Од податоците внесени во графиконот се добива математичка формула која понатаму ја користевме за да ја пресметаме концентрацијата на подокаликсинот во примероците со анти-логоритам во Excel документ. Концентрацијата на подокаликсинот во примероците ја изразувавме во ng/ml.

#### 4.4.3 Одредување на концентрација на микроалбумин во урина со имунотурбидиметриска метода

За да ја одредиме концентрацијата на микроалбумин во урината користевме комерцијален кит од фирмата (Biogex, UK).

**Принцип на методата:** примерокот урина се меша со анти - хуман албумин овчи антисерум при што се јавува аглутинација како резултат на антиген - антитело реакцијата. Интензитетот на заматувањето е пропорционален со концентрацијата на микроалбумин во урината и се мери на бранова должина 340 nm на автоматизиран биохемиски анализатор ChemWell<sup>®</sup> 2910 (Awareness Technology, Inc, USA). Резултатот се отчитува од стандардна крива која ја конструира апаратот од комерцијални стандарди за микроалбумин и се изразува во mg/L.

#### 4.4.4 Одредување на концентрација на креатинин во урина со фотометриска метода

Се користеа комерцијални реагенси на фирмата (Human, De), за одредување на концентрација на креатинин во урина.

**Принцип на методата по Jaffe:** кинетичка фотометриска/колориметриска без депротеинизација. Се работеше на автоматизиран биохемиски анализатор ChemWell<sup>®</sup> 2910 (Awareness Technology, Inc, USA). Примерокот урина претходно се разредува 1+49 дестилирана вода. Измерената вредност за креатинин во урина се множи со факторот на разредување 50. Резултатите се изразуваа во  $\mu\text{mol/L}$ .

#### 4.4.5 Одредување на стапка на гломеруларна филтрација по формулата на Cockcroft and Gault

Стапката на гломеруларна филтрација (ГФР – гломеруларна филтрациска рата) ја одредувавме користејќи ја формулата на **Cockcroft and Gault**, за што ни беа потребни податоци за следниве параметри: концентрацијата на креатинин во серум, пол, возраст и телесна тежина [68].





Бидејќи резултатите од фотометриското мерење на креатинин во урина ги добиваме во  $\mu\text{mol/L}$ , беше неопходно да се направи конверзија на мерната единица за креатинин од  $\mu\text{mol/L}$  во  $\text{g/L}$ . Конверзијата ја правевме по следнава формула:

$$\text{креатинин } \mu\text{mol/L} : 8840 = \text{креатинин во g/L}$$

Односот микроалбумин/креатинин во урина високо корелира со концентрацијата на микроалбумин во 24 часовна урина и се користи со цел да се избегне собирање на 24 часовна урина [70].

#### 4.4.7 Хемиски преглед на урина

Хемискиот преглед на урината го правевме со комерцијални уринарни тест траки Combina 10, од фирмата (Human, De). Тестовите припаѓаат на техниките на сува хемија. Се работи за едноставен метод за квалитативно и семиквантитативно испитување на следниве параметри во урина: крв, уробилиноген, билирубин, протеини, нитрити, глюкоза, рН, леукоцити, специфична тежина и аскорбинска киселина. Резултатите се отчитуваа визуелно.

#### 4.4.8 Одредување на концентрација на глюкоза, вкупни протеини, албумин, уреа, креатинин, холестерол, триацилглицероли, ХДЛ и ЛДЛ во серум

Во серум ја одредувавме концентрацијата на следниве биохемиските параметри: глюкоза, албумин, вкупни протеини, уреа, креатинин, холестерол, триацилглицероли и ХДЛ. Концентрацијата ја одредувавме со стандардни фотометриски методи користејќи автоматизиран биохемиски анализатор ChemWell<sup>®</sup> 2910 (Awareness Technology, Inc, USA).

Ги користевме следниве фотометриски методи:

- за одредување на концентрација на глюкоза користевме ензимска фотометриска метода со глюкозо - оксидаза/пероксидаза,
- за одредување на концентрација на холестерол, ензимска фотометриска метода со холестерол - оксидаза/пероксидаза,

- за одредување на концентрација на триацилглицеролите, ензимска фотометриска метода со серија ензимски врзани реакции катализирани од липаза, глицерол киназа, глицерол фосфат оксидаза и пероксидаза,
- за албумин, фотометриска метода со бром - крезол и цитратен пуфер,
- за одредување на концентрација на вкупни протеини, биуретска метода,
- за одредување на концентрација на уреа, ензимска метода со уреаза и глутамат дехидрогеназа,
- за одредување на концентрација на креатинин користевме модификувана кинетичка метода по Jaffe - фотометриска/колориметриска без депротеинизација со пикринска киселина во присуство на алкален пуфер,
- концентрацијата на ХДЛ ја меревме фотометриски по претходна ензимска преципитација на хиломикроните, ВЛДЛ, и ЛДЛ а потоа ХДЛ холестеролот се одредува со ензимска - холестерол оксидаза/пероксидаза метода.
- концентрацијата на ЛДЛ математички ја пресметувавме по Friedwald-ова равенка ( $\text{ЛДЛ} = \text{вкупен холестерол} - \text{триацилглицероли}/2.2 - \text{ХДЛ холестерол}$ ) кај испитаниците чија концентрација на триацилглицероли во серумот беше пониска од 3,94 mmol/L. Кај испитаниците чија концентрација на триацилглицероли во серумот беше повисока од 3,94 mmol/L, ја меревме концентрацијата на ЛДЛ холестеролот фотометриски со метода на ензимска преципитација и со холестерол оксидаза/пероксидаза.

#### 4.4.9 Одредување на БМИ - индекс на телесна маса

Индексот на телесна маса - ВМІ - (body mass index) го одредувавме кај сите испитаници по формула врз основа на податоци за телесна тежина и висина добиени од пополнетите анкетни листови. Ја користевме следнава формула: телесна тежина во kg поделено со висината во  $\text{m}^2$ . Резултатите се изразуваа во  $\text{kg}/\text{m}^2$ .

#### 4.4.10 Сепарација на уринарни протеини со градиентна SDS-PAGE според методот на Görg

Сепарацијата на уринарните протеини беше направена со примена на тенкослојна хоризонтална градиентна SDS-PAGE според методот на Görg и соработниците [71].

**Принцип на методата:** Анјонскиот детергент, натриум додецил сулфат, нековалентно се врзува со полипептидните вериги резултирајќи со негативен електростатски набој на протеините независно од нивниот првобитен набој. Од овие причини кај овој тип електрофореза, електрофоретската подвижност зависи од молекулската маса на протеините, а не од нивниот полнеж. За анализа на смеси од протеини со различна молекуларната маса се користат градиентни гелови, кои имаат континуирано променлива големина на порите во правецот на движење. Поради тоа што молекулите мигрираат до границата на порозноста и го запираат движењето се добиваат во многу остри ленти.

Според методот на Görg и соработниците се користи 4-22% градиентен гел, кој во почетниот дел предвиден за апликација на примероците, има концентрација на полиакриламид од 4%, а потоа линеарно се зголемува до 22%. Тоа на гелот му овозможува формирање на мрежеста структура со особини на молекуларно сито. На почетокот, гелот има најголеми пори, но тие линеарно се намалуваат кон спротивниот крај. Протеините патувајќи низ гелот се сепарираат според нивната молекуларна големина. Најбавно патува протеинот со најголем молекул. Преостанатите молекули патуваат подалеку, соодветно според намалувањето на нивната релативна молекуларна маса, а најдалеку патува протеинот со најмал молекул. Протеините, продирајќи низ гелот, се сепарираат и со набивање се фокусираат во тенки фракции, што овозможува нивно визуелизирање и кога се присутни во ниски концентрации во примерокот. Со примена на соодветни стандарди се овозможува определување на молекуларната маса на сепарираните протеини.

Постапката за сепарација и идентификација на уринарните протеини со градиентна (4-22%) SDS-PAGE се состои од повеќе етапи:

##### 1) Подготовка на линеарен градиентен гел (4-22%)

Потребна опрема:

- Калап со две стаклени плочи со димензии 195 x 250 x 0,5 mm;
- Два стаклени резервоари од кои едниот е комора за мешање;
- Градиентен миксер;
- Магнетна мешалка.

На едната стаклена плоча од калапот во кој се разлива гелот на неколку cm од горниот крај се лепи тенка лента (Dymo<sup>R</sup> lenta) широка 4 mm. Со помош на скалпел се формираат апликации во вид на правоаголници со димензии 8 x 4 mm, кои овозможуваат при разливањето на гелот да се формираат вдлабнатини во кои се аплицираат примероците урина (15  $\mu$ l). За да се спречи лепењето на гелот на апликациите, истите се обложуваат со Repel Silane. За полесно пренесување на гелот, истиот се полимеризира на пластичен Gel Bond филм.

Потребни раствори:

1. Акриламид/бисакриламид раствор.

Се раствораат 28,8 g акриламид (Acrylamide, C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>NO, Bio-Rad, USA) и 0,8 g бисакриламид (Bis, N,N'-methylene-bis-acrylamide, C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Bio-Rad, USA) во дестилирана вода и се дополнува до волумен од 100 mL;

2. Гел пуфер (1,5 M Tris/HCl, pH 8,8).

Се раствораат 18,2 g Трис (Tris [Hydroxymethyl] amino-methane, Bio-Rad, USA), 0,4 g SDS (sodium dodecyl sulfate, C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>O<sub>4</sub>SNa, Bio-Rad, USA) и 10 mg NaN<sub>3</sub> во 80 ml дестилирана вода. Се дотерува pH на пуферот со концентрирана HCl и се дополнува до 100 ml со дестилирана вода;

3. Ammonium persulfate (40%). Се раствораат 400 mg ammonium persulfate (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, (Bio-Rad, USA) во дестилирана вода до 1 ml;

4. TEMED (N,N,N',N'-tetra-methyl-ethylene-diamine, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>, Bio-Rad, USA).

Сите употребувани хемикалии се со степен на чистота "pro analysi", наменети за електрофоретска сепарација.

Линеарниот гел се формира со мешање на два комплетно подготвени акриламидни раствори, А и Б со концентрација 4% односно 22%. Пред да се разливаат акриламидните раствори, во калапот се додава средство за полимеризација (ammonium persulfat) и

катализатор (TEMED). Растворите се ставаат во два засебни, но меѓусебно поврзани резервоари. Растворот Б истекува во растворот А, според принцип на сврзани садови, а оттаму во калапот. Со постојано мешање на магнетна мешалка во садот А се овозможува континуирано намалување на концентрацијата на полиакриламидниот гел од 22% кон 4%, со истовремено формирање на гел во калапот. По разлевањето калапот се остава 15 минути на собна температура, а потоа се става 30 минути во сушара на 50 °C.

## 2) Обработка на примероците урина пред нивно аплицирање на гелот

Примероците урина пред апликација ги обработувавме така што најпрво ги центрифугиравме 5 минути на 3000 вртежи во минута. Потоа ја одредувавме концентрацијата на протеините и доколку беше поголема од 500 mg/L уринарните примероци ги разредувавме со пуфер со pH 8,8. Потоа додававме раствор на SDS (натриум додецил сулфат), по што следи 3 минутно варење на уринарните примероци во текот на кое варење дополнително се збогатуваат уринарните протеини со негативен полнеж, сврзувајќи SDS пропорционално со големината на молекулот. На крај ги аплициравме примероците (15 µl) на гелот.

Потребни раствори:

1. Раствор на SDS. 5 g SDS се раствораат во 5 ml гел пуфер (pH 8,8) и се дополнува до 50 ml со дестилирана вода;
2. Пуфер за разредување на урина. Се раствораат 5,45 g Tris (0,45 mmol/L), 2,78 g Acidum borici (0,45 mmol/L) и 0,37 g EDTA (1 mmol/L) во 1000 ml дестилирана вода. pH на пуферот се дотерува. Се чува на +4°C.

## 3) Одвивање на електрофорезата

SDS - полиакриламид електрофорезата се одвива во 0,375 mol/L Tris-глицин пуфер, pH 8,3, на 600 V (max), 50 mA, 30 W, 5 °C во тек на 120-180 минути на LKB Multiphor II System.

Потребни раствори:

1. Пуфер за електрофореза

Се раствораат 30,28 g Tris, 144,0 g Glycine, 10,0 g SDS и 10 mg NaN<sub>3</sub> во дестилирана вода, се дотерува pH до 8,3 со концентрирана оцетна киселина и се дополнува до 1000 ml со дестилирана вода. Од овој основен раствор се прави разреден пуфер со кој се полнат кадите за електрофореза (1+9).

**4) Фиксација на гелот, негово боење со бојата Coomassie Blue R 250, обезбојување на гелот и преведување во траен транспарентен препарат**

По завршување на електрофорезата, гелот го потопувавме во средство за фиксација (20%  $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ), потоа го боевме со претходно подготвениот раствор на бојата Coomassie Blue R-250. По боењето гелот го обезбојувавме, по што гелот го стававме помеѓу две целофански фолии и го сушевме под вакуум 30 минути на температура од  $50^\circ\text{C}$ . На крајот добивавме траен транспарентен препарат кој може да се дензитометрира.

Потребни раствори:

1. Раствор за фиксација (20%  $\text{CCl}_3\text{COOH}$ );
2. Раствор за боење (се раствораат 0,5 g боја Coomassie Blue R-250 во 250 ml 90% метанол. Се меша на магнетна мешалка 30 минути, а потоа се филтрира). Пред употреба бојата се меша во однос 1:1 со 20%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ;
3. Раствор за обезбојување (се мешаат еднакви волумени (1:1) на 70% метанол и 20%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ).

**5) Идентификација на сепарираниите протеински фракции врз основа на аплицираните стандарди**

Идентификација на сепарираниите протеински фракции ја правевме врз основа на стандарди со точно позната молекуларна маса кои ги аплициравме на гелот паралелно со испитуваните уринарни примероци. За идентификација на сепарираниите фракции користевме комерцијални стандарди - (LMW - low molecular weight и HMW - high molecular weight, Calibration kit for native electrophoresis, GE Healthcare UK and Pharmacia USA). Молекуларната маса на раздвоените протеински фракции ја одредувавме со екстраполација од стандардна крива подготвена од стандардите со точно позната молекуларна маса врз основа на нивната релативна миграциона дистанца ( $R_f$  вредности).

## 4.5 Статистичка анализа

Статистичката анализа на податоците е направена со помош на статистичкиот пакет SPSS 22 и R како и Excel компјутерска програма. Резултатите се прикажани графички и табеларно. Направени се основни декриптивни статистички анализи за прикажување на распределбите на податоците. За сите параметри тестирано е дали податоците подлежат на нормална (Гаусова) распределба користејќи Kolmogorov-Smirnov тест. Бидејќи за сите податоци е добиено дека не подлежат на нормална распределба, во понатамошните анализи се користени непараметарски методи.

За определување на еднаквост на распределбите на вредностите на параметрите користен е тестот на Kruskal-Wallis (еднонасочна ANOVA), додека за определување на корелациите меѓу рангираните вредности на податоците методот на Spearman. Во сите анализи, сметаме дека резултатите се статистички значајни ако  $p$ -вредностите се помали од 0.05.

За определување на дискриминаторската способност на нефринот и подокаликсинот користена е бинарна логистичка регресија во која независната променлива е групата на испитаници (со нефропатија/преклампсија и контролните групи). ROC кривите како влез ги користат веројатностите за припадност на група, добиени од логистичката регресија.

## 5. РЕЗУЛТАТИ

### 5.1. Резултати кај групата испитаници со шеќерна болест тип 2

#### 5.1.1 Клинички карактеристики на испитаниците

Сите испитаници со шеќерна болест тип 2 (n=90) ги поделивме во три подгрупи во зависност од вредноста на микроалбумин/креатинин односот и тоа на:

- нормоалбуминурични испитаници - М/К однос  $< 30$  mg/g (n=56),
- микроалбуминурични испитаници - М/К однос  $30 - 300$  mg/g (n=25) и
- макроалбуминурични испитаници - М/К однос  $> 300$  mg/g (n=9).

Оваа поделба е во согласност со водичите на КДИГО (KDIGO - **Kidney Disease: Improving Global Outcomes-guidelines** од 2012 година [69].

Направивме и уште една поделба на испитаниците со шеќерна болест тип 2 на две подгрупи, во зависност од тоа дали имаат или не дијагностицирана дијабетска нефропатија и тоа на:

- испитаници со шеќерна болест тип 2 со дијагностицирана дијабетска нефропатија (n=30) и
- испитаници со шеќерна болест тип 2 без дијагностицирана дијабетска нефропатија (n=60).

Здравите лица служеа како контролна група.

Клиничките карактеристики на испитаниците по групи се дадени во **Табела 2 и 3**. Со помош на Kruskal-Wallis (еднонасочна АНОВА) тест направивме споредба на клиничките параметри помеѓу подгрупите испитаници.



**Табела 2.** Клинички карактеристики на подгрупите испитаници со шеќерна болест тип 2 поделени според М/К однос и здравите испитаници

	Испитаници со макро албуминурија	Испитаници со микро албуминурија	Испитаници со нормо албуминурија	Здрави испитаници	p value
Пол мажи/жени %	67/33	48/52	35/65	33/67	/
Возраст (години)	59.1±10.6	57.2±8.2	57.4±6.9	47.8±9.3	0.005
Траење на болест (години)	13±6.7	8.5±6.5	4.8±4.2	/	<10 <sup>-3</sup>
БМИ (kg/m <sup>2</sup> )	29.5±5.6	28.8±3.6	28.7±4.0	25.6±3.8	<10 <sup>-3</sup>
Глукоза во серум (mmol/L)	9.9±3.9	8.1±2.9	6.8±2.4	4.2±1.1	<10 <sup>-3</sup>
М/К однос (mg/g)	437.8±170.8	89.6±57.9	12.1±6.9	15.1±15.4	<10 <sup>-3</sup>
НbA1c (%)	7.9±0.9	7.4±1.6	6.9±1.1	4.7±0.4	0.025
Вкупен холестерол (mmol/L)	5.5±1.5	5.1±2.1	4.1±1.1	3.5±1.2	0.001
Триглицериди (mmol/L)	2.2±1.2	2.5±1.3	1.9±1.4	1.2±0.6	<10 <sup>-3</sup>
ХДЛ (mmol/L)	1.6±0.5	1.3±0.4	1.2±0.4	1.2±0.4	0.289
ЛДЛ (mmol/L)	2.9±1.4	2.4±1.2	1.9±0.8	1.8±0.9	0.026
Вкупни протеини (g/L)	72.1±8.1	64.1±11.4	62.4±10.5	73.7±5.8	<10 <sup>-3</sup>
Албумин во серум (g/L)	39±4.3	36.2±9.2	37.5±6.5	46.4±2.9	<10 <sup>-3</sup>
Уреа во серум (mmol/L)	7.9±2.1	8.4±5.4	6.7±1.9	4.3±1.1	<10 <sup>-3</sup>
Креатинин во серум (μmol/L)	109.5±7.5	81.5±15.1	75.9±13	75.1±14.6	<10 <sup>-3</sup>
eGFR (ml min <sup>-1</sup> 1.73 m <sup>-2</sup> )	48.2±12.5	65±19.6	67.5±12.5	91.3±5.9	<10 <sup>-3</sup>
Нефрин во урина (ng/ml)	1086.5±550	983.3±1182.5	444.6±237.6	160.5±58	<10 <sup>-3</sup>
Подокаликсин во урина (ng/ml)	67.5±17.5	58.8±26.2	51.1±54.4	27.1±12.9	<10 <sup>-3</sup>

Резултатите се прикажани како mean ± SD за континуираните варијабли, а во % за категоријските варијабли. БМИ - индекс на телесна маса, НbA1c - glycated haemoglobin - гликозилиран хемоглобин, ХДЛ - липопротеини со висока густина, ЛДЛ - липопротеини со ниска густина, eGFR - (estimated Glomerular Filtration Rate) - предвидена гломеруларна филтрациска стапка.

Од **Табела 2** може да си види дека во однос на параметрите: возраст, траење на болеста, БМИ, глукоза, М/К однос, НbA1c, вкупен холестерол, триацилглицероли, ЛДЛ, вкупни протеини, албумин, уреа, креатинин, eGFR, нефрин и подокаликсин постои статистички значајна разлика помеѓу сите испитувани подгрупи ( $p < 10^{-3}$ ). Единствено во однос на параметарот ХДЛ не постои статистички значајна разлика ( $p = 0.289$ ) помеѓу подгрупите испитаници.

**Табела 3.** Клинички карактеристики на групите испитаници со и без дијагностицирана дијабетска нефропатија и здравите испитаници

	Испитаници без дијагностицирана дијабетска нефропатија	Испитаници со дијагностицирана дијабетска нефропатија	Здрави испитаници	p value
Пол мажи/жени %	35/65	56/44	33/67	/
Возраст (години)	57.9±6.7	55.8±10.1	47.8±9.3	<10 <sup>-3</sup>
Траење на болест (години)	4.9±4.5	10.7±6.9	/	<10 <sup>-3</sup>
БМИ (kg/m <sup>2</sup> )	28.7±4.1	28.8±4.2	25.6±3.8	0.002
Глукоза во серум (mmol/L)	6.8±2.3	9.3±3.6	4.2±1.1	<10 <sup>-3</sup>
М/К однос (mg/g)	16.9±18.9	209.5±206.1	15.1±15.4	<10 <sup>-3</sup>
НбА1с (%)	6.9±1.1	7.7±1.6	4.7±0.5	0.020
Вкупен холестерол (mmol/L)	3.9±1.2	5.4±2.1	3.5±1.2	<10 <sup>-3</sup>
Триглицериди (mmol/L)	1.8±1.1	2.5±1.8	1.2±0.6	<10 <sup>-3</sup>
ХДЛ (mmol/L)	1.2±0.4	1.4±0.5	1.2±0.4	0.496
ЛДЛ (mmol/L)	1.9±0.8	2.6±1.3	1.8±0.9	0.004
Вкупни протеини серум (g/L)	61.3±10.8	69.5±9.9	73.7±5.8	<10 <sup>-3</sup>
Албумин во серум (g/L)	36.6±6.3	38.3±9.3	46.4±2.8	<10 <sup>-3</sup>
Уреа во серум (mmol/L)	6.7±2.1	8.3±5.3	4.3±1.1	<10 <sup>-3</sup>
Креатинин во серум (μmol/L)	74.9±12.1	94.1±18.1	75.1±14.6	<10 <sup>-3</sup>
eGFR (ml min <sup>-1</sup> 1.73 m <sup>-2</sup> )	67.1±12.5	61.1±21.8	91.3±5.9	<10 <sup>-3</sup>
Нефрин во урина (ng/ml)	418.7±233.1	1043.3±889.5	160.5±58	<10 <sup>-3</sup>
Подокаликсин во урина (ng/ml)	45.6±21.2	70.6±75.1	27.1±12.9	<10 <sup>-3</sup>

Резултатите се прикажани како mean ± SD за континуираните варијабли, а во % за категориските варијабли. БМИ - индекс на телесна маса, НбА1с - glycated haemoglobin - гликозилиран хемоглобин, ХДЛ - липопотеини со висока густина, ЛДЛ - липопотеини со ниска густина, eGFR - (estimated Glomerular Filtration Rate) - предвидена гломеруларна филтрациска стапка.

Од **Табела 3** може да се утврди дека во однос на параметрите: возраст, траење на болеста, БМИ, глукоза, М/К однос, НбА1с, вкупен холестерол, триацилглицероли, ЛДЛ, вкупни протеини, албумин, уреа, креатинин, eGFR, нефрин и подокаликсин постои статистички значајна разлика помеѓу сите испитувани подгрупи ( $p < 10^{-3}$ ). Единствено во однос на параметарот ХДЛ не постои статистички значајна разлика ( $p = 0.496$ ) помеѓу подгрупите испитаници.

**5.1.2 Концентрација на нефрин и подокаликсин во урина кај сите испитаници со шеќерна болест тип 2 и здравите испитаници**

Направивме споредба на измерените вредности за уринарен нефрин односно подокаликсин помеѓу сите испитаници со шеќерна болест тип 2 (макро-, микро-, нормаљабуминурични испитаници, испитаници со и без дијагностицирана нефропатија) и здравите испитаници со помош на Kruskal-Walis тест. (Табела 4 и График 3 за нефрин, Табела 5 и График 4 за подокаликсин).

Табела 4. Концентрација на уринарен нефрин кај сите испитаници со шеќерна болест тип 2 и здравите испитаници

Нефрин	n	$\bar{x}$	SD	Min.	Max.	Median	Percentile			P value
							25	50	75	
Испитаници со шеќерна болест тип 2	90	604	596	121	3795	450	305	450	669	<10 <sup>-3</sup>
Здрави испитаници	30	160	58	94	315	136	110	136	189	

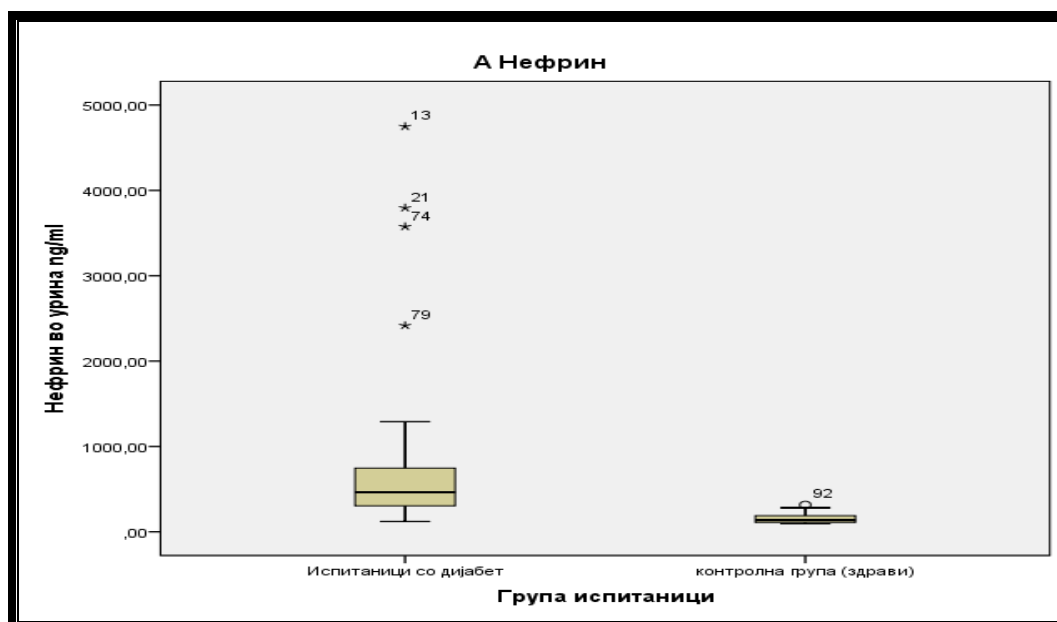
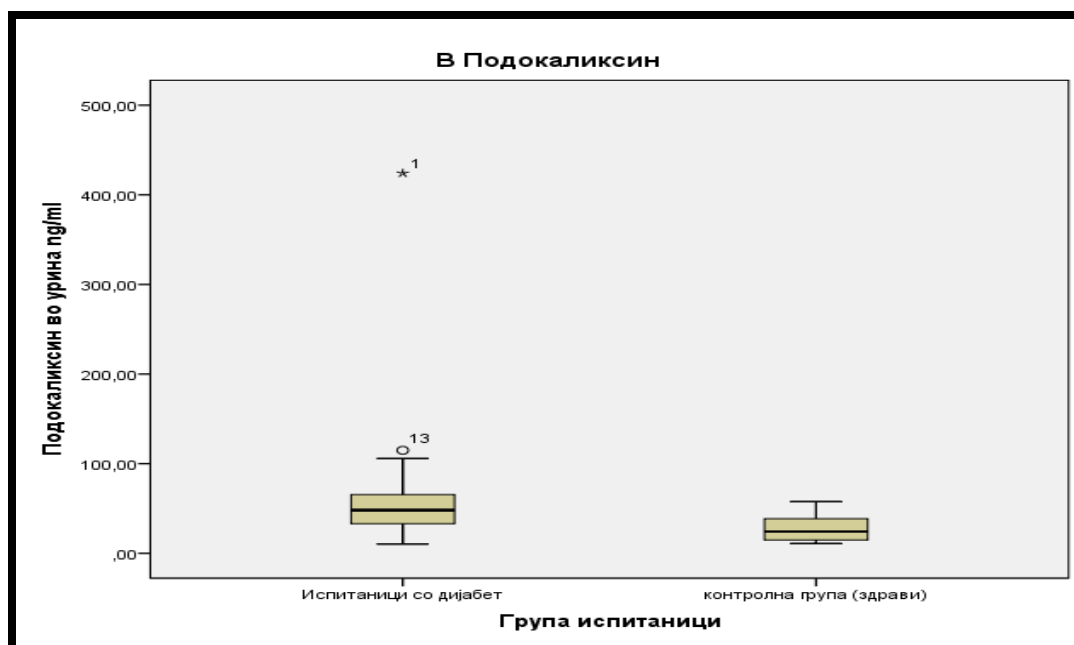


График 3. Концентрација на уринарен нефрин кај сите испитаници со шеќерна болест тип 2 и здравите испитаници

Од табела 4 и график 3 и се гледа дека концентрацијата на нефринот во урина е статистички значајно повисока кај сите испитаници со шеќерна болест тип 2 во споредба со контролната група ( $p < 0.001$ ).

**Табела 5.** Концентрација на уринарен подокаликсин кај сите испитаници со шеќерна болест тип 2 и здравите испитаници

Подокаликсин	n	$\bar{x}$	SD	Min.	Max.	Median	Percentile			P value
							25	50	75	
Испитаници со шеќерна болест тип 2	90	53	46	10	424	48	33	48	61	$<10^{-3}$
Здрави испитаници	30	27	13	11	58	24	<u>15</u>	<u>24</u>	<u>38</u>	



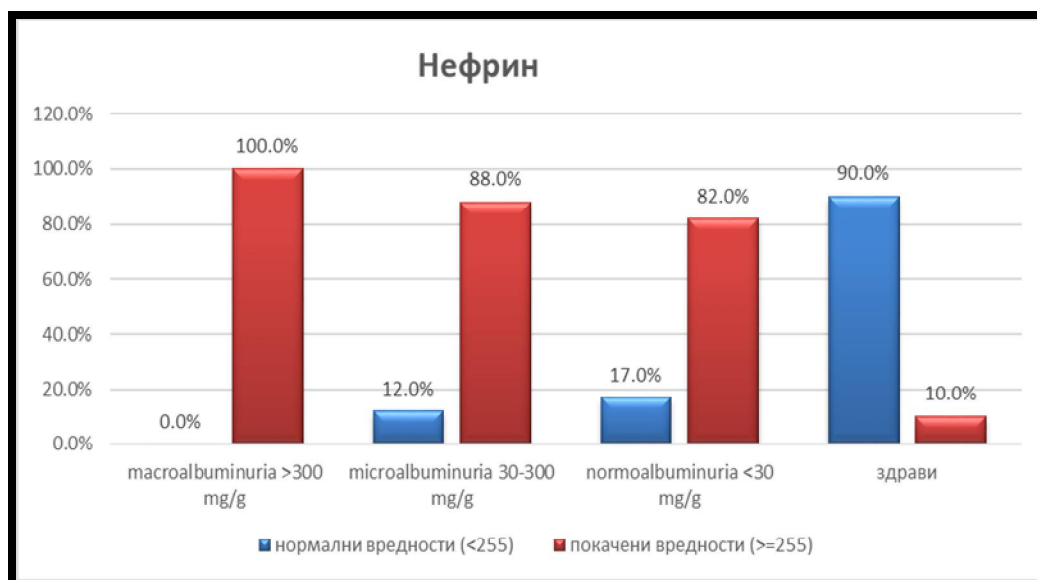
**График 4.** Концентрација на уринарен подокаликсин кај сите испитаници со шеќерна болест тип 2 и здравите испитаници

Од табела 5 и график 4 се гледа дека концентрацијата на подокаликсинот во урина е статистички значајно повисока кај сите испитаници со шеќерна болест тип 2 во споредба со контролната група ( $p < 0.001$ ).

### 5.1.3 Референтни вредности за нефрин и подокаликсин во урина и определување на процент на испитаници со покачени вредности за уринарен нефрин и подокаликсин во подгрупите испитаници поделени според М/К однос

Референтните вредности на нефринот ги определивме користејќи ги распределбите на честотите на овој параметар во урината кај здравите лица. Со оглед на несиметричната распределба (искривеност на десно) на вредностите на нефрин во урина кај здравите испитаници, за референтни вредности ги земавме оние кои се на растојание поголемо од 1.5 интерквартален ранг (IQR) од медијаната, според формулата: 50 перцентил + (75 перцентил - 25 перцентил  $\times$  1.5), (Табела 4). За **нефрин** во урина тоа се **вредности помали од  $136+119=255$  ng/ml ( $< 255$  ng/ml)**. Оттука, за покачени (патолошки) вредности за нефрин во урина ги сметаме оние кои се  **$> 255$  ng/ml**.

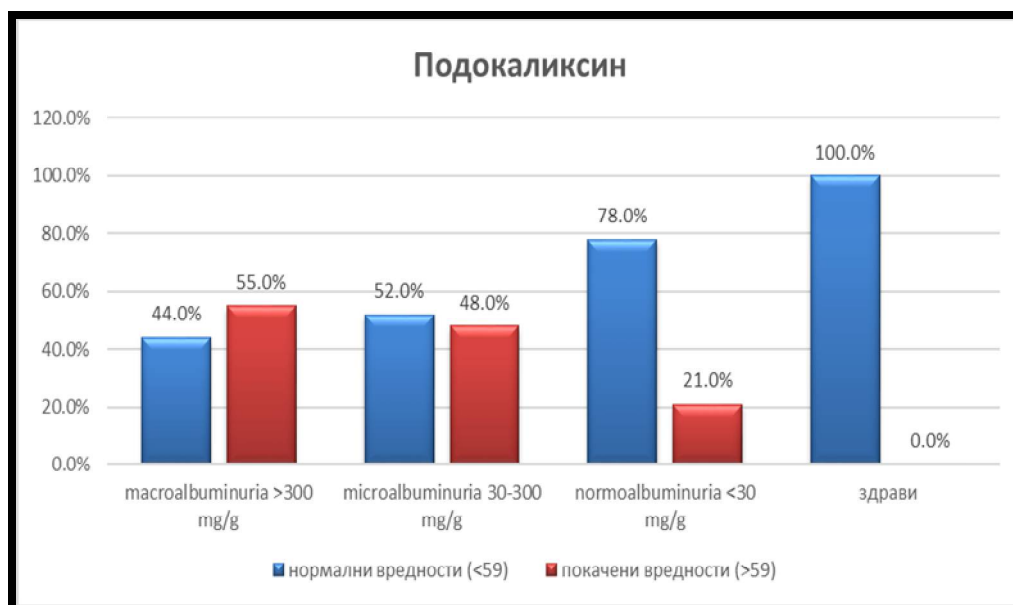
Го одредивме процентот на испитаници по подгрупи со покачен нефрин во урина ( **$> 255$  ng/ml**) и забележавме дека тој е висок кај подгрупите со макроалбуминурија (100%) и микроалбуминурија (88%), но дека е значајно висок и кај подгрупата испитаници со нормоалбуминурија, односно 82% од нормоалбуминуричните испитаници имаат покачени вредности за нефрин во урина. Само кај 10% од здравите испитаници беше покачен нефринот во урината. Резултатите се прикажани на **График 5**.



*График 5. Процентуална застапеност на испитаници со покачен нефрин во урина по подгрупи*

Референтните вредности на подокаликсин во урина ги определивме користејќи ги распределбите на честотите на овој параметар во урината кај здравите лица. Со оглед на несиметричната распределба (искривеност на десно) на вредностите за подокаликсин во урина кај здравите испитаници, за референтни вредности ги земавме оние кои се на растојание поголемо од 1.5 интерквартален ранг (IQR) од медијаната, според формулата 50 перцентил + (75 перцентил-25 перцентил x 1.5), (Табела 5). **За подокаликсинот тоа се вредности помали од  $24+35=59$  ng/ml, (<59ng/ml). Оттука, за покачени (патолошки) вредности на подокаликсин во урина ги сметаме оние кои се поголеми од 59 ng/ml.**

Го одредивме процентот на испитаници со покачени вредности за подокаликсин (> 59 ng/ml) во урина по подгрупи и забележавме дека изнесува 55% кај макроалбуминуричните испитаници, 48% кај микроалбуминуричните испитаници и 21% кај нормоалбуминуричните испитаници. Ниту еден испитаник од контролната група немаше покачени вредности за уринарен подокаликсин со што процентот од нормоалбуминуричните испитаници кои имаат покачен подокаликсин во урина е сепак значаен (21%). Резултатите се прикажани на **График 6.**



*График 6. Процентуална застапеност на испитаници со покачен подокаликсин во урина по подгрупи*

#### 5.1.4 Концентрација на уринарен нефрин и подокаликсин кај подгрупите испитаници поделени според М/К однос

Со помош на Kruskal-Wallis test направивме споредба на вредностите за уринарен нефрин односно подокаликсин во урината помеѓу подгрупите испитаници поделени според М/К односот и здравите испитаници. Резултатите покажуваат дека нивото на уринарен нефрин односно подокаликсин е статистички значајно повисоко кај сите три подгрупи испитаници со шеќерна болест тип 2 во споредба со контролната група ( $p < 0.05$ ). Резултатите се прикажани на **График 7** - нефрин и **График 8** - подокаликсин.

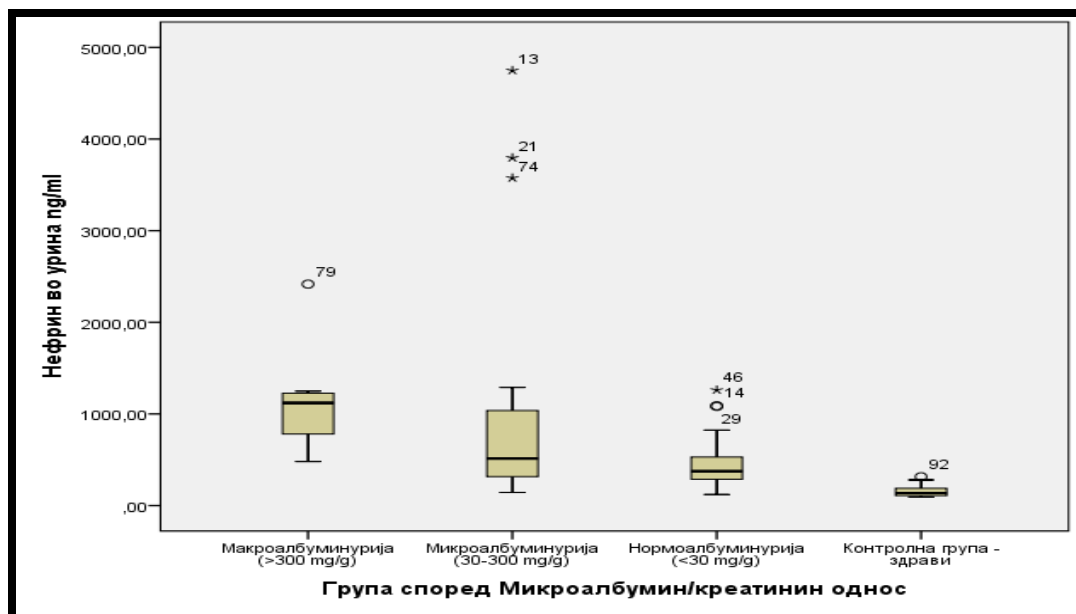


График 7. Концентрација на уринарен нефрин кај подгрупите испитаници поделени според М/К однос и здравите испитаници

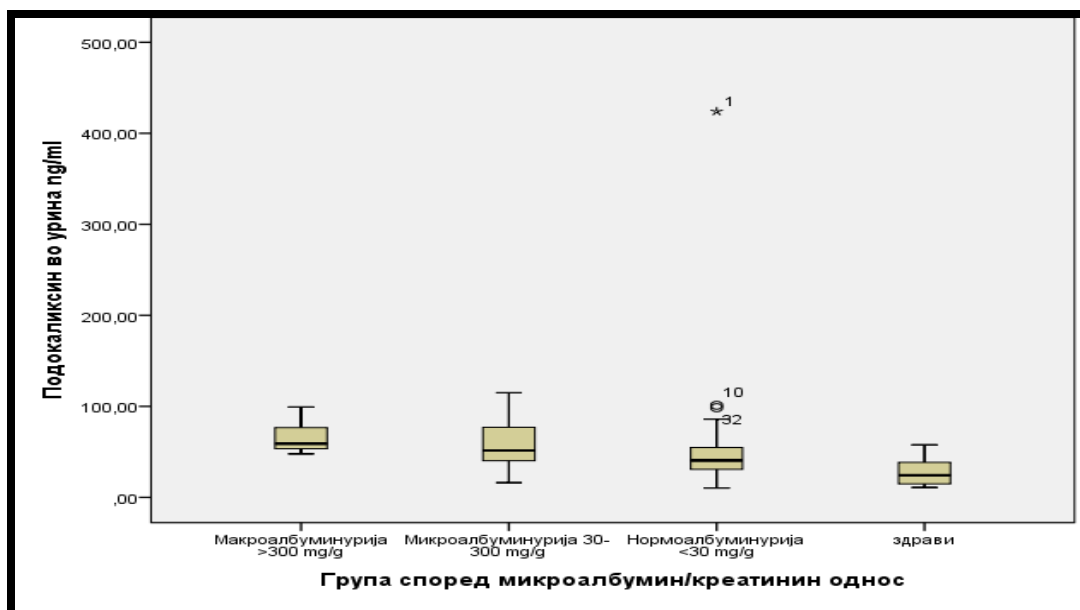
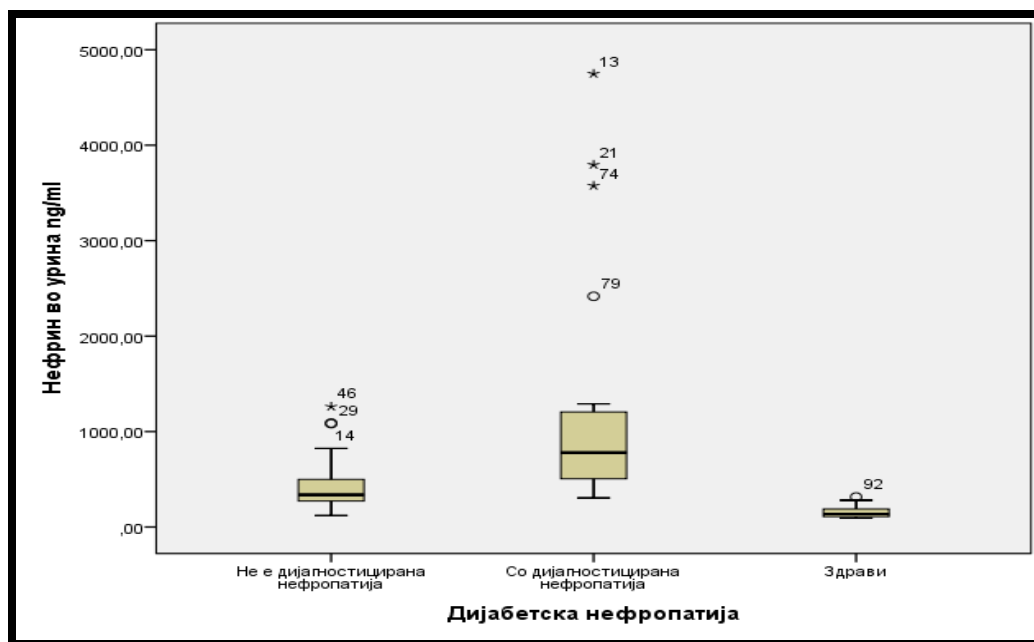


График 8. Концентрација на уринарен подокалксин кај подгрупите испитаници поделени според М/К однос и здравите испитаници

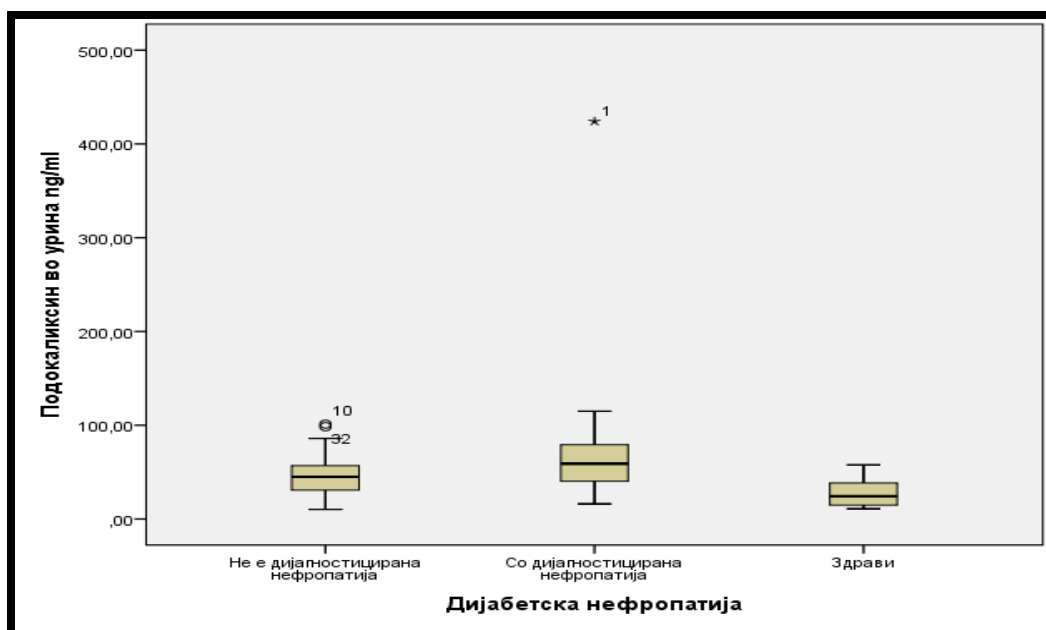


**5.1.5 Концентрација на уринарниот нефрин и подокаликсин кај подгрупите испитаници со и без дијагностицирана нефропатија**

Со помош на Kruskal-Wallis test направивме споредба на концентрацијата на нефрин односно подокаликсин во урина помеѓу подгрупите испитаници со дијагностицирана нефропатија, без дијагностицирана нефропатија и здравите испитаници. Нивото на уринарен нефрин и подокаликсин е статистички значајно повисоко кај двете подгрупи испитаници со шеќерна болест тип 2 во споредба со контролната група ( $p < 0.05$ ). Резултатите се прикажани на **График 9** - нефрин и **График 10** - подокаликсин.



*График 9. Концентрација на уринарен нефрин кај подгрупите испитаници со и без дијагностицирана нефропатија и здравите испитаници*

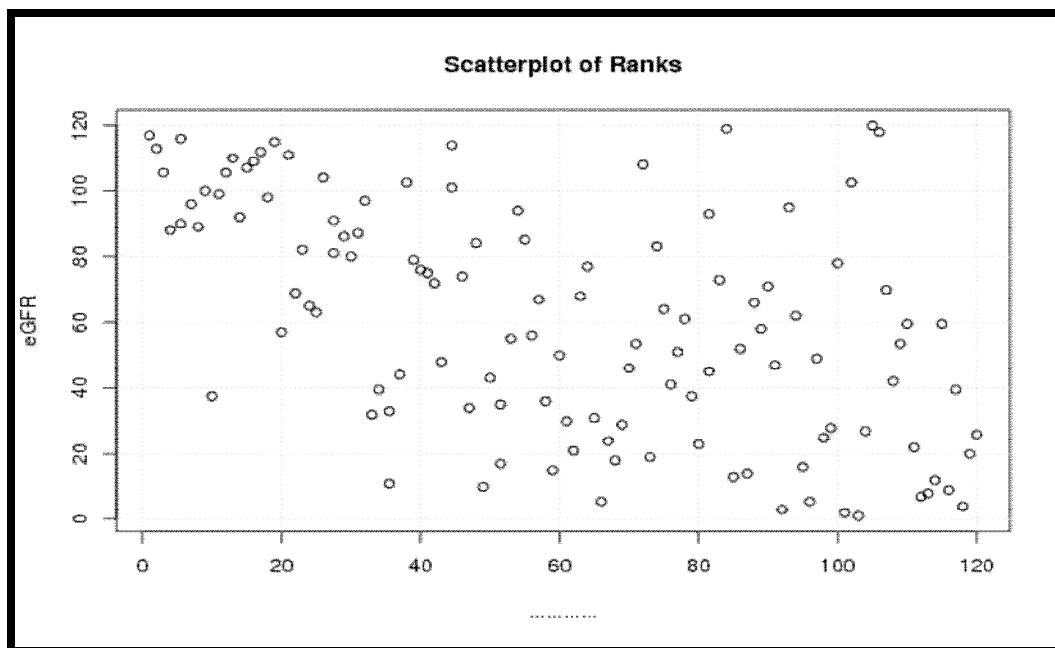


*График 10. Концентрација на уринарен подокаликсин кај подгрупите испитаници со и без дијагностицирана нефропатија и здравите испитаници*

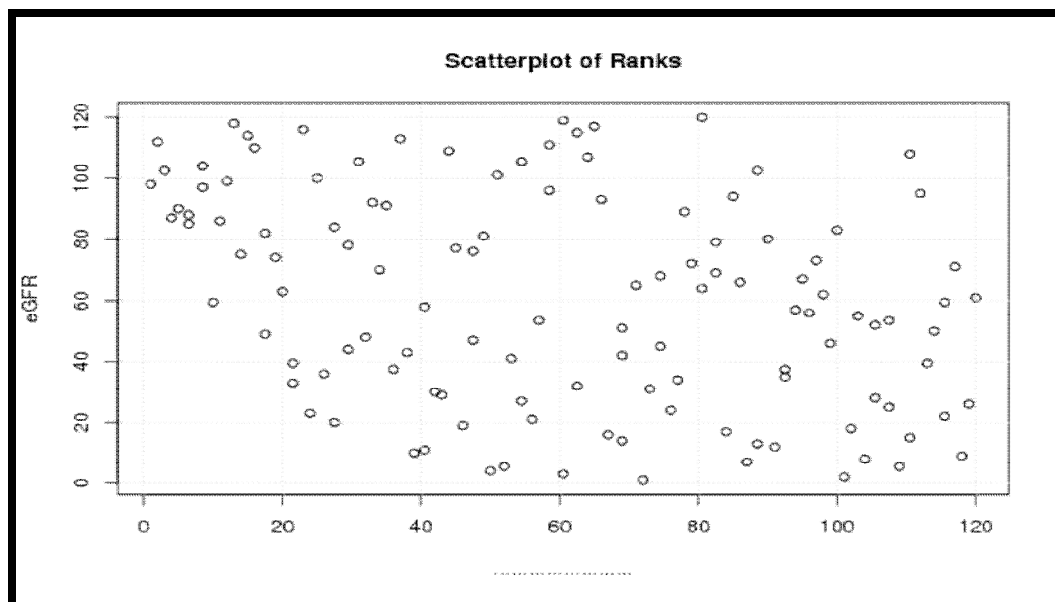
### 5.1.6 Корелација помеѓу концентрацијата на уринарен нефрин односно подокаликсин и стапката на гломеруларна филтрација

Определена е непараметарска Spearman корелација помеѓу концентрацијата на уринарниот нефрин односно подокаликсин во урина и стапката на гломеруларна филтрација кај сите испитаници со шеќерна болест тип 2 и здравите испитаници. На **График 11** се прикажани ранковите за нефрин а на **График 12** за подокаликсин.

Корелацијата е негативна и статистички значајна со ниво на значајност  $p < 10^{-3}$  (Spearman  $r = -0.541$  so 118 s.s.) за нефрин. За подокаликсин исто така е негативна и статистички значајна со ниво на значајност  $p < 10^{-3}$  (Spearman  $r = -0.356$  so 118 s.s.).



*График 11. Корелација помеѓу концентрацијата на уринарен нефрин и стапката на гломеруларна филтрација ( $r=-0.54$ ,  $p<10^{-3}$ )*



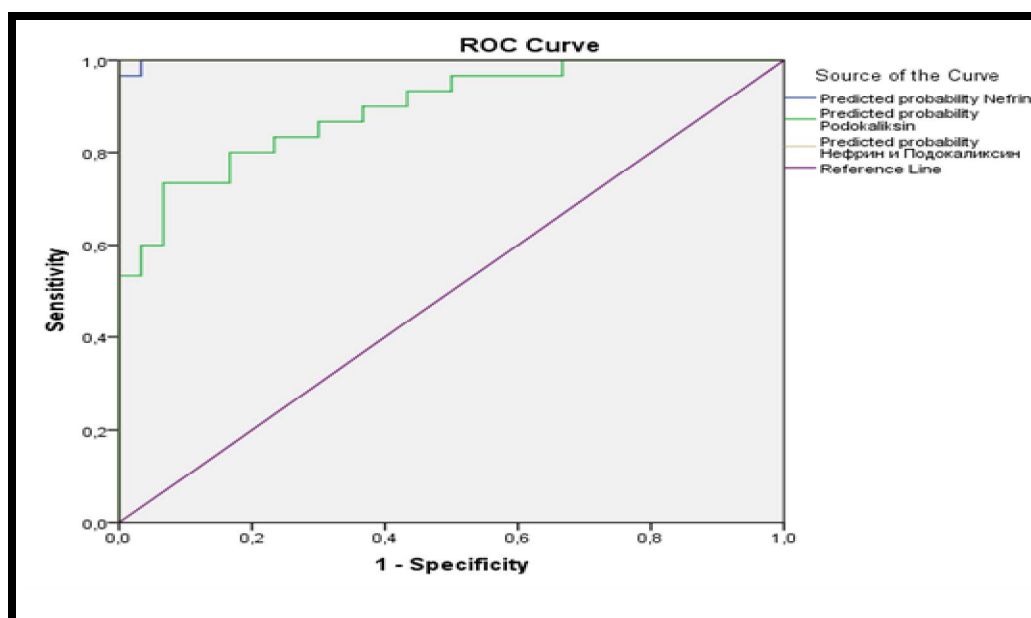
*График 12. Корелација помеѓу концентрацијата на уринарен подокаликсин и стапката на гломеруларна филтрација ( $r=-0.356$ ,  $p<10^{-3}$ )*

### 5.1.7 Непараметриска ROC анализа на уринарен нефрин и подокаликсин кај испитаници со дијабетска нефропатија

За да се определи дискриминаторската моќ на нефринот и подокаликсинот кај испитаниците со дијабетска нефропатија користени се ROC криви, каде што како влез се земени веројатностите за припадност од бинарна логистичка регресија за групата на испитаници со шеќерна болест тип 2 со дијагностицирана нефропатија и контролната група. Направена е бинарна логистичка регресија по параметрите нефрин, подокаликсин одделно и нефрин и подокаликсин заедно. Користејќи како класификатор логистичка регресија само за нефрин како независна променлива, точноста на нефринот како класификатор е 96%.

Со користење само на подокаликсинот како независна променлива, точноста на подокаликсинот како класификатор изнесува 78%.

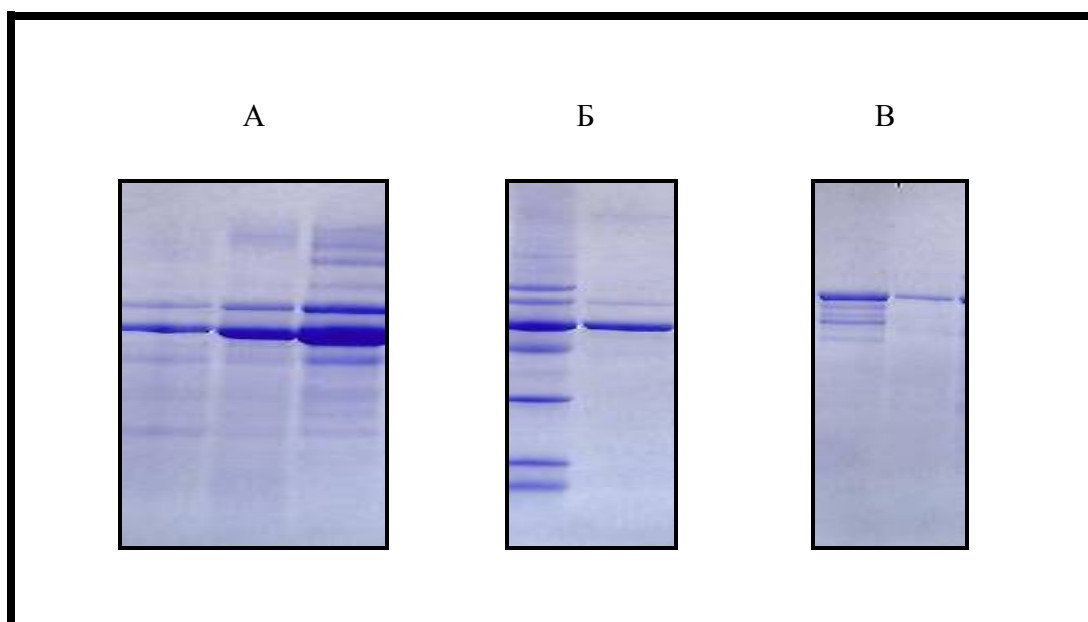
Со користење на нефринот и подокаликсинот заедно како независни променливи, точноста на нефринот и подокаликсинот како класификатори во дискриминирање на здравите испитаници од оние со дијабетска нефропатија е 100%.



**График 13.** ROC криви за тестирање на дијагностичка ефикасност (специфичност и сензитивност) на уринарен нефрин и подокаликсин кај испитаници со дијабетска нефропатија

### 5.1.8 Резултати од сепарација на уринарните протеини со градиентна SDS-PAG електрофореза

Направивме електрофоретска сепарација на излачените уринарни протеини кај испитаниците со шеќерна болест тип 2 кои имаа макро- или микроалбуминурија со цел да го утврдиме типот на протеинурија, а со тоа и степенот на бубрежно оштетување. Електрофорезата се направи кај вкупно 34 испитаници со шеќерна болест тип 2 од кои, девет испитаници беа со макроалбуминурија додека 25 беа со микроалбуминурија. Добиените елфорограми се евалуираа визуелно. На **Слика 11** се прикажани елфорограми од испитаниците со различни типови протеинурија.



*Слика 11. Елфорограми кај испитаниците: А - мешана протеинурија, Б - лево стандард, десно гломеруларна протеинурија, В - лево тубуларна протеинурија, десно нормален наод*

Го одредивме процентот на испитаници по тип на протеинурија во подгрупите испитаници со макроалбуминурија и микроалбуминурија и со шеќерна болест тип 2. Резултатите се прикажани на **График 14** и **15**.



*График 14. Процент на застапеност на типови протеинурија кај макроалбуминурични испитаници со шеќерна болест тип 2*



*График 15. Процент на застапеност на типови протеинурија кај микроалбуминурични испитаници со шеќерна болест тип 2*

Од графиконите се гледа дека кај 22% од испитаниците со макроалбуминурија се присутни само гломеруларни протеини, кај 56% се присутни само тубуларни протеини а кај 22% има мешан тип на протеинурија. Кај испитаниците со шеќерна болест тип 2 и со

микроалбуминурија 52% имаат гломеруларен тип протеинурија, а 8% тубуларен тип протеинурија. Кај 40% од микроалбуминуричните испитаници нема протеински фракции односно е присутна само албуминска фракција што претставува нормален наод при електрофореза на уринарни протеини. Најчест тип на протеинурија кај испитаниците со макроалбуминурија е тубуларната, додека кај испитаниците со микроалбуминурија е гломеруларната протеинурија.

## 5.2 Резултати кај групата испитаници со хронична хипертензија

### 5.2.1 Клинички карактеристики на испитаниците

Сите испитаници со хронична хипертензија ги поделивме во три подгрупи во зависност од вредноста на микроалбумин/креатинин односот и тоа на: нормоалбуминурични -  $M/KI < 30 \text{ mg/g}$  ( $n=60$ ), микроалбуминурични -  $M/KI 30 - 300 \text{ mg/g}$  ( $n=20$ ) и макроалбуминурични -  $M/KI > 300 \text{ mg/g}$  ( $n=4$ ) испитаници.

Направивме уште една поделба на испитаниците со хронична хипертензија според тоа дали имаат или не дијагностицирана хипертензивна нефропатија, и тоа на две подгрупи: испитаници со хронична хипертензија со дијагностицирана хипертензивна нефропатија ( $n=24$ ) и испитаници со хронична хипертензија без дијагностицирана хипертензивна нефропатија ( $n=60$ ).

Здравите лица служеа како контролна група.

Со помош на Kruskal-Wallis (еднонасочна АНОВА) тест направивме споредба на клиничките параметри помеѓу подгрупите испитаници. Клиничките карактеристики на испитаниците по подгрупи се дадени во **Табела 6 и 7**.

**Табела 6.** Клинички карактеристики на подгрупите испитаници со хронична хипертензија поделени според М/К однос и здравите испитаници

	Испитаници со макро албуминурија	Испитаници со микро албуминурија	Испитаници со нормо албуминурија	Здрави испитаници	p value
Пол мажи/жени %	20/80	45/55	40/60	33/67	<10 <sup>-3</sup>
Возраст (години)	66±7.8	54.6±9.7	57.7±9.1	47.8±9.3	<10 <sup>-3</sup>
Траење на болест (години)	7.5±2.9	6.3±6.7	5.3±4.5	/	<10 <sup>-3</sup>
БМИ (kg/m <sup>2</sup> )	31.5±4.8	28.6±4.1	29.1±4.0	25.7±3.8	0.001
Глукоза во серум (mmol/L)	5.7±1.1	6.9±3.0	6.2±2.3	4.2±1.0	<10 <sup>-3</sup>
М/К однос (mg/g)	620.4±148.8	99.9±66.6	13.1±7.5	15.1±15.4	<10 <sup>-3</sup>
СКП mm/Hg	155±11.2	150.2±15.4	147.1±13.1	120.3±4.5	<10 <sup>-3</sup>
ДКП mm/Hg	92.5±4.3	94±16.1	91.9±8.1	78.8±4.6	<10 <sup>-3</sup>
Вкупен холестерол (mmol/L)	6.2±1.5	4.7±1.0	4.3±1.2	3.5±1.2	<10 <sup>-3</sup>
Триглицериди (mmol/L)	2.9±2.1	2.7±1.5	1.7±1.3	1.2±0.6	<10 <sup>-3</sup>
ХДЛ (mmol/L)	1.3±0.4	1.2±0.3	1.2±0.4	1.2±0.4	0.923
ЛДЛ (mmol/L)	3.5±0.7	2.3±0.9	2.3±0.9	1.8±0.9	0.004
Вкупни протеини серум (g/L)	68±8.5	68.8±6.9	64.8±11.1	73.7±5.8	0.001
Албумин во серум (g/L)	38.2±2.6	40.5±4.6	38.9±6.6	46.4±2.8	<10 <sup>-3</sup>
Уреа во серум (mmol/L)	10.4±4.8	7.5±3.3	7.0±2.2	4.3±1.1	<10 <sup>-3</sup>
Креатинин во серум (μmol/L)	163.9±81.5	111.4±93.8	83.1±27.4	75.1±14.58	0.162
eGFR (ml min <sup>-1</sup> 1.73 m <sup>-2</sup> )	37.7±21.2	61.4±30.2	64.6±178.	91.3±5.9	<10 <sup>-3</sup>
Нефрин во урина (ng/ml)	1600,6±1253.8	706.3±950.2	647.4±869.4	160.5±58.0	<10 <sup>-3</sup>
Подокаликсин во урина (ng/ml)	82.6±45.7	72.1±79.5	60.1±64.1	27.1±12.8	<10 <sup>-3</sup>

Резултатите се прикажани како mean ± SD за континуираните варијабли, а во % за категориските варијабли. БМИ - индекс на телесна маса, СКП - систолен крвен притисок, ДКП - дијастолен крвен притисок, ХДЛ - липопротеини со висока густина, ЛДЛ - липопротеини со ниска густина, eGFR - (estimated Glomerular Filtration Rate) - предвидена гломеруларна филтрациска стапка.

Од **Табела 6** може да си види дека во однос на параметрите: возраст, траење на болеста, БМИ, глукоза, М/К однос, СКП, ДКП, вкупен холестерол, триацилглицероли, ЛДЛ, вкупни протеини, албумин, уреа, eGFR, нефрин и подокаликсин постои статистички значајна разлика помеѓу сите испитувани подгрупи ( $p < 10^{-3}$ ). Во однос на параметарите ХДЛ и креатинин не постои статистички значајна разлика помеѓу подгрупите испитаници (за ХДЛ  $p=0.923$ , за креатинин  $p=0.162$ ).



**Табела 7.** Клинички карактеристики на подгрупите испитаници со и без дијагностицирана нефропатија и здравите испитаници

	Испитаници без дијагностицирана хипертензивна нефропатија	Испитаници со дијагностицирана хипертензивна нефропатија	Здрави испитаници	p value
пол мажи/жени %	40/60	41/59	34/66	<10 <sup>-3</sup>
Возраст (години)	57.7±9.0	56.4±10.3	47.8±9.3	<10 <sup>-3</sup>
Траење на болест (години)	5.3±4.5	6.5±6.3	/	<10 <sup>-3</sup>
БМИ (kg/m <sup>2</sup> )	29.1±4.0	29.1±4.4	25.6±3.8	0.001
Глукоза во serum (mmol/L)	6.2±2.3	6.7±2.8	4.2±1.1	<10 <sup>-3</sup>
М/К однос (mg/g)	13.1±7.5	186.7±212.2	15.1±15.4	<10 <sup>-3</sup>
СКП mm/Hg	147.1±13.1	151.1±14.8	120.3±4.5	<10 <sup>-3</sup>
ДКП mm/Hg	91.9±8.1	93.7±14.7	78.8±4.6	<10 <sup>-3</sup>
Вкупен холестерол (mmol/L)	4.3±1.2	4.5±1.3	3.5±1.2	<10 <sup>-3</sup>
Триглицериди (mmol/L)	1.7±1.3	2.7±1.6	1.2±0.6	<10 <sup>-3</sup>
ХДЛ (mmol/L)	1.2±0.4	1.2±0.3	1.2±0.4	0.878
ЛДЛ (mmol/L)	2.3±0.9	2.5±0.9	1.8±0.9	0.009
Вкупни протеини serum (g/L)	64.8±11.1	68.7±7.2	73.7±5.8	<10 <sup>-3</sup>
Албумин во serum (g/L)	38.9±6.6	40.2±4.4	46.4±2.9	<10 <sup>-3</sup>
Уреа во serum (mmol/L)	7.1±2.2	8.1±3.7	4.3±1.1	<10 <sup>-3</sup>
Креатинин во serum (μmol/L)	83.1±27.4	120.1±94	75.1±14.6	0.153
eGFR (ml min <sup>-1</sup> 1.73 m <sup>-2</sup> )	64.6±17.8	57.4±30.2	91.3±5.9	<10 <sup>-3</sup>
Нефрин во урина (ng/ml)	647.5±869.5	855.4±1060.9	160.5±58.1	<10 <sup>-3</sup>
Подокаликсин во урина (ng/ml)	60.1±64.1	73.8±75.0	27.1±12.8	<10 <sup>-3</sup>

Резултатите се прикажани како mean ± SD за континуираните варијабли, а во % за категоријските варијабли. BMI - body mass index - индекс на телесна маса, СКП - систолен крвен притисок, ДКП - дијастолен крвен притисок, HDL - high density lipoproteins - липопротеини со висока густина, LDL - low density lipoproteins - липопротеини со ниска густина, eGFR - (estimated Glomerular Filtration Rate) - предвидена гломеруларна филтрациска стапка.

Од **Табела 7** може да си види дека во однос на параметрите: возраст, траење на болеста, БМИ, глукоза, М/К однос, СКП, ДКП, вкупен холестерол, триацилглицероли, ЛДЛ, вкупни протеини, албумин, уреа, eGFR, нефрин и подокаликсин постои статистички значајна разлика помеѓу сите испитувани подгрупи ( $p < 10^{-3}$ ). Во однос на параметарите ХДЛ и креатинин во serum не постои статистички значајна разлика помеѓу подгрупите испитаници (за ХДЛ  $p=0.878$ , за креатинин  $p=0.153$ ).

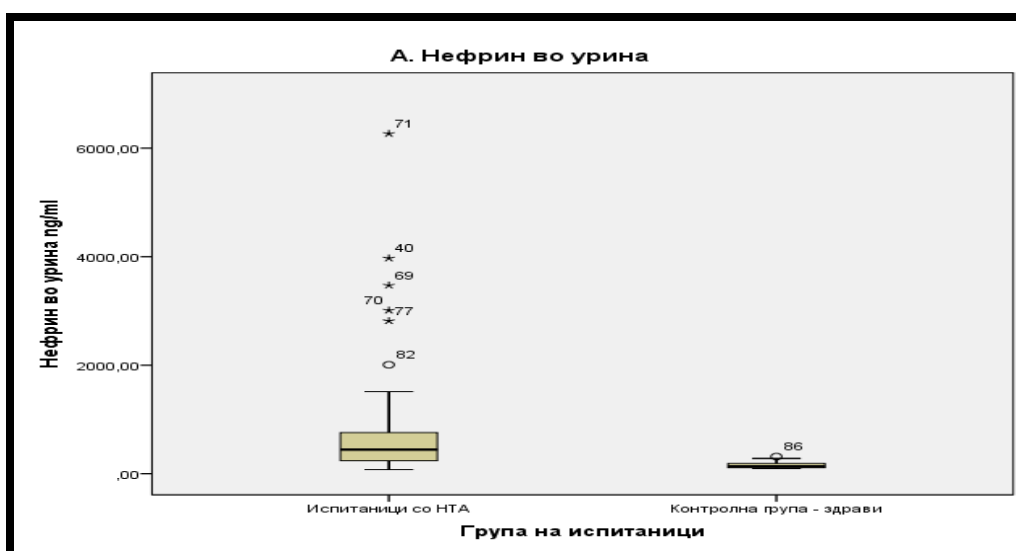
**5.2.2 Концентрација на нефрин и подокаликсин во урина кај сите испитаници со хронична хипертензија и здравите испитаници**

Направивме споредба на измерените вредности за нефрин и подокаликсин во урина помеѓу сите испитаници со хронична хипертензија и здравите испитаници со помош на Kruskal - Walis тест. (Табела 8 и График 16 за нефрин, Табела 9 и График 17 за подокаликсин).

*Табела 8. Концентрација на уринарен нефрин кај сите испитаници со хронична хипертензија и здравите испитаници*

Нефрин	n	$\bar{x}$	SD	Min.	Max.	Median	Percentile			P value
							25	50	75	
Испитаници со хронична хипертензија	84	706	938	75	6266	444	237	444	765	$<10^{-3}$
Здрави испитаници	30	160	58	94	315	136	<u>110</u>	<u>136</u>	<u>189</u>	

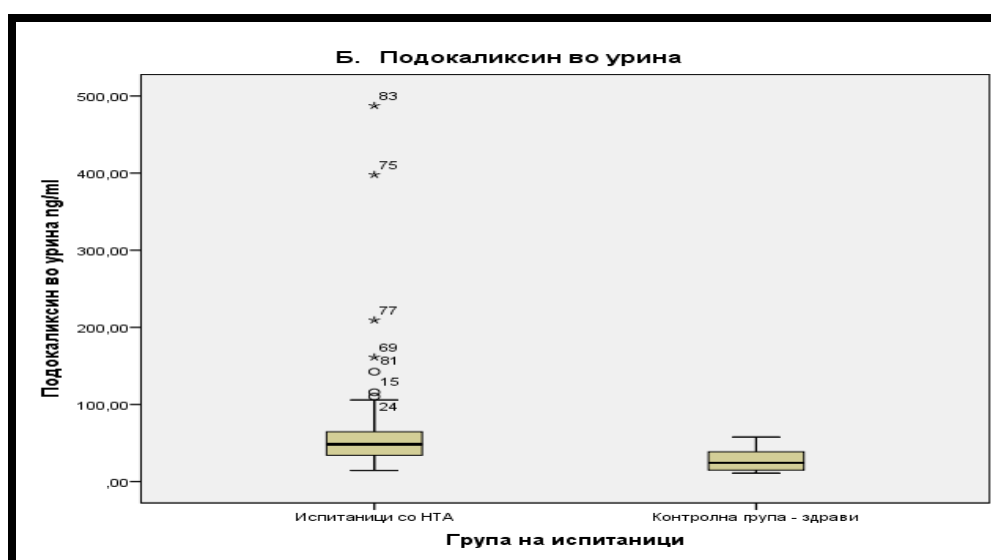
Од табела 8 и график 16 се гледа дека концентрацијата на уринарниот нефрин е статистички значајно повисока кај испитаниците со хронична хипертензија во споредба со контролната група ( $p < 0.001$ ).



*График 16. Концентрација на уринарен нефрин кај сите испитаници со хронична хипертензија и здравите испитаници*

**Табела 9.** Концентрација на уринарен подокаликсин кај сите испитаници со хронична хипертензија и здравите испитаници

Подокаликсин	n	$\bar{x}$	SD	Min.	Max	Median	Percentile			P value
							25	50	75	
Испитаници со хронична хипертензија	84	63	68	14	487	48	34	48	64	<10 <sup>-3</sup>
Здрави испитаници	30	27	13	10	57	24	<u>15</u>	<u>24</u>	<u>38</u>	

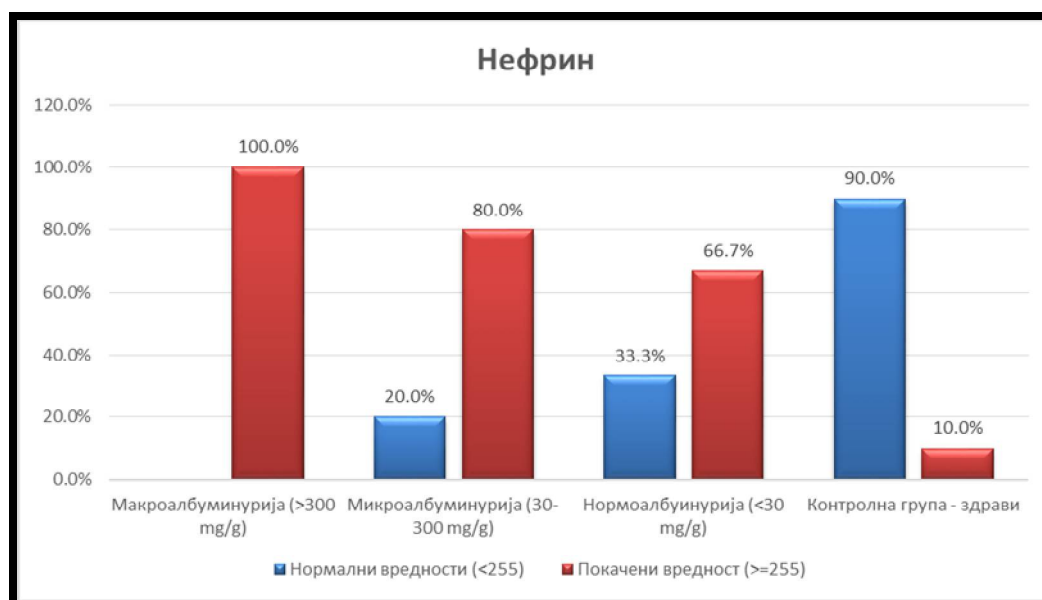


**График 17.** Концентрација на уринарен подокаликсин кај сите испитаници со хронична хипертензија и здравите испитаници

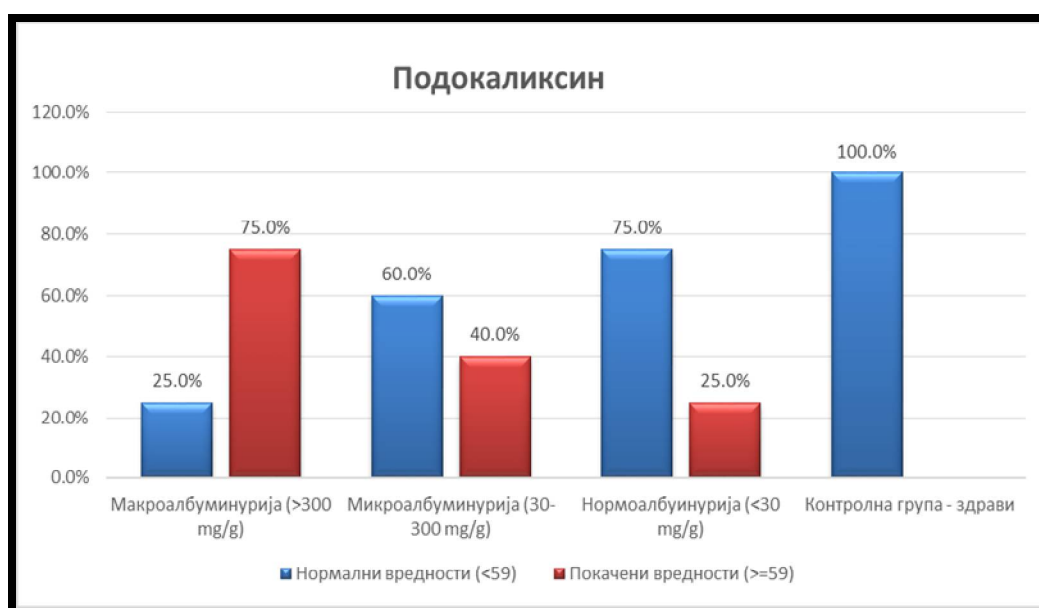
Од табела 9 и график 17 се гледа дека концентрацијата на уринарниот подокаликсин е статистички значајно повисока кај испитаниците со хронична хипертензија во споредба со контролната група ( $p < 0.001$ ).

### 5.2.3 Референтни вредности за нефрин и подокаликсин во урина и определување на процент на испитаници со покачени вредности за уринарен нефрин и подокаликсин во подгрупите испитаници поделени според М/К однос

Бидејќи контролната група која ја користевме кај оваа група испитаници е истата контролна група која ја користевме и кај групата испитаници со шеќерна болест тип 2, за референтни вредности ги земавме, за нефрин вредностите  $<255 \text{ ng/ml}$  и за подокаликсин вредностите  $<59 \text{ ng/ml}$ . Го одредивме процентот на испитаници по групи со покачен нефрин ( $>255 \text{ ng/ml}$ ) и забележавме дека тој е висок кај групите со макро (100%) и микроалбуминурија (80%) но дека е значајно висок и кај групата испитаници со нормоалбуминурија, односно 66,7% од нормоалбуминуричните испитаници имаат покачен уринарен нефрин. Кај 10% од здравите испитаници најдовме покачени вредности за нефрин во урина. Подокаликсинот е покачен кај 75% од макроалбуминуричните испитаници, кај 40% од микроалбуминуричните испитаници и кај 25% од нормоалбуминуричните испитаници. Ниту еден испитаник од контролната група немаше покачени вредности за уринарен подокаликсин со што процентот на нормоалбуминурични испитаници кои имаат покачен подокаликсин во урина е сепак значаен (25%). Добиените резултати се прикажани на **График 18** - нефрин и **График 19** - подокаликсин.



**График 18.** Процент на испитаници со покачен нефрин во урина по подгрупи испитаници поделени според М/К однос



**График 19.** Процент на испитаници со покачен подокаликсин во урина по подгрупи испитаници поделени според М/К однос

#### 5.2.4 Концентрација на уринарен нефрин и подокаликсин кај подгрупите испитаници поделени според М/К однос

Со помош на Kruskal-Wallis test направивме споредба на вредностите за уринарен нефрин односно подокаликсин помеѓу подгрупите испитаници поделени според М/К односот и здравите испитаници. Резултатите покажуваат дека нивото на уринарен нефрин и подокаликсин е статистички значајно повисоко кај сите три подгрупи испитаници со хронична хипертензија во споредба со контролната група ( $p < 0.05$ ). Резултатите се прикажани на **График 20** - нефрин и **График 21** - подокаликсин.

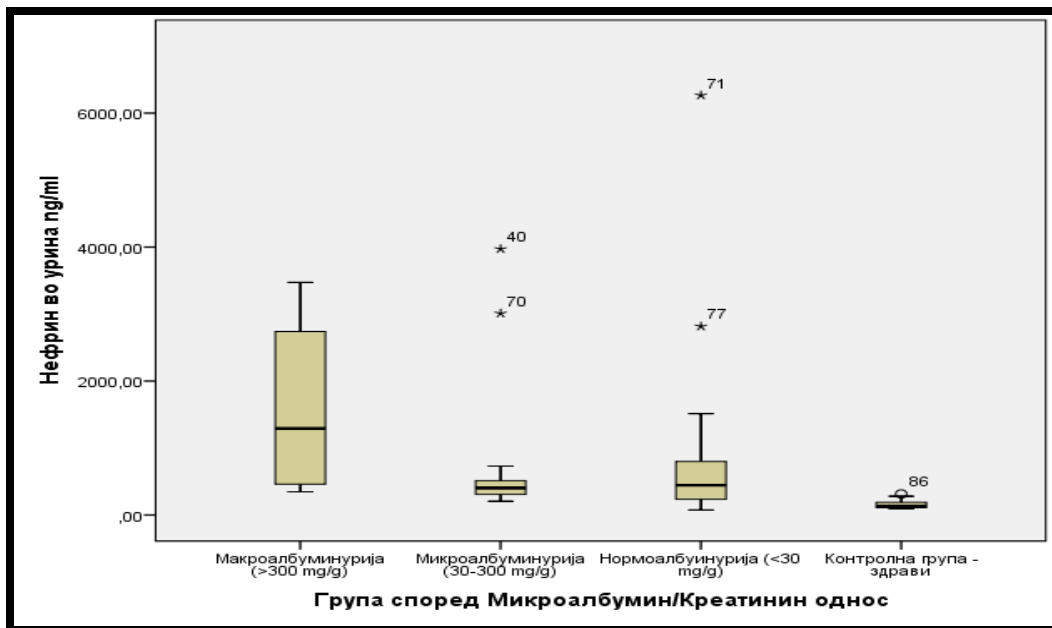


График 20. Концентрација на уринарен нефрин кај подгрупите испитаници поделени според М/К однос и здравите испитаници

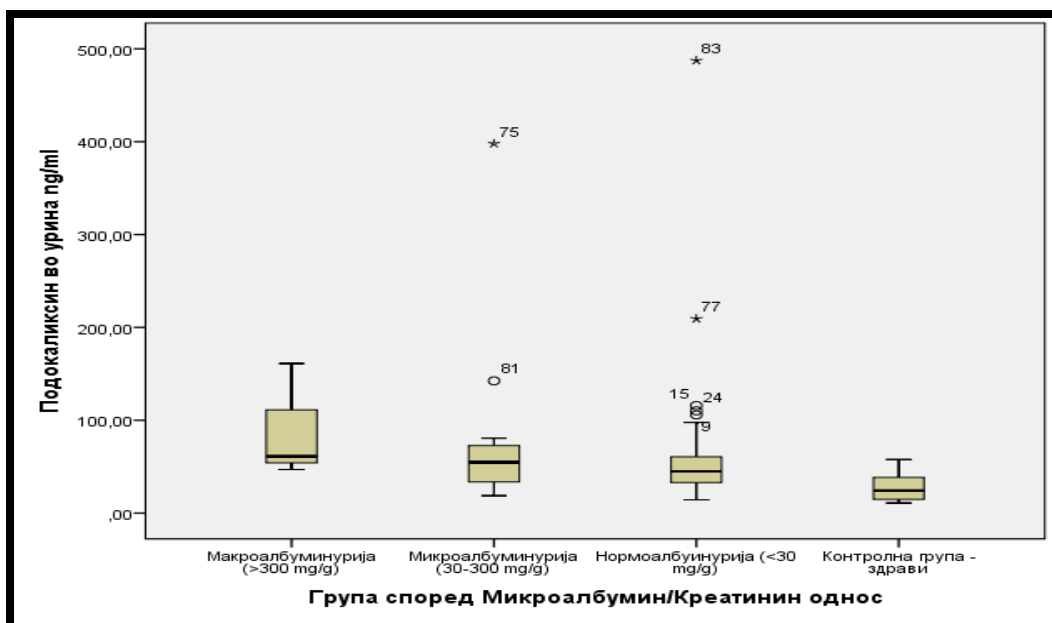
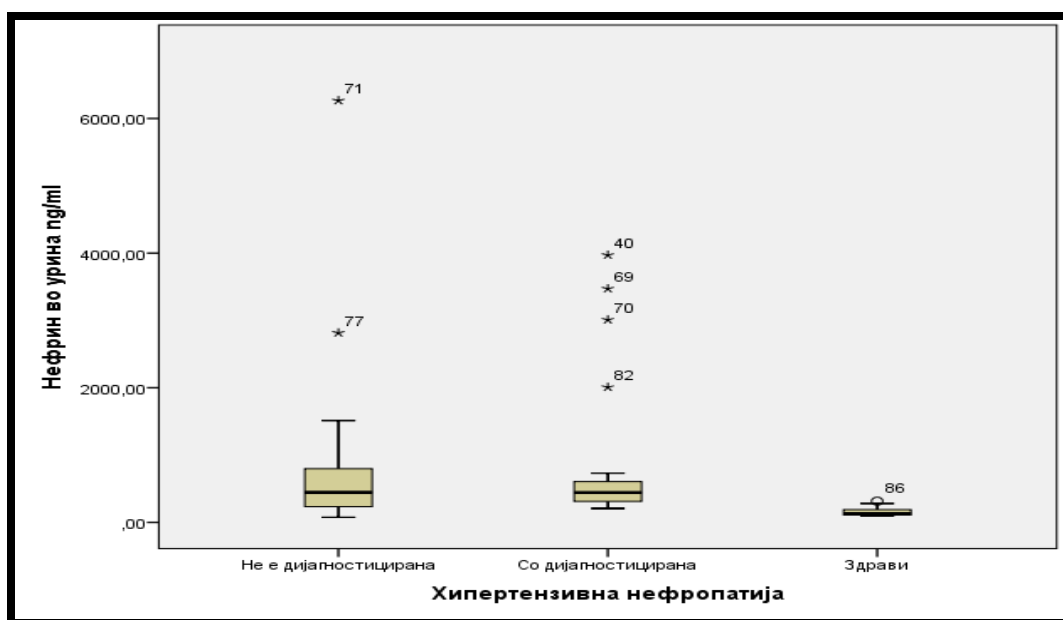


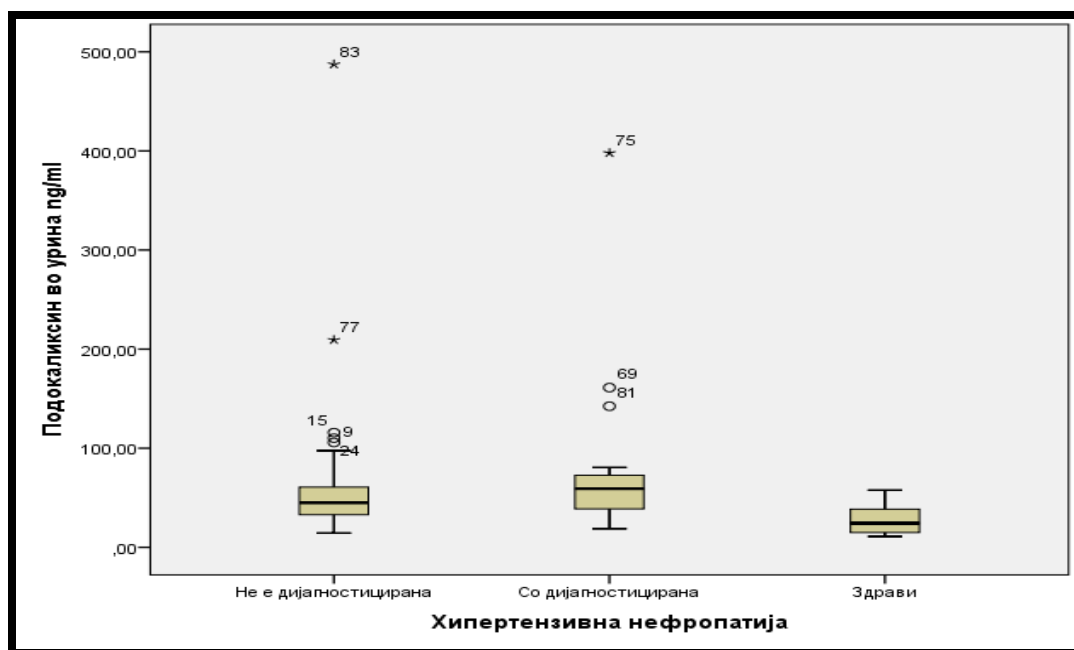
График 21. Концентрација на уринарен подокаликсин кај подгрупите испитаници поделени според М/К однос и здравите испитаници

### 5.2.5 Концентрација на уринарен нефрин и подокаликсин кај подгрупите испитаници со и без дијагностицирана нефропатија и здравите испитаници

Со помош на Kruskal-Wallis test направивме споредба на вредностите за уринарен нефрин односно подокаликсин помеѓу подгрупите испитаници со дијагностицирана хипертензивна нефропатија, без дијагностицирана нефропатија и здравите испитаници. Нивото на уринарен нефрин и подокаликсин е статистички значајно повисоко кај двете подгрупи испитаници со хронична хипертензија во споредба со контролната група ( $p < 0.05$ ). Резултатите се прикажани на **График 22** за нефрин и на **График 23** за подокаликсин.



*График 22. Концентрација на уринарен нефрин кај подгрупите испитаници со и без дијагностицирана хипертензивна нефропатија и здравите испитаници*



**График 23.** Концентрација на уринарен подокаликсин кај подгрупите испитаници со и без дијагностицирана хипертензивна нефропатија и здравите испитаници

### 5.2.6 Корелација помеѓу концентрацијата на уринарен нефрин односно подокаликсин и стапката на гломеруларна филтрација

Определена е непараметарска Spearman корелација помеѓу концентрацијата на нефрин односно подокаликсин во урина и стапката на гломеруларна филтрација кај сите испитаници со хронична хипертензија и здравите испитаници. Најдена е статистички значајна негативна корелација со ниво на значајност  $p < 10^{-3}$  (Spearman  $r = -0.525$ ) за нефрин (**График 24**). За подокаликсин исто така најдена е негативна корелација со стапката на гломеруларна филтрација која е статистички значајна со ниво на значајност  $p = 0.009$  (Spearman  $r = -0.242$ ) (**График 25**).



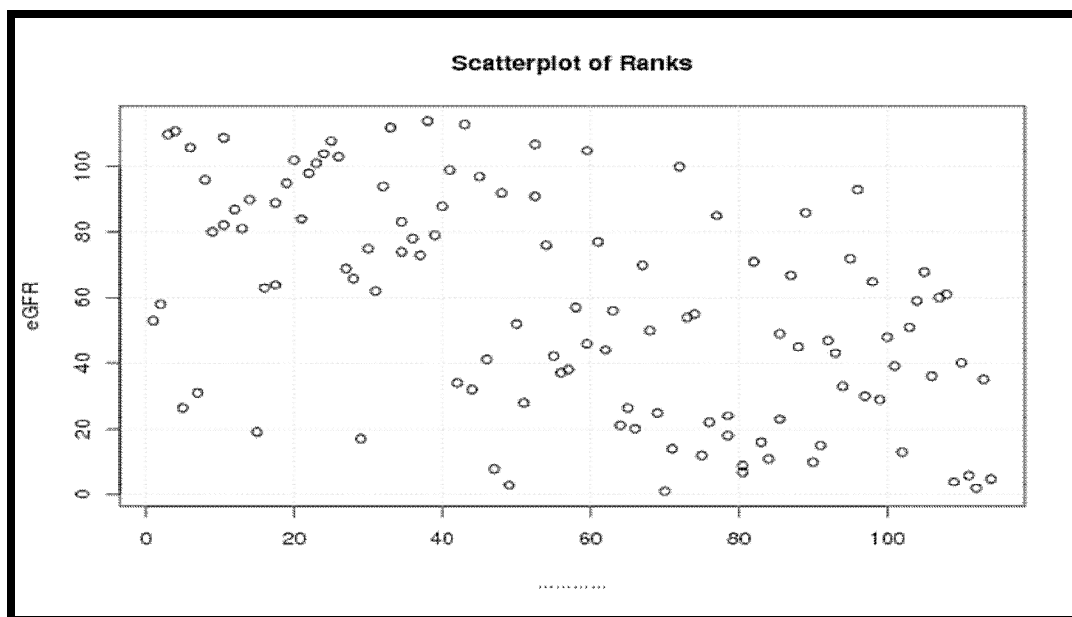


График 24. Корелација помеѓу концентрацијата на уринарниот нефрин и стапката на гломеруларна филтрација ( $r=-0.525, p<10^{-3}$ )

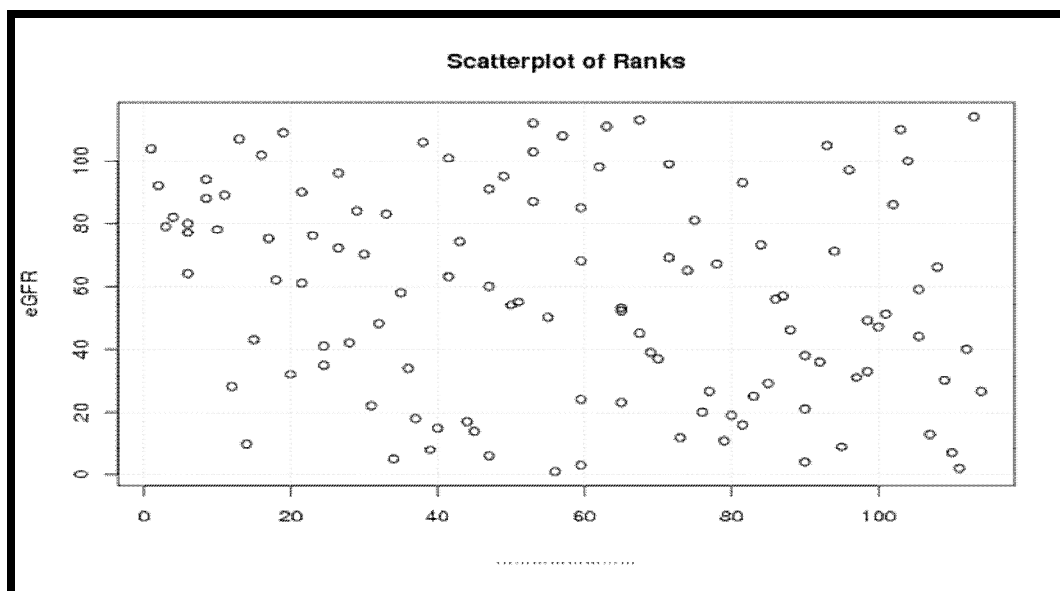


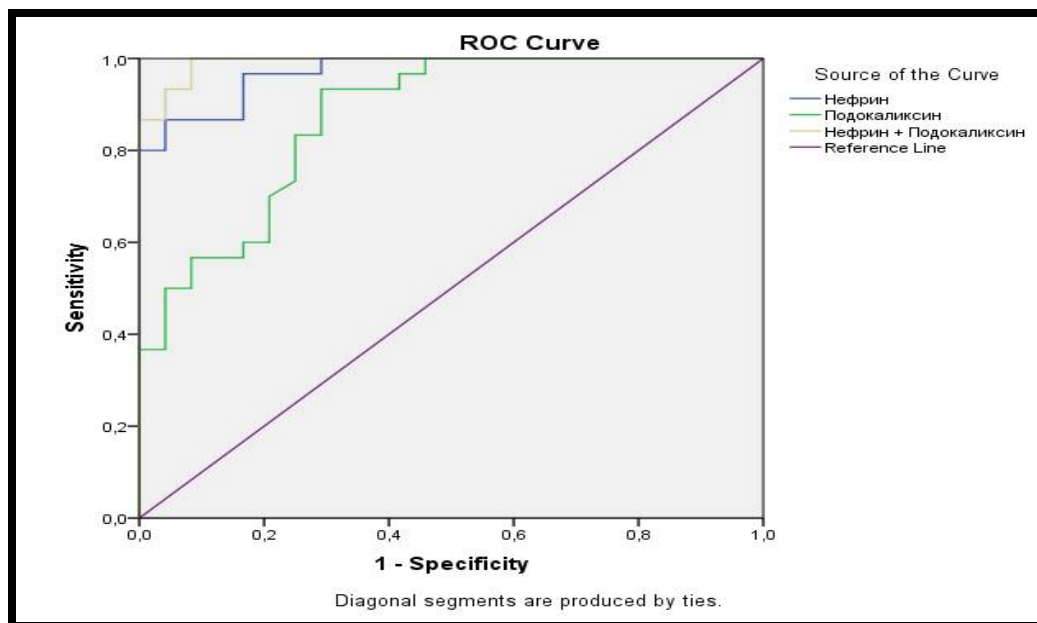
График 25. Корелација помеѓу концентрацијата на уринарниот подокаликсин и стапката на гломеруларна филтрација ( $r=-0.242, p<10^{-3}$ )

### 5.2.7 Непараметриска ROC анализа на уринарен нефрин и подокаликсин кај испитаници со хипертензивна нефропатија

За да се определи дискриминаторската моќ на нефринот и подокаликсинот кај испитаниците со хронична хипертензија и со хипертензивна нефропатија користени се ROC криви каде како влез се земени веројатностите за припадност од бинарна логистичка регресија за групата на испитаници со хронична хипертензија и со дијагностицирана хипертензивна нефропатија и контролната група. Направена е бинарна логистичка регресија по параметрите нефрин, подокаликсин одделно и нефрин и подокаликсин заедно. Користејќи како класификатор логистичка регресија само за нефрин како независна променлива, точноста на нефринот како класификатор е 87%.

Со користење само на подокаликсинот како независна променлива, точноста на подокаликсинот како класификатор е 79%.

Со користење нефринот и подокаликсинот заедно како независни променливи, точноста на нефринот и подокаликсинот како класификатори во дискриминирање на испитаниците со хипертензивна нефропатија од здравите испитаници изнесува 92%.



**График 26.** ROC криви за тестирање на дијагностичка ефикасност (специфичност и сензитивност) на уринарен нефрин и подокаликсин кај испитаници со хипертензивна нефропатија

### 5.2.8 Резултати од сепарацијата на уринарните протеини со градиентна SDS-PAGE електрофореза

Направивме електрофоретска сепарација на излачените уринарни протеини кај испитаниците со хронична хипертензија кои имаа макроалбуминурија односно микроалбуминурија, со цел да го утврдиме типот на протеинурија а со тоа и степенот на бубрежно оштетување. Електрофорезата се направи кај вкупно 26 испитаници со хронична хипертензија од кои, четворица испитаници беа со макроалбуминурија, додека 22 испитаници беа со микроалбуминурија. Добиените елферограми се евалуираа визуелно.

Го одредивме процентот на испитаници по тип на протеинурија во секоја подгрупа одделно. Резултатите се прикажани на **График 27** и **28**.



*График 27. Процентуална застапеност на типови протеинурија кај макроалбуминурични испитаници со хронична хипертензија*



**График 28.** Процентуална застапеност на типови протеинурија кај микроалбуминурични испитаници со хронична хипертензија

Од графиконите се гледа дека кај сите испитаници со макроалбуминурија е присутна мешана протеинурија. Кај испитаниците со хронична хипертензија и со микроалбуминурија 18% имаат гломеруларен тип протеинурија, додека 23% имаат тубуларен тип протеинурија. Кај 32% од микроалбуминуричните испитаници има мешан тип на протеинурија додека кај 27% нема протеински фракции односно е присутна само албуминска фракција што претставува нормален наод при електрофореза на уринарни протеини. Најчест тип на протеинурија кај испитаниците со макроалбуминурија и микроалбуминурија и хронична хипертензија е мешаниот тип на протеинурија.

## 5.3 Резултати кај групата трудници

### 5.3.1 Клинички карактеристики на трудниците

Групата трудници ја поделивме на три подгрупи:

1. трудници со прееклампсија,
2. високо - ризични трудници - трудници со ризик од појава на прееклампсија или други компликации во текот на бременоста. Групата високо-ризични трудници се состои од 41 трудница и тоа со следниве патолошки состојби: хипертензија индуцирана од бременост  $n=14$ , прекумерна телесна тежина  $n=2$ , гестациски дијабет  $n=11$ , прееклампсија во претходна бременост  $n=6$ , близначка бременост  $n=3$ , преегзистирачка хипертензија  $n=5$ ,
3. здрави трудници.

Со помош на Kruskal-Wallis (еднонасочна АНОВА) тест направивме споредба на клиничките параметри помеѓу подгрупите трудници. Клиничките карактеристики на подгрупите трудници се прикажани во **Табела 10**.

За параметрите за кои е добиена значајна разлика во распределбата на податоците помеѓу подгрупите, направени се дополнителни тестови за да се види на кои подгрупи се должи разликата. Добиено е дека најчесто постои разлика меѓу распределбите на вредностите на параметрите помеѓу контролната група и останатите две подгрупи на трудници. Поточно, со примена на Mann - Whitney U тест утврдено е дека освен разликите на распределбите помеѓу контролната група и двете подгрупи трудници, статистички значајна разлика постои помеѓу подгрупата трудници со ризична бременост и подгрупата трудници со прееклампсија во распределбите на следните параметри: глукоза во серум ( $p=0.042$ ), микроалбумин/креатинин однос ( $p=0.004$ ), нефрин ( $p<10^{-3}$ ) и подокаликсин ( $p<10^{-3}$ ).

Табела 10. Клинички карактеристики на подгрупите трудници

	Трудници со прееклампсија	Трудници со високо-ризична бременост	Здрави трудници	p value
Возраст (години)	27.7±4.7	29.1±5.6	29.4±6.0	0.376
Гестациска недела	28.9±5.6	26.4±6.8	24.3±6.8	<10 <sup>-3</sup>
БМИ (kg/m <sup>2</sup> )	29.3±4.6	29.9±3.6	25.7±3.3	<10 <sup>-3</sup>
Глукоза во серум (mmol/L)	5.2±0.5	5.9±1.2	4.6±0.5	<10 <sup>-3</sup>
М/К однос (mg/g)	214.3±160.3	169.0±271.7	15.8±11.0	<10 <sup>-3</sup>
СКП mm/Hg	151.8±13.8	145.6±26.6	119±5.4	<10 <sup>-3</sup>
ДКП mm/Hg	95.1±7.4	90.1±13	77.3±6.0	<10 <sup>-3</sup>
Вкупен холестерол (mmol/L)	6.6±0.8	6.6±0.7	6.6±1.1	0.883
Триглицериди (mmol/L)	2.1±0.7	2.1±0.8	2.4±0.9	0.421
ХДЛ (mmol/L)	1.5±0.4	1.6±0.4	1.7±0.4	0.072
ЛДЛ (mmol/L)	4.1±0.9	4.0±0.9	3.8±1.1	0.345
Вкупни протеини серум (g/L)	67.6±7.2	69±6.2	68.3±5.5	0.562
Албумин во серум (g/L)	34.2±5.1	35.4±4.7	39.1±4.1	0.001
Уреа во серум (mmol/L)	5.5±1.2	6.3±2.3	5.0±1.9	0.045
Креатинин во серум (μmol/L)	70.7±9.2	69.4±11.9	56.8±4.6	<10 <sup>-3</sup>
eGFR (ml min <sup>-1</sup> 1.73 m <sup>-2</sup> )	91.3±15.1	97.5±26.9	95.5±9.6	0.372
Нефрин во урина (ng/ml)	1846.7±1248.2	455.9±235.4	151.6±90.1	<10 <sup>-3</sup>
Подокаликсин во урина (ng/ml)	164.3±93.1	98.7±75.4	27.2±28.8	<10 <sup>-3</sup>

Резултатите се прикажани како mean ± SD за континуираните варијабли, а во % за категоријските варијабли. М/К однос - микроалбумин/креатинин однос во урина, БМИ - индекс на телесна маса, СКП - систолен крвен притисок, ДКП - дијастолен крвен притисок, ХДЛ - липопротеини со висока густина, ЛДЛ - липопротеини со ниска густина, eGFR - (estimated Glomerular Filtration Rate) - предвидена гломеруларна филтрациска стапка.

Од Табела 10 може да си види дека во однос на параметрите: возраст, вкупен холестерол, триглицериди, вкупни протеини во серум, ЛДЛ, ХДЛ и ГФР не постои статистички значајна разлика помеѓу трите подгрупите трудници и здравите трудници. Во однос на параметрите: гестациска недела, БМИ, глукоза, М/К однос, СКП, ДКП, албумин, уреа, креатинин, нефрин и подокаликсин постои статистички значајна разлика помеѓу подгрупите трудници (p<0.05).

### 5.3.2 Концентрација на уринарен нефрин и подокаликсин кај подгрупите трудници

Направивме споредба помеѓу концентрацијата на уринарниот нефрин односно подокаликсин помеѓу подгрупите трудници: со прееклампсија, ризични трудници и здрави трудници, користејќи непараметриски Kruskal - Walis тест. И за двата параметри најдовме значајна разлика во распределбите помеѓу подгрупите со ниво на статистичка значајност  $p < 10^{-3}$ . Резултатите се прикажани табеларно и графички. (Табела 11 и 12, График 29 и 30)

Табела 11. Концентрација на уринарен нефрин кај подгрупите трудници

Нефрин	n	$\bar{x}$	SD	Min.	Max.	Median	Percentile			P value
							25	50	75	
Трудници со ризична бременост	41	456	235	36	954	440	298	440	625	$<10^{-3}$
Трудници со прееклампсија	30	1847	1248	230	6130	1783	631	1738	2522	
Здрави трудници	30	152	90	15	409	126	91	126	200	

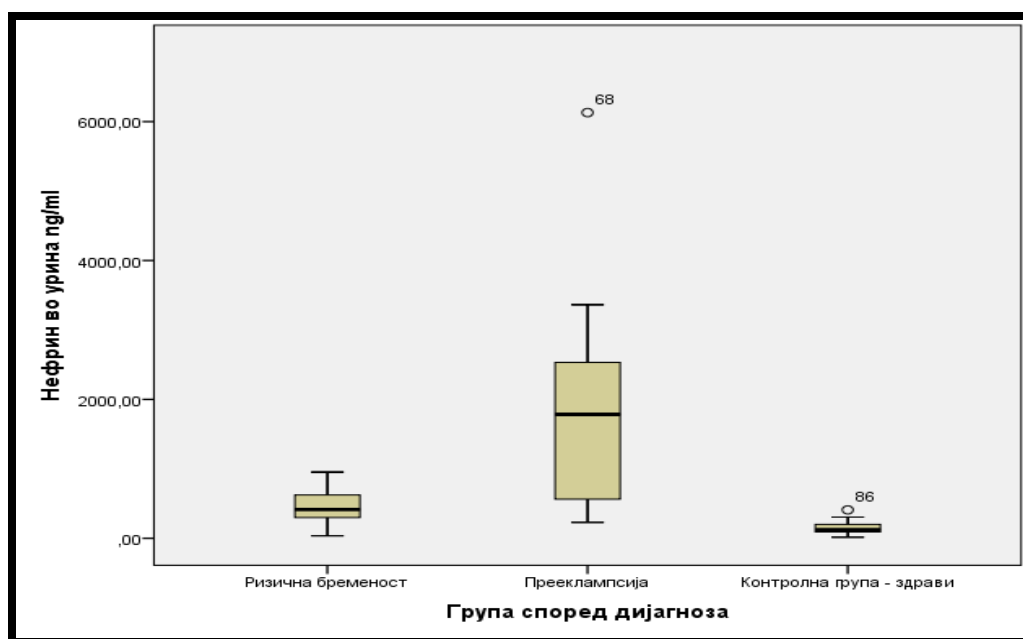


График 29. Концентрација на уринарен нефрин кај подгрупите трудници

Табела 12. Концентрација на уринарен подокаликсин кај подгрупите трудници

Подокаликсин	n	$\bar{x}$	SD	Min.	Max.	Median	Percentile			P value
							25	50	75	
Трудници со ризична бременост	41	99	75	16	366	72	49	72	117	<10 <sup>-3</sup>
Трудници со прееклампсија	30	164	93	73	479	148	93	148	182	
Здрави трудници	30	27	29	2	40	16	<u>9</u>	<u>16</u>	<u>40</u>	

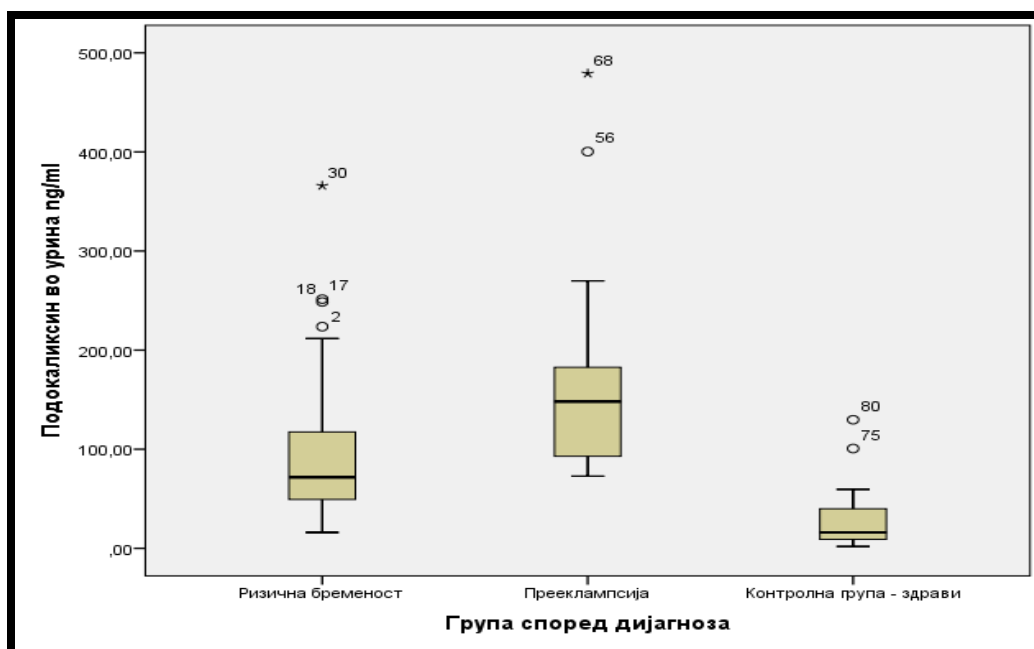


График 30. Концентрација на уринарен подокаликсин кај подгрупите трудници



### 5.3.3 Референтни вредности за нефрин и подокаликсин во урина кај трудниците и определување на процент на трудници со покачени вредности за уринарен нефрин и подокаликсин кај подгрупите

Референтните вредности на параметрите нефрин и подокаликсин во урина за групата трудници ги определивме користејќи ги распределбите на честотите на овие параметри кај здравите трудници вклучени во студијата. Со оглед на несиметричната распределба (искривеност на десно) на вредностите за нефрин и подокаликсин во урина, за покачени вредности ги земавме оние кои се на растојание поголемо од 1.5 интерквартален ранг (IQR) од медијаната, ( $50 \text{ перцентил} + (75 \text{ перцентил} - 25 \text{ перцентил} \times 1.5)$ ), (Табела 11 и 12), односно за нефрин, вредности помали од  $126+164=290 \text{ ng/ml}$ , додека за подокаликсин вредности помали од  $16+47=63 \text{ ng/ml}$ .

За покачени (патолошки) вредности на нефрин во урина кај трудниците ги земавме вредностите  $>290 \text{ ng/ml}$ , додека за подокаликсин во урина вредностите  $>63 \text{ ng/ml}$ .

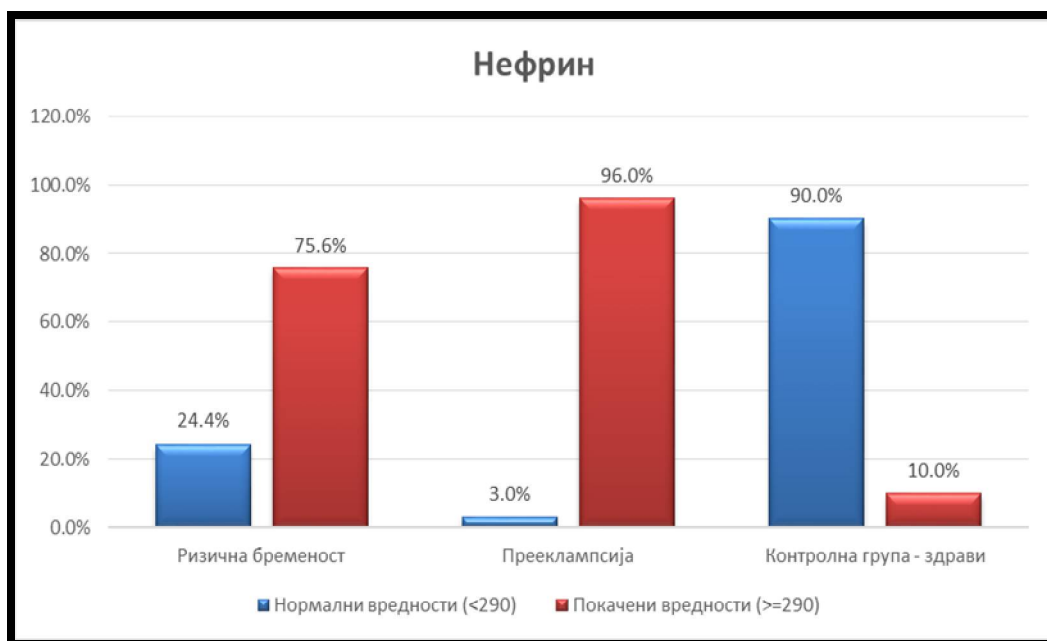
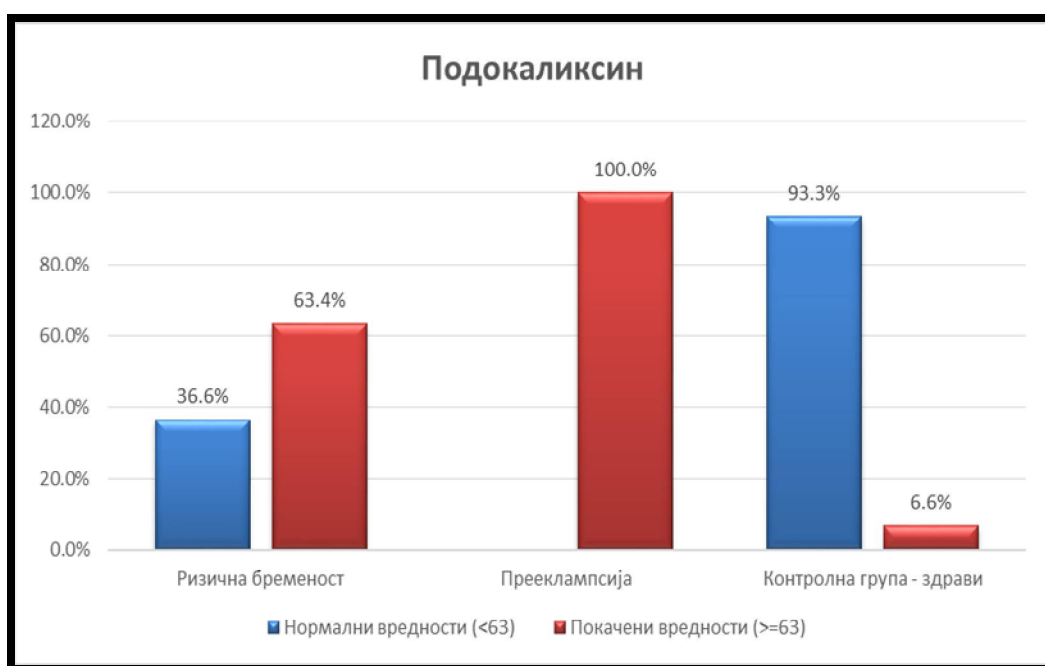


График 31. Процент на трудници по подгрупи со покачени вредности за нефрин во урина

Го одредивме процентот на трудници со покачен нефрин по подгрупи и забележавме дека тој е висок кај подгрупата со прееклампија (96%) и подгрупата високо ризични трудници (75.6%), додека само 10% од здравите трудници имаат покачени вредности за уринарен нефрин. Подокаликсинот е покачен кај 100% од трудниците со прееклампија и кај 63.4% од високо ризичните трудници. Само 6.6% од здравите трудници имаат покачени вредности за подокаликсин во урината. Добиените резултати се прикажани на **График 31** - нефрин и **График 32** - подокаликсин.



**График 32.** Процент на трудници по подгрупи со покачени вредности за подокаликсин во урина

#### 5.3.4 Концентрација на уринарен нефрин и подокаликсин кај подгрупите трудници поделени според гестациската старост на бременоста

За споредба на распределбата на параметрите нефрин односно подокаликсин во двете подгрупи (втор и трет триместар од бременост) користен е непараметарски Mann-Whitney U тест. За статистички значајни се сметаат вредности помали од 0.05. Резултатите за подгрупата ризични трудници се прикажани во **Табела 13** и **14**, додека за трудниците со прееклампија се прикажани во **Табела 15** и **16**.

*Табела 13. Концентрација на уринарен нефрин според гестациска старост на бременоста кај трудниците со ризична бременост*

Нефрин	n	$\bar{x}$	SD	Median	p value
Трет триместар	20	500	267	546	0.334
Втор триместар	21	414	192	409	

*Табела 14. Концентрација на уринарен подокаликсин според гестациска старост на бременоста кај трудниците со ризична бременост*

Подокаликсин	n	$\bar{x}$	SD	Median	p value
Трет триместар	20	102	71	76	0.549
Втор триместар	21	96	79	66	

Од добиените резултати може да се види дека не постои статистички значајна разлика во распределбите на двата параметри по триместар кај трудниците со ризична бременост.

*Табела 15. Концентрација на уринарен нефрин според гестациска старост на бременоста кај трудниците со преeklampсија*

Нефрин	n	$\bar{x}$	SD	Median	p value
Трет триместар	20	1845	980	2027	0.65
Втор триместар	10	1850	1659	1711	

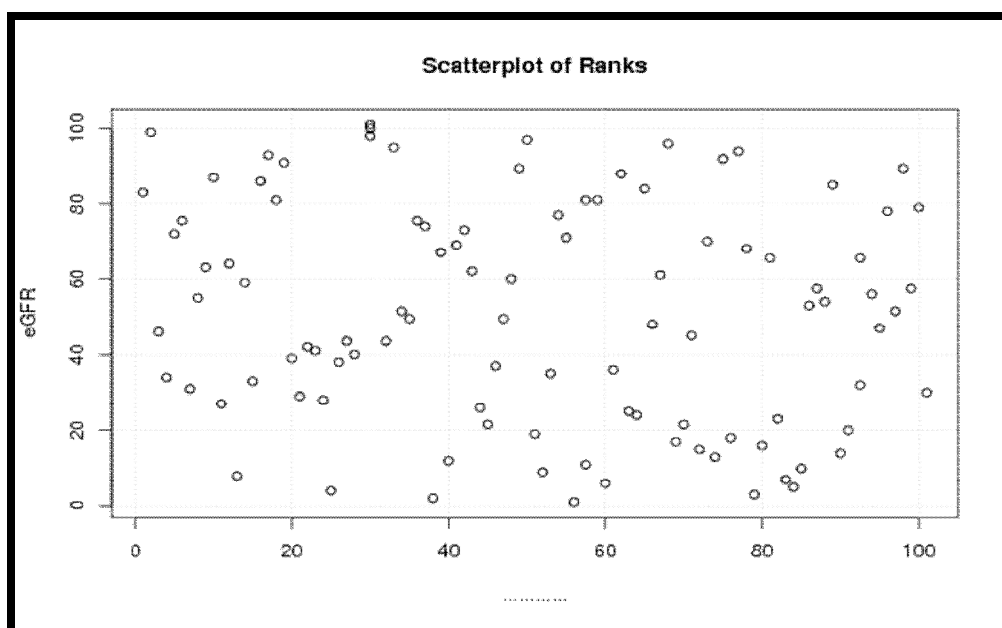
*Табела 16. Концентрација на уринарен подокаликсин според гестациска старост на бременоста кај трудниците со преeklampсија*

Подокаликсин	n	$\bar{x}$	SD	Median	p value
Трет триместар	20	163	80	158	0.681
Втор триместар	10	167	115	119	

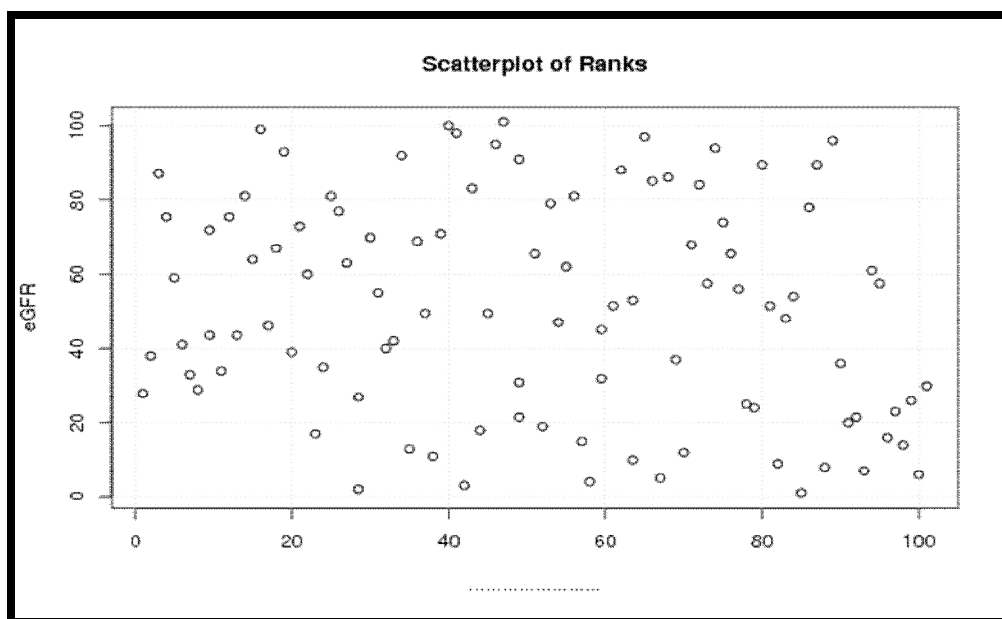
Од добиените резултати може да се види дека не постои статистички значајна разлика во распределбите на двата параметри по триместар на бременост кај трудниците со прееклампсија.

### 5.3.5 Корелација помеѓу концентрацијата на нефрин односно подокаликсин во урина и стапката на гломеруларна филтрација кај трудниците

Определена е непараметарска Spearman корелација помеѓу концентрацијата на нефрин во урина и стапката на гломеруларна филтрација (ГФР) кај сите трудници, која е негативна, но не и статистички значајна, со ниво на значајност  $p=0.129$  (Spearman  $r = -0.152$ ), како и за подокаликсин која исто така е негативна (Spearman  $r=-0.194$ ), но не е статистички значајна, со ниво на значајност  $p=0.051$ . На **График 33** и **34** прикажани се ранковите на двата параметри.



*График 33. Корелација помеѓу концентрацијата на нефрин во урина и ГФР ( $r=-0.152$ ,  $p=0.129$ )*



**График 34.** Корелација помеѓу концентрацијата на подокаликсин во урина и ГФР ( $r=-0.194$ ,  $p=0.051$ )

### 5.3.6 Корелација помеѓу концентрацијата на нефрин односно подокаликсин и гестациската старост на бременоста

Определена е непараметарска Spearman корелација помеѓу концентрацијата на нефрин во урина и гестациската старост на бременоста која е позитивна и статистички значајна, со ниво на значајност  $p=0.001$  (Spearman  $r=0.321$ ), како и за подокаликсин во урина и гестациската старост на бременост која исто така е позитивна и статистички значајна со ниво на значајност  $p=0.009$  (Spearman  $r=0.259$ ). На **График 35** и **36** прикажани се ранковите на двата параметри.

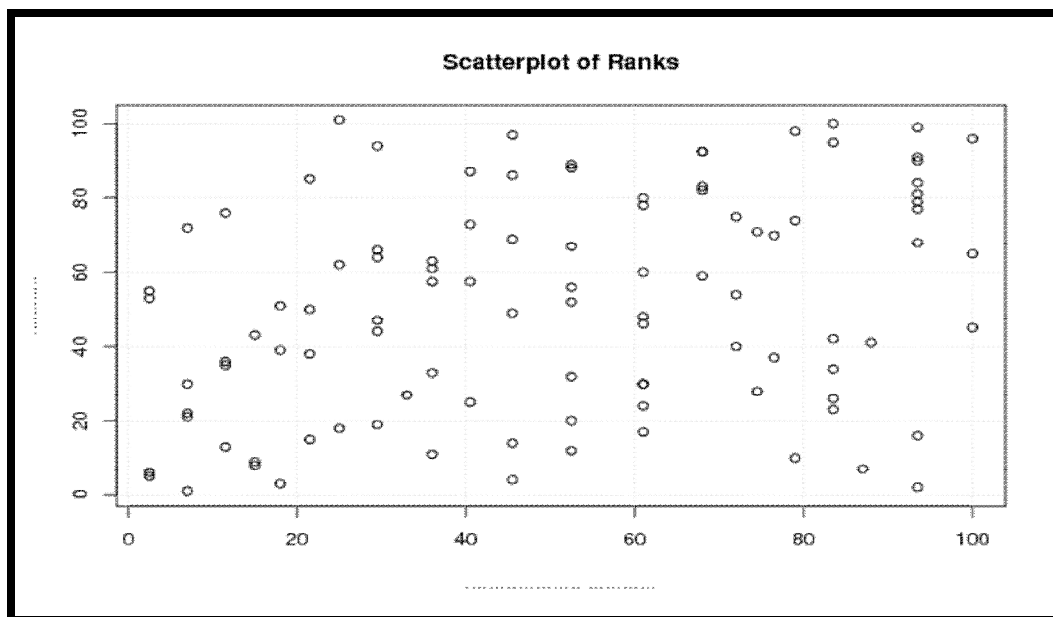


График 35. Корелација помеѓу концентрацијата на нефрин во урина и гестациската старост на бременоста ( $r=0.321$ ,  $p=0.001$ )

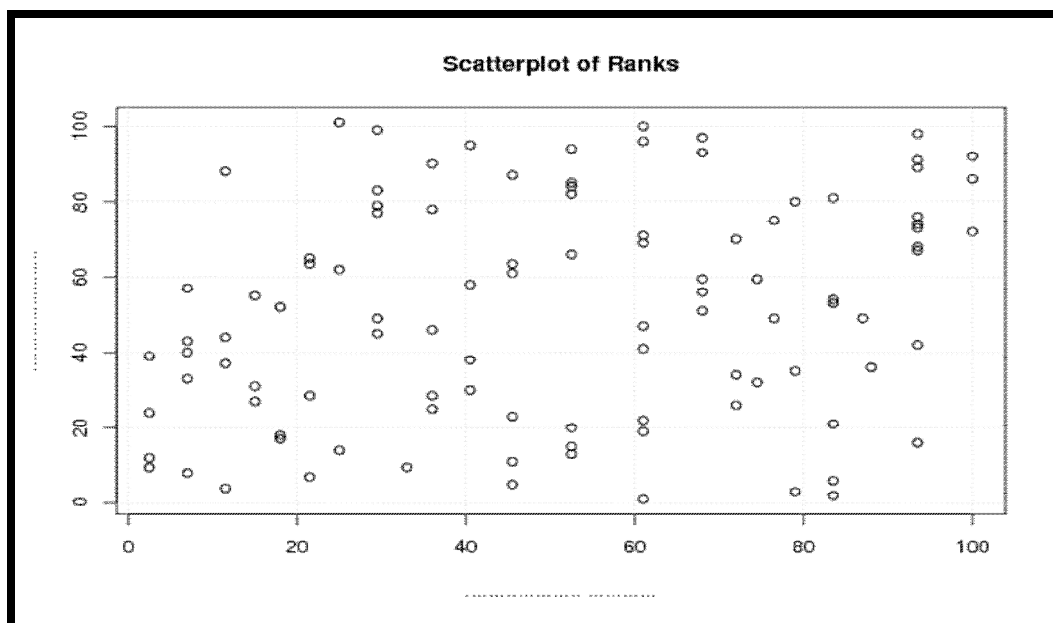


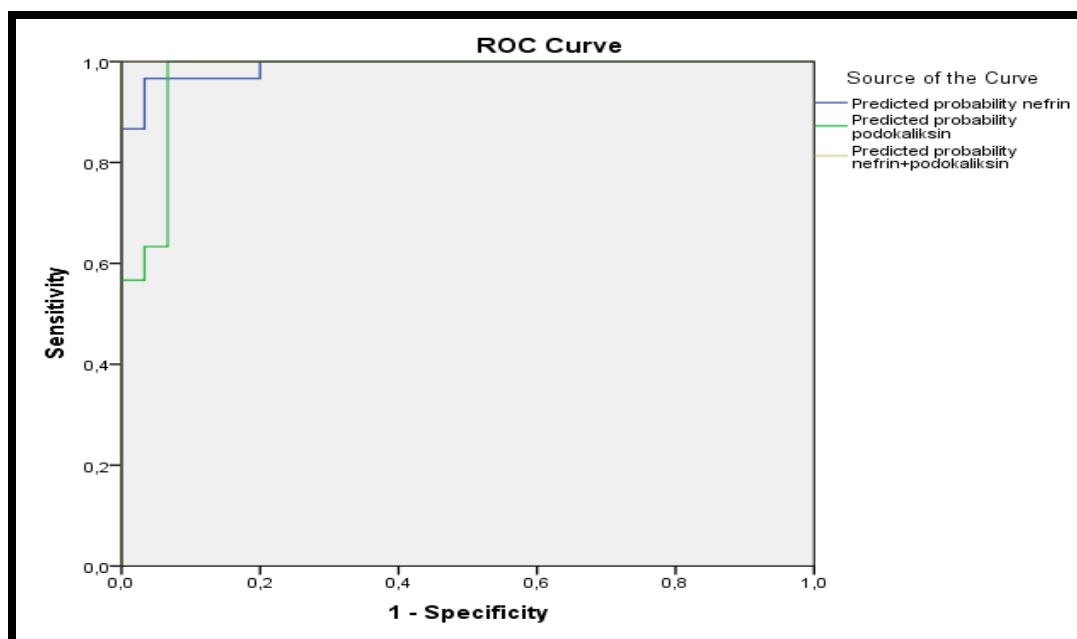
График 36. Корелација помеѓу концентрацијата на подокаликсин во урина и гестациската старост на бременоста ( $r=0.259$ ,  $p=0.009$ )

### 5.3.7 Непараметриска ROC анализа на уринарен нефрин и подокаликсин кај трудници со прееклампсија

За да се определи дискриминаторската моќ на нефринот и подокаликсинот кај трудниците со прееклампсија користени се ROC криви каде како влез се земени веројатностите за припадност од бинарна логистичка регресија за групата на трудници со прееклампсија и контролната група (здрави трудници). Направена е бинарна логистичка регресија по параметрите нефрин, подокаликсин одделно и нефрин и подокаликсин заедно. Користејќи логистичка регресија како класификатор само за нефрин како независна променлива, точноста на нефринот како класификатор е 96%.

Со користење само на подокаликсинот како независна променлива, точноста на подокаликсинот како класификатор е 95%.

Со користење на нефринот и подокаликсинот заедно како независни променливи, точноста како предиктори им изнесува 100%.



*График 37. ROC криви за тестирање на дијагностичка ефикасност (специфичност и сензитивност) на нефрин и подокаликсин во урина кај трудници со прееклампсија*

### 5.3.8 Резултати од сепарација на уринарните протеини со градиентна SDS-PAGE електрофореза

Направивме електрофоретска сепарација на излачените уринарни протеини кај трудниците со ризична бременост и прееклампсија. Електрофорезата се направи кај вкупно 71 трудница (30 со прееклампсија и 41 со ризична бременост). Во групата трудници со прееклампсија девет трудници имаа макроалбуминурија, додека 21 трудница имаа микроалбуминурија. Во групата на ризични трудници, шест имаа макроалбуминурија, 32 микроалбуминурија и три трудници имаа нормоалбуминурија.

Добиените елферограми се евалуираа визуелно.

Го одредивме процентот на испитаници по тип на протеинурија во секоја група трудници одделно. Резултатите се прикажани на **График 38 и 39**.



**График 38.** Процентуална застапеност на типови протеинурија кај трудниците со прееклампсија





*График 39. Процентуална застапеност на типови протеинурија кај трудници со ризична бременост*

Од графиконите се гледа дека кај трудниците со прееклампсија најзастапен тип на протеинурија е мешана протеинурија (81%). Гломеруларната протеинурија е застапена со 13% а тубуларната протеинурија со 6%. Во оваа подгрупа трудници нема ниту еден испитаник со нормален електрофоретски наод. Кај трудниците со ризична бременост исто така најзастапен тип на протеинурија е мешаната протеинурија. Во оваа подгрупа 20% од трудниците имаат нормален електрофоретски наод, 5% гломеруларна и 5% тубуларна протеинурија.

## 6. ДИСКУСИЈА

Секундарните нефропатии се група на бубрежни заболувања кои се јавуваат како последица на претходно постоење на некое заболување на организмот како што е шеќерната болест тип 2, хроничната хипертензија, системскиот лупус еритематозус, амилоидоза, во склоп на инфекции. Прееклампсијата кај трудниците исто така спаѓа во група на секундарни нефропатии [72]. Раното откривање на секундарните нефропатии овозможува навремен третман и значително намалување на стапката на компликации и смртност кај оваа група болести. Оттука произлезе главниот мотив на докторската студија да се воведат нови биохемиски маркери кои ќе овозможат рана дијагноза на секундарните нефропатии.

Во литературата опишани се голем број нови маркери за рано откривање на секундарни нефропатии како на пример: Neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL), N-acetyl-beta-glucosaminidase (NAG), Cystatin C, alpha 1 - microglobulin, immunoglobulin G или M, type IV collagen, nephrin, angiotensinogen, liver - type fatty acid - binding protein (L - FABP), podocalyxin, podocin, Synaptopodin, Complement receptor 1 (CR1) [2,73,74,75]. Едни од позначајните маркери за рано откривање на секундарните нефропатии во поновите литературни податоци се подоцитни протеини како нефрин и подокаликсин [76].

Нефринот и подокаликсинот се специфични протеини за подоцитите. Подоцитите заедно со фенестрираниот ендотел и гломеруларната базална мембрана ја формираат гломеруларната филтрациска бариера, која има улога на селективен филтер со главна задача да ги задржи плазмените протеини во крвта. Нефринот како главна компонента на филтрациската дијафрагма обезбедува физичка бариера, додека подокаликсинот како сијалогликопротеин обезбедува електростатска бариера за плазмените протеини. Оштетувањето на подоцитите - подоцитопатиите се манифестираат со протеинурија. Нефринот и подокаликсинот присутни во урината укажуваат на оштетување на подоцитите на гломеруларно ниво и/или присуство на апоптотични или некротични подоцити во урината, односно укажуваат на оштетување само на подоцитите, независно од останатите две градбени компоненти на гломеруларната филтрациска бариера [2].

Во докторската студија опфатени се најчестите секундарни нефропатии, дијабетската и хипертензивната нефропатија како најчести причинители на терминална

бубрежна слабост и прееклампсијата како водечка причина за мајчин и фетален морбидитет и морталитет.

Најчест тип секундарна нефропатија е **дијабетската нефропатија** (ДН) која се карактеризира со: перзистентна албуминурија, прогресивно намалување на стапката на гломеруларна филтрација и постепено покачување на крвниот притисок [77]. ДН е најчеста компликација кај пациентите со шеќерна болест тип 2, околу 40% од пациентите со шеќерна болест тип 2 развиваат ДН, и истовремено претставува водечка причина за развој на хронична бубрежна болест и терминална бубрежна слабост во западниот свет и Соединетите Американски Држави. Околу 40 % од сите случаи на терминална бубрежна слабост се јавуваат како последица на ДН. Третманот на терминалната бубрежна слабост вклучува дијализа и трансплантација што има огромни финансиски импликации врз здравствениот систем и пошироко на општествено ниво со оглед на високиот инвалидитет и морталитет кај овие заболени лица [78].

Не постојат полови разлики во однос на инциденцата на ДН, додека во однос на возраста пикот на инциденцата е околу 60<sup>-тата</sup> година. Се смета дека прогресијата кон терминална бубрежна слабост е поголема кај помладите лица заболени од шеќерна болест тип 2. Околу 3% од новодијагностицираните случаи на шеќерна болест тип 2 веќе имаат нефропатија, додека пикот на инциденцата вообичаено се јавува помеѓу 10<sup>-та</sup> и 20<sup>-та</sup> година од моментот на поставување на дијагнозата на болеста [79].

Наведените епидемиолошки факти укажуваат дека е потребно рано откривање на ДН со цел навремено превземање на соодветни терапевтски мерки (најчест избор се АЦЕ инхибитори и ангиотензин II рецептор блокатори) кои успешно ја превенираат и успоруваат прогресијата кон терминалната бубрежна слабост [80].

Скрининг за ДН се препорачува да се направи веднаш штом се постави дијагноза - шеќерна болест тип 2. Скринингот опфаќа мерење на уринарен микроалбумин во случаен примерок урина [81]. Микроалбуминуријата како ран клинички маркер за дијабетска нефропатија укажува на оштетување на гломеруларната филтрациска бариера која е изградена од ендотел, гломеруларна базална мембрана и подоцити. Присуството на микроалбумин укажува на оштетување на сите три градбени компоненти на гломеруларната филтрациска бариера [82]. Досега микроалбуминот се сметаше за златен стандард во рано откривање на дијабетска нефропатија, но литературните податоци

укажуваат дека микроалбуминот е неспецифичен и несензитивен маркер, односно има мала предиктивна вредност кај пациентите со ДН [83,84]. Литературните податоци укажуваат дека голем број испитаници со нормоалбуминурија имаат намалена стапка на гломеруларна филтрација и развиваат нефропатија, односно дека гломеруларно оштетување е присутно кај испитаници со шеќерна болест и со нормоалбуминурија [85,86,87].

Детекцијата на нефринурија кај нормолабуминурични испитаници со шеќерна болест има високо предиктивна вредност за развој на ДН [88]. Овие недостатоци на микроалбуминот како маркер за рано откривање на ДН ја наметнаа идејата за потрага по нови посепцифични и посензитивни маркери за рано откривање на дијабетска нефропатија [89].

Кај дијабетската нефропатија подоцитното оштетување има централна улога во патогенезата и прогресијата на болеста [90]. Оттука постои размислување дека подоцитното оштетување е присутно кај заболените од шеќерна болест тип 2 пред појавата на микроалбуминурија и дека подоцитните протеини се појавуваат во урината порано во однос на микроалбуминот, односно истите можат да служат како маркери за рано откривање (скрининг) на ДН.

Оттука произлезе и една од главните цели на студијата да се провери и утврди значењето на специфичните подоцитни протеини - нефрин и подокаликсин во раното откривање на ДН.

Во нашата студија за да ги реализираме поставените цели воведовме и користевме ЕЛИСА метод за квантификација на уринарниот нефрин и подокаликсин и сите испитаници ги поделивме на три подгрупи според М/К односот, а потоа и на две подгрупи во зависност од тоа дали имаат или не дијагностицирана нефропатија. Кај сите испитаници ја меревме концентрација на биохемиски параметри кои се од интерес, направивме хемиска анализа на урината и електрофоретска сепарација на уринарните протеини. Ја тестиравме и дискриминаторската моќ на двата маркери помеѓу здравите лица и испитаниците со ДН.

Основните статистички анализи на мерените биохемиски параметри од интерес покажаа дека статистички значајна разлика постои помеѓу подгрупите испитаници

поделени според М/К однос и здравите испитаници за сите мерени параметри освен за ХДЛ холестерол.

Исто така и кај подгрупите испитаници со и без нефропатија статистички значајна разлика не постои само за ХДЛ холестерол во однос на здравите испитаници.

Резултатите од статистичката анализа покажаа значајно покачена концентрација на нефрин и подокаликсин во урината кај сите испитаници со шеќерна болест тип 2 во споредба со здравите испитаници [56,57,60].

Статистичката анализа покажа дека нивото на уринарен нефрин и подокаликсин е значајно повисоко кај сите подгрупи испитаници поделени според М/К однос со шеќерна болест тип 2 во споредба со здравите испитаници. Особено е важно што постои статистички значајна разлика во нивото на уринарен нефрин и подокаликсин кај нормоалбуминуричните испитаници со шеќерна болест тип 2 во споредба со здравите испитаници што потврдува дека подоцитното оштетување е присутно кај испитаниците со шеќерна болест тип 2 пред појава на микроалбуминурија и дека овие два маркери се посензитивни за рано откривање на ДН во споредба со микроалбуминот. Статистичката анализа покажа покачена концентрација на уринарен нефрин кај 82%, 88% и 100% од нормо-, микро- и макроалбуминуричните испитаници. Само 10% од здравите испитаници имаа покачени вредности за нефрин. Овие резултати од статистичката анализа за нефринот во урина се слични со оние на Jim B и нејзините соработници каде е најдено дека 100% од испитаниците со макро- и микроалбуминурија и 54% од испитаниците со нормоалбуминурија имаат покачен нефрин во урина [57]. Статистичката анализа покажа покачена концентрација на подокаликсин во урината кај 21%, 48% и 55% од испитаниците со нормо-, микро- и макроалбуминурија. Кај ниту еден здрав субјект немаше покачени вредности за уринарен подокаликсин. Овие резултати за подокаликсин во урина се слични со оние на Нага М и нејзините соработници кои нашле покачен подокаликсин во урина кај повисок процент од испитаниците со дијабетес тип 2 односно кај 53,8% од нормоалбуминуричните испитаници, 64,7% од микро- и 66,7% од макроалбуминуричните пациенти со шеќерна болест [60]. Статистички значајно повисока концентрација на уринарен нефрин и подокаликсин најдовме кај групата испитаници со дијагностицирана нефропатија во споредба со групата испитаници без дијагностицирана нефропатија и здравите испитаници, што укажува дека со напредување на болеста расте и

концентрацијата на уринарен нефрин и подокаликсин. Покачување на нефринот во урината има во рана фаза од шеќерната болест (82%) и расте со напредување на болеста (кај микро- и макроалбуминуричните испитаници и кај оние со дијагностицирана нефропатија). Овие наоди го потврдуваат претходниот наод во студијата на Patarí et al дека гломерулараната бариера рано е засегната во текот на шеќерната болест и дека истата се манифестира како рана нефринурија, иако методите на квантифицирање на нефрин во урина се различни во двете студии [56].

Најдовме дека нивото на уринарен нефрин негативно корелира со ГФР, што укажува дека нефринуријата е добар показател за нарушување на бубрежната функција. Овие резултати се во согласност со оние на Ng DPК и соработниците иако се различни методите на мерење на уринарен нефрин и одредување на ГФР [91]. Слични резултати има објавено и Jim В и нејзините соработници, кои нашле значајна негативна корелација помеѓу уринарниот нефрин и ГФР [57]. Негативната корелација помеѓу ГФР и уринарниот нефрин кај нормоалбуминуричните испитанци укажува на ризик од развој на терминална бубрежна слабост.

Нивото на уринарниот подокаликсин негативно корелира со ГФР што укажува дека и подокаликсинот е показател за нарушена бубрежна функција. Овие резултати не се во согласност со оние на Нага М и нејзините соработници кои не нашле значајна корелација помеѓу концентрацијата на уринарниот подокаликсин и ГФР [60].

За да го утврдиме степенот на бубрежно оштетување покрај одредувањето на ГФР, направивме и електрофоретска сепарација на уринарните протеини кај подгрупите испитаници со макро- и микроалбуминурија. Нефринот има молекуларна маса од 135 кДа додека подокаликсинот има Мр од 170 кДа, но со градиентна електрофореза која вклучува техниката на бојење со Coomassie Blue R-250, каква што користевме во студијата не се забележуваат нивните фракции бидејќи истите се присутни во урината во многу ниски концентрации изразени во ng/ml. Потребна е техника на бојење со сребро нитрат која е 100 пати поосетлива од техниката на бојење со Coomassie Blue R-250, сензитивноста на техниката на бојење со Coomassie Blue R-250 е 100 ng/L додека со сребро нитрат е 1 ng/L [92].

Електрофоретската сепарација на уринарните протеини покажа дека кај групата со макроалбуминурија 56% од испитаниците имаат тубуларна протеинурија, 22%

гломеруларна и 22% мешана протеинурија. Бидејќи во оваа група спаѓаат испитанци со дијагностицирана ДН и со подолго траење на шеќерната болест (средна вредност на траење на болеста 13 години) ваквиот наод е очекуван бидејќи тубуларната протеинурија и мешаната протеинурија укажуваат на напредното оштетување на бубрезите. Воедно и стапката на гломеруларната филтрација кај оваа група испитаници изнесуваше  $48.26 \pm 12.55 \text{ ml min}^{-1} 1.73 \text{ m}^{-2}$ , односно е умерено намалена. Кај испитаниците со микроалбуминурија најдовме дека 52% имаат гломеруларна протеинурија, 8% имаат тубуларна протеинурија и 40% имаат нормален наод на елферограмите. Бидејќи во оваа група спаѓаат испитанци со пократко траење на шеќерната болест тип 2 (средна вредност на траење на болеста 8.5 години) очекувано е да имаме ваква распределба на типовите протеинурија бидејќи гломеруларната протеинурија укажува на почетни оштетувања на бубрезите. Високиот процент на испитаници со нормален наод укажува на ниската осетливост на методата во детектирање на почетни бубрежни оштетувања иако голем дел од овие испитаници имаат средна вредност за еГФР од  $65.06 \pm 19.65 \text{ ml min}^{-1} 1.73 \text{ m}^{-2}$ , односно благо намалување на стапката на гломеруларната филтрација. Ваквиот наод го потврдува и фактот дека микроалбуминуријата и нарушената ГФР можат да бидат присутни кај испитаници кои се асимптоматски и немаат дијагностицирана нефропатија [93].

Електрофоретскиот наод е во согласност со патолошките промени на ниво на нефроните кај пациентите со шеќерна болест. Имено, класичен наод во почетните стадиуми од развојот на дијабетската нефропатија е присуство на гломеруларно оштетување додека во напреднат стадиум доаѓа до засегање и на тубулите [94,95].

ROC анализата покажа дека двата маркери имаат висока дијагностичка сензитивност и специфичност кај испитаниците со шеќерна болест тип 2. Специфичноста и сензитивноста на нефринот како независна променлива е со точност од 96% во дијагностицирањето на дијабетската нефропатија. Специфичноста и сензитивноста на подокаликсинот како независна променлива е со точност од 78% во дијагностицирањето на дијабетската нефропатија. Двата маркери имаат точност од 100% во дискриминирање помеѓу здравите испитаници и испитаниците со дијабетска нефропатија. Во литературата не најдовме податоци за дискриминаторската моќ на нефринот и подокаликсинот кај дијабетската нефропатија.

**Хипертензивната нефропатија (ХН)** е патолошка состојба предизвикана од долготрајно покачен крвен притисок која се карактеризира со оштетување на бубрезите и нарушување на нивната функција. Хипертензивната нефропатија е втора по ред водечка причина за развој на терминална бубрежна слабост. Постои тренд на постојан пораст на инциденцата на ХН која е пратена со висок морталитет и морбидитет пред се заради појавата на кардиоваскуларни компликации [96].

Раното откривање на ХН ќе овозможи навремено преземање на соодветни терапевски мерки кои се насочени кон намалување на крвниот притисок и редукција на албуминуријата (антихипертензивна терапија, блокатори на РААС - ренин - ангиотензин - алдостерон систем, диуретици и хигиено-диететски режим), со цел да се спречи прогресија кон терминална бубрежна слабост [97].

Основните патохистолошките промени на ниво на бубрезите како последица на хроничната хипертензија вклучуваат: васкуларни, гломеруларни и тубулоинтерстициски промени кој вклучуваат атеросклероза, кортикална фиброза, тубуларна атрофија и гломерулосклероза [98,99]. Рани биохемиски промени кај ХН се појава на микроалбуминурија,  $\beta_2$  микроглобинурија и пораст на уратната киселина во крвната плазма, додека подоцна од биохемиските промени доаѓа до протеинурија и до пораст на серумскиот креатинин, односно до пад на стапката на гломеруларна филтрација [100]. Микроалбуминуријата е сеуште златен стандард за рано откривање на бубрежно засегање кај пациентите со хронична хипертензија пред се поради фактот што истовремено кај овие пациенти микроалбуминот претставува и маркер за предикција на кардиоваскуларни компликации [101,102].

Во центарот на патогенетските случувања кај ХН стојат оштетувањата на гломерулите при што подоцитното оштетување докажано е дека има улога во патогенезата и прогресијата на болеста. Оттука постои размислување дека подоцитното оштетување е присутно кај заболените од хронична хипертензија, односно подоцитните протеини можат да служат како маркери за рано откривање (скрининг) на ХН [52,53].

Литертурни податоците од студии на хумана популација каде е тестирано значењето на овие два маркери во рано откривање на ХН се оскудни. Во студијата на Perez-Hernandez, објавена 2017 година најдено е дека нивото на протеинските молекули



асоцирани со подоцитите како нефринот и подокаликсинот е повисоко во урината кај хипертензивни испитаници со микроалбуминурија и дека истите значајно корелираат со клиничките параметри кај испитаниците [61].

Бидејќи ХН е втора по честота причина за развој на терминална бубрежна слабост и е пратена со високиот морталитет и морбидитет, во оваа студијата вклучивме и пациенти со хронична хипертензија и хипертензивна нефропатија со цел да се тестира значењето на нефринот и подокаликсинот во рано откривање на ХН.

Во нашата студија користевме ЕЛИСА метод за квантификација на уринарниот нефрин и подокаликсин и сите испитаници ги поделивме на три подгрупи според М/К односот, а потоа и на уште две подгрупи: со хронична хипертензија без дијагностицирана ХН и со хронична хипертензија и дијагностицирана ХН. Кај сите испитаници покрај крвниот притисок ја меревме и концентрацијата на биохемиските параметри во крвниот серум кои се од интерес, направивме хемиска анализа на урината и електрофоретска сепарација на уринарните протеини. Ја тестиравме и дискриминаторската моќ на двата маркери помеѓу здравите испитаници и оние со ХН.

Основните статистички анализи на мерените биохемиски параметри од интерес покажаа дека постои статистички значајна разлика помеѓу подгрупите испитаници поделени според М/К однос и здравите испитаници за сите мерени параметри освен за креатинин во серум и ХДЛ холестерол. Помеѓу подгрупите испитаници со хронична хипертензија со и без дијагностицирана нефропатија и здравите испитаници, статистички значајна разлика не најдовме исто така само за креатинин во серум и ХДЛ холестерол.

Резултатите од статистичката анализа кои ги добивме се доста слични со оние кај групата испитаници со шеќерна болест тип 2, и покажаа значајно покачена концентрација на нефрин и подокаликсин во урината кај испитаниците со хронична хипертензија во споредба со здравите испитаници.

Статистичката анализа покажа дека нивото на уринарен нефрин и подокаликсин е значајно повисоко кај сите подгрупи испитаници со хронична хипертензија (макро-, микро- и нормоалбуминуричната група) во споредба со здравите лица. Особено е важно што постои статистички значајна разлика во нивото на уринарен нефрин и подокаликсин кај нормоалбуминуричните испитаници со хронична хипертензија во споредба со здравите испитаници што потврдува дека подоцитно оштетување е присутно кај испитаниците со

хронична хипертензија пред појава на микроалбуминурија и дека овие два маркери се посензитивни за рано откривање на ХН во споредба со микроалбуминот. Статистичката анализа покажа покачена концентрација на уринарен нефрин кај 66.7%, 80% и 100% од нормо-, микро- и макроалбуминуричните испитаници. Само 10% од здравите испитаници имаа покачени вредности за нефрин. Покачување на нефринот во урината има во рана фаза од развојот на ХН (66.7%) и расте со напредување на болеста (кај микро- и макроалбуминуричните испитаници). Статистичката анализа покажа покачена концентрација на подокаликсин во урината кај 25%, 40% и 75% од испитаниците со нормо-, микро- и макроалбуминурија. Кај ниту еден здрав субјект немаше покачени вредности за уринарен подокаликсин.

Нивото на уринарен нефрин и подокаликсин е статистички значајно повисоко кај двете подгрупи испитаници со хронична хипертензија, со и без дијагностицирана нефропатија во споредба со контролната група  $p < 0.05$ . Разликите во нивото на уринарен нефрин односно подокаликсин помеѓу двете подгрупи испитаници со хронична хипертензија исто така се статистички значајни.

Најдовме дека нивото на уринарен нефрин негативно корелира со ГФР, што укажува дека нефринуријата е добар показател за нарушување на бубрежната функција. Негативната корелација помеѓу ГФР и уринарниот нефрин кај нормоалбуминуричните испитаници укажува на ризик од развој на ХН и терминална бубрежна слабост.

Нивото на уринарниот подокаликсин негативно корелира со ГФР што укажува дека и подокаликсинот е показател за нарушена бубрежна функција.

Литературните податоци за СДС-ПАГ електрофоретска сепарација на уринарните протеини кај испитаници со хронична хипертензија и хипертензивна нефропатија се оскудни. Еден постар литературен податок објавен од Glassrock укажува дека кај хипертензивната нефропатија најчест тип на протеинурија е тубуларната [103]. Нашите резултати од електрофоретската сепарација на уринарните протеини покажаа дека кај групата со макроалбуминурија 100% од испитаниците имаат мешана протеинурија. Бидејќи во оваа група спаѓаат испитаници со дијагностицирана ХН, ваквиот наод е очекуван, односно мешаната протеинурија укажува на напредното оштетување на бубрезите. Воедно и стапката на гломеруларна филтрација кај оваа група испитаници изнесува  $37.7 \text{ ml min}^{-1} 1.73 \text{ m}^{-2}$  односно е значително намалена. Нашите резултати се во

согласност со литературните податоци со оглед дека мешаната протеинурија опфаќа и тубуларна протеинурија. Кај испитаниците со микроалбуминурија најдовме дека 18% имаат гломеруларна протеинурија, 23% тубуларна протеинурија, 32% мешана протеинурија и 27% имаат нормален наод на елферограмите. Бидејќи во оваа група спаѓаат испитаници со пократко траење на есенциелната хипертензија очекувано е да имаме нехомогена распределба на типовите протеинурија.

ROC анализата покажа дека двата маркери имаат висока дијагностичка сензитивност и специфичност кај испитаниците со ХН. Специфичноста и сензитивноста на нефринот како независна променлива е со точност од 87% во дијагностиката на ХН. Специфичноста и сензитивноста на подокаликсинот како независна променлива е со точност од 79% во дијагностиката на ХН. Двата маркери имаат точност од 92% во дискриминирање помеѓу здравите испитаници и испитаниците со ХН. Во литературата не најдовме податоци за дискриминаторската моќ на нефринот и подокаликсинот помеѓу здравите испитаници и оние со ХН.

**Прееклампсијата** е потенцијално животна - загрозувачка компликација која се јавува во бременоста, а се карактеризира со *de novo* појава на хипертензија ( $>140/90$  mmHg), протеинурија ( $>100$  mg/dl) во поединечен примерок урина и појава на едеми после 20<sup>-тата</sup> недела од гестацијата. Прееклампсијата како патолошка состојба била позната уште од времето на Хипократ, меѓутоа етиологијата и патофизиолошките механизми сеуште претставуваат енигма, односно не се разјаснети во целост [104,105]. Прееклампсијата е водечка причина за перинатална смрт во економски неразвиените земји со стапка од 23,6%, пред се заради ниската антенатална заштита на трудниците. Во економски развиените земји стапката на смртност поради прееклампсијата како компликација во бременоста изнесува 13% [106,107]. Раното откривање на ризик од појава на прееклампсија или скринингот на оваа патолошка состојба ќе овозможи навреме да се преземат соодветни терапевтски мерки (пр. ацетилсалицилна киселина), да се намали смртноста кај трудниците како и компликациите кои можат да се јават не само кај мајката туку и кај новороденчињата, бидејќи прееклампсијата најчесто завршува со предвремено породување и раѓање на прематурно дете или дете со мала родилна тежина [108].

Скринингот за прееклампсија потребно е да се прави во првиот триместар од бременоста и вклучува неколку елементи:

- проценка на ризик од појава на прееклампсија - проценката се прави врз основа на темелна анамнеза. Ризици за појава на прееклампсија се: шеќерна болест, прекумерна телесна тежина, хипертензија, фамилијарна историја за прееклампсија, мултипла бременост, коагулопатии, бремени жени постари од 40 години.
- контрола на биофизички параметри - крвен притисок и доплер на утерини артерии.
- следење на одредени биохемиски параметри во крвта [109].

Во литературата се опишани многубројни биохемиски маркери како потенцијално значајни за скрининг на прееклампсијата, како на пример: VEGF - vascular endothelial growth factor, Endoglin, P-selectin PIGF - placental growth factor, PP-13 - Placental protein 13, ADAM12 - A disintegrin and metalloprotease 12, PTX3 - Pentraxin 3, PAPP-A - pregnancy-associated plasma protein A, како и подоцитните протеини. [110,111,112,113,114,115].

Во патогенезата кај прееклампсијата, ендотелната дисфункција има централна улога во мултиорганското засегање, вклучувајќи ги и бубрезите. Во поновите литературни податоци се повеќе се зборува дека подоцитното оштетување има централна улога во бубрежното засегање кај прееклампсијата и вклучува: структурни оштетувања на подоцитите, дисрегулација на подоцитните протеини, нивна загуба преку урина - подоцитурија. Подоцитуријата може да се користи како скрининг маркер за прееклампсија при крајот на вториот триместар од бременоста [54,55,64,76,115,116].

Од тука произлезе идејата во докторската студија да се вклучат како посебна група испитаници, трудници со ризик од појава на прееклампсија и со прееклампсија односно да се тестира значењето на нефринот и подокаликсинот во предикција или скрининг на прееклампсијата.

Во литературата се опишани значењето и улогата на нефринот и подокаликсинот како маркери за рано откривање и предикција на прееклампсијата [76].

Во докторската студија сите трудници ги поделивме на три подгрупи: трудници со ризик од појава на прееклампсија, трудници со прееклампсија и здрави трудници. Во сите

три подгрупи беа приближно подеднакво бројно опфатени трудници од втор и трет триместар.

Кај сите трудници ја меревме концентрацијата на биохемиски параметри кои се од интерес, направивме хемиска анализа на урината и електрофоретска сепарација на уринарните протеини. Ја тестиравме и дискриминаторската моќ на нефринот и подокаликсинот помеѓу здравите трудници и оние со прееклампсија.

Основните статистички анализи на мерените биохемиски параметри од интерес покажаа дека статистички значајна разлика ( $p < 10^{-3}$ ) постои помеѓу подгрупите трудници за параметрите: БМИ, глукоза, микроалбумин/креатинин однос, СКП, ДКП, уреа и креатинин во серум како и за нефрин и подокаликсин. Не најдовме статистички значајна разлика помеѓу подгрупите трудници за следниве параметри: возраст, вкупен холестерол, триглицериди, вкупни протеини во серум, ЛДЛ, ХДЛ и ГФР.

Резултатите од статистичката обработка на податоците покажа значајно покачена концентрација на нефрин и подокаликсин во урината кај трудниците со ризик од појава на прееклампсија и оние со прееклампсија во споредба со здравите трудници.

Статистичката обработка на податоците покажа дека постои значајна разлика ( $p < 10^{-3}$ ) во концентрацијата на уринарен нефрин односно подокаликсин помеѓу трите подгрупи трудници. Утврдивме дека освен разликите на распределбите помеѓу контролната група и двете подгрупи трудници со одредена дијагноза, статистички значајна разлика постои во концентрацијата на нефрин односно подокаликсин помеѓу групата трудници со ризична бременост и групата трудници со прееклампсија, наод кој е во согласност со оној на Y Wang за нефрин и подокаликсин и со оној на Palacios de Franco за подокаликсин [62,66].

Статистичката анализа покажа покачена концентрација на уринарен нефрин кај 96% од трудниците со прееклампсија додека кај ризичните трудници нефринот беше покачен кај 75.6%. Уринарниот подокаликсин најдовме дека е покачен кај сите (100%) трудници со прееклампсија додека кај оние со ризик од развој на прееклампсија подокаликсинот беше покачен кај 63.4% од трудниците. Овие резултати се во согласност со оние на Garovic која нашла дека подоцитиријата е присутна кај 100% од трудниците со прееклампсија иако во нејзиниот труд се работи за детекција на подоцитни клетки [55].

Направивме споредба помеѓу концентрацијата на уринарен нефрин односно подокаликсин помеѓу подгрупите трудници поделени според гестациска недела (триместар) но не најдовме статистички значајна разлика. Овие наоди се донекаде во согласност со оние на Ga Young Yang и на Yung YJ кои во своите студии исто така не нашле статистички значајна разлика во концентрацијата на нефринот помеѓу подгрупите трудниците во вториот триместар од бременоста. [65, 117].

Иако не најдовме статистичка разлика помеѓу групите трудници во однос на гестациската старост на бременоста сепак резултатите од статистичката анализа покажаа значајна позитивна корелација помеѓу концентрацијата на нефринот и подокаликсинот во урината и гестациската старост на бременоста. Ова укажува на значењето на овие два маркери во предикција на прееклампсијата кај високо-ризични трудници.

Литературните податоци укажуваат на физиолошки повисоки вредности за ГФР кај трудниците и за намалување на стапката на ГФР кај трудниците со прееклампсија во споредба со здравите трудници [118]. Нашите резултати покажаа дека помеѓу нивото на уринарен нефрин односно подокаликсин и стапката на гломеруларна филтрација не постои статистички значајна корелација. Стапката на гломеруларна филтрација кај трите групи трудници според статистичката анализа не покажа значајна разлика помеѓу групите, имено кај сите три групи средната вредност е поголема од  $90 \text{ (ml min}^{-1} 1.73 \text{ m}^{-2}\text{)}$ . Во литературата не најдовме податоци за корелација помеѓу нивото на уринарен нефрин односно подокаликсин и стапката на гломеруларна филтрација кај трудници со ризик од појава на прееклампсија и кај трудници со прееклампсија.

ROC анализата кај оваа група покажа дека двата маркери имаат висока дијагностичка сензитивност и специфичност кај трудниците со прееклампсија. Специфичноста и сензитивноста на нефринот како независна променлива е со точност од 96% во дијагностиката на прееклампсија. Специфичноста и сензитивноста на подокаликсинот како независна променлива е со точност од 95% во дијагностиката на прееклампсијата. Двата маркери имаат точност од 100 % во дискриминирање помеѓу здравите трудници и трудниците со прееклампсија. Овие резултати за нефринот се во согласност со оние на Yang каде е најдена висока специфичност и сензитивност на нефринот во предикција на прееклампсијата [117]. Во литературата не најдовме податоци

за дискриминаторската моќ на подокаликсинот помеѓу здравите трудници и оние со прееклампсија.

Литературните податоци за СДС - ПАГ електрофоретска сепарација на уринарните протеини кај трудници со прееклампсија укажуваат дека оваа метода може да се користи како неинвазивна метода во проценка на тежината на прееклампсија [119]. Електрофоретската сепарација на уринарните протеини покажа дека кај групата со прееклампсија најзастапен тип на протеинурија е мешаната протеинурија (81%) додека ниту една трудница од оваа група немаше нормален електрофоретски наод. Овие резултати се во согласност со литературните податоци [119]. Кај групата трудници со ризик од појава на прееклампсија најзастапен тип на протеинурија е исто така мешаната протеинурија (70%), ваквиот наод укажува дека оваа метода може да се користи за проценка на ризик од развој на прееклампсија во комбинација со други скрининг методи и биохемиски маркери.

Резултатите од нашата докторска студија покажаа дека нефринот и подокаликсинот можат да се користат како значајни маркери за рана дијагноза на ДН и ХН како и за предикција на прееклампсијата кај високо-ризични трудници. Нефринот и подокаликсинот мерени во урината поединечно или заедно, во комбинација со одредување на стапката на гломеруларна филтрација и електрофоретска сепарација на уринарните протеини можат да служат како маркери за скрининг (рана дијагноза) на ДН, ХН и во предикција на прееклампсијата. Резултатите од студијата укажуваат и на поголемо дијагностичко значење на нефринот и подокаликсинот во раното откривање на ДН и ХН во однос на микроалбуминот кој досега се сметаше за златен стандард во нивно рано откривање.

Од резултатите кои произлегуваат од оваа студија можеме да дадеме и препорака до сите лица заболени од шеќерна болест тип 2, хипертензија и трудници кои носат некаков ризик за развој на компликации во текот на бременоста пред се прееклампсија, дека рано во текот на болеста односно бременоста треба да направат скрининг за бубрежно засегање преку квантификација на нефрин и подокаликсин во урина, со цел навремено да се преземат соодветни тераписки мерки за да се спречи прогресијата кон терминална бубрежна слабост или појава на сериозни компликации во текот на бременоста.

Потребни се натамошни лонгитудинални студии кои ќе вклучат поголем број испитаници во секоја група, како и вклучување на испитаници со други нефропатии, како

на пример испитанци со системски еритематозен лупус, ИгА нефропатија, испитаници со јувенилен дијабет, шеќерна болест тип 1, амилоидоза, примарни гломерулопатии кај деца и возрасни итн., за да може да се потврди огромното и широко значење на нефринот и подокаликсинот како скрининг маркери но и да се утврди дијагностичкото и диференцијално дијагностичкото значење на двата маркери кај сите гореневедени заболувања како би можело истите да се воведат како рутински маркери во секојдневната лабораториска пракса.



## 7. ЗАКЛУЧОЦИ

Главна цел на докторската студија беше да се утврди дали нефринот и подокаликсинот како специфични подоцитни протеини, поединечно или заедно имаат значење / улога во рано откривање на вклучените секундарни нефропатии во истражувањето.

Резултатите од докторската студија покажуваат дека овие два маркери поединечно и/или заедно се значајни во рано откривање на дијабетската и хипертензивната нефропатија и во предикција на прееклампијата.

Нефринот и подокаликсинот можат да бидат корисни маркери за рана дијагноза на дијабетската нефропатија поради следниве добиени резултати:

1. високиот процент, особено на нормоалбуминурични испитаници, со покачени вредности за нефрин и подокаликсин;
2. значително повисоки вредности за уринарен нефрин и подокаликсин кај подгрупите испитаници поделени според М/К однос и подгрупите со и без дијагностицирана дијабетска нефропатија во однос на здравите испитаници;
3. негативната корелација помеѓу концентрацијата на уринарниот нефрин односно подокаликсин и ГФР;
4. високата сензитивност и специфичност, односно дискриминаторска моќ на маркерите помеѓу здравите испитаници и испитаниците со ДН;
5. електрофоретски наод кој е во согласност со степенот на бубрежното оштетување кај подгрупите испитаници.

Нефринот и подокаликсинот можат да бидат корисни маркери за рана дијагноза на хипертензивна нефропатија поради следниве добиени резултати:

1. високиот процент, особено на нормоалбуминурични испитаници, со покачени вредности за нефрин и подокаликсин;
2. значително повисоки вредности за уринарен нефрин и подокаликсин кај подгрупите испитаниците поделени според М/К однос и под групите со и без дијагностицирана хипертензивна нефропатија во однос на здравите испитанци;
3. негативната корелација помеѓу концентрацијата на уринарниот нефрин односно подокаликсин и ГФР;

4. високата сензитивност и специфичност, односно дискриминаторска моќ на маркерите помеѓу здравите испитаници и испитаниците со ХН;
5. електрофоретски наод кој е во согласност со степенот на бубрежното оштетување кај подгрупите испитаници.

Нефринот и подокаликсинот можат да бидат корисни маркери за предикција на прееклампсијата кај високо-ризични трудници за појава на прееклампсија, поради следниве добиени резултати:

1. статистички значајни разлики во вредностите за уринарен нефрин односно подокаликсин помеѓу трудниците со ризик од појава на прееклампсија, со прееклампсија и здравите трудници;
2. високиот процент на трудници со покачени вредности за уринарен нефрин односно подокаликсин во подгрупите трудници со прееклампсија и ризик од појава на прееклампсија;
3. позитивната корелација помеѓу концентрацијата на уринарен нефрин односно подокаликсин и гестациската старост на бременоста;
4. високата сензитивност и специфичност, односно дискриминаторска моќ на нефринот и подокаликсинот помеѓу здравите трудници и оние со прееклампсија;
5. електрофоретски наод кој е во согласност со степенот на бубрежното оштетување кај подгрупите трудници.

**8. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА**

- [1] Kumagai T, Mouawad F, Takano T. Pathogenesis of common glomerular diseases – role of the podocyte cytoskeleton. *Cell Health and Cytoskeleton* 2012; 4:103-118.
- [2] Sekulic M, Pichler Sekulic S. A compendium of urinary biomarkers indicative of glomerular podocytopathy. *Pathol Res Int* 2013;2013:782395.
- [3] Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003; 83(1):253-307.
- [4] Behairy MA, Shakweer MM, El Said TW et al. Value of immunohistochemical expression of podocalyxin in active lupus nephritis. *Nefrologia* 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nefro.2017.06.008>
- [5] Barisoni L, Mundel P. Podocyte Biology and the Emerging Understanding of Podocyte Diseases. *Am J Nephrol* 2003;23:353-60.
- [6] Vogtlander NPJ, Dijkman H, Bakker MAH et al. Localization of alpha-dystroglycan on the podocyte: from top to toe. *J Histochem Cytochem* 2005;53:1345–1353.
- [7] Adler S. Characterization of glomerular epithelial cell matrix receptors. *Am J Pathol* 1992;141:571–578.
- [8] Trygvasson K, Patrakka J, Wartivaara J. Hereditary proteinuria syndromes and mechanism of proteinuria. *New Engl J Med* 2006;354:1387-401.
- [9] Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J et al. Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999;96:7962-7967.
- [10] Mundel P, Shankland SJ. Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 3005–3015.
- [11] de Zoysa JR and Topham PS. Podocyte biology in human disease. *Nephrology* 2005;10:362-367.
- [12] Jefferson JA, Alpers CE, Shankland SJ. Podocyte Biology for the Bedside. *Am J Kidney Dis.* 2011 ; 58(5):835-845.
- [13] Faul C, Asanuma K, Yanagida-Asanuma E et al. Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 2007;17(9):428–437.
- [14] Menzel S, Moeller MJ: Role of the podocyte in proteinuria. *Pediatr Nephrol* 2011; 26(10):1775–1780.

- [15] Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein—nephrin—mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998;1: 575–582.
- [16] Lenkkeri U, Antignac C, Kashtan CE et al. Structure of the gene for congenital nephrotic syndrome of the Finnish type (NPHS1) and characterization of mutations. *Am J Hum Genet* 1999; 64:51-61.
- [17] Putaala H, Soininen R, Kilpeläinen P et al. The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Hum Mol Genet.* 2001;10(1):1-8.
- [18] Astrom E, Rinta-Valkama J, Gylling M et al. Nephrin in human lymphoid tissues. *Cell Mol Life Sci* 2006, 63: 498–504.
- [19] Li XZ, He JC. An update: the role of Nephrin inside and outside the kidney. *Sci China Life Sci*, 2015, 58:649-657.
- [20] Grahmmer F, Schell C, Huber TB. The podocyte slit diaphragm—from a thin grey line to a complex signalling hub. *Nat Rev Nephrol* 2013, 9: 587–598.
- [21] Fahrig T, Landa C, Pesheva P et al. Characterization of binding properties of the myelin-associated glycoprotein to extracellular matrix constituents. *EMBO J*, 1987, 6: 2875–2883.
- [22] Yan K, Khoshnoodi J, Ruotsalainen V et al. N-linked glycosylation is critical for the plasma membrane localization of nephrin. *J Am Soc Nephrol*, 2002;13(5):1385–1389.
- [23] Gerke P, Huber TB, Sellin L et al. Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 918-926.
- [24] Lehtonen S, Lehtonen E, Kudlicka K et al. Nephrin forms a complex with adherens junction proteins and CASK in podocytes and in Madin-Darby canine kidney cells expressing nephrin. *Am J Pathol.* 2004;165(3):923-36.
- [25] Benzing T. Signaling at the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1382–91.
- [26] Doyonnas R, Nielsen JS, Chelliah S et al. Podocalyxin is a CD34-related marker of murine hematopoietic stem cells and embryonic erythroid cells. *Blood* 2005;105(11):4170–4178.
- [27] Orlando RA, Takeda T, Zak B et al. The glomerular epithelial cell anti-adhesin podocalyxin associates with the actin cytoskeleton through interactions with ezrin. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(80):1589–1598.
- [28] Nielsen JS and McNagny KM: The role of podocalyxin in health and disease. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20:1669–1676.

- [29] Kerjaschki D, Sharkey DJ, Farquhar MG. Identification and characterization of podocalyxin—the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J Cell Biol.* 1984;98(4):1591–1596.
- [30] Kerjaschki D, Poczewski H, Dekan G et al. Identification a major sialoprotein in the glycocalyx of human visceral glomerular epithelial cells. *J Clin Invest* 1986;78:1142-1149.
- [31] Sasseti C, Tangemann K, Singer MS et al. Identification of podocalyxin-like protein as a high endothelial venule ligand for L-selectin: Parallels to CD34. *J Exp Med* 1998;187: 1965–1975.
- [32] Li Y, Li J, Straight SW et al. PDZ domain mediated interaction of rabbit podocalyxin and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange regulatory factor-2. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002;282(6): F1129–F1139.
- [33] Doyonnas R, Kershaw DB, Duhme C et al. Anuria, omphalocele, and perinatal lethality in mice lacking the CD34-related protein podocalyxin. *J Exp Med* 2001;194(1) :13–27.
- [34] Takeda T, Go WY, Orlando RA et al. Expression of podocalyxin inhibits cell-cell adhesion and modifies junctional properties in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol. Biol. Cell* 2000;(11):3219-3232.
- [35] Nielsen JS, Graves ML, Chelliah S et al. The CD34-Related Molecule Podocalyxin Is a Potent Inducer of Microvillus Formation. *PLoS ONE* 2007; 2(2): e237.
- [36] Pollak MR. Inherited podocytopathies: FSGS and nephrotic syndrome from a genetic viewpoint. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:3016-23.
- [37] Barisoni L, Schnaper HW, Kopp JB. A proposed taxonomy for the podocytopathies: A reassessment of the primary nephrotic diseases. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007;2:529-42.
- [38] Wagrowska-Danilewicz M, Stasikowska O, Danilewicz M. Immunoexpression of podocyte-associated proteins in acquired human glomerulopathies with nephrotic syndrome. *Pol J Pathol* 2006;57:17-21.
- [39] Tervaert TW, Mooyaart AL, Amann K et al. Pathologic classification of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(4):556–563.
- [40] Ziyadeh FN, Wolf G. Pathogenesis of the Podocytopathy and Proteinuria in Diabetic Glomerulopathy. *Current Diabetes Reviews* 2008;4:39-45.
- [41] Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S et al. Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *J Clin Invest.* 1997;99(2):342-8.

- [42] Weil EJ, Lemley KV, Mason CC et al. Podocyte detachment and reduced glomerular capillary endothelial fenestration promote kidney disease in type 2 diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2012; 82: 1010–1017.
- [43] Mandache E, Penescu M. Nanostructural features of diabetic podocytopathy. *Rom J Morphol Embryol*. 2012;53:23–27.
- [44] Bjorn SF, Bangstad HJ, Hanssen KF et al. Glomerular epithelial foot processes and filtration slits in IDDM patients. *Diabetologia* 1995; 38: 1197-1204.
- [45] Meyer TW, Bennett PH, Nelson RG. Podocyte number predicts long-term urinary albumin excretion in Pima Indians with type II diabetes and microalbuminuria. *Diabetologia* 1999; 42: 1341–1344.
- [46] White KE, Bilous RW. Structural alterations to the podocyte are related to proteinuria in type 2 diabetic patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19(6):1437–1440.
- [47] Vestra MD, Masiero A, Roiter AM et al. Is podocyte injury relevant in diabetic nephropathy? Studies in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; 52:1031-5.
- [48] Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S et al. Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1379-83.
- [49] Endlich N, Kress KR, Reiser J et al. Podocytes respond to mechanical stress in vitro. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(3):413–422.
- [50] Seccia TM, Caroccia B, Calò LA. Hypertensive nephropathy. Moving from classic to emerging pathogenetic mechanisms. *J Hypertens*. 2017;35(2):205-212.
- [51] Fogo A, Breyer JA, Smith MC et al. Accuracy of the diagnosis of hypertensive nephrosclerosis in African Americans: a report from the African American Study of Kidney Disease (AASK) trial. AASK pilot study investigators. *Kidney Int* 1997; 51: 244–252.
- [52] Wang G, Lai FM, Kwan BC et al. Podocyte loss in human hypertensive nephrosclerosis. *Am J Hypertens* 2009;22:300–306.
- [53] Kretzler M, Koeppen-Hagemann I, Kriz W. Podocyte damage is a critical step in the development of glomerulosclerosis in the uninephrectomised-desoxycorticosterone hypertensive rat. *Virchows Arch*. 1994; 425: 181–193.
- [54] Craici IM, Wagner SJ, Bailey KR et al. Podocyturia predates proteinuria and clinical features of preeclampsia: A longitudinal prospective study. *Hypertension*. 2013; 61(6): 1289–1296.

- [55] Garovic VD, Wagner SJ, Turner ST et al. Urinary podocyte excretion as a marker for preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2007; 196:320 e321–327.
- [56] Patari A, Forsblom C, Havana M et al. Nephriuria in diabetic nephropathy of type 1 diabetes. *Diabetes* 2003;52: 2969–2974.
- [57] Jim B, Ghanta M, Qipo A et al. Dysregulated Nephtrin in Diabetic Nephropathy of Type 2 Diabetes: A Cross Sectional Study. *PLoS ONE.* 2012;7(5):e3604.
- [58] Shoji M, Kobayashi K, Takemoto M et al. Urinary podocalyxin levels were associated with urinary albumin levels among patients with diabetes. *Biomarkers* 2016;21(2):164-7.
- [59] Ye H, Bai X, Gao H et al. Urinary podocalyxin positive-element occurs in the early stage of diabetic nephropathy and is correlated with a clinical diagnosis of diabetic nephropathy. *J Diabetes Complicat* 2014 ;28:96–100.
- [60] Hara M, Yamagata K, Tomino Y et al. Urinary podocalyxin is an early marker for podocyte injury in patients with diabetes: establishment of a highly sensitive ELISA to detect urinary podocalyxin. *Diabetologia* 2012;55(11):2913-2919.
- [61] Perez-Hernandez J, Olivares D, Solaz E et al. Quantification of urinary protein levels of podocyte associated molecules in hypertensive patients with microalbuminuria. *Journal of Hypertension* 2017, 35(2):e13.
- [62] Wang Y, Zhao S, Loyd S et al. Increased urinary excretion of nephrin, podocalyxin, and  $\beta$ ig-h3 in women with preeclampsia. *Am. J. Physiol. Renal Physiol* 2012; 302(9) F1084–F1089.
- [63] Son GH, Kwon JY, Lee S et al. Comparison of serum and urinary nephrin levels between normal pregnancies and severe preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013;166(2)139–144.
- [64] Jim B, Mehta S, Qipo A et al. A comparison of podocyturia, albuminuria and nephriuria in predicting the development of preeclampsia: A Prospective Study, *PLOS ONE*, 2014, DOI: 10.1371/journal.pone.0101445.
- [65] Jung YJ, Cho HY, Cho S et al. The Level of Serum and Urinary Nephrin in Normal Pregnancy and Pregnancy with Subsequent Preeclampsia. *Yonsei Med J.* 2017;58(2):401-406.
- [66] Palacios de Franco Y, Velazquez K, Segovia N et al. Urinary podocalyxin as a marker of preeclampsia in a Hispanic population. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2014;6(2):115-124.

- [67] Barratt J, Topham P. Urine proteomics: the present and future of measuring urinary protein components in disease. *Can. Med. Assoc. J.* 2007;177(4):361–368.
- [68] Cockcroft DW and MH Gault. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron.* 1976. 16(1):31-41.
- [69] KDIGO 2012. Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney international supplements*, 2013; volume 3, issue 1.
- [70] Witte EC, Lambers Heerspink HJ, de Zeeuw D et al. First Morning Voids Are More Reliable Than Spot Urine Samples to Assess Microalbuminuria. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20(2): 436–443.
- [71] Gorg A, Postel W, Weser J et al. Horizontal SDS electrophoresis in ultrathin pore-gradient gels for the analysis of urinary proteins. *Science Tools* 1985; 32(1):5-9.
- [72] Hennessy A and Makris A. Preeclamptic nephropathy. *Nephrology* 2011 Feb;16(2):134-43.
- [73] Fiseha T. Urinary biomarkers for early diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients. *Biomark Res* 2015; 3:16.
- [74] Mehta S, Cabrera VJ, Upputalla R, Jim B. Urinary biomarkers of diabetic nephropathy. *Curr Biomark Find* 2013;3 67–78.
- [75] Araki S. Novel biomarkers for diabetic nephropathy. *Rinsho Byori.*2014;62(2):171-9.
- [76] Kandasamy Y, Smith R , Lumbers ER et al. Nephrin – a biomarker of early glomerular injury. *Biomark Res* 2014; 2:21.
- [77] Tang SCW, Chan GCW , Lai KN. Recent advances in managing and understanding diabetic nephropathy [version 1; referees: 3 approved]. *F1000Research* 2016, 5 (F1000 Faculty Rev):1044
- [78] De Boer IH, Rue TC, Hall YN et al. Temporal trends in the prevalence of diabetic kidney disease in the United States. *JAMA* 2011 ; 305: 2532-2539.
- [79] Pavkov ME et al. Effect of youth-onset type 2 diabetes mellitus on incidence of end-stage renal disease and mortality in young and middle-aged Pima Indians. *JAMA* 2006; 296:421-426.
- [80] Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 1993 ;329(20):1456-62.
- [81] Gross JL, de Azevedo MJ, Silveiro SP et al. Diabetic Nephropathy: Diagnosis, Prevention, and Treatment. *Diabetes Care.* 2005;28(1):164-176.



- [82] Mogensen CE. Microalbuminuria as a predictor of clinical diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1987;31:673–689.
- [83] Tabaei BP, Al-Kassab AS, Ilag LL et al. Does Microalbuminuria Predict Diabetic Nephropathy? *Diabetes Care* 2001; 24(9): 1560-1566.
- [84] Haffner SM, Stern MP, Gruber MK et al. Microalbuminuria. Potential marker for increased cardiovascular risk factors in nondiabetic subjects? *Arteriosclerosis*. 1990;10:727–731.
- [85] Rigalleau V, Lasseur C, Raffaitin C et al. Normoalbuminuric Renal-Insufficient Diabetic Patients. *Diabetes Care* 2007;30:2034–9.
- [86] MacIsaac RJ, Tsalamandris C, Panagiotopoulos S et al . Nonalbuminuric renal insufficiency in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004;27:195–200.
- [87] Caramori ML, Fioretto P, Mauer M. Low glomerular filtration rate in normoalbuminuric type 1 diabetic patients: An indicator of more advanced glomerular lesions. *Diabetes* 2003;52(4), 1036–1040.
- [88] Petrica L, Vlad A, Gluhovschi G et al. Proximal tubule dysfunction is associated with podocyte damage biomarkers nephrin and vascular endothelial growth factor in type 2 diabetes mellitus patients: a cross-sectional study. *PLoS One*. 2014;9:e112538.
- [89] Jain S, Rajput A, Kumar Y et al. Proteomic analysis of urinary protein markers for accurate prediction of diabetic kidney disorder. *JAPI* 2005, 53: 513-20.
- [90] Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN. From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. *Diabetes* 2005; 54: 1626–1634.
- [91] Ng DPK, Tai BC, Tan E et al. Nephrinuria associates with multiple renal traits in type 2 diabetes. *Nephrol Dial Transpl* 2011;26:2508–14.
- [92] Weiss W, Weiland F, Görg A. Protein detection and quantitation technologies for gel-based proteome analysis. *Methods Mol Biol*, 2009; 564(4):59-82.
- [93] Suenaga K. Analysis of urinary protein in diabetics; its clinical implications as a predictor of nephropathy. *Nihon Jinzo Gakkai Shi* 1991; 33:43–52.
- [94] Ponchiardi C, Mauer M, Najafian B. Temporal Profile of Diabetic Nephropathy Pathologic Changes. *Current Diabetes Reports* 2013; 13(4):592–599.
- [95] White K. Histological appearance of Diabetic Nephropathy. *Diapedia* 2014;7105002828.

- [96] USRDS. 2002 Annual Data Report. Atlas of end-stage renal disease in the United States: incidence and prevalence. *Am J Kidney Dis.* 2003; 41: S41–S56.
- [97] Hart DP, Bakris LG. Hypertensive nephropathy: prevention and treatment recommendations. *Expert Opin. Pharmacother.* 2010; 11:2675-2686.
- [98] Freedman BI, Iskandar SS, Appel RG. The link between hypertension and nephrosclerosis. *Am J Kidney Dis* 1995; 25(2):207-21.
- [99] Kato T, Mizuguchi N, Ito A. Candesartan suppresses proteinuria and decrease of nephrin expression but hydralazine does not in hypertensive nephropathy. *J Biomed* 2017; 2(2):57-63.
- [100] Murea M and Freedman BI. Essential hypertension and risk of nephropathy: a reappraisal. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2010;19(3):235-241.
- [101] Mancia G, De Backer G, Dominiczak A et al. Guidelines for the management of arterial hypertension: the task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens* 2007; 25: 1105-87.
- [102] Chobanian AV, Bakris GL, Black HR et al. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 2003; 42: 1206-52.
- [103] Glassrock RJ. Proteinuria. In: Massry SJ, Glassrock RJ, eds. *Textbook of nephrology*. 3d ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995:602.
- [104] Hutcheon JA, Lisonkova S, Joseph KS. Epidemiology of preeclampsia and the other hypertensive disorders of pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011;25(4):391–403.
- [105] Kar M. Role of Biomarkers in Early Detection of Preeclampsia. *J Clin Diagn Res.* 2014; 8(4): BE01–BE04.
- [106] Say L, Chou D, Gemmill A et al. Global causes of maternal death: a WHO systematic analysis. *Lancet Glob Health* 2014;2(6):323–33.
- [107] Ngoc NT, Merialdi M, Abdel-Alem H et al. Causes of stillbirths and early neonatal deaths: data from 7993 pregnancies in six developing countries. *Bull World Health Organ.* 2006;84(9):699–705.
- [108] Bujold E, Morency AM, Roberge S et al. Acetylsalicylic acid for the prevention of preeclampsia and intra-uterine growth restriction in women with abnormal uterine artery Doppler: a systematic review and meta-analysis. *J Obstet Gynaecol Can* 2009 ; 31(9):818-26.

- [109] Mikat B, Gellhaus A, Wagner N et al. Early Detection of Maternal Risk for Preeclampsia. *ISRN Obstetrics and Gynecology* 2012:172808.
- [110] Grill S, Holzgreve W, Hahn S et al. Potential markers of preeclampsia – a review. *Reproductive Biology and Endocrinology RB&E* 2009;7:70.
- [111] Anderson UD, Olsson MG, Kristensen KH et al. Review: Biochemical markers to predict preeclampsia. *Placenta* 33, Supplement A, *Trophoblast Research*, 2012; (26) S42eS47.
- [112] Masoura S, Kalogiannidis IA, Gitas G et al. Biomarkers in pre-eclampsia: A novel approach to early detection of the disease. *J Obstet Gynaecol* 2012;32:609-616.
- [113] De Muro P, Capobianco G, Lepedda AJ et al. Plasma PP13 and urinary GAGs/PGs as early markers of pre-eclampsia. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 2016;294: 959–965.
- [114] Litwińska E, Litwińska M, Oszukowski P et al. Biochemical markers in screening for preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Ginekol Pol.* 2015;86(8):611-5
- [115] Weissgerber TL, Craici IM, Wagner SJ et al. Advances in the pathophysiology of pre-eclampsia and related podocyte injury. *Kidney International*, 2014; 86(2), 275-285.
- [116] Garovic VD. The Role of the Podocyte in Preeclampsia. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014; 9: 1337–1340.
- [117] Yang GY, Lee KA, Park MH et al. Urinary nephrine: A new predictive marker for pregnancies with preeclampsia and small for gestational age infants *Obstet Gynecol Sci.* 2013;56(1):22–28.
- [118] Moran P, Lindheimer MD, Davison JM. The renal response to preeclampsia. *Seminars in nephrology* 2004;24(6):588-595.
- [119] Moodley J, Malleck N, Ramjee G, Randeree I. Clinical significance of sodium dodecyl sulfate polyacrylamde gel electrophoresis of urinary proteins in preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 1997; 16:11-7.

# Прилози

# **1. Nephrin and Podocalyxin - New markers for early detection of secondary nephropathies – *review article***

---

*Irena Kostovska, Katerina Tosheska Trajkovska, Svetlana Cekovska, Goce Spasovski, Danica Labudovic.*

*BANTAO Journal 2016;14(1):11-16.*

## Review article

## Nephrin and Podocalyxin - New Podocyte Proteins for Early Detection of Secondary Nephropathies

Irena Kostovska<sup>1</sup>, Katerina Tosheska Trajkovska<sup>1</sup>, Svetlana Cekovska<sup>1</sup>, Goce Spasovski<sup>2</sup> and Danica Labudovic<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical and Experimental Biochemistry, <sup>2</sup>Department of Nephrology, Medical Faculty, Skopje, University "Ss Cyril and Methodius", Skopje, Republic of Macedonia

### Abstract

In the last two decades a great progress was observed in understanding of podocytes, their specific structure and function identifying many specific podocyte proteins, such as nephrin and podocalyxin. Podocytes form the final barrier to plasma proteins leakage. Nephrin as a main component of the filtration diaphragm forms a physical barrier while podocalyxin as sialoglycoprotein forms an electrostatic barrier. Podocyte damage, i.e. podocytopathies and their loss through urine-podocyturia, are crucial in pathogenesis and progression of nephropathies with proteinuria as main clinical manifestation. In podocytopathies, nephrin and podocalyxin appear in the urine before proteinuria and microalbuminuria which were previously considered as earliest markers of nephropathies. Nephrinuria and podocalyxuria indicate damage of the podocytes on glomerular level and/or presence of apoptotic and necrotic podocytes in urine. These urinary markers are also important in early

diagnosis of secondary nephropathies such as diabetic, lupus and hypertensive nephropathy as the most common causes of end-stage renal failure (ESRF). These markers are also important in the prediction of preeclampsia, which is the most common complication in pregnancy. In this review we elaborate in dept the main structural and functional features of podocytes and their specific proteins, nephrin and podocalyxin, summarizing the recent literature data on their importance in the early diagnosis of the most common secondary nephropathies.

**Keywords:** nephrin, podocalyxin, podocytes, podocytopathies, secondary nephropathies

### Introduction

Nephrin and podocalyxin are specific podocyte proteins. Podocytes are terminally differentiated cells creating

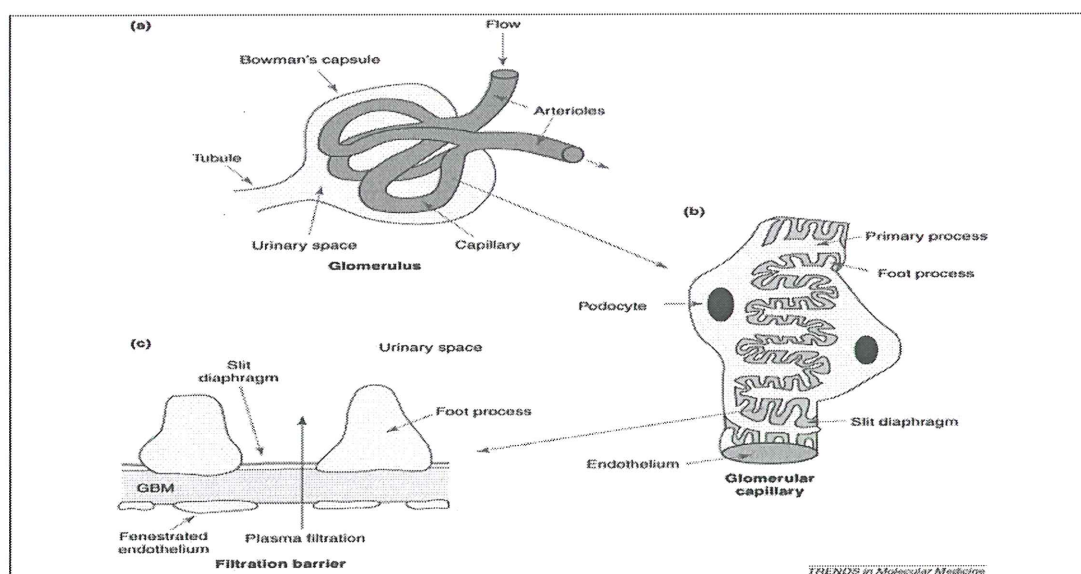


Fig. 1. a) Structure of the glomerulus b) structure of the glomerular filtration barrier c) structure of the slit diaphragm [3]

Correspondence to: Irena Kostovska, Bul "Treta Makedonska Brigada" 31b/14, 1000 Skopje, R. Macedonia; Phone: +389 78 20 89 90; E-mail: irenakostovska22@yahoo.com

the visceral epithelial layer of the glomerulus. The glomerulus is a network of capillary loops surrounded by the Bowman's capsule and performs the first step of blood filtering. As a selective filter, based on its size and charge, the glomerulus allows passage of materials that circulate through blood, creating primary ultrafiltrate. This selectivity is based on the structural integrity of the three main components of the glomerular filtration barrier: the fenestrated vascular endothelium, the glomerular basement membrane (GBM), and the visceral epithelium overlying the GBM. Podocytes as a part of glomerular filtration barrier have foot processes that encircle the GBM. The interdigitating foot process of podocytes is joined by a slit diaphragm. Slit diaphragm is described as a zipper-like interaction of membrane proteins such as nephrin molecules between neighboring podocyte foot processes. The slit diaphragm has an essential role in size selectivity of the glomerular filtration barrier [1,2]. Figure 1 illustrates the structure of the glomerulus, glomerular filtration barrier and filtration diaphragm also called slit diaphragm.

#### *Nephrin - (NPH), structure and function*

Nephrin was first discovered in 1998 as a mutant product of NPHS1 gene, which was first cloned by Kestila and colleagues in children with Finnish type of congenital nephrotic syndrome-(Congenital nephrotic syndrome of the Finnish type-CNF). CNF is an autosomal recessive disease characterized by massive proteinuria in utero and symptoms of nephrotic syndrome (hypoalbuminemia, hyperlipidemia and swelling) that occur in the first days after birth. Renal biopsy in these children shows obliteration of podocyte foot processes and lack of slit

diaphragm [4]. In mice inactivation of NPHS1 gene causes massive proteinuria and death in the first 24 hours after birth [5]. This suggests the importance of nephrin in the process of glomerular filtration as a structural component of the slit diaphragm. Nephrin is exclusively expressed by podocytes but also may be expressed in brain, lymphoid tissue, heart, testis, placenta and  $\beta$  cells of the Langerhan's islets of the pancreas [6]. NPHS1 gene is located on chromosome 19 (19q13.1), organized in 29 exons [7]. Nephrin has 1241 amino acids with molecular weight of 180 kDa (135 kDa without posttranslational modification). It is a transmembrane glycoprotein belonging to the immunoglobulin superfamily of cell-adhesion receptors. It contains eight extracellular Ig like domains, followed by a fibronectin type III-like module, a short transmembrane domain and a cytoplasmic C-terminus. Cytoplasmic segment contains nine tyrosine residues which are phosphorylated in interaction with other nephrin molecules, a process which is very important in the intracellular signaling. Nephrin has three cysteines in the extracellular segment that are important in the podocyte foot process interaction, described as zipper interaction in the center of the slit diaphragm. As a major component of the slit diaphragm, nephrin forms the physical barrier to plasma proteins [8]. Nephrin is important in organization and maintenance of integrity of podocyte cytoskeleton and as a signal molecule, through several signaling pathways, regulates the shape and structure of the podocytes and slit diaphragm [9,10]. Nephrin is located laterally on the foot processes and it is a major component of the slit diaphragm (Figure 2).

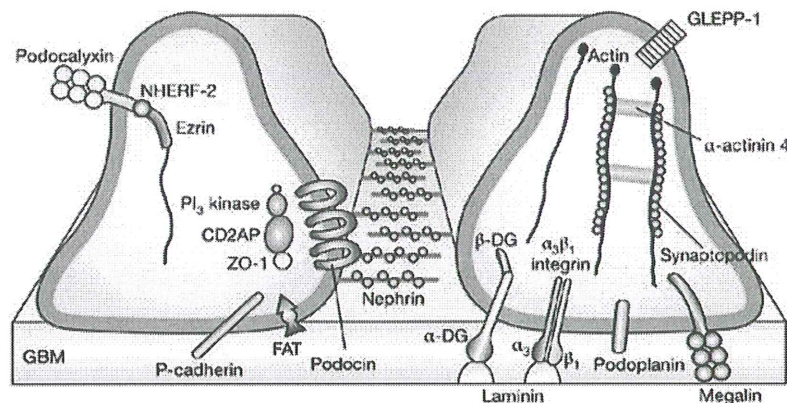


Fig. 2. Arrangement of the podocyte foot process and slit diaphragm proteins. Localization of nephrin and podocalyxin in podocytes [11]

#### *Podocalyxin - (PODXL), structure and function*

Podocalyxin is an anionic transmembrane protein localized at the apical surface of the podocytes (Figure 2); it may also be expressed on the surface of hematopoietic

progenitor cells, vascular endothelial cells, neurons and numerous tumor cells [12]. Podocalyxin is a main sialoglycoprotein of the podocyte glycocalyx, which primarily has been identified in mice, and later in the humans. As sialoglycoprotein, podocalyxin forms the

electrostatic barrier to plasma proteins. Podocalyxin is a member of the CD34 (Cluster of Differentiation 34) family with a molecular weight of 140 kDa. The extracellular part of podocalyxin is rich in serine, threonine and proline, containing O-glycosylated, sialysed and N-glycosylated domain. The intracellular part has several phosphorylation sites along one protein interaction domain, through which domain, podocalyxin interacts with Na / H exchanger regulatory factor 1 and 2 (NHERF1 and NHERF2) [13-16]. Podocalyxin interacts with ezrin molecules that are part of the podocyte cytoskeleton [17]. Podocalyxin is important in the development of glomeruli and mice that do not express podocalyxin were found to have disrupted architecture of the podocytes and showed absence of foot processes and slit diaphragm [18]. Since sialomucin has cell-cell antiadhesive effect, which is important to keep the filtration pores open and prevent conglomeration of the parietal and visceral epithelial layer of Bowman's capsule. All these processes are important to keep the normal glomerular filtration [14]. Podocalyxin is a major hallmark of podocyte phenotype and preferred protein marker for the detection and identification of podocyte with immunofluorescence technique in bioptic material and urine.

### **Podocytopathies**

In recent years the attention of scientists, especially nephrologists and pathologists, has been focused on the role of podocytes in the pathogenesis of glomerulopathies or nephrotic syndrome. Furthermore, a great progress has been achieved in the study of the biology of podocytes, their function and mechanisms of their impairment. The response to injury of podocytes as highly differentiated cells is not typical and once they are damaged, there is a progression towards glomerulosclerosis [19,20]. The etiology of podocytopathies may be different: immunological, mechanical, infectious, metabolic, toxic, genetic etc. Reaction of podocytes to etiological factors can be different:

1. foot process effacement without changes in the number of podocytes,
2. apoptosis and loss of podocytes,
3. changes in development of podocytes and their proliferation,
4. de-differentiation.

Hence, based on the histological changes there are four types of podocytopathies:

1. minimal change nephropathy with normal number of podocytes,
2. focal segmental glomerulosclerosis with podocytopenia,
3. diffuse mesangial sclerosis with low proliferative index,
4. collapsing glomerulopathy with high proliferative index [21].

Diagnosis of podocytopathies includes morpho-pathological examination by light and electron microscopy of

bioptic kidney material, immunohistochemistry-identification of specific proteins of podocytes in the bioptic material, detection and quantification of circulating biomarkers, detection and quantification of urinary biomarkers (Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Western blot, immunofluorescence, flow cytometry, mass spectrometry and Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for detection of mRNA of specific podocyte proteins), genetic analyses in hereditary podocytopathies [2,22].

### **Diagnostic relevance of nephrin and podocalyxin in secondary nephropathies**

Specific podocyte proteins, nephrin and podocalyxin are relatively new urinary markers for detection of nephropathies. The diagnostic advantages of these markers are: high specificity, non-invasive detection, monitoring of nephropathies, and they can be measured by relatively simple and sensitive methods such as ELISA. This is in agreement with the statement of Walter Piering, MD: "Urine is the liquid biopsy of the kidney". Relevance as an early diagnostic marker is reserved for secondary nephropathies such as diabetic, lupus, hypertensive and preeclampsia. Early nephropathy detection may allow timely treatment and prevention for the need of renal replacement therapy as well as significant reduction of complications and mortality in these patients.

### **Nephrinuria and podocalyxuria in diabetic nephropathy**

The podocytopathies play a critical role in the early functional and structural changes of diabetic kidney disease [23]. In diabetic nephropathy (DN) there is a decreased podocyte number and/or density as a result of apoptosis or detachment, GBM thickening and a reduction in nephrin protein in the slit diaphragm with podocyte foot process effacement [24]. Pathohistologically, DN begins with hypertrophy and hyperactivity of podocytes which lead to damage of the slit diaphragm. In advanced stage there is an ensuing atrophy of podocytes, narrowing of the foot processes, fragmentation and detachment of podocytes from GBM. All these changes lead to proteinuria [24,25]. Thus, a significant increase of foot processes width is noted in histomorphological studies in diabetic patients with advanced nephropathy and proteinuria [26]. Diabetic Pima Indians with clinical nephropathy have fewer glomerular epithelial cells compared to those with less-advanced renal disease and also there is a correlation between the number of podocytes and the degree of proteinuria. In this study, it has been shown that the number of glomerular podocytes is the best predictor of glomerular damage in diabetics [27]. In another cohort study including patients with type 2 diabetes a significant reduction was found in the number of glomerular podocytes



even in the normoalbuminuric patients [28]. In one Japanese study podocytes were detected in the urine in 53% of microalbuminuric patients and 80% of macroalbuminuric patients with type 2 diabetes. In the same study, trandolapril reduced urinary albumin excretion, as well as urinary podocytes in patients with DN. This study showed that podocyturia can be a useful marker for disease activity and trandolapril can be useful drug in DN [29]. All these studies suggest that morphological changes in podocytes are present before appearance of proteinuria. In the study of Patari, nephrinuria was present in 30% of normoalbuminuric, 17% of microalbuminuric, 28% of macroalbuminuric, 28% of new-microalbuminuric patients and 0% in control subjects. This study reconfirmed that nephrinuria may have a prognostic value in DN [30]. It was also observed that the number of urinary podocalyxin-positive elements (PCX+EL) may be significantly increased in the early course of DN compared to health controls and correlated well with the clinical diagnosis of DN, especially in the stage of normoalbuminuria [31]. Hara *et al.* found that urinary podocalyxin was significantly higher in 53.8% of normoalbuminuric, 64.7% of microalbuminuric and 66.7% of macroalbuminuric patients with DN. Thus, podocalyxin measured in urine by the ELISA method can be used as a marker for early detection of diabetic nephropathy [32].

#### *Nephrinuria and podocalyxuria in preeclampsia*

Preeclampsia is a pregnancy-specific disorder associated with significant maternal-fetal morbidity and mortality. Hypertension (>140/90 mm Hg) and proteinuria (>300 mg in a 24-hour urine) are the main clinical manifestations of preeclampsia, which usually occurs after 20 weeks of gestation. Preeclampsia is a secondary nephropathy that includes damage to podocytes and their loss on glomerular level that leads to proteinuria. One study demonstrated that podocyturia was present in pregnant women who developed preeclampsia, at a time when hypertension and proteinuria were absent, suggesting that podocyturia may serve as a predictive marker in preeclampsia. In addition, there was a positive correlation between the number of podocytes and the degree of proteinuria, suggesting that podocyte loss may be related to the onset and severity of proteinuria [33]. In a study of Garovic *et al.* podocyturia exhibited 100% sensitivity and 100% specificity in the diagnosis of preeclampsia [34]. On the other hand, in the study of Wang urine nephrin and podocalyxin levels were found significantly higher in women with preeclampsia compared to those in normal pregnant [35]. Son *et al.* also found a positive correlation between urinary nephrin and proteinuria, creatinuria and diastolic blood pressure in preeclamptic women, which indicate the importance of nephrin in the pathogenesis of proteinuria in preeclampsia and the ability to be a reliable indicator of renal damage [36]. On the other hand, Jim *et al.* found that

nephrinuria had 57% sensitivity and 58% specificity as a diagnostic tool in preeclampsia [37]. In pregnant women with preeclampsia and eclampsia in Paraguay elevated concentrations of podocalyxin in urine were found regardless of the presence of proteinuria. In fact, podocalyxin concentration in urine correlated with the degree of damage to podocytes [38]. In the same study the quantification of urinary podocalyxin was made by the ELISA method as a relatively inexpensive, simple and also a useful method for detecting damage of podocytes.

#### *Nephrinuria and podocalyxuria in hypertensive nephropathy*

Hypertensive nephropathy or hypertensive nephrosclerosis is a medical condition referring to damage to the kidney due to the high blood pressure. This is the second most common cause of ESRF [39]. Podocyte damage is important in the pathogenesis of hypertensive nephropathy, but human data on the mechanisms of damage to podocytes in hypertension are yet limited. However, it is supposed that mechanical damage of podocyte cytoskeleton is crucial in pathogenesis of the hypertensive podocytopathy [40]. Pathohistological examination of bioptic material in hypertensive adult Africans showed that 13% of them presented with typical focal segmental glomerulosclerotic lesions [41]. The study of Wang demonstrated the presence of podocytopenia on glomerular level and reduced intrarenal gene expression of podocyte-associated molecules in patients with hypertensive nephropathy. These findings were in correlation with renal function and the degree of renal fibrosis, suggesting that podocyte loss may play an important role in the pathogenesis of hypertensive nephropathy [42].

#### *Nephrinuria and podocalyxuria in lupus nephropathy*

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an inflammatory autoimmune disease characterized by the production of antinuclear antibodies. As a multi-organ disease SLE involves the kidney. Lupus nephritis (LN) patients present with proteinuria that has generally been associated with immune complex deposition in the glomerular capillary wall and endo-capillary proliferation and inflammation [43]. A decreased number of glomerular podocytes, an association between proteinuria and decreased podocyte numbers in lupus glomerulus and an increased excretion of urinary podocytes in patients with lupus nephritis have been recently found [44]. Interestingly, it has also been found that in patients with SLE there are increased urinary levels of podocyte proteins, nephrin and podocalyxin. Thus, urinary podocalyxin/creatinine ratio may be used as a non-invasive marker for pathological impact of SLE on the kidney [45].

## Conclusion

Nephrin and podocalyxin are relatively new markers for detection of podocytopathies. They appear in urine before microalbuminuria and proteinuria and therefore may be useful in the early diagnosis of secondary nephropathies. They have a great importance as auxiliary tools in the diagnosis, differential diagnosis and prognosis in primary nephropathies, reducing the requirement of indications for renal biopsy. The meaning of early diagnostic markers is reserved for secondary nephropathies because in the primary nephropathies proteinuria is often the first clinical manifestation. Nephrin and podocalyxin are important as markers for early detection of secondary nephropathies such as diabetic, lupus, and hypertensive, which are the most common causes of end-stage renal disease. These markers are also important in the prediction of preeclampsia as a leading cause of complications during pregnancy. Early detection of these secondary nephropathies will allow timely treatment and reduce complications and mortality. The advantage of these urinary markers is high specificity and sensitivity for secondary nephropathies and ability to be measured by relatively inexpensive, simple and non-invasive methods. Nephrin and podocalyxin have a promising potential as diagnostic and prognostic markers for clinicians and researchers, but more extensive clinical research is required to assess their true diagnostic and prognostic value. These markers are also new potential therapeutic targets in renal diseases.

*Conflict of interest statement.* None declared.

## References

- Kumagai T, Mouawad F, Takano T. Pathogenesis of common glomerular diseases-role of the podocyte cytoskeleton. *Cell Health and Cytoskeleton* 2012; 4: 103-118.
- Sekulic M, Pichler Sekulic S. A compendium of urinary biomarkers indicative of glomerular podocytopathy. *Pathol Res Int* 2013; 2013: 782395.
- Patrakka J, Tryggvason K. Nephrin-a unique structural and signaling protein of the kidney filter. *Mol Med* 2007; 13(9): 396-403.
- Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein-nephri-mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998; 1: 575-582.
- Putaala H, Soininen R, Kilpelainen P, et al. The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Hum Mol Genet* 2001; 10(1): 1-8.
- Li XZ, He JC. An update: the role of Nephrin inside and outside the kidney. *Sci China Life Sci* 2015; 58: 649-657.
- Lenkkeri U, Antignac C, Kashtan CE, et al. Structure of the gene for congenital nephrotic syndrome of the Finnish type (NPHS1) and characterization of mutations. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 51-61.
- Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, et al. Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 7962-7967.
- Lehtonen S, Lehtonen E, Kudlicka K, et al. Nephrin forms a complex with adherens junction proteins and CASK in podocytes and in Madin-Darby canine kidney cells expressing nephrin. *Am J Pathol* 2004; 165(3): 923-936.
- Benzing T. Signaling at the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(6): 1382-91.
- Alain Meyrier. Mechanisms of Disease: focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Clin Pract Nephrol* 2005; 1: 44-54.
- Doyonnas R, Nielsen JS, Chelliah S, et al. Podocalyxin is a CD34-related marker of murine hematopoietic stem cells and embryonic erythroid cells. *Blood* 2005; 105 (11): 4170-4178.
- Orlando RA, Takeda T, Zak B, et al. The glomerular epithelial cell anti-adhesin podocalyxin associates with the actin cytoskeleton through interactions with ezrin. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12(80): 1589-1598.
- Kershaw DB, Beck SG, Wharram BL, et al. Molecular cloning and characterization of human podocalyxin-like protein. Orthologous relationship to rabbit PCLP1 and rat podocalyxin. *J Biol Chem* 1997; 272: 15708-15714.
- Kerjaschki D, Sharkey DJ, Farquhar MG. Identification and characterization of podocalyxin-the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J Cell Biol* 1984; 98 (4): 1591-1596.
- Li Y, Li J, Straight SW, et al. PDZ domain-mediated interaction of rabbit podocalyxin and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange regulatory factor-2. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 282(6): F1129-F1139.
- Doyonnas DB Kershaw, Duhme C, et al. Anuria, omphalocele, and perinatal lethality in mice lacking the CD34-related protein podocalyxin. *J Exp Med* 2001; 194(1): 13-27.
- Takeda T, Go WY, Orlando RA, et al. Expression of podocalyxin inhibits cell-cell adhesion and modifies junctional properties in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 2000; (11): 3219-3232.
- Pollak MR. Inherited podocytopathies: FSGS and nephrotic syndrome from a genetic viewpoint. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 3016-3023.
- Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol rev* 2003; 83(1): 253-307.
- Barisoni L, Schnaper HW, Kopp JB. A proposed taxonomy for the podocytopathies: A reassessment of the primary nephrotic diseases. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007; 2: 529-542.
- Wagrowska-Danilewicz M, Stasikowska O, Danilewicz M. Immunoreexpression of podocyte-associated proteins in acquired human glomerulopathies with nephrotic syndrome. *Pol J Pathol* 2006; 57: 17-21.
- Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN. From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. *Diabetes* 2005; 54: 1626-1634.
- FN Ziyadeh, G Wolf. Pathogenesis of the Podocytopathy and Proteinuria in Diabetic Glomerulopathy. *Current Diabetes Reviews* 2008; 4: 39-45.
- Mandache E, Penescu M. Nanostructural features of diabetic podocytopathy. *Rom J Morphol Embryol* 2012; 53: 23-27.
- Bjorn SF, Bangstad HJ, Hanssen KF, et al. Glomerular epithelial foot processes and filtration slits in IDDM patients. *Diabetologia* 1995; 38: 1197-1204.
- Meyer TW, Bennett PH, Nelson RG. Podocyte number predicts long-term urinary albumin excretion in Pima Indians with type II diabetes and microalbuminuria. *Diabetologia* 1999; 42: 1341-1344.
- Vestra MD, Masiero A, Roiter AM, et al. Is podocyte injury relevant in diabetic nephropathy? Studies in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; 52: 1031-1035.

29. Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, *et al*. Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1379-1383.
30. Patari A, Forsblom C, Havana M, *et al*. Nephriuria in diabetic nephropathy of type 1 diabetes. *Diabetes* 2003; 52: 2969-2974.
31. Ye H, Bai X, Gao H, *et al*. Urinary podocalyxin positive-element occurs in the early stage of diabetic nephropathy and is correlated with a clinical diagnosis of diabetic nephropathy. *J Diabetes Complicat* 2014; 28: 96-100.
32. Hara M, Yamagata K, Tomino Y, *et al*. Urinary podocalyxin is an early marker for podocyte injury in patients with diabetes: establishment of a highly sensitive ELISA to detect urinary podocalyxin. *Diabetologia* 2012; 55(11): 2913-2919.
33. Iasmina M Craici, Steven J Wagner, Kent R Bailey, *et al*. Podocyturia predates proteinuria and clinical features of preeclampsia: A longitudinal prospective study. *Hypertension* 2013; 61(6): 1289-1296.
34. Garovic VD, Wagner SJ, Turner ST, *et al*. Urinary podocyte excretion as a marker for preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 196: 320 e321-e327.
35. ang YW, Zhao S, Loyd S, *et al*. Increased urinary excretion of nephrin, podocalyxin, and  $\beta$ ig-h3 in women with preeclampsia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012; 302(9): F1084-F1089.
36. Son GH, Kwon JY, Lee S, *et al*. Comparison of serum and urinary nephrin levels between normal pregnancies and severe preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013; 166(2): 139-144.
37. Jim B, Mehta S, Qipo A, *et al*. A comparison of podocyturia, albuminuria and nephriuria in predicting the development of preeclampsia: prospective study. *PLoS One* 2014; 9: e101445. 10.1371/journal.pone.0101445.
38. Palacios de Franco Y, Velazquez K, Segovia N, *et al*. Urinary podocalyxin as a marker of preeclampsia in a Hispanic population. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 2014; 6(2): 115-124.
39. Rishi Sharma, Surineni Kamalakar, Ellen McCarthy, *et al*. Proteinuria in Hypertensive Nephropathy: A Review. *Open Journal of Nephrology* 2014; 4: 92-99.
40. Endlich N, Kress KR, Reiser J, *et al*. Podocytes respond to mechanical stress in vitro. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12(3): 413-422.
41. Fogo A, Breyer JA, Smith MC, *et al*. Accuracy of the diagnosis of hypertensive nephrosclerosis in African Americans: a report from the African American Study of Kidney Disease (AASK) trial. AASK pilot study investigators. *Kidney Int* 1997; 51: 244-252.
42. Wang G Lai, Kwan FM, Lai BC, *et al*. Podocyte loss in human hypertensive nephrosclerosis. *Am J Hypertens* 2009; 22: 300-306.
43. Gao J, Cai GY, Liu SW, *et al*. Characteristics and influence factors of pathologic transformation in the subclasses of class IV lupus nephritis. *Rheumatol Int* 2012; 32(6): 1751-1759.
44. Bollain-y-Goytia JJ, Gonzalez-Castaneda M, Torres-del-Muro F, *et al*. Increased excretion of urinary podocytes in lupus nephritis. *Indian J Nephrol* 2011; 21: 166-171.
45. Ahmed T, Abou Ghanima, Mohammed F. Almaghraby, Hossam M. Elsaadany *et al*. Urinary podocalyxin and nephrin levels as biomarkers in lupus nephritis patients: Relation to renal involvement and disease activity. *The Egyptian Rheumatologist* 2015; doi.org/10.1016/2015.11.002.

## **2. Role of nephrin and podocalyxin in early detection of diabetic nephropathy - *original article***

---

*Kostovska I, Tosheska Trajkovska K, Cekovska S, Labudovic D, Spasovski G*

*Phisioacta 2016;Vol.10-No3:87-97.*

## ROLE OF NEPHRIN AND PODOCALYXIN IN EARLY DETECTION OF DIABETIC NEPHROPATHY

*Kostovska I<sup>1</sup>, Tosheska Trajkovska K<sup>1</sup>, Cekovska S<sup>1</sup>, Labudovic D<sup>1</sup>, Spasovski G<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Department of Medical and Experimental Biochemistry, Medical Faculty, Skopje, R. Macedonia

<sup>2</sup>University Department of Nephrology, Medical Faculty, Skopje, R. Macedonia

### Abstract

**Introduction:** Diabetic nephropathy (DN) is the leading cause of the end-stage renal disease. Podocytopathies have a crucial role in pathogenesis of DN, thus the podocyte specific proteins may be significant in early detection of DN. The aim of this study was to determine whether podocyte proteins nephrin and podocalyxin could serve as biomarkers in early detection of DN.

**Materials and methods:** Our study included 82 patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) (46 females) with mean age 56.6±6.7 years. Twenty patients were with diabetic nephropathy and 62 without diagnosed nephropathy. A control group consisted of 30 healthy subjects (20 females) with mean age 48.7±9.4 years. All patients were divided into three groups: with normoalbuminuria, microalbuminuria and macroalbuminuria. Fresh first void morning urine and venous blood samples were used. Urinary nephrin and podocalyxin were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), creatinine by photometry and microalbumin by turbidimetry, while urea, creatinine, glucose, albumin and total proteins were measured by photometric method in blood sera.

**Results:** Elevated urinary nephrin and podocalyxin were found in 74.6% and 52.5% of subjects with normoalbuminuria, respectively. Concentrations of nephrin and podocalyxin were statistically significantly increased in all groups of subjects with T2DM compared to the control group ( $p < 0.05$ ). Urinary concentration of nephrin and podocalyxin positively correlated with serum creatinine and negatively with eGFR. ROC analysis showed that both markers have significant diagnostic performance in patients with DN.

**Conclusion:** Nephrin and podocalyxin may be useful markers for an early and non-invasive detection of DN.

**Keywords:** nephrin, podocalyxin, microalbumin, diabetic nephropathy

## УЛОГА НА НЕФРИН И ПОДОКАЛИКСИН ВО РАНО ОТКРИВАЊЕ НА ДИЈАБЕТИЧНА НЕФРОПАТИЈА

### Апстракт

**Вовед:** Дијабетичната нефропатија (ДН) е водечка причина за терминална бубрежна слабост. Подоцитопатиите имаат клучна улога во патогенезата и развојот на ДН, оттука подоцитно специфичните протеини можат да бидат

значајни во раното откривање на ДН. Целта на трудот е да се утврди дали подоцитно специфичните протеини нефрин и подокаликсин можат да служат како маркери за рано откривање на ДН.

Материјал и методи: Во студијата беа вклучени 82 лица со шеќерна болест тип 2 (46 жени) со средна возраст  $56,6 \pm 6,7$  години. Шеесет и двајца испитаници со шеќерна болест тип 2 се без а 20 се со присутна дијабетична нефропатија. Контролната група содржи 30 здрави лица (20 жени) со средна возраст  $48,7 \pm 9,4$  години. Сите испитаници врз основа на уринарен микроалбумин/креатинин однос беа поделени на три групи: нормоалбуминурични, микроалбуминурични и макроалбуминурични. Како материјал користевме свежа прва утринска урина и венска крв. Во урината ја меревме концентрацијата на нефрин и подокаликсин со ЕЛИСА метод, креатинин со фотометриска и микроалбумин со турбидиметриска метода. Во крвниот серум ја меревме концентрацијата на уреа, креатинин, глукоза, албумин и вкупни протеини со фотометриска метода.

Резултати: Од нормоалбуминуричните испитаници со дијабет тип 2, 74,6% и 52,5% имаат покачен уринарен нефрин, односно подокаликсин. Двата маркери се значајно покачени кај сите групи испитаници со дијабетес тип 2 во споредба со контролната група ( $p < 0,05$ ). Најдовме умерена позитивна корелација помеѓу концентрацијата на уринарен нефрин и подокаликсин и серумски креатинин и умерена негативна корелација помеѓу двата маркери и ГФР. ROC анализата покажа дека двата маркера имаат значајна дијагностичка ефикасност кај пациентите со дијабет тип 2.

Заклучок: Нефринот и подокаликсинот се корисни маркери за рано и неинвазивно откривање на дијабетична нефропатија.

**Клучни зборови:** нефрин, подокаликсин, микроалбумин, дијабетична нефропатија

### Introduction

Diabetic nephropathy (DN) is a serious and most common complication in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) and is a leading cause of end-stage renal disease (ESRD). Patients with DN have a high mortality and fast chronic kidney disease (CKD) progression with a need for renal replacement therapy with either dialysis or kidney transplant, which now poses a large social problem worldwide [1, 2]. Thus, an early detection of renal involvement in patients with T2DM is important for timely treatment and slowing down the progression to ESRD. Microalbuminuria was previously considered as a gold standard in early detection of DN, despite being a non-specific marker concomitantly present in other pathological conditions such as urinary tract infections, cardiovascular disease, in non-diabetic patients etc. In addition, body of evidence indicates a high percent of patients with T2DM, who have renal involvement despite the absence of microalbuminuria [3, 4]. Currently, new and more specific markers for early detection and prediction of DN that appear in the urine before microalbuminuria are being evaluated [5, 6, 7]. Podocytopathies have a crucial role in the pathogenesis of DN, recently a particular attention has been paid to the role of specific podocyte proteins such as nephrin, podocalyxin, sinaptopodin, podocin, mindin, etc., in an early detection of DN. Among these new urinary biomarkers the podocyte

proteins - nephrin and podocalyxin have been evaluated as most promising ones in early detection of DN [8].

Podocytes, visceral epithelial cells, are key structural elements of the glomerular filtration barrier [9]. Nephrin is a transmembrane glycoprotein that plays a key role in the structure of the filtration diaphragm, and provides the ultimate physical barrier for plasma proteins. Podocalyxin is an anionic transmembrane sialoglycoprotein; it is a main podocyte's surface antigen and provides an electrostatic barrier for plasma proteins [8]. Decreased number of podocytes at a glomerular level and presence of podocytes in urine - podocyturia were reported in DN [10,11,12]. The loss of podocytes leads to glomerulosclerosis and together with the damage of the podocyte's cytoskeleton and filtration diaphragm lead to proteinuria [13, 14, 15]. Such damage and podocytes loss through the urine bring to presence podocyte-specific proteins in urine, such as nephrin and podocalyxin, rendering them as an attractive markers for non-invasive early diagnosis or prediction of DN.

The aim of this study was to determine whether podocyte proteins nephrin and podocalyxin could serve as biomarkers in early detection of DN and to assess their diagnostic performance.

#### **Materials and Methods**

Our cross-sectional study included 82 patients with T2DM (20 patients with T2DM and diagnosed nephropathy and 62 with T2DM but without diagnosed nephropathy) and 30 healthy subjects. The characteristics of subjects in terms of sex, age, and disease duration are presented in Table 1. Patients were recruited during 2015 in the Primary Health Care Office and University Department of Nephrology at the Medical Faculty in Skopje. All patients with T2DM were diagnosed in the Center of Diabetes at the University Department of Endocrinology and Metabolic Diseases. Inclusion criteria for patients with T2DM without nephropathy were: duration of diabetic disease < 5 years, absence of pregnancy in women, and exclusion of any type of renal disease. For patients with nephropathy, inclusion criteria were presence of T2DM with clinically diagnosed nephropathy (macroalbuminuria) while exclusion criteria were presence of renal disease from any other etiology. There were no exclusion criteria related to sex, race and ethnicity. By following the practice guidelines developed by the KDIGO proposals, we classified the diabetic patients into three groups according to urinary microalbumin-to-creatinine ratio (UMCR): patients with normoalbuminuria - UMCR < 30 mg/g, patients with microalbuminuria - UMCR - 30-300 mg/g and patients with macroalbuminuria - UMCR >300 mg/g [16].

As material we used the first mead stream morning urine and blood sera. Urine (10 ml) was collected in plastic clean containers, without any preservative. After centrifugation of the blood at 3.000 rpm for 10 min, the serum was collected in 1.5 ml eppendorf tubes. Firstly, a chemical analysis of the fresh urine with urinary dipsticks was done. Then, microalbumin concentration was measured by a turbidimetric method and the creatinine by using the Jaffe reaction on biochemical analyzer ChemWell (2910 Awareness Technology, Inc). The rest of the urine samples after centrifugation were until quantification of the nephrin and podocalyxin.

Microalbumin/creatinine ratio was determined by using mathematical formula from the assessed concentration of microalbumin and creatinine in urine. The glomerular filtration rate (GFR) was calculated by Cocroft and Gault formula.

The concentration of nephrin and podocalyxin in urine was determined using commercially available kits (Exocell Inc., Philadelphia, PA). The method is an indirect competitive ELISA with polyclonal antibodies used against nephrin and podocalyxin. Antigens - nephrin and podocalyxin from urine sample and immobilized nephrin/podocalyxin antigens (at the bottom of polystyrene plates) compete for anti-nephrin / anti-podocalyxin rabbit antibodies. Antirabbit HRP (HRP- horseradish peroxidase) conjugate is used for detection of bound antibodies. After rinsing, the remaining concentration of antibody conjugate bound to immobilized nephrin / podocalyxin antigens is measured photometrically at 450 nm wavelength. The colour intensity is inversely proportional to the concentration of nephrin / podocalyxin in urine sample. The concentration is read from a standard curve constructed from commercial standards. The results are presented in ng/ml. According to the manufacturer instruction the concentration of urinary nephrin in healthy subjects is 0 - 300 ng/ml, the concentration of urinary podocalyxin is 0 - 40 ng/ml.

In blood sera we measured the concentrations of the following parameters: urea, creatinine, glucose, total protein and albumin. All parameters were measured by photometric method on the biochemical analyzer ChemWell. Data on age, sex, height, weight, duration of the disease, blood pressure and glycemic control were collected from the patients records and completed questionnaires.

All analyses were performed at the Institute of Medical and Experimental Biochemistry, Medical Faculty in Skopje. Informed written consents were obtained from all participants. The study was approved by the Ethical Committee of the Medical Faculty in Skopje, Macedonia.

#### *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed using the Statistica for Windows 7.0 and SPSS, version 17.0. Data are expressed as mean  $\pm$  SD or median. Differences among the four groups in terms of clinical data were compared by ONE-way analysis of variance (ANOVA) for normally distributed values and by Kruskal-Wallis test for non-parametric values. Comparisons between two groups were performed applying the Mann-Whitney U test. The association between urinary nephrin and podocalyxin with microalbumin, serum creatinine and GFR were calculated by the Spearman rank-order correlation. The diagnostic performance of urinary nephrin and podocalyxin for early detection of DN was tested and compared by receiver operating characteristic (ROC) curve. The differences of the area under the curve (AUC) between markers were performed by Z-test. Differences between groups were considered to be statistically significant for  $p < 0.05$ .

## **Results**

#### *Clinical data*

All subjects with T2DM were classified in three groups depending on UMCR: normoalbuminuric, microalbuminuric and macroalbuminuric patients. Healthy subjects were used as a control group. Eight patients with clinically diagnosed DN had macro- and 12 patients had microalbuminuria. Three patients without clinically diagnosed DN had microalbuminuria. Clinical characteristics of the three groups of patients with T2DM and healthy subjects are shown in Table 1.



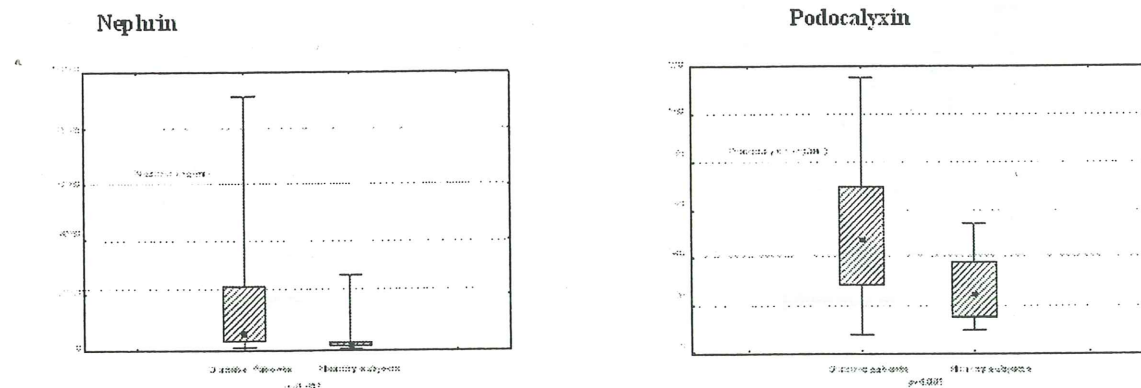
**Table 1** Clinical characteristics of various groups of patients with T2DM and healthy subject

	Macroalbuminuria	Microalbuminuria	Normoalbuminuria	Healthy subjects	p value
Gender n ( male/female)	8 (4/4)	15 (8/7)	59 (24/35)	30 (10/20)	0.393
Age (years)	55.75±4.53	57.13±8.31	57.10±7.31	48.77±9.74	<0.001
Duration of disease (years)	14.37±7.07	7.57±7.50	4.42±3.69	/	<0.002
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	30.24±6.93	29.09±4.02	28.97±4.04	25.53±3.95	<0.002
Glucose (mmol/L)	10,2±4,01	8,2±3,06	6,76±2,25	4,32±0,84	<0.001
HbA1c (%)	7.74±1.06	7.46±1.82	6.97±1.11	4.75±0.46	<0.001
Total protein in serum (g/L)	73±9.12	64.07±11.46	62.12±11.16	73.47±6.56	<0.001
Serum albumin (g/L)	38.37±3.62	36.60±5.91	37.29±6.62	46±4.13	<0.001
Serum urea (mmol/L)	10.38±8.88	7.18±2.90	7.09±2.16	4.27±1.16	<0.001
Serum creatinine (μmol/L)	133.87±101.09	82.40±32.10	80.98±16.40	75.02±14.87	0.133
eGFR (ml min <sup>-1</sup> 1.73 m <sup>-2</sup> )	52.29±19.50	72.10±28.67	68.47±20.34	86.95±24.46	0.643
Nephrin in urine (ng/ml)*	959 (204-3583)	472 (146-3729)	589 (123-9156)	181 (73-2685)	<0.001
Podocalyxin in urine (ng/ml)*	62,6±17,8	53,9±18,7	48,4±30,5	27,1±12,9	<0.001

Data are expressed as mean ± SD or \*median. BMI - body mass index, HbA1c - glycated hemoglobin, eGFR - estimated Glomerular Filtration Rate.

**Concentration of urinary nephrin and podocalyxin in all patients with T2DM and healthy subjects**

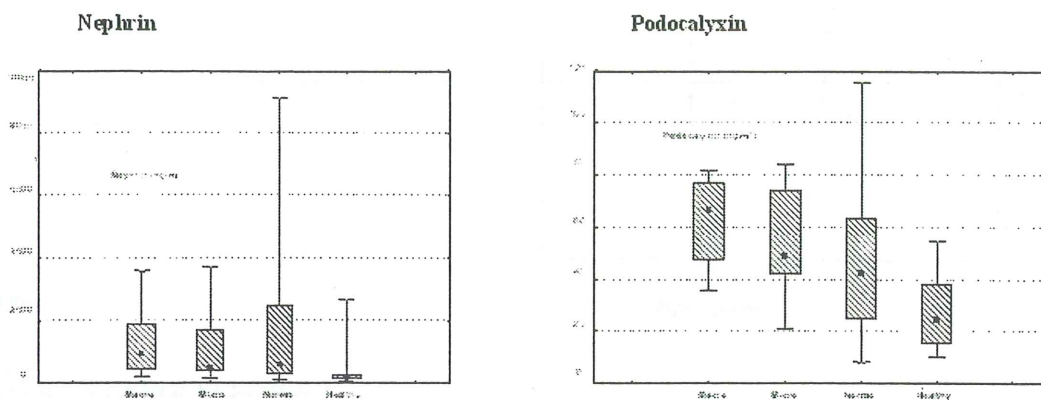
The concentration of urinary nephrin and podocalyxin in all patients with T2DM and healthy subjects is shown in Figure 1.



**Figur 1.** Concentration of urinary nephrin and podocalyxin in all patients with T2DM and healthy subjects

**Concentration of urinary nephrin and podocalyxin in various groups of patients and healthy subjects**

Concentration of urinary nephrin and podocalyxin separately between groups of T2DM patients and healthy subjects is shown in Figure 2.



**Figur 2.** Concentration of urinary nephrin and podocalyxin separately between groups of T2DM patients and healthy subjects

Concentration of urinary nephrin was statistically significantly higher in macroalbuminuric patients versus healthy subjects ( $p > 0.004$ ), microalbuminuric patients versus healthy subjects ( $p > 0.002$ ) and normoalbuminuric patients versus healthy subjects ( $p > 0.0001$ ). Also, concentration of urinary podocalyxin was statistically significantly higher in macroalbuminuric patients versus healthy subjects ( $p > 0.0009$ ), microalbuminuric patients versus healthy subjects ( $p > 0.0006$ ) and normoalbuminuric patients versus healthy subjects ( $p > 0.0023$ ). There was no statistically significant difference in the concentration of nephrin and podocalyxin between various groups of patients, macro- vs. microalbuminuria, micro- vs. normoalbuminuria and macro- vs. normoalbuminuria.

**Percent of subjects with elevated urinary nephrin and podocalyxin in various groups of subjects**

We determined the percent of patients with elevated nephrin and podocalyxin in various groups, and it showed that 74.6% of normoalbuminuric patients were with elevated urinary nephrin and 52.5% of normoalbuminuric patients were with elevated podocalyxin. The results are presented in Figure 3.

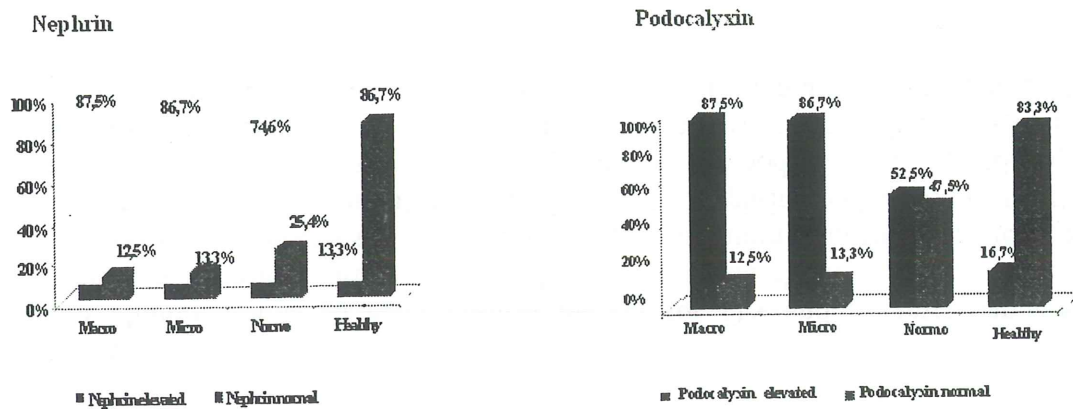


Figure 3. Percent of subjects with elevated nephrin and podocalyxin in various groups of subject

*Correlation between the concentration of urinary nephrin and podocalyxin and serum creatinine, microalbumin in urine and glomerular filtration rate*

Correlation between urinary nephrin and serum creatinine, GFR and urinary microalbumin are depicted in Figure 4.

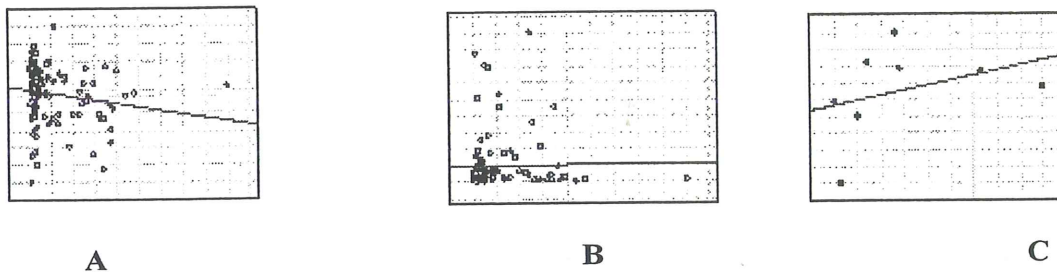


Figure 4. Correlation between urinary nephrin and GFR-A, urinary nephrin and microalbumin-B and urinary nephrin and serum creatinine-C

There was a moderate positive correlation between urinary nephrin and serum creatinine ( $R=0.476$ ) and expectedly, a moderate negative correlation between GFR and urinary nephrin ( $R=-0.467$ ). No significant correlation between microalbumin and nephrin was found ( $R=-0.051$ ).

Correlations between urinary podocalyxin and serum creatinine, GFR and urinary microalbumin are depicted in Figure 5.

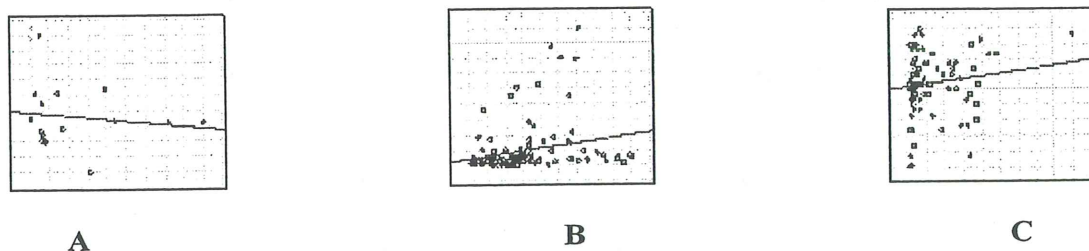


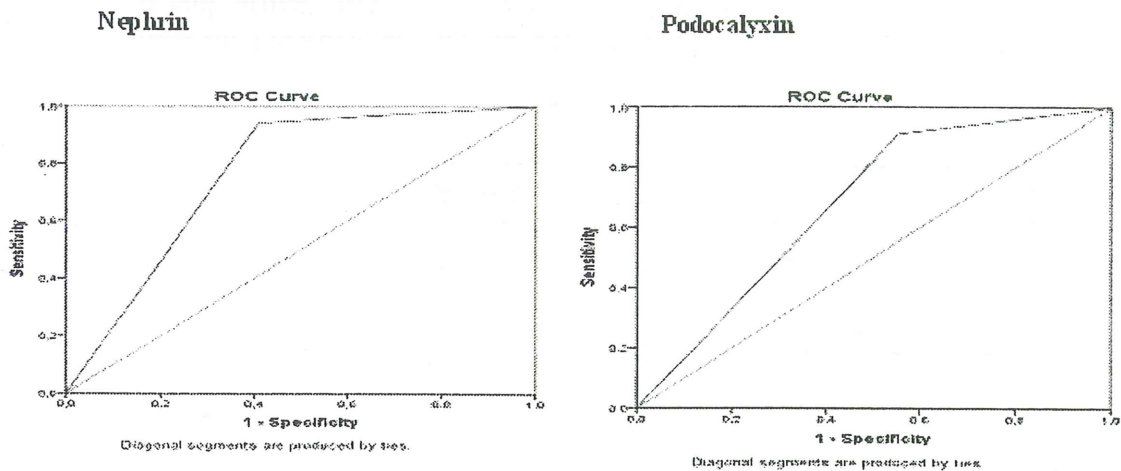
Figure 5. Correlation between urinary podocalyxin and GFR-A, urinary microalbumin-B and serum creatinine-C

We also detected a moderately positive correlation between podocalyxin and serum creatinine ( $R=0.419$ ), slightly positive correlation between podocalyxin and microalbumin in urine ( $R=0.314$ ) and a slightly negative correlation between podocalyxin and GFR ( $R=-0.414$ ).

*Non-parametric ROC analysis of urinary nephrin and podocalyxin in patients with T2DM*

Non-parametric ROC curve for assessment of diagnostic performance of nephrin and podocalyxin in discrimination between patients and healthy subjects, comparing the area under the curves (AUCs) is shown in Figure 6. The results obtained for nephrin were as follows:  $AUC=0.766$ , 95% CI= 0.668 – 0.864,  $p=0.0001$ , sensitivity=78.03%, specificity=86.67, Jouden index=0.64. The results obtained for podocalyxin were:  $AUC=0.679$ , 95%CI=0.578–0.779,  $p=0.001$ , sensitivity=62.19%, specificity=83.33%, Jouden index=0.45.

The AUCs of both markers were above 0.5, which means that they can effectively discriminate patients from controls. There was no significant difference between the AUC values of both markers ( $Z=1.299$   $p=0.194$ ).



**Figure 6.** Non-parametric ROC curve to assess the diagnostic performance of nephrin and podocalyxin in discrimination between patients and healthy subjects

### Discussion

Microalbuminuria is an early clinical marker for DN and suggests damage of the glomerular filtration barrier which is built by the endothelium, glomerular basement membrane and podocytes. The presence of microalbumin indicates damage of all three components of the glomerular filtration barrier. Nephrin, podocalyxin and the other podocyte-specific proteins indicate only damage of podocytes, independently of the other two components of the glomerular filtration barrier [15]. Thus, it is thought that podocyte damage is present before the appearance of microalbuminuria and proteinuria,

hence, podocyte proteins are considered as earlier markers for diagnosis of DN compared to microalbuminuria.

In our study we used the ELISA method for quantification of urinary nephrin and podocalyxin. We detected statistically significantly elevated concentrations of both specific podocyte proteins in patients with T2DM compared to healthy subjects. It is particularly important that we found statistically significant difference in the concentration of urinary nephrin and podocalyxin in normoalbuminuric subjects with T2DM compared to healthy subjects. These results indicate that damage of podocytes is present in subjects with T2DM before the appearance of microalbuminuria. It is important to highlight that we found an elevated concentrations of urinary nephrin in 74.6% of normoalbuminuric, and increased podocalixin in 52.5% of normoalbuminuric patients. Our findings are similar to those published by Jim *et al.*, who detected that 54% of normoalbuminuric patients had increased nephrin [17] and by Hara *et al.* who found that 52% of normalbuminuric patients had increased podocalyxin concentration [18]. We found an elevated concentrations of urinary nephrin in 86.7% of microalbuminuric and 87.5% of macroalbuminuric patients. Our results for urinary nephrin are in agreement with those presented in the study by Jim B. *et al.* where 100% of patients with macroalbuminuria and 100% of patients with microalbuminuria had elevated nephrin. [17]. In addition, we detected elevated levels of urinary podocalyxin in 86.7% of microalbuminuric patients and in 87.5% of macroalbuminuric patients. These results are similar to those presented by Hara M. *et al.*, who found elevated urinary podocalyxin, in 64.7% of micro- and in 66.7% of macroalbuminuric patients with T2DM [18].

The level of urinary nephrin correlated positively with serum creatinine and negatively with GFR, indicating that nephrinuria is a marker of disordered renal function. In the study of Ng DPK the same correlation was found, although a different method for measurement of nephrin and GFR was used [19]. A significant negative correlation between urinary nephrin and GFR was also found in the study of Jim B *et al.* [17]. Yet, we found that the level of urinary podocalyxin correlated positively with serum creatinine and negatively with GFR, suggesting that podocalyxin is an indicator of impaired kidney function. These results are in contrast to those of Hara M. *et al.*, who did not find a significant correlation between GFR, serum creatinine and urinary podocalyxin [18]. Non-parametric ROC analysis showed that both markers have a high diagnostic sensitivity and specificity in discriminating between patients with T2DM and healthy subjects. Nephrin specificity in the diagnosis of DN was 86.67% and sensitivity 78.03%. Podocalyxin specificity in the diagnosis of DN was 83.33% and sensitivity 62.19%. Nevertheless, there are scarce literature data on specificity and sensitivity of nephrin and podocalyxin in diagnosis of DN.

The results of this study indicate that these two markers individually or together may be important in early detection of DN, primarily due to the high percent of normoalbuminuric subjects with elevated levels of nephrin and podocalyxin, statistically significant difference in the levels of these two markers between normoalbuminuric subjects and healthy subjects; the negative correlation with GFR and their high diagnostic sensitivity and specificity. Furthermore, these results indicate that nephrin and podocalyxin might have greater diagnostic value in early detection of DN compared to microalbumin, which was previously considered as a gold standard in early diagnosis of DN.

In conclusion, nephrin and podocalyxin may be useful markers for early and non-invasive detection of the DN.

## References

1. Ninomiya T, Perkovic V, de Galan BE, Zoungas S, Pillai A, Jardine M et al. Albuminuria and kidney function independently predict cardiovascular and renal outcomes in diabetes. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20:1813–21.
2. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu C. Chronic Kidney Disease and the Risks of Death, Cardiovascular Events, and Hospitalization. *N Engl J Med.* 2004;351(13):1296–305.
3. Rigalleau V, Lasseur C, Raffaitin C, Beauvieux MC, Barthe N, Chauveau P et al. Normoalbuminuric Renal-Insufficient Diabetic Patients. *Diabetes Care.* 2007;30:2034–9.
4. Jain S, Rajput A, Kumar Y, Uppuluri N, Arvind AS, Tatu U. Proteomic Analysis of Urinary Protein Markers for Accurate Prediction of Diabetic Kidney Disorder. *JAPI.* 2005;53:513–20.
5. Nauta FL, Boertien WE, Bakker SJL, van Goor H, van Oeveren W, de Jong PE et al. Glomerular and Tubular Damage Markers Are Elevated in Patients With Diabetes. *Diabetes Care.* 2011;34:975–81.
6. Gatua WK, Makumi JN, Njagi EM, Kigundu CS, Mcligeyo SO, Waithaka SK. Evaluation of Urinary Tubular Enzymes as Screening Markers of Renal Dysfunction in Patients Suffering from Diabetes Mellitus. *Asian J Med Sci.* 2011;3(3):84–90
7. Kandasamy Y, Smith R, Lumbers ER, Rudd D. Nephryn – a biomarker of early glomerular injury. *Biomark Res.* 2014;2:21.
8. [8] Sekulic M, Pichler Sekulic S. A compendium of urinary biomarkers indicative of glomerular podocytopathy. *Pathol Res Int.* 2013;2013:782395.
9. Weil EJ, Lemley KV, Mason CC, Yee B, Jones LI, Blouch K et al. Podocyte detachment and reduced glomerular capillary endothelial fenestration promote kidney disease in type 2 diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2012;82(9):1010–7.
10. Meyer TW, Bennett PH, Nelson RG. Podocyte number predicts long-term urinary albumin excretion in Pima Indians with Type II diabetes and microalbuminuria. *Diabetologia.* 1999;42:1341-1344.
11. White KE, Bilous RW, Marshall SM, EL Nahas M, Remuzzi G, Piras G et al. Podocyte number in normotensive type 1 diabetic patients with albuminuria. *Diabetes.* 2002;51:3083–3089.
12. Asanuma K, Mundel P. The role of podocytes in glomerular pathobiology. *Clin Exp Nephrol.* 2003;7:255–259.
13. Patari A, Forsblom C, Havana M, Taipale H, Groop PH, Holthöfer H. Nephrynuria in diabetic nephropathy of type 1 diabetes. *Diabetes.* 2003;52:2969–2974.
14. Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Ebihara I et al. Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15:1379–1383.
15. Mogensen CE. Microalbuminuria as a predictor of clinical diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1987;31:673–689.
16. KDIGO. Chapter 1: Definition and classification of CKD. *Kidney Int Suppl.* 2013;3:19.

*ROLE OF NEPHRIN AND PODOCALYXIN IN...*

17. Jim B, Ghanta M, Qipo A, Fan Y, Chaung PY, Cohen HW et al. Dysregulated Nephrin in Diabetic Nephropathy of Type 2 Diabetes: A Cross Sectional Study. PLoS ONE. 2012;7(5):e3604
18. Hara M, Yamagata K, Tomino Y, Saito A, Hirayama Y, Ogasawara S et al. Urinary podocalyxin is an early marker for podocyte injury in patients with diabetes: establishment of a highly sensitive ELISA to detect urinary podocalyxin. Diabetologia 2012;55(11):2913-2919.
19. [Ng DPK, Tai B-C, Tan E, Leong H, Nurbaya S, Lim XL et al. Nephrouria associates with multiple renal traits in type 2 diabetes. Nephrol Dial Transpl. 2010;26:2508-14.

## ПРИЛОГ 3 – ОДОБРЕНИЕ ОД ЕТИЧКА КОМИСИЈА

Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ  
Република Македонија  
Бр. 03-SSIS/8  
09.12.2015 год.  
СКОПЈЕ

### **ЕТИЧКА КОМИСИЈА ЗА ИСТРАЖУВАЊЕ НА ЛУЃЕ МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ ПРИ УКИМ ВО СКОПЈЕ**

На својата XI седница одржана на ден 09.12.2015 година, Етичката комисија за истражување на луѓе при УКИМ-Медицински факултет во Скопје го разгледа поднесокот за изработка на докторска дисертација со наслов: **"Улога на подоцитните протеини-нефрин и подокаликсин во рана дијагноза на секундарните гломерулопатии"** на барање од д-р Ирена Костовска од Институт за медицинска и експериментална биохемија-Скопје. По разгледувањето на поднесената документација, Комисијата во состав: проф. д-р Бети Зафирова-Ивановска, проф. д-р Соња Алабаковска, проф. д-р Гордана Петрушевска, проф. д-р Даниела Миладинова, проф. д-р Здравко Чакар, доц. д-р Симонида Црвенкова, проф. д-р Емилија Влашки, проф. д-р Александар Стојановиќ, проф. д-р Весна Пејоска-Геразова, проф. д-р Гоце Спасовски, м-р Соња Стамболиева и дипл. прав. Радмила Митановска, го одобри изведувањето на студијата.

Комисијата работи во согласност со директивата 2001/20/ЕС од Европскиот Парламент и Совет од 04.04.2001 година.

Претседател  
на Етичката комисија  
за истражување на луѓе

Проф. д-р Бети Зафирова-Ивановска





## ПРИЛОГ 4 – ФОРМУЛАР ЗА ИНФОРМИРАНА СОГЛАСНОСТ

### ФОРМУЛАР ЗА ИНФОРМИРАЊЕ И СОГЛАСНОСТ ЗА УЧЕСТВО ВО МЕДИЦИНСКО ИСТРАЖУВАЊЕ

Потребна е Вашата писмена согласност за информираност и учество во научно-истражувачката студија -  
**Улога на нефрин и подокаликсин во рана дијагноза на секундарните нефропатии**

#### ЛИЧНИ ПОДАТОЦИ

Име и Презиме: \_\_\_\_\_  
Дата на раѓање: \_\_\_\_\_

#### ЦЕЛ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

Истражувањето од овој тип се изведува за прв пат во нашата земја. Бараме од Вас да учествувате во ова истражување бидејќи сте заболени од шеќерна болест тип 2, хронично покачен крвен притисок или пак сте трудница со ризик за појава на компликации во текот на бременоста или имате прееклампсија. Главна цел на истражувањето ќе биде утврдување на улогата на нефрин и подокаликсин (протеини во урината) во раното откривање на бубрежно засегање кај пациенти со шеќерна болест, покачен крвен притисок и кај жени со ризична бременост. Шеќерната болест и хронично покачениот крвен притисок се најчести причинители за хронична бубрежна слабост, навременото откривање на бубрежното засегање кај овие пациенти ќе овозможи навремено превземање на соодветни терапевтски мерки што значително ќе го подобри квалитетот на живот и прогнозата кај овие пациенти. Високо-ризичните трудници можат да развијат прееклампсија, состојба која може да го загрози животот на мајката и плодот а раното откривање на прееклампсија ќе овозможи превземање на соодветни терапевтски мерки кај овие трудници со цел да се спречат компликациите. Резултатите од ова истражување ќе бидат од голема корист не само за Вас туку во иднина и за сите лица заболени од шеќерна болест тип 2, покачен крвен притисок и трудници со ризик од појава на компликации.

Ве молиме внимателно прочитајте ги долунаведените информации:

- Учесството во оваа студија е во целост на доброволна основа.
- Со потпишување на оваа согласност, Вие се согласувате да дадете примерок 10 мл урина и 5 мл венска крв за истражувачки цели.
- Со потпишување на овој формулар, Вие дозволувате на вашата урина да се одреди концентрацијата на: микроалбумин, нефрин, подокаликсин, креатинин, да се направи хемиска анализа и електрофореза на уринарни протеини, додека во вашата крв да се одредат: уреа, креатинин, глукоза, вкупни протеини, албумин, холестерол, триацилглицероли, ЛДЛ, ХДЛ.
- Вашата урина и венска крв ќе се користат само за научни цели.
- Сите информации што ќе се добијат во врска со истражувањето се строго доверливи.
- Резултатите ќе бидат отпечатени во научно списание при тоа вашиот идентитет нема да биде откриен.

Јас го прочитав и потполно го разбрав овој формулар и се согласувам да учествувам во оваа научно-истражувачка студија.

Ако се согласувате да бидете контактирани, Ве молиме наведете ги вашите податоци за контакт: \_\_\_\_\_

Потпис: \_\_\_\_\_

**Доктор/Истражувач:** Костовска Ирена  
Институт за медицинска и експериментална биохемија  
Медицински факултет - Ул.,50-Дивизија.,бр.6 - Скопје  
Тел. раб. 02 3217 303 Моб. Тел. 078 208 990

Потпис: \_\_\_\_\_

Дата: \_\_\_\_\_

**ПРИЛОГ 5 – АНКЕТЕН ЛИСТ ЗА ИСПИТАНИЦИ СО ШЕЌЕРНА БОЛЕСТ ТИП 2**



Институт за Медицинска и Експериментална Биохемија

Докторска студија: Улога на нефрин и подокаликсин во рана дијагноза на секундарните нефропатии

Истражувач: Д-р. Костовска Ирена

Анкетен лист за испитаници со шеќерна болест  
(се пополнува во присуство на доктор)

Број: \_\_\_\_\_

Име: \_\_\_\_\_ Татково име: \_\_\_\_\_ Презиме: \_\_\_\_\_

Пол: \_\_\_\_\_ Година на раѓање: \_\_\_\_\_ Адреса: \_\_\_\_\_

Контакт Телефон: \_\_\_\_\_ Националност: \_\_\_\_\_

Дијагноза: \_\_\_\_\_

Времетраење на болеста: \_\_\_\_\_

Гликемична контрола: \_\_\_\_\_

Телесна тежина и висина: \_\_\_\_\_

Терапија: \_\_\_\_\_

Болести од интерес: \_\_\_\_\_

Датум и место: \_\_\_\_\_

Потпис на истражувач: \_\_\_\_\_

**ПРИЛОГ 6 – АНКЕТЕН ЛИСТ ЗА ИСПИТАНИЦИ СО ХРОНИЧНА ХИПЕРТЕНЗИЈА**



**Институт за Медицинска и Експериментална Биохемија**

**Докторска студија: Улога на нефрин и подокаликсин во рана дијагноза на секундарните нефропатии**  
**Истражувач: Д-р. Костовска Ирена**

**Анкетен лист за испитаници со хронична хипертензија**  
(се пополнува во присуство на доктор)

**Број:** \_\_\_\_\_

**Име:** \_\_\_\_\_ **Татково име:** \_\_\_\_\_ **Презиме:** \_\_\_\_\_

**Пол:** \_\_\_\_\_ **Година на раѓање:** \_\_\_\_\_ **Адреса:** \_\_\_\_\_

**Контакт Телефон:** \_\_\_\_\_ **Националност:** \_\_\_\_\_

**Дијагноза:** \_\_\_\_\_

**Времетраење на болеста:** \_\_\_\_\_

**Крвен притисок (mmHg):** \_\_\_\_\_

**Телесна тежина и висина:** \_\_\_\_\_

**Терапија:** \_\_\_\_\_

**Болести од интерес:** \_\_\_\_\_

**Датум и место:** \_\_\_\_\_

**Потпис на истражувач:** \_\_\_\_\_

## ПРИЛОГ 7 – АНКЕТЕН ЛИСТ ЗА ТРУДНИЦИ



Институт за Медицинска и Експериментална Биохемија

Докторска студија: Улога на нефрин и подокаликсин во рана дијагноза на секундарните нефропатии

Истражувач: Д-р. Костовска Ирена

Анкетен лист за трудници  
(се пополнува во присуство на доктор)

Број: \_\_\_\_\_

Име: \_\_\_\_\_ Татково име: \_\_\_\_\_ Презиме: \_\_\_\_\_

Година на раѓање: \_\_\_\_\_ Адреса: \_\_\_\_\_

Контакт Телефон: \_\_\_\_\_

Националност: \_\_\_\_\_

Гестациска старост на бременост: \_\_\_\_\_

Историја на претходна бременост/и: \_\_\_\_\_

Крвен притисок (mmHg): \_\_\_\_\_

Гликемија: \_\_\_\_\_

Телесна тежина и висина: \_\_\_\_\_

Терапија: \_\_\_\_\_

Болести од интерес: \_\_\_\_\_

Датум и место: \_\_\_\_\_ Потпис на истражувач: \_\_\_\_\_

## **ПРИЛОГ 8 – УПАТСТВО ЗА ПРАВИЛНО СОБИРАЊЕ ПРИМЕРОК УРИНА**

### **УПАТСТВО ЗА ПРАВИЛНО СОБИРАЊЕ НА УРИНА**

- ✓ За анализа е потребна прва утринска урина, собрана во хемиски чист и сув сад, (најдобро стерилен за еднократна употреба);
- ✓ Собирањето урина се прави пред доручек и било какви други активности, при што од последното празнење на мочниот меур треба да бидат поминати најмалку 4, а највеќе 8 часа;
- ✓ Кај жени непосредно пред, за време и непосредно по менструацијата, ниту кај жени кои имаат видлив вагинален исцедок, не се препорачува собирање на урина за анализа;
- ✓ Пред самото собирање на урината во соодветниот сад потребно е рацете и гениталиите да бидат чисти;
- ✓ Првиот млаз од урината се остава да истече во тоалетот и без прекин во мокрењето, средниот млаз се собира во садот;
- ✓ Со капачето (да се внимава да биде чисто), се затвара добро садот.