



Središnja medicinska knjižnica

Čužić, Snježana (2007) *Ekstracelularni matriks kod primarnih glomerulonefritisa*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/248>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Snježana Čužić

**Ekstracelularni matriks kod primarnih
glomerulonefritisa**

DISERTACIJA

Zagreb, 2007.

Disertacija je izrađena na Zavodu za patologiju Rebro, KBC Zagreb. Korišteni su podaci prikupljeni na Zavodu za nefrologiju Rebro, KBC Zagreb.

Voditelj rada: prof.dr.sc. Mira Šćukanec-Špoljar

Rad je plod truda, dobre volje, poticanja i opsežnog znanja moje drage profesorice Mire Šćukanec-Špoljar.

POPIS KRATICA

ANCA	antineutrophil cytoplasmic antibodies
ACE	angiotensin converting enzyme
Ang II	angiotensin II
CTGF	connective tissue growth factor
ECM	ekstracelularni matriks
ELAM-1	endothelial leucocyte adhesion molecule-1
ET-1	endothelin-1
FGF	fibroblast growth factor
FGS	fokalna segmentalna skleroza
Fibrin	fibrin/fibrinogen
FN	fibronektin
FSP-1	fibroblast specific protein-1
GBM	glomerularna bazalna membrana
GN	glomerulonefritis
HSP47	heat shock protein
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IFN- γ	interferon-gamma
IL-2	interleukin 2
IL-2R	interleukin 2 receptor
IL-6	interleukin 6
IL-8	interleukin 8
ILK	integrin linked kinase
ILK	integrin-linked kinase
IP-10	IFN inducible protein-10
KO I	kolagen tip I
KO III	kolagen tip III
KO IV	kolagen tip IV
LAP	latency associated protein
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MePGN	mezangioproliferativni GN
MGN	membranski GN
MIP-1	macrophage inflammatory protein
MMP	metaloproteinase
MPGN	endokapilarni GN, membranoproliferativni GN
mRNA	messenger RNA, glasnička ribonukleinska kiselina
NF-1	nuclear factor-1
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
PAR-1	protease-activated receptor 1
PDGF	platelet derived growth factor
RANTES	citokin "regulated on activation normal T expressed and secreted"
RPGN	difuzni GN sa polumjesecima, "rapid-progressive GN"
SERPIN	SERine protease INhibitor
SMA	smooth muscle actin
TBM	tubularna bazalna membrana
TGF- β	transforming growth factor beta
TIMP-1	tissue inhibitor of metalloproteinase
TN	tenascin
TNF- α	tumor necrosis factor

KAZALO

1.	UVOD	1
1.1.	Definicija i incidencija primarnih glomerulonefritisa	1
1.2.	Klasifikacija primarnih glomerulonefritisa	2
1.3.	Klinička slika glomerulonefritisa	3
1.4.	Patogeneza i morfologija primarnih glomerulonefritisa	4
	1.4.1. Glomerulopatije sa nepromjenjivom histološkom slikom i stalnim nalazom imunofluorescencije	4
	1.4.1.1. Glomerulopatije koje nisu posredovane imunim kompleksima: “idiopatski nefrotski sindrom”	4
	1.4.1.2. Minimalne promjene glomerula	4
	1.4.1.3. Difuzna mezangijska proliferacija	4
	1.4.1.4. Fokalna/segmentalna skleroza	4
	1.4.2. Glomerulopatije posredovane imunim kompleksima	6
	1.4.2.1. Endokapilarni glomerulonefritis s “grbama”	6
	1.4.2.2. Membranski glomerulonefritis	6
	1.4.2.3. Mezangiokapilarni glomerulonefritis	7
	1.4.2.4. Bolest s gustim intramembranskim depozitima	7
	1.4.3. Imunofluorescencijom definirane glomerulopatije s promjenljivim histološkim nalazom	8
	1.4.3.1. Anti-GBM glomerulonefritis	8
	1.4.3.2. IgA glomerulonefritis	8
	1.4.4. Glomerulopatije s nepromjenljivom histološkom slikom i promjenjivim nalazom imunofluorescencije	8
	1.4.4.1. Mezangioproliferativni glomerulonefritis	9
	1.4.4.2. Difuzni proliferativni endokapilarni glomerulonefritis	9
	1.4.4.3. Fokalni/segmentalni glomerulonefritis	9
	1.4.4.4. Difuzni glomerulonefritis s polumjesecima	9

1.5.	Tubulointersticijalna upala u sklopu glomerulonefritisa	10
1.5.1.	Etiologija i patogeneza tubulointersticijalne upale kod primarnog glomerulonefritisa	10
1.5.2.	Fibroza intersticija	11
1.6.	Proteini ekstracelularnog matriksa	11
1.6.1.	Kolagen tip I i kolagen tip III	11
1.6.2.	Kolagen tip IV	12
1.6.3.	Fibronektin	12
1.6.4.	Tenascin	12
1.6.5.	Fibrin/fibrinogen	12
2.	CILJ I SVRHA DOKTORSKE STUDIJE	13
3.	ISPITANICI, HISTOLOŠKI MATERIJAL I METODE	14
3.1.	Ispitanici	14
3.2.	Histološki materijal	14
3.3.	Histološke metode	14
3.4.	Imunohistokemija	15
3.5.	Histološka dijagnoza	16
3.6.	Statistička obrada	16
4.	REZULTATI	17
4.1.	Osnovni klinički podaci o ispitivanim bolesnicima	17
4.2.	Proteini ekstracelularnog matriksa u normalnom bubrežnom tkivu	20
4.3.	Proteini ekstracelularnog matriksa bubrežnog intersticija kod intersticijalne upale i/ili fibroze u sklopu primarnog glomerulonefritisa	22
4.3.1.	Kolagen tip I	23
4.3.2.	Kolagen tip III	24
4.3.3.	Kolagen tip IV	25
4.3.4.	Tenascin	27
4.3.5.	Fibronektin	28

4.3.6. Fibrin/fibrinogen	29
4.4. Proteini ekstracelularnog matriksa bubrežnog intersticija i klinička slika u času biopsije	31
4.4.1. Proteinurija	31
4.4.2. Kreatinin	33
4.5. Proteini ekstracelularnog matriksa bubrežnog intersticija i odgovor na terapiju	34
4.5.1. Bolesnici sa proteinurijom	34
4.5.2. Bolesnici sa nefrotskom proteinurijom	35
4.5.3. Bolesnici sa povišenim kreatininom	37
4.6. Proteini ekstracelularnog matriksa i ACE-genotip	38
5. RASPRAVA	41
5.1. Uloga imunohistokemije i imunofluorescencije u proučavanju patoloških promjena tijekom glomerulonefritisa	41
5.2. Proteini ekstracelularnog matriksa u normalnom bubrežnom tkivu	41
5.2.1. Proteini ekstracelularnog matriksa glomerula	41
5.2.2. Proteini ekstracelularnog matriksa bubrežnog intersticija	42
5.3. Proteini ekstracelularnog matriksa bubrežnog intersticija kod intersticijalne upale i/ili fibroze u sklopu primarnog glomerulonefritisa	42
5.3.1. Proteini ekstracelularnog matriksa bubrežnog intersticija i integrini	45
5.4. Proteini ekstracelularnog matriksa i klinička slika kod primarnih glomerulonefritisa	46
5.5. Tubuointersticijalna fibroza i ACE-genotip	48
6. ZAKLJUČCI	50
6.1. Normalno bubrežno tkivo	50
6.2. Tubulintersticijalna upala/fibroza u sklopu primarnog glomerulonefritisa	50

6.3. Proteini ekstracelularnog matriksa bubrežnog intersticija i klinička slika u času biopsije	50
7. SAŽETAK	51
8. SUMMARY	53
9. LITERATURA	54
POPIS TABLICA I SLIKA	65
ŽIVOTOPIS	

1. UVOD

1.1. Definicija i incidencija glomerulonefritisa

Primarni glomerulonefritis je bolest koja prvenstveno zahvaća glomerule uzrokujući strukturalne promjene glomerularnog klupka i poremećaj funkcije bubrega (1). Javlja se kod djece i odraslih, te zahvaća osobe svih rasa (2-8).

Primarni se glomerulonefritis pojavljuje kao javno-zdravstveni problem budući da dovodi do kroničnog zatajenja bubrega. Kod odraslih je primarni glomerulonefritis, uz dijabetičku nefropatiju i vaskularne bolesti bubrega, vodeći uzrok potrebe za dugotrajnom dijalizom, odnosno transplantacijom bubrega (2, 9,10) . Kod djece je primarni glomerulonefritis najčešći uzrok kroničnog zatajenja bubrega, ispred pijelonefritisa i urođenih grešaka u razvoju mokraćnog sustava (6).

Stvarnu učestalost pojave primarnog glomerulonefritisa teško je odrediti; prvenstveno zbog malog broja studija koje se bave tim problemom, te različitog pristupa u odabiru populacije. Promatrane skupine su ili bolesnici sa biopsijom bubrega ili bolesnici sa kroničnim zatajenjem bubrega, a vrlo rijetko se iznose podaci o učestalosti primarnog glomerulonefritisa u populaciji. Prema jednoj studiji u Francuskoj prevalencija primarnog glomerulonefritisa u njihovoj pokrajini iznosila je $5.7/10^9$ (11). Rezultati velike studije Talijanskog registra za bubrežne biopsije pokazuju incidenciju od 22.7 slučajeva na milijun stanovnika (12).

Incidencija primarnog glomerulonefritisa razlikuje se s obzirom na spol i rasu. Primarni glomerulonefritis češći je kod muškaraca svih dobnih skupina bez obzira na rasnu pripadnost (4,5,11). Primarni glomerulonefritis učestaliji je među Američkim Crncima i Indijancima no Američkim Bijelcima (2,13,14,15). Na Arapskom poluotoku uočena je viša incidencija primarnog glomerulonefritisa kod djece u usporedbi sa Zapadnim zemljama (5), dok kod odraslih nema razlike (16).

Najčešći primarni glomerulonefritis kod Crnaca u svim dobnim skupinama je fokalna glomerulokleroza (13-15,17-19), dok kod pripadnika drugih rasa prevladavaju proliferativni oblici primarnog glomerulonefritisa. U Saudiskoj Arabiji prevladava mesangiokapilarni (membranoproliferativni glomerulonefritis tip I i tip III) (20). U Evropi, posebno zemljama Mediteranskog bazena, te kod europskih potomaka u Americi i Australiji najčešći oblik primarnog glomerulonefritisa je IgA-GN (3,7,12,18,21-22). IgA-GN češći je u Evropi i Aziji nego u Sjevernoj Americi i Australiji (8), te opet češći u Evropi nego u Aziji (4,23).

Tijekom posljednjih nekoliko desetljeća primjećuje se porast broja neproliferativnih oblika primarnog glomerulonefritisa. Francuska je studija pokazala da iako IgA-GN kroz tri dekade ostaje vodeći oblik primarnog glomerulonefritisa raste broj membranskog GN (11). Incidencija fokalne glomeruloskleroze je u porastu među afroamerikancima (14,17) i u Indokini (4,24,25).

1.2. Klasifikacija primarnih glomerulonefritisa

Tijekom desetljeća klasifikacija glomerulonefritisa bila je podložna mnogim promjenama. Uvođenje biopsije bubrega u rutinsku obradu bolesnika sa bubrežnim bolestima doprinjelo je boljem poznavanju histoloških promjena, a primjena imunofluorescencije omogućila je razumjevanje patogeneze glomerulonefritisa. Sa stjecanjem novih saznanja mjenjale su se mnoge klasifikacije, koje su se neke više oslanjale na histološku sliku, a druge na patogenezu glomerulonefritisa. Dodatne teškoće u stvaranju sveobuhvatne klasifikacije proizlaze iz činjenice da se ista histološka slika može javiti kod glomerulonefritisa sa različitim patogenetskim mehanizmom i obratno. Kada se još uzme u obzir da patohistološki nalaz i klinička slika nisu bezuvjetno povezani; tj. jedna klinička slika može biti odraz nekoliko različitih patohistoloških promjena bubrežnog parenhima i vice versa, u poimanju i klasifikaciji glomerulonefritisa nastaje posvemašnja zbrka.

Danas je opće prihvaćena klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije (26) koja se oslanja na histološke kriterije i primarni glomerulonefritis dijeli na slijedeće entitete:

1. minimalne promjene glomerula
2. fokalne/segmentalne lezije
 - 2.1. fokalna segmentalna skleroza
 - 2.2. fokalni/segmentalni glomerulonefritis
3. difuzni glomerulonefritis
 - 3.1. membranski glomerulonefritis
 - 3.2. proliferativni glomerulonefritis
 - 3.2.1. mezangioproliferativni glomerulonefritis
 - 3.2.2. endokapilarni glomerulonefritis
 - 3.2.3. membranoproliferativni glomerulonefritis
 - 3.2.4. bolest s gustim intramembranskim depozitima
 - 3.2.5. difuzni ekstrakapilarni glomerulonefritis sa polumjesecima
 - 3.3. sklerozirajući glomerulonefritis
4. neklasificirani oblici glomerulonefritisa

Obzirom na nalaz imunofluorescencije moguće je grupiranje prije spomenutih histoloških entiteta u slijedeće tri skupine (27):

1. Glomerulopatije sa nepromjenjivom histološkom slikom i stalnim nalazom imunofluorescencije
 - 1.1. Glomerulopatije koje nisu posredovane imunim kompleksima: "idiopatski nefrotski sindrom"
 - 1.1.1. Minimalne promjene glomerula
 - 1.1.2. Difuzna mezangijska proliferacija
 - 1.1.3. Fokalna/segmentalna skleroza
 - 1.2. Glomerulopatije posredovane imunim kompleksima
 - 1.2.1. Endokapilarni glomerulonefritis sa "grbama"
 - 1.2.2. Membranski glomerulonefritis
 - 1.2.3. Mezangiokapilarni glomerulonefritis
 - 1.2.4. Bolest s gustim intramembranskim depozitima

2. Imunofluorescencijom definirane glomerulopatije sa promjenljivim histološkim nalazom
 - 2.1. Anti-GBM glomerulonefritis
 - 2.2. IgA glomerulonefritis
3. Glomerulopatije sa nepromjenljivom histološkom slikom i promjenjivim nalazom imunofluorescencije
 - 3.1. Mezangioproliferativni glomerulonefritis
 - 3.2. Difuzni proliferativni endokapilarni glomerulonefritis
 - 3.3. Fokalni/segmentalni glomerulonefritis
 - 3.4. Difuzni glomerulonefritis sa polumjesecima

U gore navedenoj klasifikaciji iz 1993. godine Habib i suradnici (27) izdvojili su IgA nefropatiju budući da pokazuje specifičnu sliku odlaganja IgA imunoglobulina u glomerulima. Kasnije su Churg i suradnici, koji su se u prethodnoj klasifikaciji iz 1982. godine (26) rukovodili isključivo morfološkim kriterijima u modifikaciji klasifikacije primarnih glomerulonefritisa iz 1995. godine izdvojili IgA-nefropatiju kao poseban entitet, bez obzira na histološki tip (28).

1.3. Klinička slika glomerulonefritisa

Klinička slika glomerulonefritisa ovisi o tri čimbenika: patofiziološkom mehanizmu nastanka bolesti, morfološkim promjenama nefrona i duljini trajanja bolesti. Primarni i sekundarni glomerulonefritis mogu se prezentirati jednim od slijedećih kliničkih sindroma (29,30):

1. Nefritički sindrom. Dominiraju hematurija, blaga do umjerena proteinurija i hipertenzija, te povišeni kreatinin i snižen klirens kreatinina.
2. Nefrotski sindrom. Karakteristični su teška proteinurija (više od 3.2 gr/dan), hipoalbuminemija, generalizirani edemi, hiperlipidemija i lipidurija.
3. Asimptomatska hematurija i/ili proteinurija.
4. Akutno zatajenje bubrega je karakterizirano akutnom oligurijom ili anurijom, te azotemijom
5. Kronično zatajenje bubrega. Zatajenje ekskretorne funkcije bubrega sa azotemijom, metaboličkim i endokrinim poremećajima.

Pojedini morfološki entiteti definirani klasifikacijom Svjetske zdravstvene organizacije mogu se očitovati jednom ili više različitih kliničkih sindroma. Najbolji primjer je IgA glomerulonefritis koji može prouzročiti nefritički sindrom, nefrotski sindrom, asimptomatsku hematuriju i kronično zatajenje bubrega. Ista klinička slika, pak, može objedinjavati više različitih morfološki i/ili patofiziološki definiranih entiteta. Nefrotski sindrom u svom okrilju sadrži "idiopatski nefrotski sindrom", membranski glomerulonefritis, mezangiokapilarni i ponekad, mezangioproliferativni glomerulonefritis (29,30).

Za potpunu dijagnozu glomerulonefritisa potrebna je sinteza morfoloških promjena i kliničkih simptoma.

1.4. Patogeneza i morfologija primarnih glomerulonefritisa

1.4.1. Glomerulopatije sa nepromjenjivom histološkom slikom i stalnim nalazom imunofluorescencije

1.4.1.1. Glomerulopatije koje nisu posredovane imunim kompleksima: “idiopatski nefrotski sindrom”

“Idiopatski nefrotski sindrom” definiran je kliničkom slikom nefrotskog sindroma nepoznatog uzroka i najčešći je oblik primarnog glomerulonefritisa kod djece (27,30). Pod tim imenom kriju se tri morfološka entiteta; minimalne promjene glomerula, difuzna mezangijska proliferacija i fokalna/segmentalna skleroza (27). Nalaz imunofluorescencije je najčešće negativan, ali se u slici svakog pojedinog morfološkog entiteta mogu u mezangiju naći depoziti IgM i/ili C1q. Ovi su depoziti, po mišljenju većine autora, nespecifični (27,30,31).

1.4.1.2. Minimalne promjene glomerula

Karakteristična ultrastrukturalna promjena je stapanje nožica podocita. Ponekad se može uočiti stanjena *lamina densa* glomerularne bazalne membrane. Ostali segmenti glomerula su nepromijenjeni. Promjene tubulointersticija su rijetke, i ako prisutne slabo izražene. Oko polovice bolesnika dobro reagira na terapiju kortikosteroidima. Bolest se rijetko pojavljuje u transplantiranom bubregu (30).

1.4.1.3. Difuzna mezangijska proliferacija

Glavno morfološko obilježje ovog entiteta je blaga proliferacija mezangijskih stanica i umnažanje mezangijskog matriksa. McAdams i suradnici su uočili ultrastrukturalne promjene slične kao kod glomerulonefritisa minimalnih promjena, te čestu pojavu tubuloretikularnih inkluzija (30). Tubulointersticijalne promjene su rijetke i blago izražene. Kronično zatajenje bubrega se javlja rijetko, no obično vrlo brzo progredira. Rekurencija bolesti u transplantiranom bubregu je rijetka (30).

1.4.1.4. Fokalna/segmentalna skleroza

Fokalnu glomeruloskleroza definira prisustvo žarišta skleroze glomerularnog klupka. Uz fokalnu glomeruloskleroza redovito se javljaju izražene tubulointersticijske promjene (27,30,31).

Odnos opisanih triju entiteta predmet je razmatranja mnogih autora. Uvriježeno je mišljenje većine da su glomerulonefritis minimalnih promjena i fokalna glomeruloskleroza dva aspekta iste bolesti (30,32), gdje se kod nekih bolesnika sa minimalnim promjenama javlja skleroza klupka, a kod drugih do takvih promjena nikada ne dođe. Prisustvo mezangijske proliferacije predstavlja moguću međufazu u razvoju bolesti. McAdams i suradnici (30) smatraju skleroza glomerula epifenomenom. Obzirom na ultrastrukturalne promjene ne-sklerotičnog dijela klupka razlikuju dva morfološko-klinička entiteta: “primarnu fokalnu glomeruloskleroza” i bolest sa ultrastrukturalnim promjenama glomerula. Kod “primarne fokalne glomeruloskleroze” ne nalaze se promjene podocita ili drugih struktura glomerula. Tubulointersticijske promjene su uvijek prisutne i češće naglašene. Bolest se nikada ne pojavljuje u transplantiranom bubregu. “Primarna fokalna glomeruloskleroza” zahvaća djecu Crne rase u doba puberteta. Klinički se glomerulonefritis minimalnih promjena i difuzna

mezangijska proliferacija od primarne fokalne glomeruloskleroze razlikuju po tome što zahvaćaju djecu Bijele rase, te se mogu ponovo pojaviti nakon transplantacije.

Genetski čimbenici

U posljednje vrijeme se sve češće idiopatski nefrotski sindrom povezuje genetskim poremećajem, koji je ili odraz svježije mutacije ili nasljeđen. Najdulje su poznate nasljedne bolesti dječje dobi poput Alport-ovog sindroma i "Finski tip fokalne glomeruloskleroze" (32). U podlozi Alport-ovog sindroma leži poremećaj sinteze kolagena IV glomerularne bazalne membrane (32). "Finski tip" glomerulonefritisa se u nekim obiteljima nasljeđuje kao autosomalno dominantan poremećaj, dok se kod drugih radi o recesivnom obliku nasljeđivanja, te se vjerojatno radi o grupi više različitih genetskih poremećaja koji uzrokuju slične morfološke promjene i kliničku sliku. Autosomalno dominantan tip nasljeđivanja idiopatskog nefrotskog sindroma sa morfološkom slikom koji varira od minimalnih promjena glomerula do fokalne glomeruloskleroze, vezan je za kromosom 19q13 (33,34,35). Zabilježene su i mutacije gena na kromosomima 1,11 i 17, a pobliže je opisana mutacija gena HPHS1. Ova mutacija dovodi do poremećaja sinteze nephrina, proteina koji je dio dijafragme podocita (36). Slijedeći u nizu poremećaja koji narušava sklad "filtracijske membrane" glomerula (endotel, glomerularna bazalna membrane, podociti) je mutacija gena za β 4-integrin, receptor ekstracelularnog matriksa (37). α 6 β 4 je epitelni receptor za laminin bazalne membrane i u bubregu je izražen tijekom embrionalnog razvoja, a u odraslom se bubregu gubi (38).

Osim strukturalnih promjena i funkcionalni poremećaji uzrokuju sklerozu glomerularnog klupka. Paraoksonaza je enzim vezan uz lipoproteine visoke gustoće (HDL) i sprječava oksidaciju lipoproteina niske gustoće (LDL). Progresija proteinurije i ubrzana skleroza glomerula povezane su sa poremećajima u metabolizmu lipida. Kod djece je uočena povezanost paraoksonaza LL-genotipa i lošije prognoze (39).

Podaci o učestalosti pojedinih HLA genotipova u populaciji bolesnika sa idiopatskim nefrotskim sindromom su ponekad proturječni. Već 1980. godine su HLA-B8 i HLA-B12 bili povezani sa lošijom prognozom idiopatskog nefrotskog sindroma (40). U kasnijim istraživanjima nije potvrđena povezanost fokalne glomeruloskleroze (FGS) ni sa HLA-B8 (41) niti HLA-A1, B27, DR2, DR3 i DR7 (41,42), već se FGS povezuje sa HLA-DR4 (43). Glomerulonefritis minimalnih promjena je češći kod osoba HLA-DR3, DR7 i DQ2 genotipa (43).

Nisu samo mutacije na DNK jezgre uzrok pojave FGS. Mutacija mitohondrijalne DNK (A3243G) uzrokuje mitohondrijalnu citopatiju koja se manifestira neuromuskularnim poremećajima, encefalopatijom, gluhoćom, dijabetesom, te poremećajima funkcije bubrežnih kanalića i fokalnom glomerulosklerozom. Simptomi poremećene bubrežne funkcije mogu biti prvi i/ili jedini izraženi. Morfološki su za ovaj poremećaj karakteristični veliki, dismorfni mitohondriji koji su naročito izraženi u podocitima (44,45).

1.4.2. Glomerulopatije posredovane imunim kompleksima

Ovu skupinu čine četiri entiteta koji nisu etiopatogenetski povezani. Njihova je jedina zajednička značajka da se u pojedinim dijelovima glomerula mogu naći depoziti imunokompleksa koji se stvaraju *in-situ* ili «zapnu» prilikom prolaženja glomerularne barijere.

1.4.2.1. Endokapilarni glomerulonefritis sa «grbama»

Morfološka obilježja endokapilarnog glomerulonefritisa su proliferacija mezangijskih i endotelnih stanica te nakupljanje upalnih stanica, prvenstveno neutrofila i monocita/makrofaga. Neutrofili prevladavaju u početnoj fazi bolesti, no tijekom bolesti polagano zamjenjuju mononukleari i CD4+ limfociti (46). Imunokompleksi, C3 komponenta komplementa i IgG, stvaraju subepitelne depozite («grbe»). Imuno-depoziti se mogu naći i u mezangiju, te u imunofluorescenciji daju sliku «zvjezdanog neba». U teškim oblicima bolesti može se naći i ekstrakapilarna proliferacija, tzv. polumjeseci (47). Endokapilarni glomerulonefritis najčešće se javlja nakon streptokokne infekcije, no može biti posljedica infekcije humanim B19 parvovirusom (48), stafilokokima ili Gram-negativnim mikroorganizmima (49). Post-infekcijski endokapilarni glomerulonefritis javlja se kod djece i kod imunosuprimiranih odraslih osoba. Iako je kod djece lakši oblik bolesti češći i uglavnom prolazi bez posljedica (46), post-infekcijski endokapilarni glomerulonefritis kod odraslih može uzrokovati kroničnu renalnu insuficijenciju (49). Tijekom akutne faze bolesti moguć je smrtni ishod; i opet mnogo rjeđe kod djece (<1%) nego kod odraslih osoba (5-9%) (46).

1.4.2.2. Membranski glomerulonefritis

Osnovna morfološka karakteristika membranskog glomerulonefritisa je zadebljanje glomerularne bazalne membrane uslijed subepitelnog nakupljanja komponenata komplementa (najčešće C3) i imunoglobulina, a prevladavaju depoziti IgG. Proliferacija mezangijskih stanica uglavnom izostaje. U daljnjem tijeku bolesti između subepitelnih depozita urasta novostvorena glomerularna bazalna membrana i stvara se karakteristična slika «šiljaka». Vremenom bazalna membrane potpuno okruži imunodepozite koji se lagano otapaju te na njihovom mjestu zaostaju «šupljine», a GBM izgleda poput «lančića». Šupljine budu popunjene odlaganjem proteina ekstracelularnog matriksa, a tijekom ovog procesa GBM postaje sve deblja i nepravilnija. (50,51)

«Sekundarni» membranski glomerulonefritis može se javiti u sklopu autoimunih bolesti, sistemske infekcije, kod onkoloških bolesnika ili biti posljedica uzimanja lijekova. Patogeneza bolesti nije u potpunosti razjašnjena. U modelu Haymanovog nefritisa na štakorima membranski glomerulonefritis bio je izazvan aplikacijom antigene komponente s površine epitelnih stanica proksimalnih kanalića. Antigen je kasnije identificiran kao megalin koji je građevni dio epitelnih stanica tubula i podocita kod štakora. Kod čovjeka je megalin prisutan u epitelnim stanicama kanalića ali ga nema na podocitima (52). Antigeni koji se mogu naći u subepitelnim depozitima kod humanog membranskog glomerulonefritisa su slijedeći:

- a) antigeni iz živih uzročnika: hepatitis B virus, hepatitis C virus, *Helicobacter pylori* (53)
- b) tumorski antigeni
- c) vlastiti proteini: tiroglobulin
- d) lijekovi

Povezanost određenog antigena i membranskog glomerulonefritisa može se dokazati u oko 25% slučajeva. Kod preostalih 75% slučajeva etiologija ostaje i dalje nerazjašnjena, a bolest se naziva «idiopatski» ili «primarni» membranski GN (50). Membranski glomerulonefritis najčešće uzrokuje kliničku sliku nefrotskog sindroma i/ili kronične renalne insuficijencije (50).

1.4.2.3. Meziangiokapilarni glomerulonefritis (Membranoproliferativni GN tip I i tip III)

Glavne morfološke značajke membranoproliferativnog glomerulonefritisa tip I i tip III su proširenje mezangija uslijed proliferacije mezangijskih stanica i njihovo «urastanje» u kapilarne stjenke. Uz mezangijske stanice u stijenama kapilara nalaze se i monociti/makrofagi. Posljedica tog procesa je stvaranje novog lista GBM, tako da se posebnim histološkim bojanjem (impregnacija srebrom po Jonesu, elektronska mikroskopija) može uočiti duplikacija glomerularne bazalne membrane (51). Lumeni glomerularnih kapilara su uglavnom ispunjeni i/ili začepljenim stanicama (lobulirani glomeruli, koji izgledaju kao da su sastavljeni od loptica) tako da su protok kroz glomerularne kapilare i filtracija primarnog urina gotovo onemogućeni. U težim slučajevima mogu se pojaviti polumjeseci (ekstrakapilarne proliferacije stanica), dok je nekroza glomerularnog klupka uvijek odsutna (54). Imunofluorescencijom dokazano je odlaganje imunokompleksa (IgG, C3). Imunodepoziti su kod membranoproliferativnog glomerulonefritisa tip I smješteni subendotelno, a kod membranoproliferativnog glomerulonefritisa tip III subepitelno i subendotelno. Mnogi autori vjeruju da je tip II samo varijanta membranoproliferativnog glomerulonefritisa tip I (54).

Etiologija bolesti je u većini slučajeva nepoznata, pa se govori o «idiopatskom membranoproliferativnom glomerulonefritisu tip I». Opisani su slučajevi pojave membranoproliferativnog glomerulonefritisa tip I u sklopu autoimunih bolesti (51), krioglobulinemije (55) te uz hepatitis B i C (56) i limfocitnu leukemiju (57). Klinički se bolest uglavnom očituje kao nefritički sindrom u odraslih osoba i nefrotički sindrom kod djece (51).

1.4.2.4. Bolest s gustim intramembranskim depozitima (Membranoproliferativni GN tip II, «Dense deposit disease»)

Membranoproliferativni glomerulonefritis tip II morfološki je karakteriziran odlaganjem «gustih», tamnih depozita uzduž GBM i u mezangiju. Depoziti se mogu naći uz Bowman-ovu čahuru i uzduž TBM. Imunofluorescencijom se mogu pokazati depoziti C3 komponente komplementa (54). Histološki promjene mogu nalikovati «minimalnim promjenama glomerula» ili membranskom GN u početnom stadiju, ali najčešće nalikuju membranoproliferativnomi GN tip I. Za postavljanje dijagnoze potrebna je elektronskomikroskopska identifikacija «gustih depozita» poput vrpce unutar bazalne membrane (51).

Bolest se obično pojavljuje kod starije djece i mlađih odraslih osoba sa kliničkom slikom nefrotskog sindroma. Ponekad je prisutna i mikrohematurija. Membranoproliferativni GN tip II vrlo često uzrokuje kroničnu renalnu insuficijenciju i gotovo redovito recidivira u presađenom bubregu (51).

1.4.3. Imunofluorescencijom definirane glomerulopatije sa promjenljivim histološkim nalazom

1.4.3.1. Anti-GBM glomerulonefritis

Anti-GBM glomerulonefritis je autoimuna bolest uzrokovana prisustvom auto-antitijela na glomerularnu bazalnu membranu. Iako ima više antigena koji mogu uzrokovati stvaranje antitijela, najpoznatiji je Goodpasture-ov antigen, ne-kolagena domena 1 α 3 lanca molekule kolagena IV (58). Za bolest su karakteristični linearni imunodepoziti za antigene GBM specifičnih antitijela IgG klase i rjeđe, komponenta komplekta, prvenstveno C3. Imunodepoziti se nalaze i uzduž GBM histološki intaktnih glomerula. Morfološki, se radi o difuznom ekstrakapilarnom glomerulonefritisu. Ponekad je prisutna segmentalna nekroza glomerularnog klupka (33).

Bolest je rijetka, javlja se češće kod mlađih odraslih osoba i, opet, češće kod muškaraca nego kod žena. Klinički se anti-GBM GN manifestira kao mikro- i makro-hematurija, a tijekom vremena se razvija sve teža klinička slika koja može kulminirati akutnim zatajenjem bubrežne funkcije (33).

1.4.3.2. IgA glomerulonefritis

Osnovno obilježje IgA nefropatije je odlaganje IgA-imunokompleksa (IgA, C3) u različite djelove glomerula; prvenstveno u mezangij, ali se mogu naći i uzduž GBM. Uz IgA gotovo su uvijek prisutni i depoziti IgG i C3 (51). IgA nefropatija poprima različite morfološke oblike i može se očitovati kao: fokalni/segmentalni glomerulonefritis, mezangioproliferativni glomerulonefritis, difuzni ekstrakapilarni glomerulonefritis s polumjesecima i sklerozirajući glomerulonefritis; te je stoga izdvojena kao poseban entitet (27).

IgA je najčešća glomerularna bolest i javlja se u svim dijelovima svijeta. U Aziji IgA nefropatija predstavlja gotovo polovinu glomerularnih bolesti, a u Europi do 30% (ovisno o dijelu Europe) (59). Započinje obično u mlađoj životnoj dobi i zahvaća češće dječake (51). U posljednje se vrijeme govori da je IgA nefropatija nasljedna bolest vezana za IGAN1-lokus na kromosomu 6q22-23 (60).

Kako je histološka slika IgA nefropatije promjenjiva, tako je i klinička slika i klinički tijek bolesti. IgA nefropatija može se očitovati samo mikrohematurijom i spontano regredirati nakon nekog vremena ili u cijelom rasponu različitih simptoma dovesti do kroničnog zatajenja bubrega. Nepovoljni klinički prognostički čimbenici su DD-genotip ACE gena, porast kreatinina, nefrotska proteinurija i hipertenzija (59).

1.4.4. Glomerulopatije sa nepromjenjivom histološkom slikom i promjenljivim nalazom imunofluorescencije

Entiteti u ovoj skupini su definirani histološkom slikom uz koju se mogu naći obrasci odlaganja imunodepozita. Etiologija bolesti se razlikuje i djelomično odražava u nalazu imunofluorescencije. Neke od ovih morfoloških entiteta već su spomenuti prilikom diskusije o imunofluorescencijom definiranim glomerulopatijama koje imaju promjenljivu histološku sliku.

1.4.4.1. Mezangioproliferativni glomerulonefritis

Mezangioproliferativni GN morfološki je definiran proliferacijom mezangijskih stanica što je ponekad udruženo sa infiltracijom monocita/makrofaga iz cirkulacije. Glomerularne kapilare su bez patoloških promjena. O etiologiji bolesti koja je dovela do glomerulonefritisa može se zaključivati na temelju nalaza imunofluorescencije. Mezangioproliferativni GN je najčešći morfološki oblik IgA nefropatije, kada su u mezangiju prisutni depoziti IgA i C3. Proliferacija mezangijskih stanica se često vidi kao «zaostale» promjene nakon postinfekcijskog GN, što može biti samo prolazni stadij ili permanentan nalaz. Mezangioproliferativni GN se javlja i kod sistemskih bolesti (27). Klinička slika je obično blaga sa hematurijom i/ili proteinurijom i u velikoj mjeri ovisi o osnovnoj bolesti (51).

1.4.4.2. Difuzni proliferativni endokapilarni glomerulonefritis

Difuzni proliferativni endokapilarni glomerulonefritis je morfološki definiran obilnom proliferacijom mezangijskih i endotelnih stanica, te nakupljanje polimorfonukleara i monocita u lumenu kapilara. Promjene zahvaćaju više od 80% glomerula. Ovaj se oblik najčešće javlja u sklopu postinfekcijskog GN (51).

1.4.4.3. Fokalni/segmentalni glomerulonefritis

Naziv «fokalni/segmentalni GN» označava da je zahvaćeno manje od 80% glomerula, a unutar samog glomerula patološke promjene prisutne su samo u dijelu (segmentu) glomerularnog klupka. Glavne patološke promjene su nekroza dijela glomerularnog klupka i/ili segmentalna proliferacija mezangijskih stanica koje su ponekad popraćene stvaranjem polumjeseca (51). Ovaj histološki tip glomerulonefritisa najčešće se javlja u sklopu sistemskih bolesti poput ANCA-pozitivnog vaskulitisa (61), a ponekad je morfološki oblik IgA nefropatije (27).

1.4.4.4. Difuzni glomerulonefritis s polumjesecima

Difuzni glomerulonefritis sa polumjesecima ili ekstrakapilarni brzoprogresivni glomerulonefritis je naziv za skupinu glomerulonefritisa različite etiologije čije je glavno morfološko obilježje stvaranje polumjeseca. Klinički tijek je izrazito buran sa naglim razvojem kronične bubrežne insuficijencije. Imunohistokemijski nalaz do neke mjere upućuje na etiologiju bolesti i različit je od bolesti do bolesti.

Kod polovine difuznih glomerulonefritisa s polumjesecima nema odlaganja imunodepozita u strukture glomerula, a etiologija je nepoznata. Ovaj se oblik naziva «idiopatski ekstrakapilarni brzoprogresivni GN» (51).

Ponekad se u sklopu nepovoljnog tijeka glomerulopatija sa nepromjenjivom histološkom slikom i stalnim nalazom imunofluorescencije razvije histološka slika ekstrakapilarnog glomerulonefritisa. To se prvenstveno odnosi na bolesti posredovane imunim kompleksima poput IgA nefropatije, postinfekcijskog GN, membrano-proliferativnog GN tip I. Ekstrakapilarni glomerulonefritis javlja se i u sklopu sistemskih autoimunih bolesti. U tim slučajevima nalaz imunofluorescencije ukazuje na osnovnu bolest (26,32,51).

Anti-GBM glomerulonefritis vrlo često poprima histološku sliku ekstrakapilarnog brzoprogredirajućeg glomerulonefritisa, pogotovo ako je bubrež zahvaćen u sklopu sistemske bolesti zajedno sa plućima (Goodpasterov sindrom) (51).

U novije vrijeme definiran je ekstrakapilarni glomerulonefritis sa malo imunih depozita («pauci imunodepoziti»). Najčešće se javlja u sklopu ANCA-pozitivnog hipersenzitivnog vaskulitisa ili Wegenerove granulomatoze (61).

1.5. Tubulointersticijalna upala u sklopu glomerulonefritisa

Komparativna analiza 2500 slučajeva primarnih glomerulopatija u koju su bila uključena 1747 slučajeva primarnog glomerulonefritisa (62) pokazala je da klinička prognoza bolesti ovisi o stupnju oštećenja bubrežnog intersticija. Autori su uspoređivali razinu kreatinina u serumu u vrijeme biopsije bubrega i histološke promjene tkiva te su došli do zaključka da postoji statistički značajna pozitivna korelacija između relativne površine bubrežnog intersticija i koncentracije kreatinina u serumu u svim oblicima primarnog glomerulonefritisa, osim kod brzo-progredirajućeg glomerulonefritisa.

U daljnjem su radu isti autori detaljnije obradili sakupljene podatke (63) i došli do slijedećih rezultata:

1. Patološke promjene ograničene samo na glomerule bez obzira na opsežnost, ne uzrokuju povišenje serumskog kreatinina, niti vode u kronično zatajenje bubrega.
2. Blage promjene glomerula u sklopu glomerulonefritisa povezane su sa povišenom koncentracijom serumskog kreatinina jedino ako su udružene sa fibrozom intersticija i atrofijom bubrežnih kanalića.
3. Kod mezangioproliferativnog glomerulonefritisa postoji statistički značajna negativna korelacija između koncentracije kreatinina u serumu i broja otvorenih intersticijalnih kapilara
4. Postoji statistički značajna pozitivna korelacija između relativnog volumena intersticija i koncentracije kreatinina u serumu kod svih oblika primarnog glomerulonefritisa, osim kod brzo progredirajućeg GN (RPGN).

1.5.1. Etiologija i patogeneza tubulointersticijalne upale kod primarnog glomerulonefritisa

Glavna morfološka karakteristika tubulointersticijalne upale kod primarnog glomerulonefritisa je prisustvo T-limfocita (CD4+) i makrofaga (62,64,65,66), te u manjoj mjeri B-limfocita u intersticiju. Infiltraciju intersticija upalnim stanicama uzrokuju brojni citokini (IL-6, IL-8, IP-10, TGF- β , TNF- α , MCP-1, RANTES, PDGF) koje luče i epitelne stanice bubrežnih kanalića (67,68) Tijekom tubulointersticijalne upale dolazi na površini epitelnih stanica bubrežnih kanalića do *de novo* ekspresije adhezijskih molekula (integrini, VCAM-1, ICAM-1, E-selectin, osteopontin) (64,69). Aktivacija T-limfocita se odigrava i *in situ* preko antigen-prezentirajućih stanica. Dokazano je prisustvo dendritičnih stanica u intersticiju tijekom upale. Osim profesionalnih antigen-prezentirajućih stanica (dendritične stanice, makrofagi) epitelne stanice proksimalnih kanalića mogu prezentirati antigene T-limfocitima. Tijekom upalnog procesa pod utjecajem citokina one postaju HLA-DR pozitivne (70,71,72,73).

Upala bubrežnog intersticija javlja se u sklopu sistemskih infekcija, primarnih i sekundarnih glomerulonefritisa, mogu je uzrokovati lijekovi ili direktno toksično oštećenje epitelnih stanica kanalića (74). U sklopu glomerulonefritisa glavni uzrok oštećenja epitelnih stanica kanalića (64) je proteinurija (75). Bohle i suradnici (1996) su postavili hipotezu da su primarni antigeni fragmenti glomerularne bazalne membrane. GBM antigeni su, prema postavljenoj hipotezi, prilikom oštećenja glomerula i odljepljivanja podocita otplavljeni u urin

i reapsorbiraju ih epitelne stanice proksimalnih kanalića, koje su ujedno i antigen prezentirajuće stanice. Neki autori smatraju da za oštećenje tubulointersticija nije presudna vrsta proteina već njegova količina, odnosno više od 3g/24h, i njihova 'pogrešno usmjerena' reapsorpcija iz kanalića (76,77,78).

1.5.2. Fibroza intersticija

Makrofazi luče mnogobrojne pro-fibrotične citokine, među kojima ključnu ulogu igraju TGF- β , TNF- α i ET-1 (79). Ovi citokini stimuliraju sintezu proteina ekstracelularnog matriksa (80) i inhibiraju njihovu razgradnju putem metaloproteinaza (TIMP-1, PAI-1). TGF-beta se nalazi u svojoj inaktivnoj formi vezan za LAP, a njegova aktivacija slijedi nakon disocijacije kompleksa preko lokalnih aktivatora. U bubregu je lokalni aktivator TGF- β integrin α v β 6. Osim makrofaga ET-1 luče aktivirane epitelne stanice bubrežnih kanalića, endotelne stanice i fibroblasti. ET-1 stimulira sintezu TGF- β i proteina ekstracelularnog matriksa, te proliferaciju intersticijalnih fibroblasta. TNF- α djeluje preko receptora p55 (79).

Intersticijalni alpha-SMA pozitivni miofibroblasti su glavne stanice za sintezu kolagena kod intersticijalne fibroze. Tubularne epitelne stanice također doprinose sintezi proteina ekstracelularnog matriksa. One se transformiraju mijenjajući svoj fenotip iz epitelnih u mezenhimalne stanice (proces poznat pod nazivom «transdiferencijacija»), migriraju u intersticij i luče FSP-1. Ovaj proces se odigrava pod utjecajem IL-1 (81) TGF-beta (82) koji inducira ILK. Prekomjerna ekspresija ILK u epitelnim stanicama kanalića dovodi do supresije E-cadherina (međustanična adhezijska molekula epitela), indukcije sinteze fibronektina i njegovog odlaganja u intersticijalni prostor, te ekspresije MMP-2 koja razgrađuje tubularnu bazalnu membranu. Ove promjene omogućuju migraciju epitelnih stanica kanalića u intersticij (83) i njihovu transformaciju u SMA-pozitivne, citokeratin negativne miofibroblaste (84).

U svojoj konačnici tubulointersticijalna fibroza uzrokuje ireverzibilno smanjenje intersticijalnog volumena i broja intersticijalnih kapilara. Ovi parametri najznačajnije utječu na klinički tijek bolesti te imaju prognostičko značenje (63).

1.6. Proteini ekstracelularnog matriksa

Sastav ekstracelularnog matriksa bubrežnog intersticija mijenja se tijekom embrionalnog razvoja, te u upali i fibrozi. Proteini ekstracelularnog matriksa nisu pasivni sastojci intersticija već imaju aktivnu ulogu u procesima stanične diferencijacije, rasta, migracije i/ili transformacije.

1.6.1. Kolagen tip I i kolagen tip III

Kolagen tip I zajedno s drugim kolagenima sudjeluje u prijenosu signala kod međusobne interakcije epitela i mezenhima tijekom embrionalnog razvoja bubrega, no nije neophodan za granjanje tubula. Njegova uloga je izraženija u stvaranju bazalne membrane tijekom embrionalnog razvoja. (85). Kolagen tip I se kod fibroze bubrega odlaže kasno tijekom procesa i u malim količinama (80). U kulturi stanica kolagen tip I stimulira «epitelno-mezenhimalnu transdiferencijaciju» epitelnih stanica bubrežnih kanalića (84). Kolagen tip III je također jedan od proteina ekstracelularnog matriksa u fibrozi bubrega i odlaže se u većim količinama no kolagen tip I (80). Sinteza oba tipa kolagena pod utjecajem je TGF- β koji djeluje preko NF-1 mjesta na promotoru gena za kolagen (87).

1.6.2. Kolagen tip IV

Molekula kolagena tip IV je zavojnica građena od 3 α -lanca kolagena IV. Kod čovjeka je identificirano 6 različitih α -lanaca, a helix tvore dva do tri različita lanca. Kolagen IV je glavni građevni protein glomerularne i tubularne bazalne membrane.

Kod fibroze bubrega kolagen IV se obilno odlaže u intersticij (80). TGF- β potiče transkripciju gena za kolagen IV, no ne preko NF-1 mjesta kao kod kolagena I i III (87).

1.6.3. Fibronektin

Fibronectini su glikoproteini velike molekularne mase. Razlikuju se dva glavna oblika: celularni fibronektin i fibronektin plazme. (88) Fibronektin se nalazi u plazmi, međustaničnom matriksu mekih tkiva i sastavni je dio bazalne membrane. Fibronektin plazme sintetiziraju endotelne stanice, hepatociti i makrofagi. Najznačajniji izvor fibronectina u međustaničnom prostoru su fibroblasti, no sintetiziraju ga još hondrociti, neke vrste epitelnih stanica i embrionalne stanice. U međustaničnom prostoru fibronektin je najčešće uklopljen u vlakanca (fibrile) koje sadrže kolagen i proteoglikane. Fibronektin se veže na denaturirani kolagen, fibrin/fibrinogen, aktin, C1q komponentu komplementa, DNK, stanice i bakterije. Fibronektin sudjeluje u adheziji stanica na ekstracelularni matrix (bazalnu membranu), organizaciji intracelularnih mikrofilamenata (citoskeleton) i migraciji stanica. Neophodan je tijekom embrionalnog razvoja i u procesu fagocitoze.(88)

1.6.4. Tenascin

Tenascin je glikoprotein čija se uloga veže za migraciju stanica, pregradnju extracelularnog matriksa, te involuciju organa (80). Tenascin je neophodan tijekom embrionalnoga razvoja zbog svoje uloge u binarnoj diferencijaciji mezenhima u epitel i stromu, i u kontroli rasta epitela (85). Tenascin se nalazi u 'potaknutom' mezenhimalnom matriksu koji stoji neposredno u kontaktu sa pupajućim epitelom bubrežnih kanalića, ali ga nema u drugim dijelovima mezenhima.

1.6.5. Fibrin/fibrinogen

Molekula fibrinogena građena je od tri para aminokiselinskih lanaca (α, β, γ) koji su međusobno povezani disulfidnim mostovima. Fibrin je produkt cijepanja molekule fibrinogena pod utjecajem trombina. Fibrinske molekule stvaraju mrežu međusobno povezanih fibrila. Osnovna funkcija fibrinogen-fibrin sistema plazme je stvaranje trodimenzionalne mreže koja omogućuje nastanak krvnog ugruška. U dodiru sa ekstracelularnim matriksom fibrin se veže na fibronektin. Fibrin, fibrinogen i fibronektin tvore mrežu koja omogućuje adheziju i/ili migraciju stanica, te njihovu proliferaciju. (89). U tom procesu sudjeluju fibrinogen plazme i fibrinogen kojeg sintetiziraju epitelne stanice na mjestu upale. Uloga fibrinogena je dvojaka; preko γ -lanca fibrinogen djeluje kao spremište za FGF koji direktno stimulira proliferaciju fibroblasta (90) i s druge strane sudjeluje u procesu povratne sprege tako što inhibira sintezu mRNA za fibronektin (91). Fibrin potiče proliferaciju fibroblasta i neoangiogenezu, te preko integrinskih receptora α Mb2 (Mac-1) omogućuje migraciju monocita i neutrofila koja se odvija pod utjecajem citokina (kemotaksija) (92).

2. CILJ I SVRHA DOKTORSKE STUDIJE

U meni dostupnoj literaturi nema podataka o mogućem prognostičkom značenju patološkog nakupljanja pojedinih proteina ekstracelularnog matriksa u intersticiju bubrega kod glomerulonefritisa. Cilj doktorske disertacije je utvrditi da li analiza proteina ekstracelularnog matriksa intersticija u bioptičkom materijalu može biti prognostički značajna za bolesnika.

Da bi se mogao donijeti konačan zaključak potrebno je učiniti slijedeće:

1. utvrditi prisutnost ili odsutnost pojedinih proteina ekstracelularnog matriksa (kolagen tip I, kolagen tip III, kolagen tip IV, tenascin, fibronektin) te fibrina/fibrinogena u intersticiju bubrega kod bolesnika sa pojedinim oblicima primarnog glomerulonefritisa.
2. utvrditi relativnu rasprostranjenost pojedinih proteina ekstracelularnog matriksa u intersticiju bolesnika sa primarnim glomerulonefritisom u odnosu na normalni bubrežni intersticij.
3. usporediti prisutnost (neprisutnost) pojedinih proteina ekstracelularnog matriksa s jačinom upalnog infiltrata u intersticiju bolesnika sa primarnim glomerulonefritisom.
4. usporediti prisutnost ili neprosutnost pojedinih proteina ekstracelularnog matriksa s razinom kreatinina u serumu i proteinurijom u času biopsije kod bolesnika s primarnim glomerulonefritisom.
5. usporediti prisutnost (odsutnost) pojedinih proteina ekstracelularnog matriksa s odgovorom na terapiju (razina kreatinina u serumu i proteinurija prilikom prvog pregleda nakon započete terapije) bolesnika sa primarnim glomerulonefritisom.

Svrha ovog rada je da pokuša ponuditi nove histološke prognostičke čimbenike primarnih glomerulonefritisa.

3. ISPITANICI, HISTOLOŠKI MATERIJAL I METODE

3.1. Ispitanici

Ispitanici su u ovoj studiji bila 55 bolesnika Zavoda za nefrologiju KBC Zagreb; 32 muškarca i 22 žene, u dobi od 17 do 72 godine (srednja dob 38 godina). Klinički podaci za razinu kreatinina u serumu i proteinuriju u času biopsije (kreatinin1, biuret1) i nakon uvođenja terapije (kreatinin2, biuret2) dobiveni su sa Zavoda za nefrologiju. Trajanje bolesti do biopsije iznosilo je 27,8 +/- 29,2 mjeseca; medijan 17 mjeseci (kvartili 5 i 36). Dodatno su za neke bolesnike (n=25) bili dostupni podaci o ACE-genotipu učinjenim u sklopu kliničke obrade. Tijekom studije ustanovljeno je da za jednog ispitanika nedostaju klinički podaci.

3.2. Histološki materijal

Obraden je bioptički materijal bubrega Zavoda za patologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb-Rebro 55 bolesnika sa primarnim glomerulonefritisom liječenih na Zavodu za nefrologiju Interne klinike Kliničkog bolničkog centra Zagreb-Rebro u razdoblju od 1992. do 1998. godine.

Histološka dijagnoza bila je:

1. membranski glomerulonefritis	9	bolesnika
2. IgA glomerulonefritis	29	bolesnika
3. mezangioproliferativni glomerulonefritis	10	bolesnika
4. membranoproliferativni glomerulonefritis	2	bolesnika
5. fokalna glomeruloskleroza	4	bolesnika
6. difuzni glomerulonefritis sa polumjesecima	1	bolesnik

Kontrolna skupina za histološko određivanje proteina ekstracelularnog matriksa bilo je normalno bubrežno tkivo uzeto (5 slučajeva) iz bubrega odstranjenih zbog karcinoma.

3.3. Histološke metode

Bioptički materijal preuzet je za svjetlosnu mikroskopiju, imunofluorescenciju, elektronsku mikroskopiju i imunohistokemiju.

Dio preuzet za svjetlosnu mikroskopiju fiksiran je u Dubosq-Bouin fiksativu 6 sati, a preko noći u puferiranom formalinu, uklopljen u paraplast i rezan na debljinu 3-5 mikrona. Tkivo je bojano hemalaun-eozinom, perjodnom kiselinom i Schiff-ovim reagensom (PAS), trikromnom metodom po Mallory-u i impregnirano srebrom (metoda srebrenog metenamina po Jones-u). (Luna LG. Histopathologic methods and color atlas of special stains and tissue artifacts. 1992 American Histolabs INC, Gaithersburg)

Dio tkiva preuzet za imunofluorescenciju smrznut je na -27°C i rezan u kriostatu na debljinu 3-5 µm. Tkivo je montirano na predmetno staklo, osušeno i fiksirano kroz 10 minuta u acetonu na +40°C. Nakon toga rezovi su inkubirani sa FITC-konjugiranim primarnim antitijelima (Dako) na humane imunoglobuline (IgG, IgA, IgM) i komponente komplekta (C1q, C3, C4), te fibrin/fibrinogen.

Tkivo je analizirano svjetlosnim mikroskopom podešenim za imunofluorescenciju (Reichert), povećanje 200x.

Dio bioptičkog materijala preuzet za elektronsku mikroskopiju fiksiran je u puferiranom 4% formalinu (Merck) i zatim u 1% OsO4 kroz 2 sata. Fiksirano tkivo dehidrirano je u seriji acetona i uklopljeno u smolu (Durcupan). Polutanki rezovi bojani su toluidinom. Ultratanki prerezi kontrastirani su u uranil acetatu i olovnom citratu. Tkivo je analizirano pomoću elektronskog mikroskopa Opton EM-9A.

3.4. Imunohistokemija

Dio bubrežnog tkiva preuzet za imunohistokemiju fiksiran je u B5-fiksativu u trajanju od 2 sata i preko noći u 80% alkoholu, uklopljen u paraplast i rezan na debljinu 3 mikrona. Primijenjena je peroksidaza-antiperoksidaza (PAP) metoda imunohistokemijskog bojanja.

PAP-metoda

1. inkubacija u TBS-puferu 5-10 min
2. H₂O₂ kroz 5 min
3. ispiranje u destiliranoj vodi
4. TBS kroz 5 minuta
5. neutralni serum svinje kroz 5 minuta
6. inkubacija sa primarnim antitijelom (razrijeđeno u TBSu) kroz 90 minuta na sobnoj temperaturi
7. ispiranje u TBSu
8. inkubacija sa sekundarnim antitijelom (razrijeđeno u TBSu 1:10; dodano 1% gamma-venin) kroz 30 minuta na sobnoj temperaturi
9. ispiranje u TBSu
10. inkubacija sa PAP-kompleksom kroz 30 minuta na sobnoj temperaturi
11. ispiranje u TBSu
12. diaminobenzidin (DAB) (1ml+1 mikrolitar H₂O₂) u mraku 1-3 minute
13. ispiranje u destiliranoj vodi
14. kontrastiranje u hemalaunu
15. pokrivanje želatinom i pokrovnim staklcem

TBS-pufer:

pH 7,4

TrisHCl 10x razrijeđen sa 0,15M izotoničkom otopinom NaCl

Primarna antitijela

primarno antitijelo za:		životinjska vrsta	proizvođač	klon/ razrijeđenje
kolagen tip I	monoklonalno antitijelo	dobiveno iz zeca	Monosan	1:25
kolagen tip III	monoklonalno antitijelo	dobiveno iz miša	Monosan	klon MC3-HA 1:10
kolagen tip IV	monoklonalno antitijelo	dobiveno iz miša	DAKO	klon CIV 22 1:10
fibronektin	poliklonalno natitijelo	dobiveno iz zeca	DAKO	1:10
tenascin	monoklonalno antitijelo	dobiveno iz miša	DAKO	klon TN2 1:25
Fibrin/ fibrinogen	monoklonalno antitijelo	dobiveno iz miša	DAKO	1:50

Rezultati imunohistokemijske reakcije analizirani su pod povećanjem 200x upotrebom svjetlosnog mikroskopa Olympus BX. Određen je razmještaj proteina ekstracelularnog matriksa u tubulointersticiju i intenzitete reakcije na 10 velikih vidnih polja. Intenzitet imunohistokemijske reakcije određen je semikvantitativno:

oznaka	jačina reakcije
-	bez reakcije
+	slabo pozitivna reakcija
++	pozitivna reakcija

3.5. Histološka dijagnoza

Histološka dijagnoza glomerulonefritisa postavljena je prema kriterijima Svjetske zdravstvene organizacije (Churg J, Sobin LH: Renal disease. Classification and atlas of glomerular disease. Tokyo, New York: Igaku Shoin, 1982)

3.6. Statistička obrada

Svi pokazatelji bili su mjereni kategoričkom ljestvicom mjerenja, te su shodno tome bili raspoređeni u kontingencijskim tablicama upotrebom X²-testa i Fisher-ovog egzaktnog testa.

4. REZULTATI

Pregledan je bioptički materijal 55 bolesnika, a klinički podaci su bili dostupni za 54 bolesnika.

4.1. Osnovni klinički podaci o ispitivanim bolesnicima

Neproliferativni oblik glomerulonefritisa imalo je osamnaestero bolesnika; 9 bolesnika sa membranskim glomerulonefritisom, 4 sa fokalnom glomerulosklerozom i 5 bolesnika sa neproliferativnim oblicima IgA glomerulonefritisa. U skupini se nalazilo 9 muškaraca i 9 žena u dobi od 18 do 72 godine (srednja dob 36 godine). Klinička slika nefrotskog sindroma bila je prisutna kod 10 bolesnika. Trajanje bolesti prije biopsije u prosjeku je iznosilo godinu dana (raspon od 0 do 79 mjeseci). Praćenje bolesnika u prosjeku je iznosilo 66 mjeseci (raspon od 8 do 241 mjesec). Svi su bolesnici u ovoj skupini bili podvrgnuti medikamentoznoj terapiji, desetero je liječeno samo kortikosteroidima, a osmero kortikosteroidima i ciklofosfamidom.

Proliferativni oblik glomerulonefritisa imalo je 37 bolesnika; 10 bolesnika s mezangioproliferativnim GN, 2 s membranoproliferativnim GN, 1 bolesnik s brzo-progredirajućim GN (bez kliničkih podataka) i 24 bolesnika s proliferativnim oblicima IgA nefropatije. U skupini se nalazilo 22 muškarca i 14 žena u dobi od 17 do 63 godine (srednja dob 36 godina). Klinička slika nefrotskog sindroma bila je prisutna kod 11 bolesnika. Trajanje bolesti prije biopsije u prosjeku je iznosilo 30 mjeseci (raspon od 1-99 mjeseca). Praćenje bolesnika u prosjeku je iznosilo 57 mjeseci (raspon od 11 do 336 mjeseca). Bez terapije bilo je 16 bolesnika, kortikosteroide primalo je 11 bolesnika, a kortikosteroide i ciklofosfamid 9 bolesnika.

Klinički podaci o bolesnicima prikazani su Tablici 1. U tablici su prikazani osnovni podaci o ispitanicima; spol, dob, trajanje bolesti prije biopsije, duljina praćenja bolesnika nakon prvotne obrade, vrijednosti kreatinina u serumu i proteina u urinu (biuret) prilikom obrade i nakon praćenja.

Tablica 1. Klinički podaci o ispitanicima

HISTOLOŠKA DIJAGNOZA	HISTOLOŠKI BROJ	SPOL	DOB	TRAJANJE (mjeseci)	PRAĆENJE	BIURET 1	KREATININ 1	BIURET2	KREATININ2
IgAGN	4200/96	M	25	84	x	0.0	98	0.0	0
IgAGN	7428/93	M	35	32	84	3.2	144	0.6	125
IgAGN	7643/96	M	37	18	x	3.3	85	0.0	0
IgAGN	10103/98	M	33	96	100	5.3	177	1.7	146
IgAGN	2965/94	ž	50	12	14	2.0	71	0.0	67
IgAGN	5159/92	M	25	36	120	1.5	167	1.0	460
IgAGN	2964/94	ž	56	8	44	6.3	279	0.0	97
IgAGN	3027/92	ž	28	99	168	0.8	73	2.0	92
IgAGN	4098/92	M	41	9	16	5.0	271	1.3	639
IgAGN	4924/93	M	57	5	11	0.2	134	0.0	118
IgAGN	5019/92	M	45	60	x	2.5	115	0.0	0
IgAGN	7049/94	M	29	12	48	4.3	177	2.2	225
IgAGN	11516/96	M	18	9	x	2.1	85	0.0	0
IgAGN	12390/96	M	38	1	x	7.0	867	0.0	0
IgAGN	7097/96	M	51	2	x	2.7	79	0.0	0
IgAGN	11846/97	M	26	16	43	4.7	118	0.7	127
IgAGN	5580/92	M	28	12	x	0.7	86	0.0	0
IgAGN	6470/93	M	18	96	180	1.3	79	1.4	105
IgAGN	4864/95	ž	22	19	79	2.2	70	7.7	213
IgAGN	4522/92	M	60	1	x	2.5	70	0.0	0
IgAGN	5666/97	ž	24	48	x	0.1	65	0.0	0
IgAGN	4990/96	M	23	60	x	3.1	87	0.0	0
IgAGN	3876/93	ž	53	18	19	9.8	100	5.6	78
IgAGN	3798/92	ž	18	40	89	1.6	64	0.4	72
IgAGN	3239/94	M	72	4	8	15.7	340	3.3	150
IgAGN	6817/95	ž	24	12	72	3.4	54	1.0	55
IgAGN	3543/95	ž	36	6	54	4.5	81	5.8	275
IgAGN	3720/93	ž	42	4	12	0.4	113	0.7	107
MGN	7726/95	ž	44	7	31	2.7	60	0.0	60
MGN	3409/92	ž	38	84	180	4.2	87	1.4	82
MGN/FGS	3407/94	ž	20	79	83	6.0	82	3.1	66
MGN	1164/94	M	57	17	27	7.7	89	1.4	73
MGN	6298/93	ž	28	26	34	4.7	60	0.1	62
MGN	944/93	ž	18	4	14	7.8	103	0.1	83
MGN	6340/94	M	35	17	39	3.1	110	0.0	95
MGN	4423/92	M	30	15	53	9.5	69	0.2	56
MGN	3643/92	M	29	48	66	3.9	75	0.5	77
MePGN/FGS	4558/97	M	38	12	0	2.7	61	0.0	0
MePGN	3588/93	M	23	24	36	0.4	100	1.0	106
MePGN	6539/94	ž	35	3	20	1.3	59	1.0	65
MePGN	2612/92	ž	29	24	48	5.5	55	2.3	50
MePGN	5196/93	M	24	5	17	3.0	82	0.8	70
MePGN	60/93	M	37	2	7	7.3	117	0.2	85
MePGN	3741/93	ž	62	99	336	0.0	89	0.0	99
MePGN	1163/94	M	28	36	116	6.0	78	0.2	93
MePGN	6559/92	M	17	14	x	0.1	71	0.0	0
MePGN	3306/93	M	55	15	26	1.6	312	0.6	150

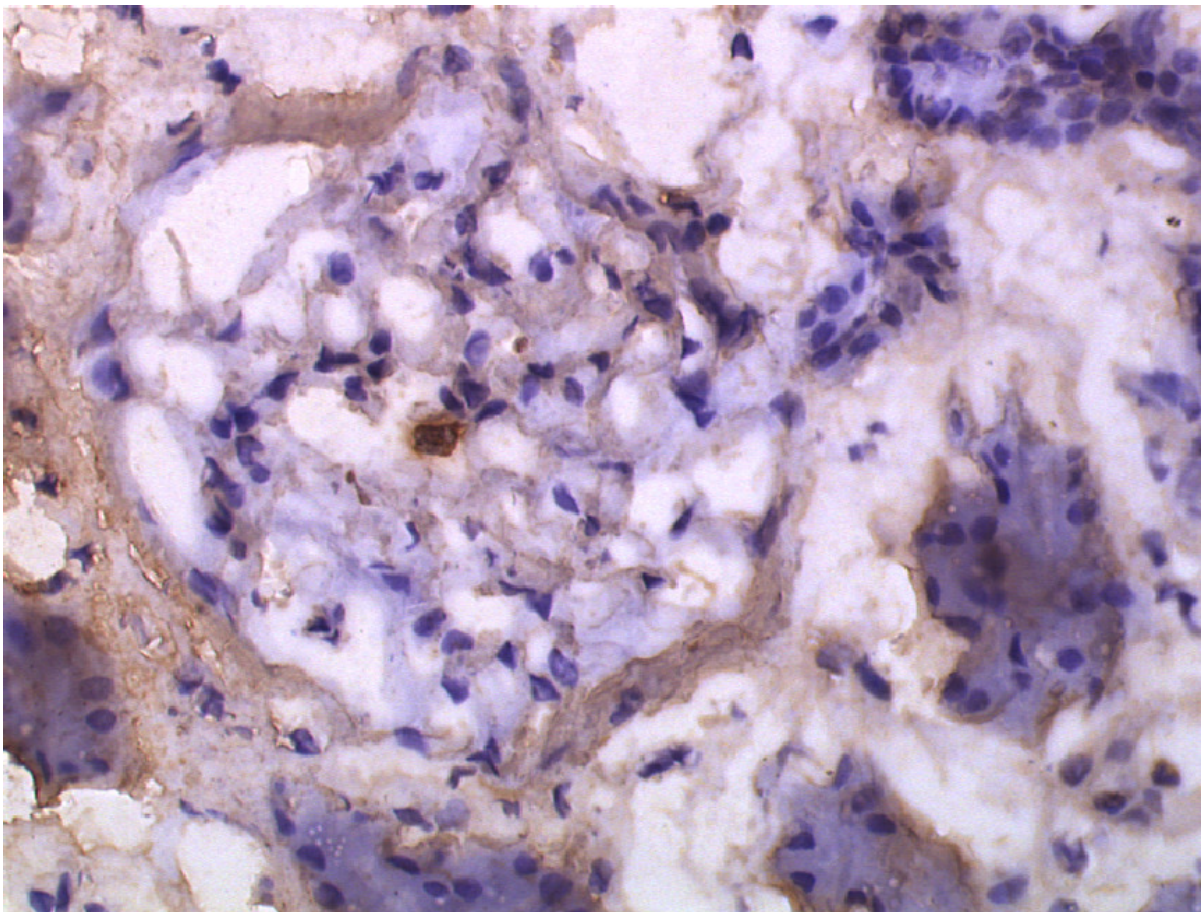
Tablica 1. Klinički podaci o ispitanicima (nastavak)

HISTOLOŠKA DIJAGNOZA	HISTOLOŠKI BROJ	SPOL	DOB	TRAJANJE (mjeseci)	PRAĆENJE (mjeseci)	BIURET1	KREATININ 1	BIURET2	KREATININ 2
FGS	653/94	M	35	27	99	5.1	78	2.3	98
FGS	2532/92	ž	32	20	92	3.8	57	1.2	70
FGS	4908/94	ž	54	0	241	2.9	80	2.0	70
FGS	1496/94	M	47	1	19	5.5	321	3.6	121
MPGN	7292/95	ž	27	36	96	5.2	70	2.5	97
MPGN	3408/94	ž	40	32	104	4.7	159	0.7	155
RPGN	6776/92	ž	63	3	13	3.7	858	2.6	521

Trajanje bolesti prije biopsije i duljina praćenja bolesnika izraženi su u mjesecima, «x» označva nedostatak podataka.

4.2. Proteini ekstracelularnog matriksa u normalnom bubrežnom tkivu

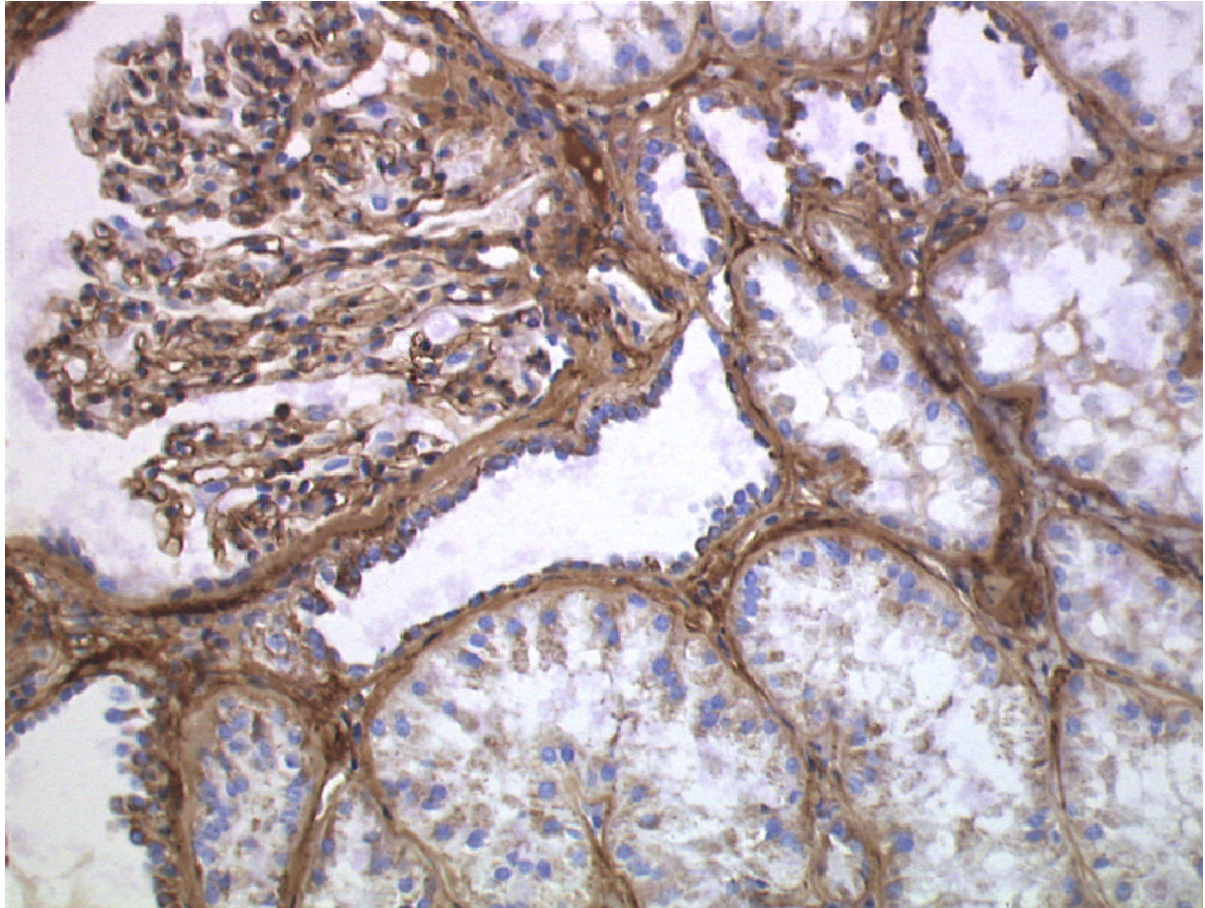
Pregledano je pet uzoraka normalnog bubrežnog tkiva koje je dobiveno iz bubrega odstranjenih zbog tumora. Glomerularni mezangij je tenascin i fibronektin pozitivan (Slika 1), te slabo kolagen I pozitivan. Kolagen III i kolagen IV nisu prisutni u normalnom mezangiju. Kolagen IV se nalazi u glomerularnoj i tubularnoj bazalnoj membrani (Slika 2). U intersticiju se fibronektin nalazi uz samu Bowmann-ovu čahuru i tubularnu bazalnu membranu (Slika 1). Kolagen I je slabo pozitivan, difuzno u intersticiju kore i medule bubrega. Intersticij medule bubrega je intenzivno tenascin pozitivan, a u intersticiju kore ga nema. Stjenke većih krvnih žila bubrega su tenascin, fibronektin i kolagen tip I pozitivne. U normalnom bubrežnom tkivu nema kolagena III, niti fibrina/fibrinogena.



Slika 1. *Fibronektin u normalnom bubregu*

U normalnom bubrežnom tkivu je glomerularni mezangij slabo fibronektin pozitivan, a u intersticiju se fibronektin nalazi uz samu Bowmann-ovu čahuru i uz tubularnu bazalnu membranu.

Imunohistokemijsko bojanje na fibronektin na smrznutom tkivu, povećanje 400x



Slika 2. Kolagen IV u normalnom bubrežnom tkivu

Kolagen IV je građevni element glomerularne i tubularne bazalne membrane. Imunohistokemijsko bojanje na kolagen IV na parafinskim rezu, povećanje 200x.

4.3. Proteini ekstracelularnog matriksa bubrežnog intersticija kod intersticijalne upale i/ili fibroze u sklopu primarnog glomerulonefritisa

Intersticijalne promjene bile su prisutne kod 49 bolesnika iz obrađivane skupine; 5 bolesnika sa intersticijalnom upalom, 11 bolesnika sa intersticijalnom fibrozom, i 33 bolesnika sa upalom i fibrozom. Kod 5 bolesnika u bioptičkom materijalu nije bila prisutna ni upala niti fibroza. Podaci o rasprostranjenosti proteina ekstracelularnog matriksa kod intersticijalne upale i/ili fibroze prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Rasprostranjenosti proteina ekstracelularnog matriksa u sklopu primarnog GN

ECM	fibroza		upala i fibroza		upala	
	prolif. GN	neproliif. GN	prolif. GN	neproliif. GN	prolif GN	neproliif GN
COI						
0	4	1	10	5	0	1
1	1	1	9	3	3	0
2	3	1	6	0	1	0
X	0	0	0	0	0	0
CO III						
0	6	3	15	7	3	1
1	2	0	10	1	0	0
2	0	0	0	0	0	0
X	0	0	0	0	1	0
CO IV						
0	1	0	1	1	1	1
1	5	1	5	4	1	0
2	0	1	3	0	0	0
X	2	1	16	3	2	0
TN						
0	3	1	1	3	1	1
1	1	0	10	4	1	0
2	4	2	14	1	2	0
X	0	0	0	0	0	0
FN						
0	1	1	3	0	1	1
1	1	1	1	4	1	0
2	4	1	4	0	0	0
X	2	0	17	4	2	0
fibrin/fibrinogen						
0	4	2	16	5	2	0
1	1	0	1	1	0	1
2	3	0	7	2	1	0
X	0	1	1	0	1	0
ukupno	8	3	25	8	4	1

0=nije prisutan; 1=slabo pozitivan; 2=intezivno pozitivan; X=nema podataka

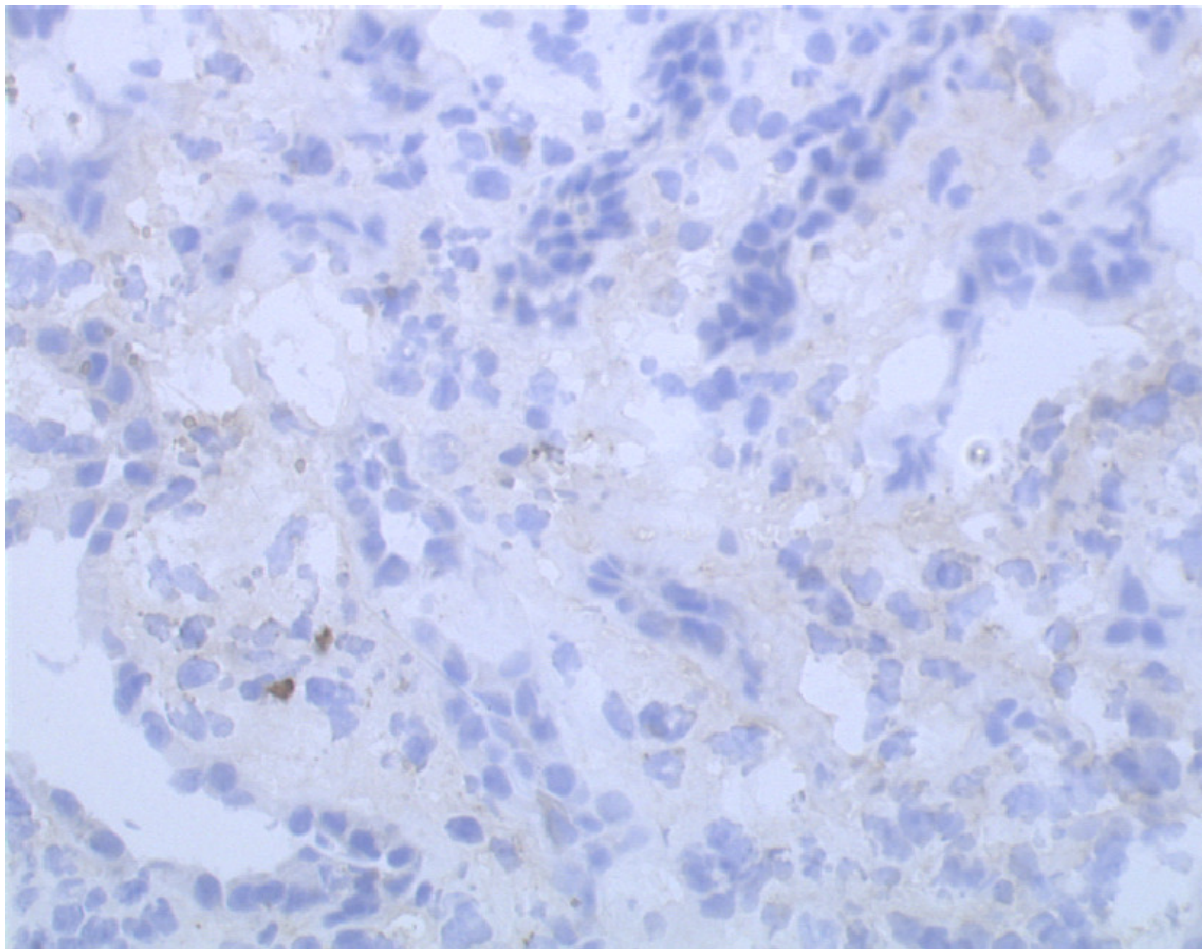
Nema razlike u učestalosti odlaganja ispitivanih proteina ekstracelularnog matriksa kod proliferativnih GN u odnosu na neproliferativne oblike GN. Kod proliferativnih oblika glomerulonefritisa češće su u intersticiju prisutni tenascin (p=0,068) i fibronektin (p=0,052) no kod neproliferativnih oblika GN, no razlika nije statistički značajna.

Kod bolesnika sa intersticijalnom upalom postoji statistički značajna razlika u prisutnosti tenascina ($p=0,04$).

Kod bolesnika sa intersticijalnom fibrozom postoji statistički značajna razlika u prisutnosti kolagena IV u odnosu na sve ostale promatrane proteine ekstracelularnog matriksa ($p=0,024$).

4.3.1. Kolagen tip I

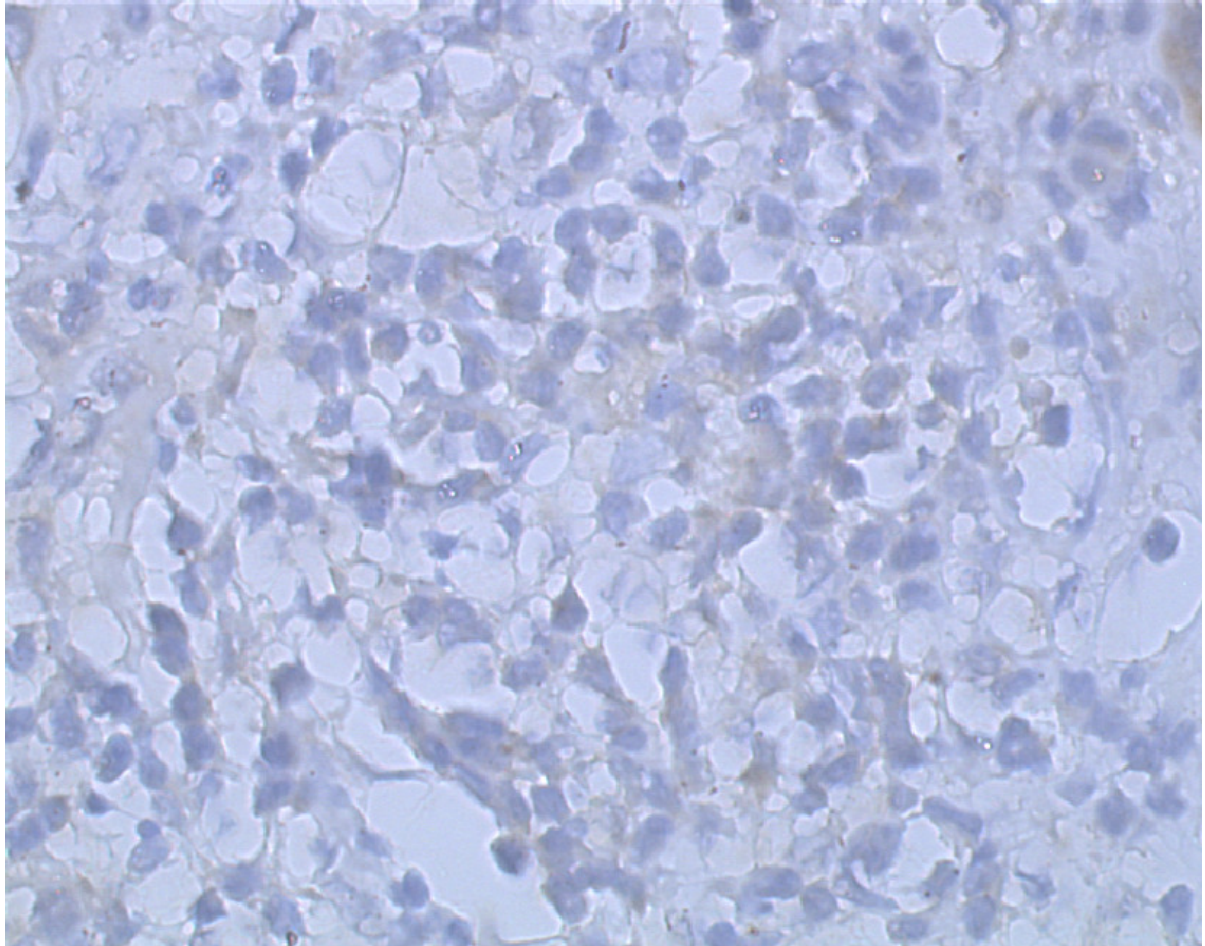
Podaci o rasprostranjenosti kolagena tip I prisutni su za sve obrađene bolesnike. “Negativan” ili slabo pozitivan kolagen tip I zabilježen je kod većine biopsija ($n=38$) (Slika 3), dok se povećano odlaganje kolagena tip I u intersticiju javlja samo kod bolesnika sa fibrozom, sa ili bez upale. Kod samo jednog slučaja s izoliranom intersticijalnom upalom zabilježeno je povećano odlaganje kolagena tip I u intersticij. .



Slika 3. Kolagen tip I u bubrežnom intersticiju kod bolesnika sa primarnim GN. Slabo pozitivan kolagen tip I u bubrežnom intersticiju uz prisutnu intersticijalnu upalu. Pojedinačne intersticijalne stanice su intenzivno kolagen tip I pozitivne. Imunohistokemijsko bojanje na kolagen I na smrznutom tkivu, povećanje 400x.

4.3.2. Kolagen tip III

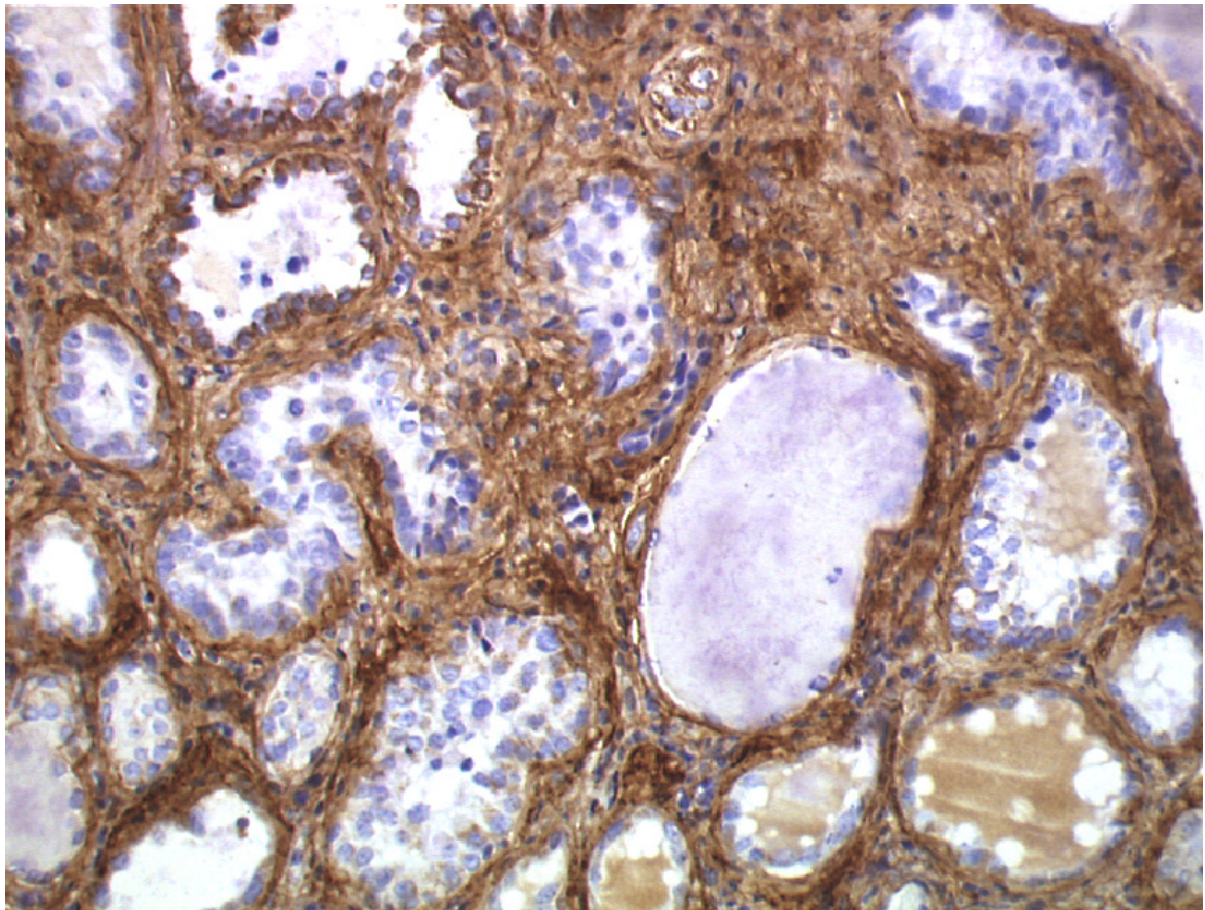
U većini biopsija kolagen III nije prisutan, a slabo je pozitivan u intersticijalnoj fibrozi sa ili bez upale kod proliferativnih oblika GN (Slika 4). Za jedan slučaj nema podataka o prisutnosti kolagena III u biopsiji.



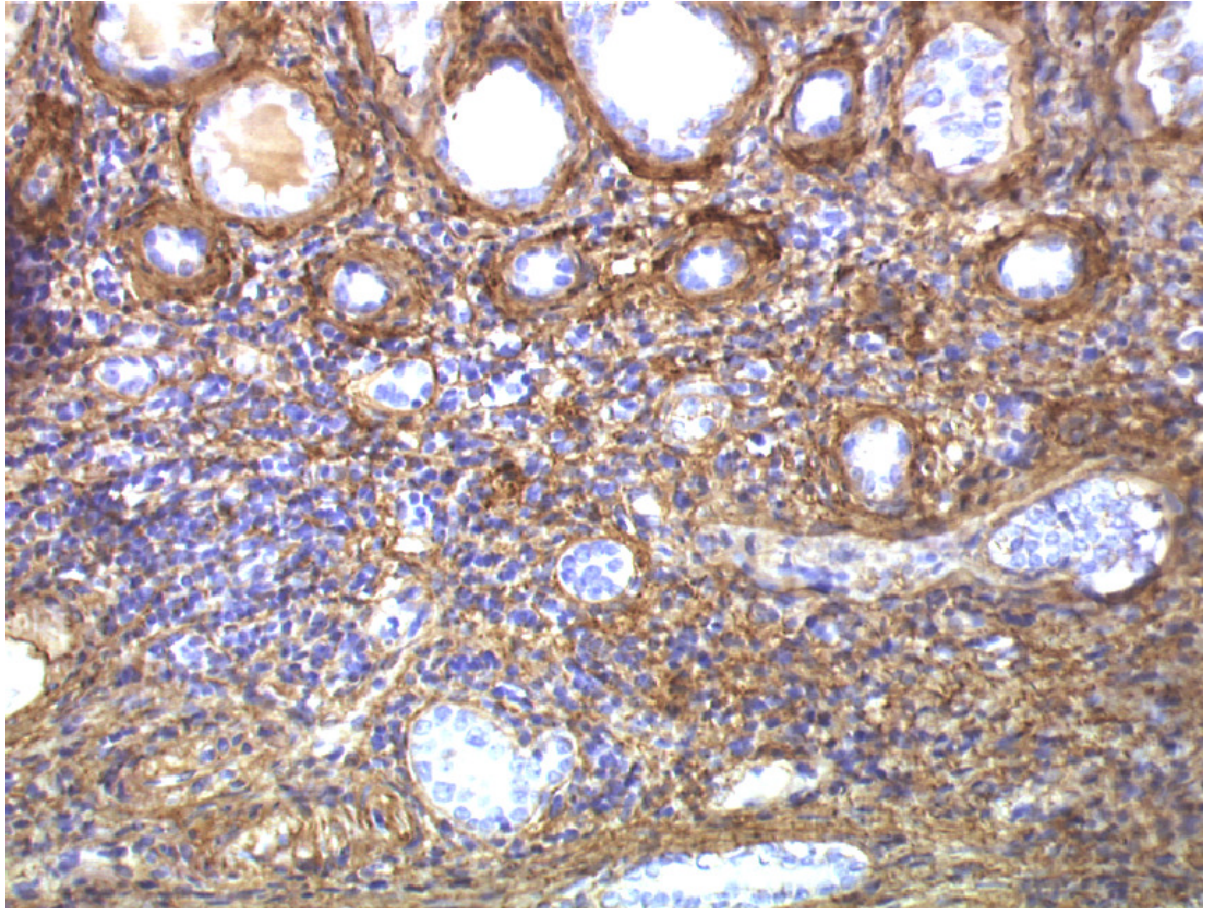
*Slika 4. Kolagen tip III u bubrežnom intersticiju kod bolesnika sa primarnim GN
Žarište intersticijalne upale sa slabo pozitivnim kolagenom tip III između upalnih stanica.
Imunohistokemijsko bojanje na kolagen III na smrznutom tkivu, povećanje 630x*

4.3.3. Kolagen tip IV

U područjima fibroze u intersticij se *de novo* odlaže kolagen tip IV (Slika 5). U samo je jednom slučaju sa izoliranom intersticijalnom upalom kolagen tip IV bio prisutan u intersticiju (Slika 6). U 25 biopsija nije učinjeno imunohistokemijsko bojanje na kolagen IV uslijed nedostatka materijala.



Slika 5. De novo odlaganje kolagena tip IV u području fibroze intersticija
Kolagen tip IV se odlaže u područjima fibroze intersticija.
Imunohistokemijsko bojanje na kolagen IV na parafinskim rezu, povećanje 200x.



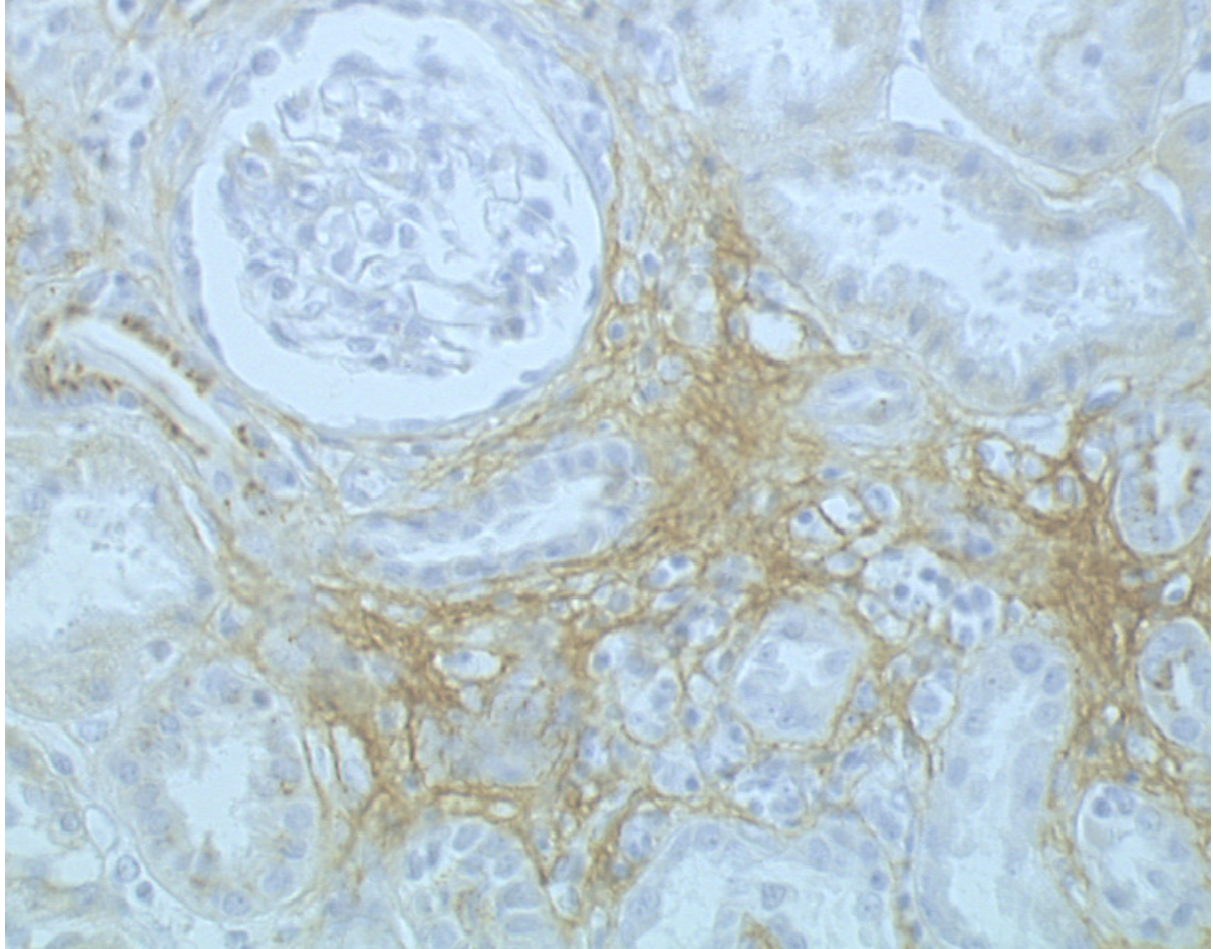
Slika 6. De novo odlaganje kolagen tip IV u području upale intersticija

Kolagen tip IV se odlaže i u područjima intersticijalne upale. Tubularne bazalne membrane su zadebljale.

Imunohistokemijsko bojanje na kolagen IV na parafinskim rezu, povećanje 200x.

4.3.4. Tenascin

Tenascin se odlaže *de novo* u intersticij bubrežne kore tijekom upale u svim ispitanim slučajevima (Slika 7). Tenascin je često prisutan kod izolirane intersticijalne fibroze.



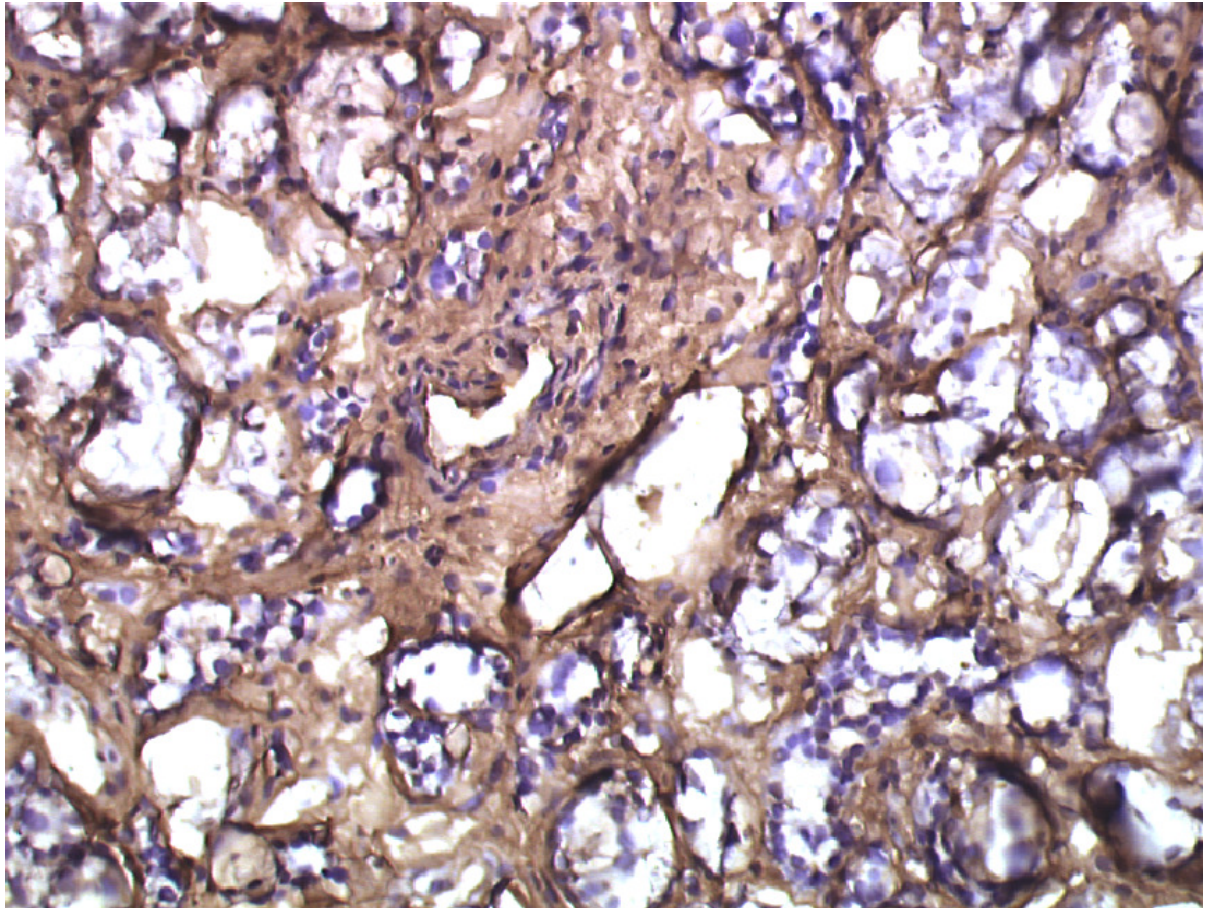
Slika 7. De novo odlaganje tenascina u intersticij

Tenascin se odlaže *de novo* u intersticij bubrežne kore tijekom upale. U žarištu upale tenascin tvori nježnu mrežu niti između skupina upalnih stanica. Acelularno područje intersticijalne fibroze je izrazito tenascin pozitivno. Ujedno se vidi pozitivno bojanje na tenascin stjenke arterije (lijevo uz glomerul).

Imunohistokemijsko bojanje na tenascin na parafinskim rezu, povećanje 200x.

4.3.5. Fibronektin

Usljed nedostatka bioptičkog materijala imunohistokemijsko bojanje na fibronektin učinjeno je u 24 slučaja. Pojačano odlaganje fibronektina u intersticij javlja se kod fibroze intersticija sa ili bez upale, dok kod izolirane upale intersticija nije prisutno.



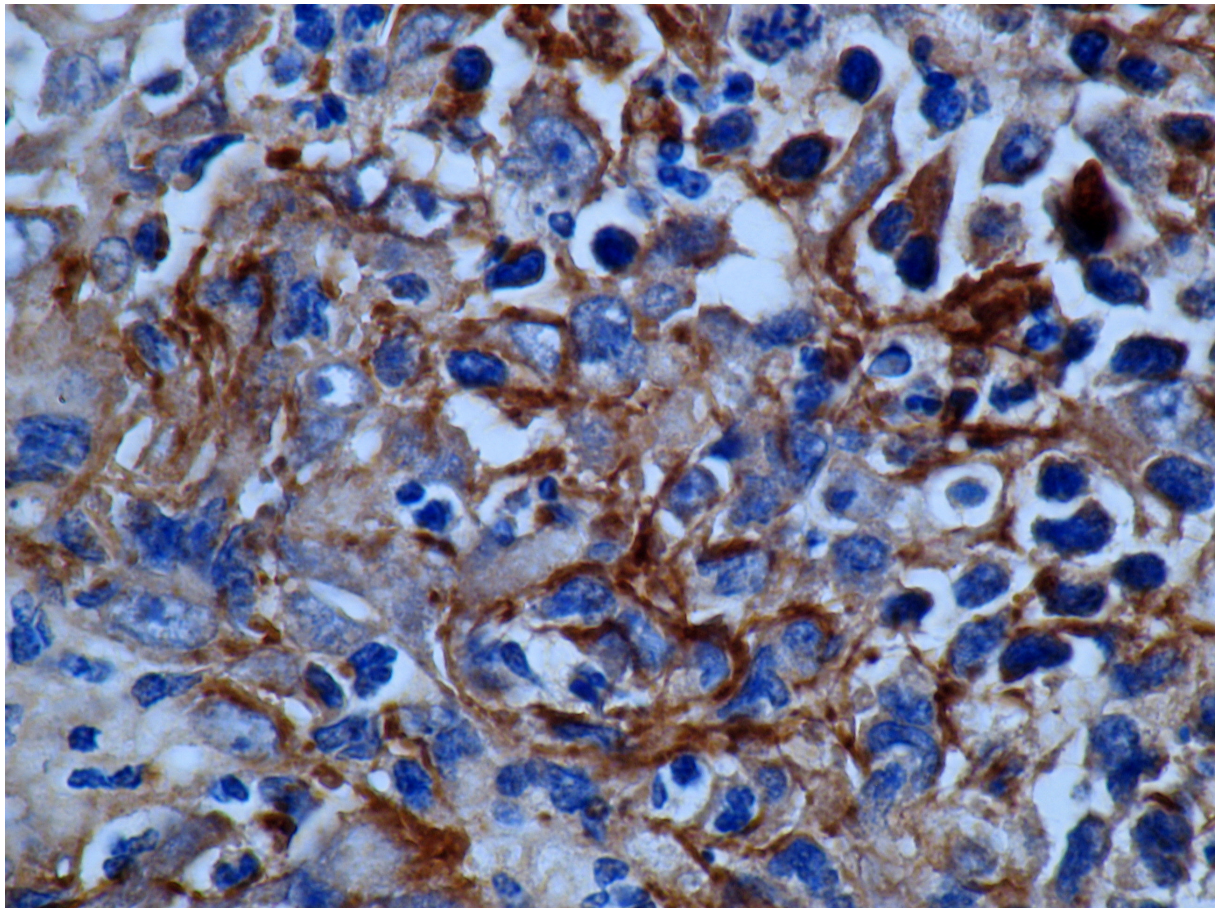
Slika 8. Pojačano odlaganje fibronektina u intersticij kod fibroze intersticija
Fibronektin se odlaže u intersticij kod fibroze intersticija (usporedi sa Slikom 1).
Imunohistokemijsko bojanje na fibronektin na smrznutom tkivu, povećanje 200x.

4.3.6. Fibrin/fibrinogen

Fibrin/fibrinogen je u većini slučajeva bio negativan. Depoziti fibrina/fibrinogena bili su prisutni nešto češće kod proliferativnih oblika glomerulonefritisa, razlika nije statistički značajna (Tablica 3). Fibrin/fibrinogen se javlja već u stadiju izolirane upale (Slika 9) i perzistira sve do stadija izolirane fibroze intersticija (Slika 10).

Tablica 3. Učestalost odlaganja fibrina/fibrinogena u intersticij bubrega kod glomerulonefritisa

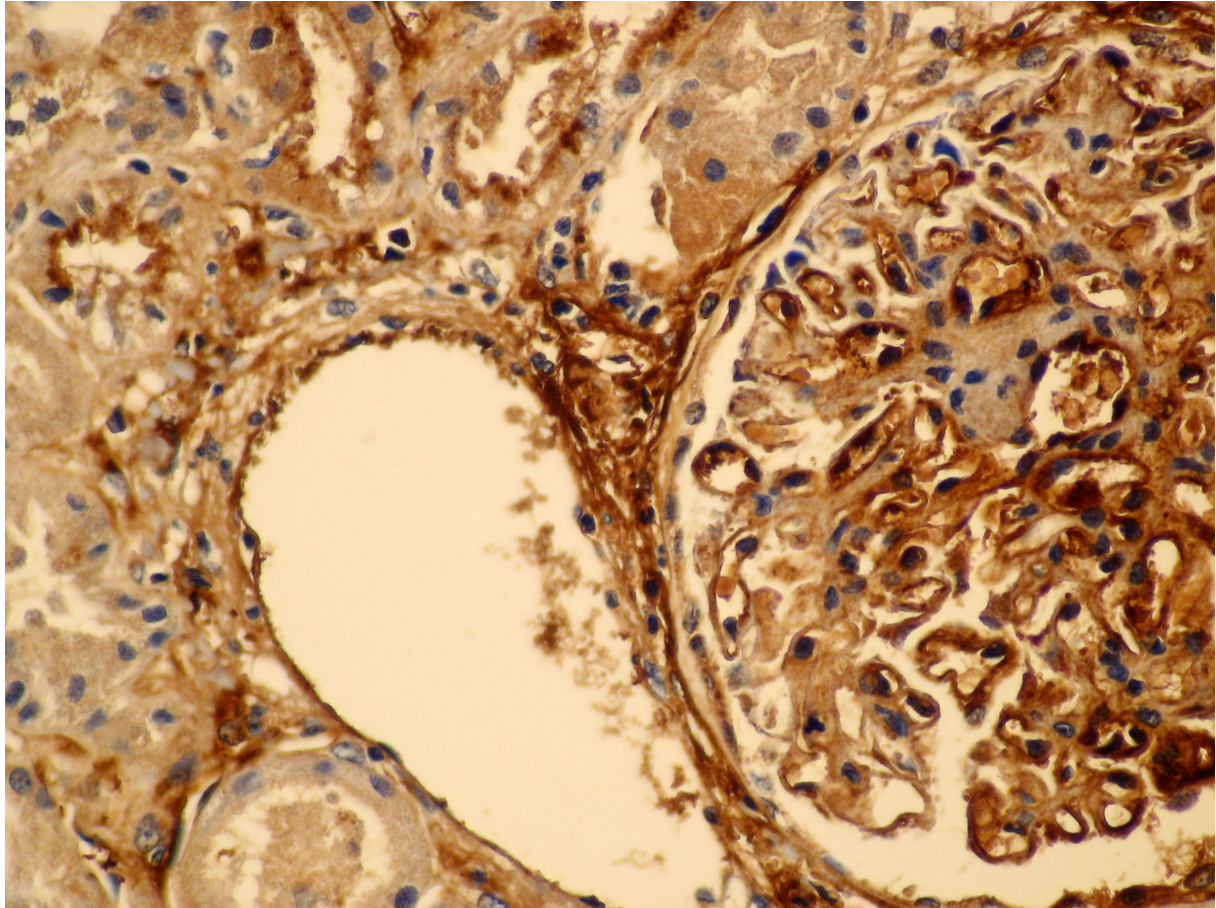
Fibrin/fibrinogen	proliferativni GN	neproliferativni GN
pozitivan	11	8
negativan	22	10
ukupno	33	18



Slika 9. Odlaganje fibrina/fibrinogena u žarištu upale

Odlaganje fibrina/fibrinogena u žarištu upale kod proliferativnog oblika glomerulonefritisa (brzo-progerdirajući glomerulonefritis). Između upalnih stanica u intersticiju nalaze se vlaknca fibrina.

Imunohistokemijsko bojanje na fibrin na smrznutom tkivu, 1000x.



Slika 10. Odlaganje fibrina u manjem žarištu intersticijalne fibroze

Manje žarište fibroze u intersticiju između krvne žile i glomerula u kojem je fibrin intenzivno pozitivan. Ujedno se vide depoziti fibrina uzduž glomerularne bazalne membrane u slučaju membranskog glomerulonefritisa (neproliferativni oblik glomerulonefritisa).
Imunohistokemijsko bojanje na fibrin na parafinskom rezu, 400x.

4.4. Proteini ekstracelularnog matriksa bubrežnog intersticija i klinička slika u času biopsije

Klinički podaci bili su dostupni za 54 bolesnika.

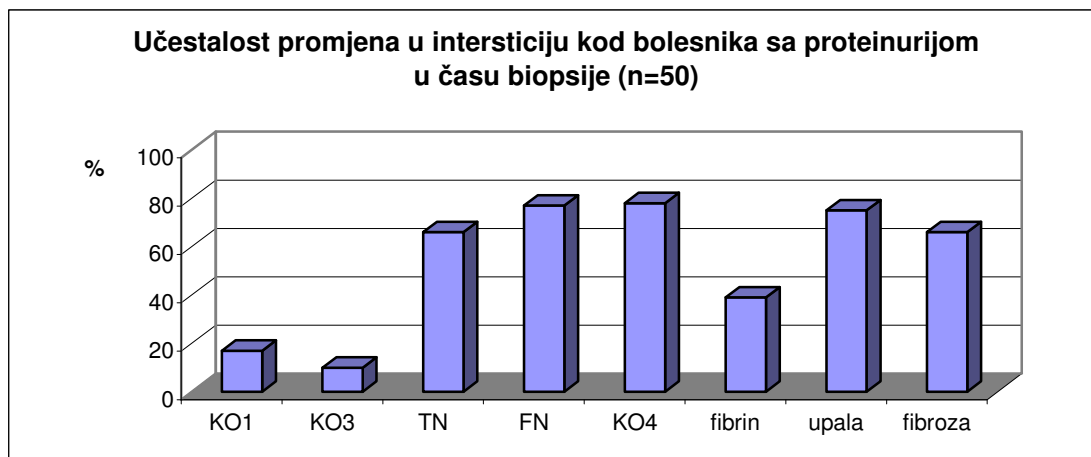
Nema razlike u trajanju bolesti između bolesnika sa ili bez upale/ fibroze intersticija.

4.4.1. Proteinurija

Nema razlike u intenzitetu proteinurije ili serumskog kreatinina, niti u času biopsije niti na kraju praćenja, obzirom na prisutnosti tenascina, fibronektina, kolagena I, kolagena II i kolagena IV u intersticiju bubrega.

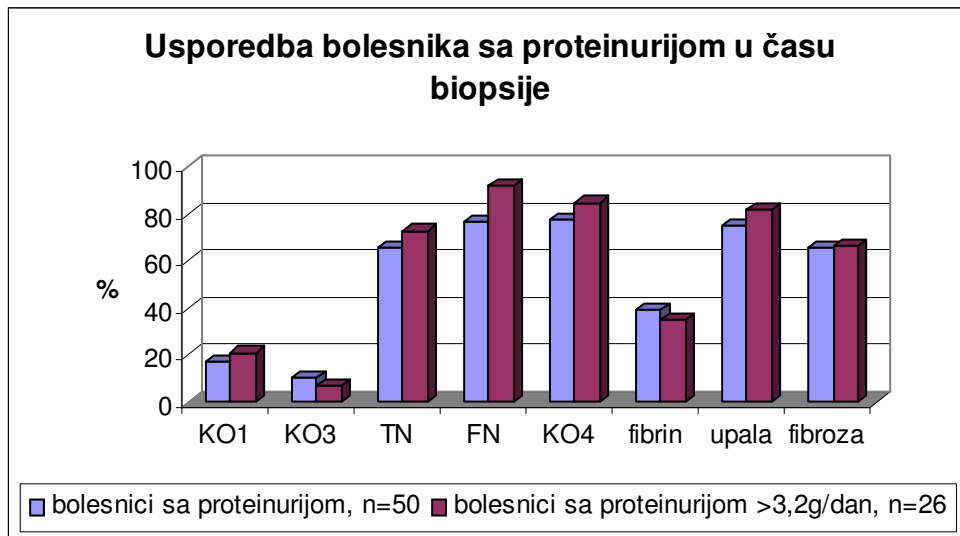
U času biopsije proteinurija (prisutnost bjelančevina u urinu) je bila prisutna kod 50 bolesnika. Kod većine bolesnika bile su prisutne upala i fibroza u intersticiju. Najčešće prisutni proteini bili su tenascin i kolagen IV, a nešto rjeđe fibrin/fibrinogen (Tablica 4). Od 50 bolesnika sa proteinurijom 24 bolesnika je imalo proteinuriju višu od 3,2g/dan. Nema značajnijih razlika u zastupljenosti pojedinih proteina ekstracelularnog matriksa u intersticiju u skupini bolesnika s nižom proteinurijom u usporedbi sa skupinom ispitanika sa proteinurijom višom od 3,2 g/dan (Tablica 5).

Tablica 4. Učestalost promjena u intersticiju bubrega kod bolesnika s proteinurijom u času biopsije



U tablici je prikazan postotak bolesnika sa proteinurijom u času biopsije koji su imali povećano odlaganje (kolagena tip I i fibronektina) ili *de novo* odlaganje (kolagena tip III, tenascina, kolagena tip IV, fibrina/fibrinogena) proteina ekstracelularnog matriksa. Ujedno je prikazan postotak bolesnika sa proteinurijom i upalom i/ili fibrozom intersticija u času biopsije .

Tablica 5. Učestalost promjena u intersticiju bubrega kod bolesnika s proteinurijom u času biopsije

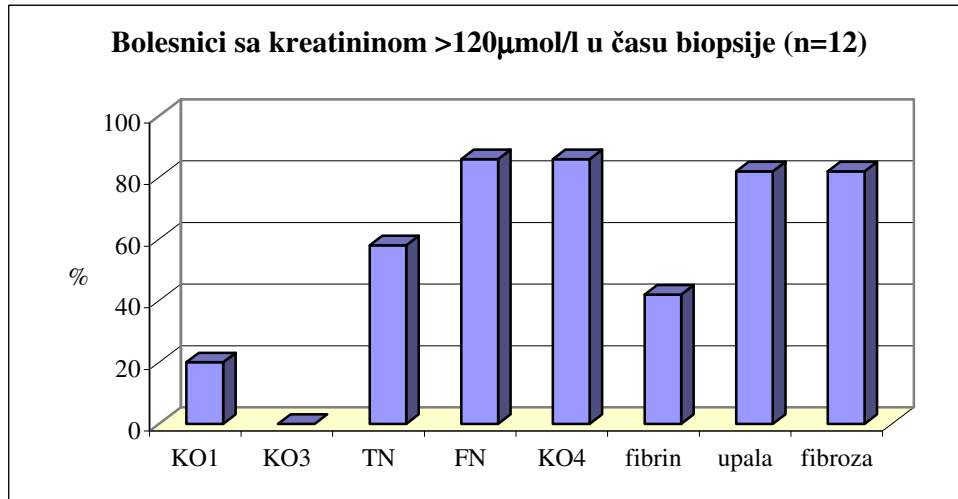


U tablici je prikazan postotak bolesnika sa proteinurijom i proteinurijom višom od 3,2g/dan u času biopsije koji su ujedno imali povećano odlaganje (kolagena tip I, fibronektina) ili *de novo* odlaganje (kolagena tip III, tenascina, kolagena tip IV, fibrina/fibrinogena) proteina ekstracelularnog matriksa. Dodatno je prikazan postotak bolesnika sa proteinurijom i upalom i/ili fibrozom intersticija u času biopsije .

4.4.2. Kreatinin

U času biopsije samo je 12 bolesnika imalo povišen kreatinin. Kod tih je bolesnika nešto češće bila prisutna fibroza intersticija nego u skupini sa proteinurijom. Tenascin je bio rjeđe prisutan u intersticiju nego u skupini sa proteinurijom, razlika nije statistički značajna (Tablica 6).

Tablica 6. Učestalost promjena u intersticiju bubrega kod bolesnika s povišenim kreatininom u času biopsije



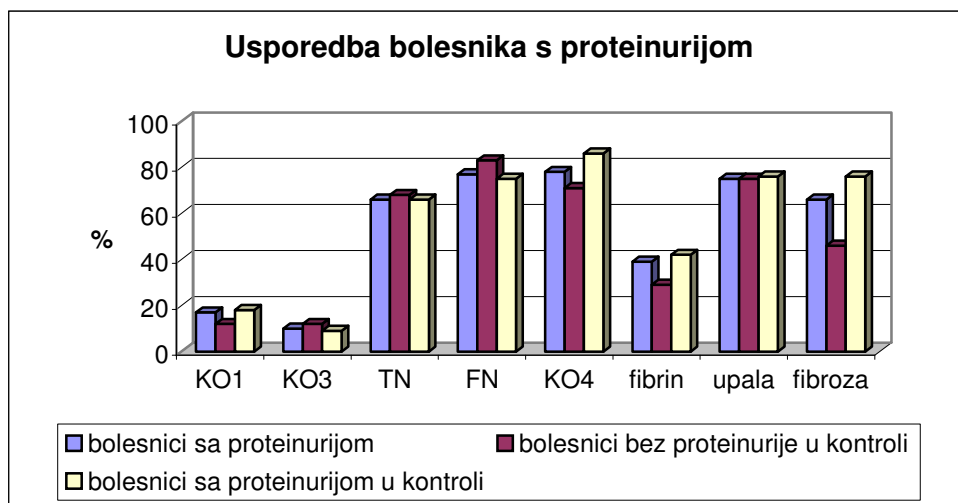
U tablici je prikazan postotak bolesnika sa povišenim kreatininom u času biopsije koji su ujedno imali povećano odlaganje (kolagena tip I, fibronektina) ili *de novo* odlaganje (kolagena tip III, tenascina, kolagena tip IV, fibrina/fibrinogena) proteina ekstracelularnog matriksa. Dodatno je prikazan postotak bolesnika sa povišenim kreatininom i upalom i/ili fibrozom intersticija u času biopsije .

4.5. Proteini ekstracelularnog matriksa bubrežnog intersticija i odgovor na terapiju

4.5.1. Bolesnici s proteinurijom

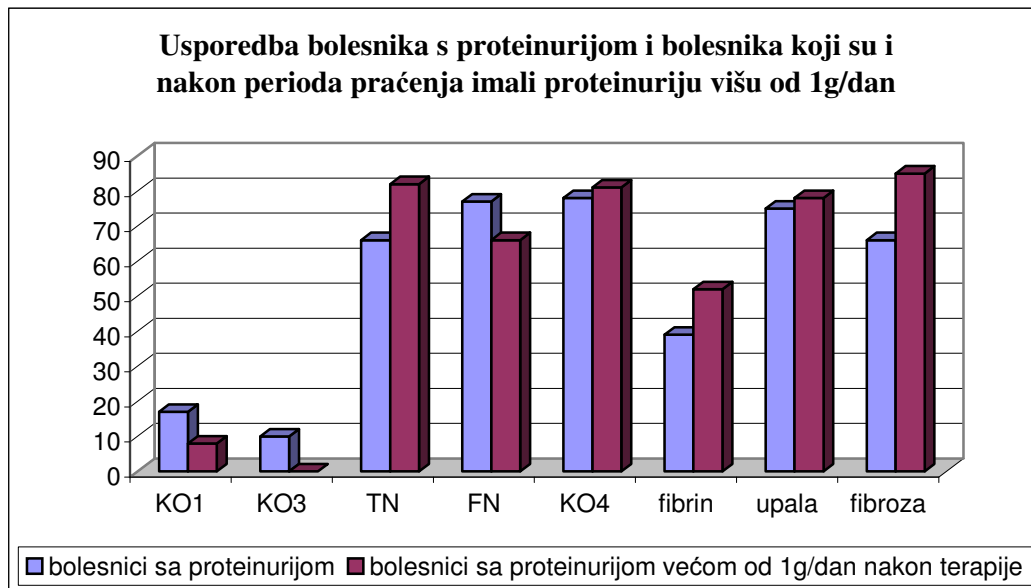
Većina bolesnika je u času biopsije imala proteinuriju (n=50). Kod bolesnika koji su nakon praćenja (uz primjenu terapije ili bez nje) bili bez bjelančevina u urinu (n=17) fibroza intersticija bila je rjeđe zastupljena nego kod bolesnika kod kojih je proteinurija perzistirala (n=33), razlike su bez statističke značajnosti (Tablica 7). Također u toj skupini bolesnika fibrin/fibrinogen je bio rjeđe prisutan u intersticiju, ali razlika nije statistički značajna (Tablica 8).

Tablica 7. Prikaz prisutnosti proteina ekstracelularnog matriksa kod bolesnika s proteinurijom



U tablici je prikazan odnos prisutnosti proteina ekstracelularnog matriksa kod bolesnika koji su u času biopsije imali proteinuriju, kod ispitanika koji su nakon perioda praćenja bili bez proteina u mokraći i skupine bolesnika koji su i nakon praćenja imali proteinuriju. Nema značajnih razlika između skupina, iako je fibroza intersticija nešto češće prisutna u skupini bolesnika sa perzistentnom proteinurijom.

Tablica 8. Prikaz prisutnosti proteina ekstracelularnog matriksa kod bolesnika s proteinurijom nakon perioda praćenja



U tablici je prikazan odnos prisutnosti proteina ekstracelularnog matriksa kod bolesnika s perzistentnom proteinurijom. Prikazane su razlike između skupina bolesnika koji su nakon perioda praćenja imali proteinuriju nižu ili višu od 1g/dan. U skupini sa proteinurijom višom od 1g/dan nakon praćenja češće su bili prisutni fibroza intersticija i fibrin/fibrinogen. Razlika nije statistički značajna.

4.5.2. Bolesnici s nefrotskom proteinurijom

Od 26 bolesnika koji su u času biopsije imali nefrotsku proteinuriju (više od 3,2g/dan), 12 bolesnika je u kontroli (nakon terapije ili bez nje) imalo proteinuriju nižu od 1g/dan. Proteinuriju višu od 1g/dan zadržalo je 14 bolesnika, a loš prognostički čimbenik u toj skupini bilo je prisustvo fibrina/fibrinogena u bubrežnom intersticiju ($p=0,035$) (Tablica 9). 89% bolesnika kod kojih je u času biopsije bio prisutan fibrin/fibrinogen u intersticiju zadržalo visoku proteinuriju i nakon perioda praćenja. Od svih bolesnika sa visokom proteinurijom nakon perioda praćenja 60% bolesnika je imalo fibrin/fibrinogen u intersticiju prilikom biopsije. Nije bilo značajnih razlika u ostalim parametrima (kolagen tip I, kolagen tip III, kolagen tip IV, tenascin, fibronektin, upala, fibroza) među skupinama (Tablice 9, 10). Porast proteinurije nakon praćenja zabilježen je kod 6 bolesnika, samo jedan bolesnik iz te skupine u času biopsije nije imao intersticijalnu upalu i fibrozu.

Tablica 9. Učestalost odlaganja fibrina/fibrinogena kod bolesnika sa nefrotskom proteinurijom

Table of fibrinFb by Biuret2Fb				
fibrinFb Frequency Percent Row Pct Col Pct	Biuret2Fb			Total
	0	v0	v1.2	
1	2	10	5	17
	7.69	38.46	19.2	65.38
	11.7	58.82	3	
	6	100.0	29.4	
	66.6	0	1	
	7		38.4	
			6	
2	1	0	8	9
	3.85	0.00	30.7	34.62
	11.1	0.00	7	
	1	0.00	88.8	
	33.3		9	
	3		61.5	
			4	
Total	3	10	13	26
	11.5	38.46	50.0	100.0
	4		0	0

Fisher's Exact Test	
Table Probability (P)	0.0012
Pr <= P	0.0035

Legenda:

«Fb» su bolesnici sa proteinurijom u času biopsije («Biuret 1») većom od 3,2g/dan
 «Biuret 2» je proteinurija nakon perioda praćenja: a) bez proteinurije (Biuret2Fb je 0)
 b) Biuret2Fb iznosi 0-1,2g/dan
 c) Biuret2Fb je veci od 1,2g/dan

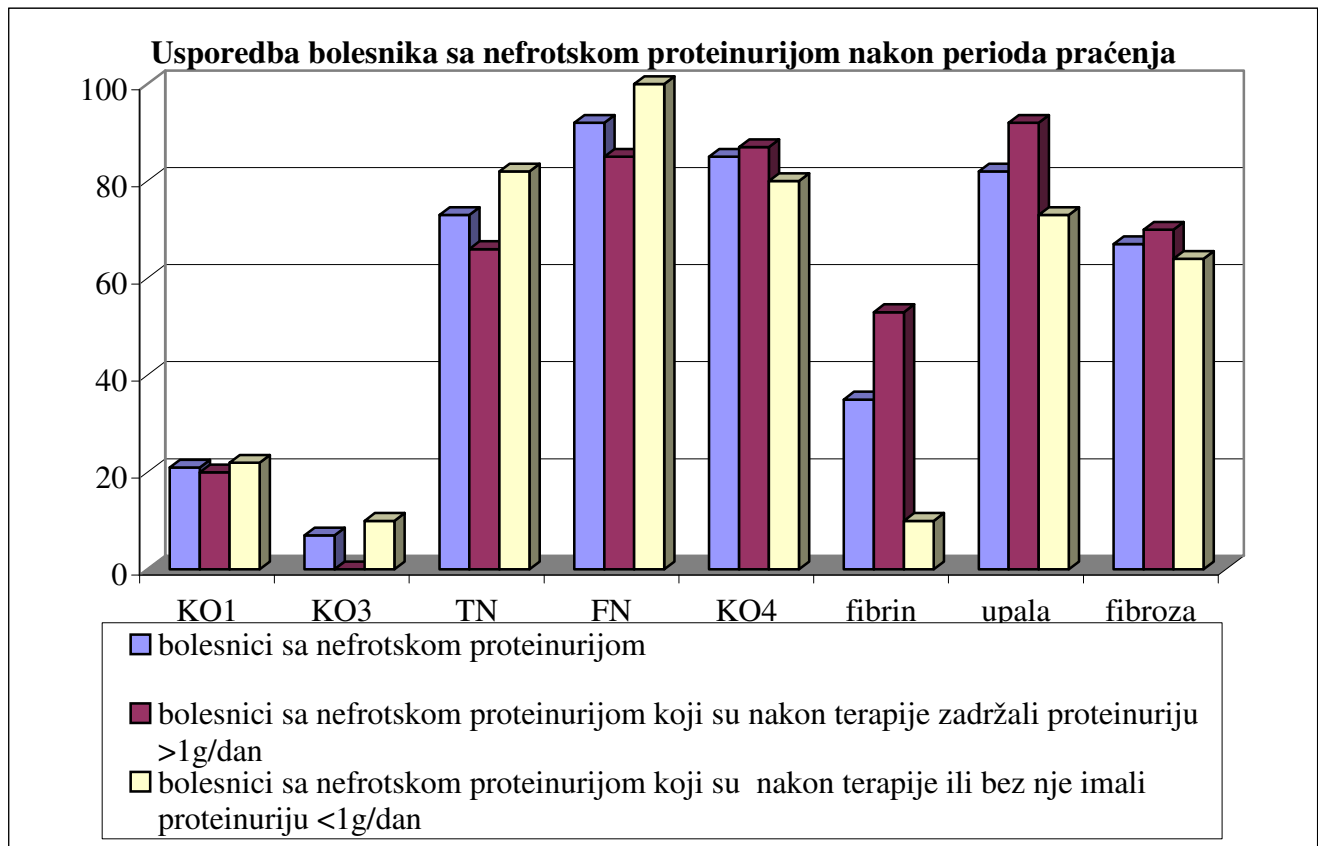
«Frequency» je broj ispitanika (učestalost u apsolutnim brojevima)

«Percent» je postotak u odnosu na cijelu grupu (svi ispitanici sa «Biuret 1» > 3,2g/dan)

«Row Pct» je postotak obzirom na odlaganje fibrina/fibrinogena (1= «nema»; 2=«ima»)

«Col Pct» je postotak obzirom na proteinuriju («Biuret 2»)

Tablica 10. Prikaz prisutnosti proteina ekstracelularnog matriksa kod bolesnika sa nefrotskom proteinurijom nakon perioda praćenja



U tablici je prikazan odnos prisutnosti proteina ekstracelularnog matriksa kod bolesnika sa perzistentnom proteinurijom koji su u času biopsije imali proteinuriju višu od 3,2g/dan. Prikazane su razlike između skupina bolesnika koji su nakon perioda praćenja imali proteinuriju nižu ili višu od 1g/dan. Proteinuriju višu od 1g/dan zadržalo je 14 bolesnika, a loš prognostički čimbenik u toj skupini bilo je prisustvo fibrina/fibrinogena u bubrežnom intersticiju ($p=0,035$).

4.5.3. Bolesnici s povišenim kreatininom

Osam od 12 bolesnika sa povišenim kreatininom u času biopsije nije nakon terapije doseglo normalne vrijednosti kreatinina, dapače kod troje bolesnika razina kreatinina u serumu je rasla.

Kod bolesnika sa porastom kreatinina u periodu praćenja u času biopsije jedan je bolenik imao izoliranu fibrozu bez upale i obilno odlaganje kolagena tip IV u intersticij. Kod jednog bolesnika utvrđeni su i upala sa prisustvom tenascina, fibronektina i fibrina/fibrinogena u intersticiju te žarišta fibroze intersticija. Kod trećeg bolesnima utvrđena je samo intwersticijalna upala sa odlaganjem tenasina i fibronektina; fibrin/fibrinogen bio je negativan.

Kod bolesnika (5/8) kod kojih je u periodu praćenja smanjena razina kreatinina u serumu, ali je ona još uvijek bila viša od $120\mu\text{mol/l}$, bila je prisutna tubulointersticijalna upala sa odlaganjem tenascina i fibronektina u intersticij. Fibrin/fibronektin bio je prisutan u

intersticiju samo kod dvoje bolesnika. Četvero je bolesnika uz upalu imalo i fibrozu intersticija, čak sa pojačanim odlaganjem kolagena tip I u intersticiju..

Četvero je bolesnika dobro reagiralo na terapiju i nakon perioda razina kreatinina se kreatla oko 120 μ mmol/l. Svi su bolesnici imali umjerenu fibrozu intersticija, a troje udruženu sa jakom upalom inersticija. U područjima fibroze bili su prisutni kolagen tip I i kolagen tip IV, dok su u područjima upale bili prisutni tenascin, fibronektin i u dva bolesnika fibrin/fibrinogen.

4.6. Proteini ekstracelularnog matriksa i ACE-genotip

Za 23 klinički obrađena bolesnika bili su dostupni podaci o ACE-genotipu; 5 bolesnika od 18 sa neproliferativnim oblicima glomerulonefritisa i 18 bolesnika od 36 sa proliferativnim oblicima glomerulonefritisa (Tablica 11). Najčešći genotip u ispitivanoj skupini bio je DD, dok su genotip II i ID bili podjednako zastupljeni.

U skupini ispitanika sa određivanim ACE-genotipom 14 bolesnika nije imalo intersticijalnu fibrozu, a kod 9 bolesnika je ona bila prisutna. U skupini od 7 bolesnika sa II-genotipom fibroza intersticija je bila prisutna kod 4 bolesnika, bez fibroze intersticija u času biopsije bila su 3 bolesnika. U skupini sa ID-genotipom bilo je 7 bolesnika, 2 sa fibrozom intersticija i 5 bez fibroze. U skupini sa DD-genotipom bilo je 9 bolesnika, 3 sa fibrozom intersticija i 6 bez fibroze. (Tablica 12 i Tablica 13).

U skupini od 23 bolesnika kojim je bio određen ACE-genotip osmero je imalo fibrin/fibrinogen u intersticiju. Odlaganje fibrina bilo je češće kod bolesnika sa ID (4/7) i DD (4/9) genotipom, no kod bolesnika sa II (1/7) genotipom. Bez obzira na ACE-genotip odlaganje fibrina/fibrinogena bilo je povezano sa proliferativnim oblicima GN (6/8) i upalom u intersticiju (6/8).

Tablica 11. Zastupljenost pojedinih ACE-genotipa kod ispitivanih bolesnika

ACE-genotip	neproliferativni glomerulonefritis	proliferativni glomerulonefritis
bez podataka	13	18
DD	2	7
ID	1	6
II	2	5
ukupno	18	36

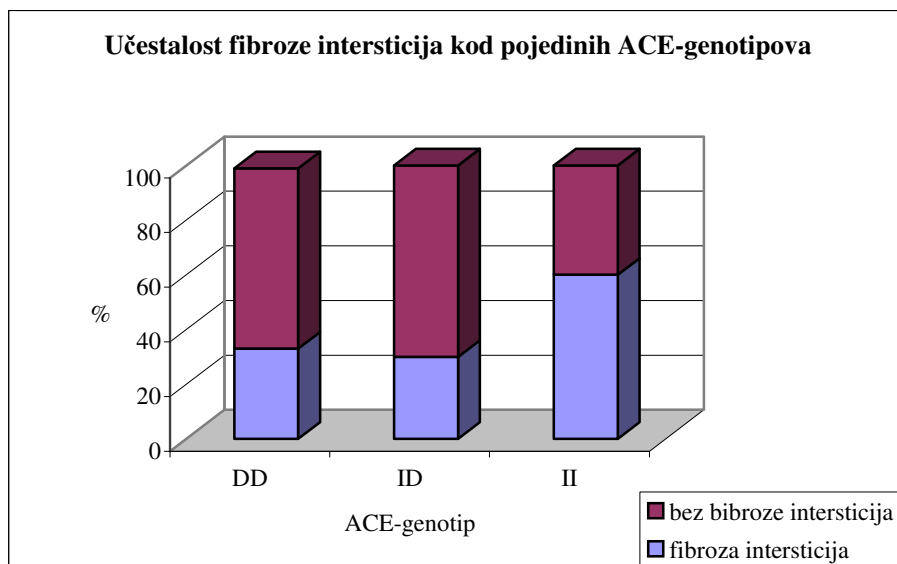
Iz prikazane tablice vidljivo je da se u ispitivanoj skupini ACE-genotip češće određivao kod bolesnika sa proliferativnom oblicima glomerulonefritisa.

Tablica 12. Učestalost fibroze intersticija kod bolesnika sa pojedinim tipovima ACE-genotipa

ACE-genotip	sa fibrozom intersticija	bez fibroze intersticija
DD	3	6
ID	2	5
II	4	3
ukupno	9	14

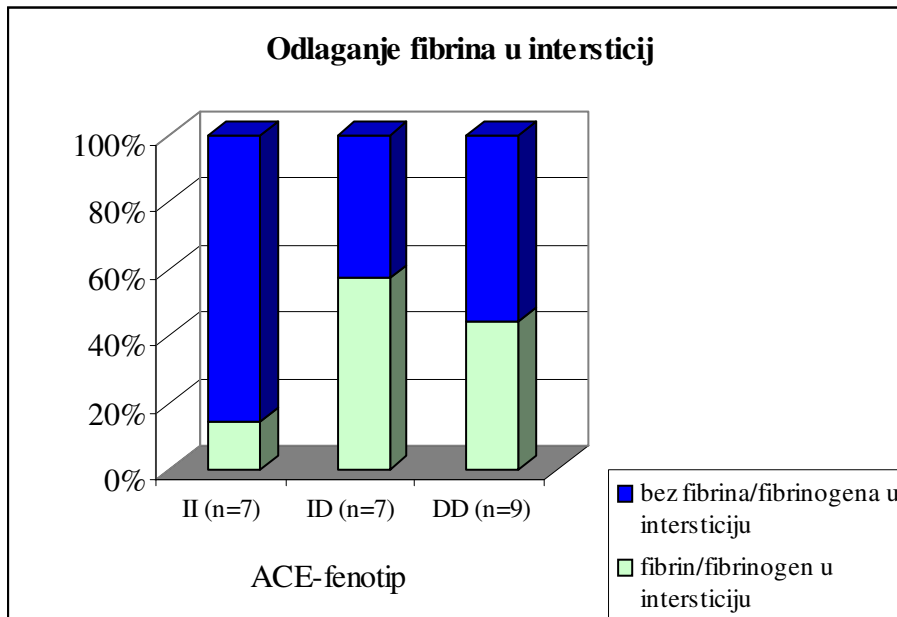
U skupini ispitanika sa fibrozom intersticija najčešći ACE-genotip bio je II-genotip. Također, od ukupno 7 ispitanika s II-genotipom većina ih je imala fibrozu intersticija bubrega. Treba uzeti u obzir da se radi o vrlo malim ispitivanim skupinama.

Tablica 13. Učestalost fibroze intersticija kod bolesnika sa pojedinim tipovima ACE-genotipa (grafički prikaz)



Unutar skupine ispitanika sa II-genotipom više ispitanika ima fibrozu intersticija bubrega. Treba uzeti u obzir da se radi o vrlo malim ispitivanim skupinama.

Tablica 14. Učestalost odlaganja fibrina u intersticij kod bolesnika sa pojedinim tipovima ACE-genotipa (grafički prikaz)



Unutar skupine ispitanika sa ID-genotipom više je ispitanika sa odlaganjem fibrin/fibrinogena u intersticij bubrega. Treba uzeti u obzir da se radi o vrlo malim ispitivanim skupinama i da je odlaganje fibrina/fibrinogena bilo povezano sa proliferativnim oblicima GN (6/8) i upalom u intersticiju (6/8).

5. RASPRAVA

5.1. Uloga imunohistokemije i imunofluorescencije u proučavanju patoloških promjena tijekom glomerulonefritisa

U ovom radu su u skupini 55 bolesnika sa primarnim glomerulonefritisom uspoređivani klinički parametri oštećenja bubrežne funkcije, proteiunurija i razina kreatinina u serumu u vrijeme biopsije bubrega i nakon perioda praćenja, sa histološkim promjenama intersticija. Histološke promjene intersticija promatrane su kroz promjene sastava ekstracelularnog matriksa. Bioptički materijal preuzet je za svjetlosnu mikroskopiju, imunofluorescenciju, elektronsku mikroskopiju i imunohistokemiju. Histološka dijagnoza glomerulonefritisa postavljena je prema kriterijima Svjetske zdravstvene organizacije (26). Imunohistokemijski je određivano prisustvo i rasprostranjenost kolagena tip I (monoklonalno antitijelo dobiveno iz zeca, 1:25), kolagena tip III (monoklonalno antitijelo dobiveno iz miša, klon MC3-HA, 1:10), kolagena tip IV (monoklonalno antitijelo dobiveno iz miša, klon CIV 22, 1:10), fibronektina (poliklonalno antitijelo dobiveno iz zeca, 1:10) i tenascina (monoklonalno antitijelo dobiveno iz miša, klon TN2, 1:25). Imunofluorescencijom je određivano prisustvo i rasprostranjenost fibrina/fibrinogena (primarna antitijela konjugirana sa fluoresceinom). Intenzitet imunohistokemijske reakcije i imunofluorescencije određen je semikvantitativno («-« bez reakcije, «+» slabo pozitivna reakcija, «++» pozitivna reakcija) na 10 velikih vidnih polja (povećanje 400x).

Imunofluorescencija je standardna metoda koja se koristi prilikom određivanja prisustva imunokompleksa u bubrežnom tkivu bolesnika sa glomerulonefritisom. (26,27). Ona se sprovodi rutinski prilikom svake učinjene biospije na smrznutom i u acetonu fiksiranom tkivu. U nekim se histopatološkim laboratorijima preferira imunohistokemijska reakcija pred imunofluorescencijom u svakodnevnoj praksi (93). No nedvojbeno je da je određivanje prisustva imunoglobulina i komponenata komplementa u bubrežnom tkivu presudno za određivanje tipa glomerulonefritisa (93).

Buduci da Dubosq-Bouin fiksativ (94) nije pogodan za imunohistokemijska reakcija, u ovom je radu korišteno smrznuto tkivo ili tkivo fiksirano u B5 fiksativu (95). Primjenom imunohistokemijske metode na tkivu fiksiranom u B5 postignuta je jasna imunohistokemijska reakcija i očuvana je bubrežna morfologija. Nedostatak imunohistokemijske metode na smrznutom tkivu je da se tijekom smrzavanja tkiva narušava morfologija stanica.

5.2. Proteini ekstracelularnog matriksa u normalnom bubrežnom tkivu

5.2.1. Proteini ekstracelularnog matriksa glomerula

Rezultati ove studije su u skladu sa prethodno objavljenim istraživanjima rasprostranjenosti proteina ekstracelularnog matriksa u normalnom bubrežnom tkivu. U ovom radu dokazano je da su tenascin i fibronektin konstituenti ekstracelularnog matriksa glomerularnog mezangija, što su već pokazali mnogi autori (96,97). Naši rezultati pokazuju da je kolagen tip I slabo pozitivan u mezangiju, što je također u skladu sa rezultatima iz literature (98). Kolagen III nije prisutan u normalnom mezangiju (99), što je potvrđeno ovom studijom. Rezultati imunohistokemijskog bojanja provedenog u sklopu ove studije pokazali su da je kolagen tip IV građevni element glomerularne i tubularne bazalne membrane, na što ukazuju i literaturni izvori. Uz kolagen tip IV u glomerularnoj i tubularnoj bazalnoj membrani prisutan je laminin (100).

5.2.2. Proteini ekstracelularnog matriksa bubrežnog intersticija

Rezultati ove studije pokazuju da se u intersticiju normalnog bubrega mogu naći tri od šest ispitivanih proteina ekstracelularnog matriksa, a to su: tenascin, fibronektin i kolagen tip I. Intersticij medule bubrega je intenzivno tenascin pozitivan, dok ga u intersticiju kore nema. Fibronektin se nalazi uz samu tubularnu bazalnu membranu, a kolagen tip I je slabo pozitivan difuzno u intersticiju kore i medule bubrega. Kolagen tip IV je sastavni dio tubularne bazalne membrane. Ovi rezultati su u skladu s podacima objavljenim u literaturi (97,102,103).

Tijekom embrionalnog razvoja bubrega mezenhim se diferencira u epitel bubrežnih kanalića (osim sabirnih kanalića koji su ektodermalnog porijekla), a u tom procesu proteini ekstracelularnog matriksa igraju ključnu ulogu. Kolageni intersticija utječu na sastav epitelnog ekstracelularnog matriksa, a nakon završenog procesa formiranja epitela nestaju iz intersticija. Umjesto regulatornih proteina ekstracelularnog matriksa pojavljuju se adhezijski proteini, poglavito oni bazalne membrane, i fibronektin koji je univerzalni adhezijski protein (stanica-stanica i stanica-matriks) (104). Grananje urastajućeg epitela odvija se pod kontrolom tensacina, koji se nalazi na samoj dodirnoj crti epitela i mezenhima, te nestaje kao i kolageni nakon završenog procesa diferencijacije epitela. Samo mali dio embrionalnog mezenhima ne diferencira se u epitel već zaostaje u intersticiju i zadržava pozitivnu reakciju na kolagen i fibronektin (86). Rezultati ove studije zajedno sa rezultatima iz literature ukazuju da proteinski sastav ekstracelularnog matriksa bubrežnog intersticija kod odraslog čovjeka odražava opisani proces.

Stijenke većih krvnih žila bubrega su tenascin, fibronektin i kolagen tip I pozitivne. Pokazano je da same endotelne stanice sintetiziraju fibronektin. (89)

U normalnom bubrežnom tkivu nema kolagena III.

5.3. Proteini ekstracelularnog matriksa bubrežnog intersticija kod intersticijalne upale i/ili fibroze u sklopu primarnog glomerulonefritisa

U ovom istraživanju slabo pozitivan kolagen tip I u intersticiju zabilježen je kod većine biopsija, što odgovara normalnom nalazu. U skupini promatranih biopsija povećano odlaganje kolagena tip I u intersticij javlja se udruženo sa fibrozom bubrežnog intersticija, sa ili bez upale. Iako je uvriježeno mišljenje da je kolagen tip I uzrok patološke fibroze, ovaj se protein kod kroničnog glomerulonefritisa odlaže u intersticij kasno u procesu fibroze i to u vrlo malim količinama (81). Povećano nakupljanje kolagena tip I u stijenke bubrežnih arterija dokazano je kod renalne hipertenzije u sklopu intersticijalne fibroze (105). U obrađenom bioptičkom materijalu nije bilo dovoljno krvnih žila s promjenama stijenke karakterističnim za hipertenziju (arterioskleroza, koncentrična hipertrofija mišićnog dijela stijenke arterije) da bi se uočilo odlaganje kolagena tip I.

U većini biopsija kolagen III nije bio prisutan, a slabo je pozitivan samo u intersticijalnoj fibrozi sa ili bez upale kod proliferativnih oblika GN. U eksperimentalnim modelima ishemijske fibroze kod životinja kolagen tip III se odlaže rano u procesu fibroze intersticija (106), te nešto češće i u većim količinama no kolagen I. Kod fibroze bubrega koja se spontano javlja u procesu starenja kod štakora ustanovljeno je odlaganje kolagen tip I i III u intersticij (107). Njihova rasprostranjenost u bubrežnom intersticiju odgovara plavo obojanim područjima u tkivu bojanom trikromnom metodom po Masson-u (108). Naši rezultati pokazuju da je odlaganje oba proteina (kolagena tip I i kolagena tip III) u intersticij bubrega kod glomerulonefritisa čovjeka rjeđe no što bi se očekivalo na osnovu eksperimentalnih podataka. S druge strane, odlaganje kolagena tip III u bubrežni intersticij uvijek je vezano za

ireverzibilne promjene, tj. fibrozu, kako je i pokazano u eksperimentalnim modelima (106, 107,108).

Kolagen IV se odlaže *de novo* u intersticij u područjima fibroze, a prisutan je samo u jednom slučaju sa izoliranom intersticijalnom upalom. Kod bolesnika sa intersticijalnom fibrozom postoji statistički značajna razlika u prisutnosti kolagena IV u odnosu na sve ostale promatrane proteine ekstracelularnog matriksa ($p=0,024$). Kolagen IV se nakuplja stvarajući zajedno sa ostalim proteinima ekstracelularnog matriksa amorfnu masu koja se pod svjetlosnim mikroskopom vidi kao ožiljak (81). Odlaganje kolagena tip IV u intersticij u područjima fibroze je univerzalan proces koji se odvija kod mnogih bolesti koje zahvaćaju intersticij bez obzira na njihovu etiologiju; bilo da se radi o primarnim glomerulonefritisima (81), sistemskim bolestima koje zahvaćaju bubrežni (109), autoimunim bolestima (110) ili izoliranom tubulointersticijalnom nefritisu (81). U novije vrijeme sve je više dokaza da epitelne stanice (111) i/ili transformirane epitelne stanice (112) luče kolagen tip IV i time doprinose njegovom pojačanom odlaganju u bazalnu membranu (zadebljanje bazalne membrane) ili u intersticij. Presudni citokini koji potiču sintezu, pojačano lučenje i odlaganje kolagena tip IV su TGF- β i CTGF (113,114,115). Ove citokine među inim luče i same epitelne stanice bubrežnih kanalića. Oba su citokina prisutna u mnogim patološkim stanjima koje karakterizira tubulointersticijalna upala. (115). Kod modela spontane fibroze bubrežni starijih štakora primijećeno je odlaganje kolagena tip I, III i IV pod utjecajem HSP47, kojeg također luče transformirane, vimentin pozitivne epitelne stanice bubrežnih kanalića (117).

Kolagen se u patologiji (28) tradicionalno povezuje s procesom stvaranja ožiljka i fibrozom parenhimnih organa. Budući da kod kroničnih bolesti bubrežni prognoza bolesti ovisi o stupnju fibroze intersticij (62,63) mnogo se je pažnje posvetilo proučavanju patogeneze intersticijalne fibroze i uloge kolagena u tom procesu. Mnoštvo podataka dobiveno je na različitim eksperimentalno izazvanim modelima fibroze i humanim bolestima pod pretpostavkom da je patohistološki definirana fibroza jedinstven patogenetski proces. Zbog visoke prevalencije dijabetičke nefropatije mnoga istraživanja, bilo eksperimentalna bilo klinička, provedena su upravo na tom primjeru fibroze bubrežnog intersticija. Dokazano je da visoka koncentracija glukoze izravno potiče miofibroblastičku bubrežnu intersticiju na pojačanu sintezu kolagena tip I (117) i tako doprinosi razvoju intersticijalne fibroze kod dijabetičke nefropatije. Povećano izlučivanje kolagena tipa I, III i IV zajedno sa TGF- β u urinu povezuje se s aktivnim procesom intersticijalne pregradnje i procesom fibroze kod dijabetičke nefropatije. Analizom proteina izlučenih mokraćom kod dijabetičkih bolesnika ustanovljeno je da se povećan udio kolagena tipa IV. Kod dijabetičara je količina kolagena IV u urinu povišena, čak i kod osoba bez proteinurije. (118,119). Ekskrecija kolagena tipa IV urinom dokazana je i kod bolesnika sa kroničnim glomerulonefritisom (IgA GN, membranski GN) (120), no udio kolagena tipa IV u mokraćom izlučenim proteinima značajno je niži nego kod bolesnika sa dijabetičkom nefropatijom (statistički značajna razlika) (119). Ovi podaci daju naslutiti da možda postoje različiti patogenetski mehanizmi nastajanja fibroze kod dijabetičke nefropatije, ishemijske fibroze bubrežni i fibroze intersticij u sklopu glomerulonefritisa.

Rezultati ove studije pokazuju da nema statistički značajne razlike u učestalosti odlaganja pojedinih ispitivanih proteina ekstracelularnog matriksa kod proliferativnih GN u odnosu na neproliferativne oblike GN. Kod proliferativnih oblika glomerulonefritisa češće su u intersticiju prisutni tenascin ($p=0,068$), fibronektin ($p=0,052$) i fibrin/fibrinogen ($p=0,2$) no kod neproliferativnih oblika GN. Ovi proteini ekstracelularnog matriksa su uglavnom bili povezani s upalnim procesom u intersticiju.

Tenascin se odlaže *de novo* u intersticij bubrežne kore tijekom upale, a prisutan je i u gotovo svim slučajevima izolirane fibroze. Postoji statistički značajna povezanost intersticijalne upale i prisutnosti tenascina u intersticiju bubrega ($p=0,04$). Tenascin je prisutan u područjima intersticijalne upale bez obzira na etiologiju glomerulonefritisa. Kod većine ispitivanih bolesnika upalni infiltrat bio je prisutan i u područjima rane fibroze koja su također bila tenascin pozitivna. Rezultati ove studije su u skladu s rezultatima studija koje su objavili drugi autori (98,121,122). Wagrowska-Danilewicz (123) je kod bolesnika sa IgA-glomerulonefritisom utvrdila prisutnost tenascina u područjima intersticijalne upale. Prema njenim rezultatima, prisutnost tenascina nije bila u korelaciji s ukupnim brojem upalnih stanica, niti pojedinačno s brojem T-limfocita i/ili monocita/makrofaga. Ustanovljeno je da se u mnogim kroničnim upalama, poput astme ili primarnog sklerozirajućeg cholangitisa, tenascin pojavljuje *de novo* u žarištima upale (124,125). Uloga tenascina u upali je mnogostruka. Tenascin djeluje poput imunomodulatora (126) i sudjeluje u pregradnji ekstracelularnog matriksa intersticija (124). Pokazano je da tenascin ima anti-adhezivnu ulogu u upali (127) inhibirajući adheziju limfocita na fibronektin (128) i time omogućava "kretanje" stanica. Nadalje, tenascin u *in vitro* uvjetima djeluje immunosupresivno sprečavajući kontakt antigen-prezentirajućih stanica i CD4-limfocita (128). Tenascin-C inhibira antigenom izazvanu aktivaciju T-limfocita sprečavajući transkripciju IL-2 i IL-2R preko nuklearnog transkripcijskog faktora AT-1 (129). Indirektna potvrda ovih *in vitro* rezultata u *in vivo* uvjetima je da se kod kronične upale ekspresija tenascina unutar limfnog čvora povećava i povezana je sa područjima gdje se nalaze CD45RO+/CD45RA- T-limfociti («memory cells») (130).

Uslijed nedostatka bioptičkog materijala imunohistokemijsko bojanje na fibronektin je učinjeno u 24 slučaja. Odlaganje fibronektina u područja intersticija koja se ne nalaze neposredno uz tubularnu bazalnu membranu javlja se kod fibroze intersticija sa ili bez upale, dok kod izolirane upale intersticija nije prisutno. Naši rezultati su u skladu sa podacima iz literature gdje se *de novo* odlaganje fibronektina u tkiva povezuje s granulacijskim tkivom i fibrozom parenhimnih organa, npr. cirozom jetre (131), a dokazano je i u tubulointersticijalnoj fibrozi u sklopu reakcije odbacivanja bubrežnog presatka i u eksperimentalnim modelima oštećenja bubrežnih kanalića (132,133,134). Fibronektin je zajedno s kolagenom tip I i kolagenom tip III receptor za syndekan B-limfocita. Syndekan je transmembranski proteoglikan prisutan isključivo kod B-limfocita koštane srži, a nema ga na površini cirkulirajućih B-limfocita. Syndekan se ponovo pojavljuje prilikom dodira B-limfocita s proteinima ekstracelularnog matriksa i vezan je za proces njihove diferencijacije u plazma stanice na mjestu upale (135). Fibronektin, osim što potiče diferencijacije B-limfocita, stimulira i proliferaciju T-limfocita preko integrinskih receptora (136,137).

Depoziti fibrina/fibrinogena se javljaju rijetko u intersticiju bubrega kod primarnih glomerulonefritisa. Mogu se naći već od stadija izolirane tubulointersticijalne upale pa sve do stadija izolirane fibroze intersticija. Odlaganje fibrina/fibrinogena u ekstracelularni prostor sinovije primijećeno je kod bolesnika sa reumatoidnim artritisom. Depoziti fibrina/fibrinogena bili su povezani sa stupnjem upalne reakcije i nakupljanjem makrofaga (138). Odlaganje fibrina u plućni intersticij kod bolesnika sa različitim bolestima (idiopatska pulmonarna fibroza, kronična opstruktivna bolest pluća, sarkoidoza, AIDS) bilo je povezano s procesom fibroze intersticija (139,140). Povećana vaskularna permeabilnost tijekom upale može dovesti do odlaganja fibrinogena i fibrina u tkivo. Trombin, plasmin i neki drugi faktori, dovode do cijepanja solubilnog fibrinogena plazme u nesolubilni fibrin. Mnogobrojne molekule fibrina tvore gustu mrežu koja doprinosi adheziji monocita/makrofaga (141) i fibroblasta (142). «Neumreženi», slobodni fibrin djeluje kao mitogen (142), modulira

kemotaksiju monocita i neutrofila (143) i povećava vaskularnu permeabilnost (144) te daljnje odlaganje fibrina u tkivo (142). Fibrin nadalje stimulira angiogenezu (145). U novije je vrijeme pokazano da fibrin inducira povećanu ekspresiju ICAM-1 na membrani fibroblasta, te sekreciju kemokina IL-8 i “growth-related oncogen- α ” (146). Fibrin dakle preko kemokina utječe na migraciju upalnih stanica na mjesto upale, a putem adhezijskih molekula na njihovo zadržavanje na mjestu upale.

5.3.1. Proteini ekstracelularnog matriksa bubrežnog intersticija i integrini

Integrini su velika obitelj staničnih receptora za proteine ekstracelularnog matriksa, a neki od njih omogućuju i međustanične veze. Oni su transmembranske molekule građene od dvije podjedinice, α - i β -lanca. Prema β -lancu integrini se razvrstavaju u podskupine; β 1, β 2 i β 3 (147,148). Članovi β 1-podskupine integrina nazivaju se još i VLA («very late activation») integrini. Oni su glavni stanični receptori za proteine ekstracelularnog matriksa (Tablica 14) (149) i reguliraju staničnu adheziju na proteine ekstracelularnog matriksa, staničnu migraciju, proliferaciju i apoptozu (150).

Tablica 15. Proteini ekstracelularnog matriksa i njihovi β 1-integrinski receptori

ECM proteini	Integrin	Drugi naziv(i)
Laminin (kolagen tip I i IV)	α 1 β 1	CD49a, VLA-1
Kolagen tip I i IV (laminin)	α 2 β 1	CD49b, VLA-2
Fibronektin, kolagen tip I	α 3 β 1	CD49c, VLA-3
Fibronektin,	α 4 β 1	CD49d, VLA-4
Fibronektin	α 5 β 1	CD49e, VLA-5
Laminin	α 6 β 1	CD49f, VLA-6
Laminin	α 7 β 1	x
Fibronektin, tenascin	α 8 β 1	x
Tenascin	α 9 β 1	x
Fibronektin, vitronektin	α v β 1	CD51

U normalnom bubrežnom tkivu nalaze se integrinski receptori za građevne proteine tubularne bazalne membrane i bubrežnog intersticija. Tubularne epitelne stanice eksprimiraju receptore za laminin i kolagen tip IV, proteine tubularne bazalne membrane (103). Sam laminin ima nekoliko veznih mjesta za integrine. Epitelne stanice (svih) kanalića su α 6 i β 1 pozitivne (71,149). Neke epitelne stanice proksimalnih kanalića uz β 1 lanac eksprimiraju i β 3 lanac (71). α 6 β 1 integrin je receptor za E8 fragment laminina (151). Tijekom embrionalnog razvoja E8 fragment laminina je presudan za diferencijaciju mezenhima u tubularni epitel (152), a veza epitelne stanice za E8 fragment laminina važna za održanje epitelne strukture i funkcije stanice u razdoblju nakon završenog embrionalnog razvoja. Uz α 6 β 1 integrin na stanicama distalnih tubula prisutan je i α v β 1 (71), receptor za E3 fragment laminina (151). Epitelne stanice distalnih tubula eksprimiraju još dva integrinska receptora za sastavne dijelove bazalne membrane, a to su α 1 β 1 (71) i α 2 β 1 integrin (71,149). Uz receptore za proteine bazalne membrane distalni kanalići posjeduju integrinski receptor α 3 β 1 (71) za kolagen tip I i fibronektin koji se u intersticiju nalaze uz samu tubularnu membranu.

Tijekom upale se u bubrežnom intersticiju *de novo* pojavljuju tenascin i ponekad fibrin, a u većim se količinama odlaže fibronektin. Fibronektin i fibrin stvaraju međusobne mreže i preko $\alpha v\beta 3$ i $\alpha 5\beta 1$ integrinskih receptora omogućuju migraciju stanica na mjesto upale (153,154). Fibrin nadalje putem $\alpha 5\beta 1$ integrina stimulira migraciju endotelnih stanica u procesu neoangiogeneze (155). Tijekom tubulointersticijalne upale u sklopu ekstrakapilarnog glomerulonefritisa tubularne epitelne stanice postaju izrazito $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ i $\alpha v\beta 3$ pozitivne. Pojačana ekspresija ovih integrinskih receptora poklapa se sa povišenom količinom tenascina i fibronektina izoliranih iz bubrežnog tkiva (156). Tenascin preko integrina $\alpha 5\beta 1$ inhibira kemotaksijom izazvanu migraciju monocita i polimorfonukleara kroz gel kolagena tip I, te kemotaksijom izazvanu migraciju polimorfonukleara kroz trodimenzionalni gel fibrina (157). Hillis i suradnici dokazali *de novo* ekspresiju $\alpha 5$ lanca i pojačanu ekspresiju $\beta 1$ lanca u bubrežnom intersticiju kod fibroze u sklopu IgA glomerulonefritisa.

U fazi upale kolagen tip IV zadebljava tubularnu bazalnu membranu, a povećane količine kolagena tip I odlažu se u intersticij. Kolagen preko $\alpha 1\beta 1$ integrinskog receptora može poticati upalnu reakciju djelujući na proliferaciju i migraciju endotelnih stanica i fibroblasta. Kolagen također preko integrina $\alpha 1\beta 1$ potiče T-limfocite na produljenu sekreciju IFN- γ . IFN- γ potiče povećanu ekspresiju $\alpha 1\beta 1$ i time podržava utjecaj kolagena na ciljne stanice. Blokada kolagen-integrin $\alpha 1\beta 1$ interakcije dovodi do inhibicije imunološki uzrokovane upale u eksperimentalnom modelu nefritisa (158).

Integrini prenose signale u stanicu preko kinaze vezane za integrine (ILK). ILK je serin-threonin kinaza koja se veže na integrine $\beta 1$ obitelji (159) i prenosi signale vezane za migraciju i adheziju stanice, ekspresiju gena, odlaganje proteina ekstracelularnog matriksa, te proces transformacije tubularnog epitela u miofibroblaste (160). Mezangijske stanice u dodiru sa kolagenom tip I pojačano sintetiziraju proteine ekstracelularnog matriksa (kolagen tip I i IV, fibronektin) i TGF- $\beta 1$. Povratno, upravo TGF- $\beta 1$ presudno utječe na transformaciju tubularnog epitela u miofibroblaste (161).

Izneseni podaci ukazuju da postoji kompleksna međuzavisnost između proteina ekstracelularnog matriksa koji se aktivno odlažu u intersticij tijekom upale i njihovih integrinskih receptora. Različiti proteini mogu prenositi svoje proinflamatorne i inhibitorne signale preko istih integrinskih receptora.

5.4. Proteini ekstracelularnog matriksa i klinička slika kod primarnih glomerulonefritisa

Ustanovljeno je da klinička prognoza glomerulonefritisa ovisi o tubulointersticijalnim promjenama, prvenstveno o proširenosti intersticijalne fibroze (63,64). Uobičajeno se proteini ekstracelularnog matriksa povezuju sa strukturom organa i stvaranjem ožiljka, odnosno kod bubrega sa tubulointersticijalnom fibrozom. Iz navedenog u Raspravi (*vide supra*) uočljivo je pak da ekstracelularni matriks nije samo potpora stanicama, već je metabolički aktivan i sudjeluje u procesima stanične proliferacije, diferencijacije i/ili aktivacije (162). Ovo istraživanje bilo je potaknuto pitanjem da li možda prisustvo nekih proteina ekstracelularnog matriksa direktno utječe na kliničku sliku ili prognozu primarnog glomerulonefritisa. Usporedbom kliničkih parametara oštećenja bubrežne funkcije, proteiunurije i razine kreatinina u serumu u vrijeme biopsije bubrega i nakon perioda praćenja, sa histološkim promjenama intersticija pokazano je da analiza proteina ekstracelularnog matriksa intersticija može ukazivati na klinički tijek bolesti.

Upala i fibroza intersticija nisu bile prisutne kod svih ispitivanih bolesnika sa proteinurijom. Promjene u ekspresiji proteina ekstracelularnog matriksa bubrežnog intersticija bile su primijećene samo kod bolesnika s upalom i/ili fibrozom intersticija, dok kod bolesnika sa proteinurijom ali bez upale i/ili fibroze intersticija nema promjena u sastavu ekstracelularnog matriksa.

Najčešće promjene u ekspresiji proteina ekstracelularnog matriksa bile su u ekspresiji tenascina i fibronektina, koji se vežu za histološku sliku intersticijalne upale, te kolagena tipa IV koji se pojavljuje u fibrozi intersticija. Intenzitet proteinurije (proteinurija manja od 3,2gr/dan u usporedbi sa proteinurijom višom od 3,2gr/dan) nije utjecao na odlaganje spomenutih proteina ekstracelularnog matriksa u intersticij. Ekspresija kolagena tip I i kolagena tip III rijetko se je mijenjala i nije bila povezana sa razinom proteinurije. Budući da se oba proteina povezuju sa poodmaklim stadijem intersticijalne fibroze u sklopu primarnog glomerulonefritisa (106,164), njihova oskudnost može se pripisati blagom intenzitetu i/ili kratkom trajanju glomerulonefritisa kod ispitanika. Eksperimentalni podaci dobiveni na životinjskim modelima i u kulturi stanica dali su naslutiti da će upravo ova dva proteina biti izrazito zastupljena u intersticiju bolesnika s nefrotskom proteinurijom. Ispitivanja vršena na mišjim miofibroblastima su pokazala da ove stanice u mediju sa visokom koncentracijom glukoze pojačano sintetiziraju i luče kolagen tip I (117).

Povišeni kreatinin bio je prisutan samo kod dvanaestero ispitanika, koji su u usporedbi sa bolesnicima sa proteinurijom imali nešto češće fibrozu intersticija. Nadalje, u usporedbi sa bolesnicima sa proteinurijom tenascin je bio rjeđe prisutan u intersticiju, dok su fibronektin i kolagen tip IV bili podjednako zastupljeni kod većine bolesnika. Niti jedna od navedenih razlika nije dosegla statističku značajnost. Kolagen tip I bio je podjednako prisutan kod bolesnika s proteinurijom i bolesnika s povišenim kreatininom.

Podaci dobiveni ovom studijom nisu u skladu sa eksperimentalnim rezultatima iz literature. U modelu anti-GBM glomerulonefritisa kod kunića povišena razina kolagen tip I mRNA u intersticiju bila je pouzdan predznak kroničnog tijeka bolesti (165). Kod životinja kod kojih je bio izazvan glomerulonefritis anti-Thy 1.1. antitijelom povišena količina kolagena tip I u bubrežnoj kori bila je povezana sa smanjenim klirensom kreatinina (166). Kod bolesnika sa IgA glomerulonefritisom povišenja razina prokolagena III u serumu bila je povezana smanjenim klirensom kreatinina (167). Budući da je u promatranoj skupini bilo malo ispitanika sa povišenim kreatininom u serumu, moguće je da oni nisu reprezentativna skupina.

U ovoj je studiji pokazano da su **depoziti fibrina/fibrinogena u intersticiju** bubrega kod bolesnika s nefrotskom proteinurijom u sklopu primarnog glomerulonefritisa prognostički čimbenik koji ukazuje na loš odgovor na terapiju i perzistentnu proteinuriju. Kada su u razmatranje bili uzeti svi bolesnici sa proteinurijom depoziti fibrina/fibrinogena u tubulointersticiju nisu ukazivali na lošiji klinički tijek bolesti u odnosu na bolesnike bez depozita fibrina/fibrinogena u tubulointersticiju. U literaturi se rijetko navode depoziti fibrina u tubulointersticiju bubrega, autori su više okrenuti značenju depozita fibrina/fibrinogena unutar glomerularnog klupka (168). Depoziti fibrina uzduž peritubularnih kapilara i tubularne bazalne membrane opisuju se kod tubulointersticijalne upale u sklopu ishemičke akutne tubularne nekroze, opstruktivne nefropatije, eksperimentalnog lupus nefritisa (169), te odbacivanja alografta (169, 170,171,172, 173,174), no njihova se prisutnost u tubulointersticiju ne povezuje sa kliničkim podacima. Ipak, Vesey i suradnici (2005) (175) navode u svojem radu o ulozi trombina na patogenezu tubulointersticijalne upale da se depoziti fibrina, koji nastaju kao posljedica utjecaja trombina na cijepanje fibrinogena u fibrin, mogu povezati sa češćom pojavom fibroze tubulointersticija kod tih bolesnika. Osim trombina, u literaturi se sve češće spominje «plasminogen activator inhibitor-1» (PAI-1) kao jedan od značajnih patogenetskih faktora upale i fibroze intersticija (176). PAI-1 je član SERPIN-obitelji

proteaza i inhibitor aktivatora plazminogena. U svjetlu tih novijih istraživanja stvaranje depozita fibrina u intersticiju može se promatrati kao posljedica poremećene ravnoteže između fibrinolitičkih enzima i njihovih inhibitora (177) tijekom tubulointersticijalne upale. Poneki od njih, poput PAI-1, mogu imati osim svoje primarne funkcije u procesu fibrinolize i dodatne proinflamatorne učinke. PAI-1 poput tenascina modulira adheziju i migraciju stanica (176), djeluje kemotaktično na makrofage i potiče sintezu TGF- β (178). Kod kronične nefropatije alografta dokazana je prostorna podudarnost rasprostranjenosti depozita fibrina u intersticiju i povećane ekspresija PAI-1 mRNA i PAR-1 na endotelnim stanicama i epitelnim stanicama proksimalnih kanalića. Povećana ekspresija PAI-1 mRNA bila je direktno povezana sa stupnjem intersticijalne fibroze (180). Doda li se navedenom da i sam fibrin posjeduje proinflamatorno djelovanje (*vide supra*) postaje razumljivo da histološki dokazani depoziti fibrina u intersticiju bubrega kod glomerulonefritisa ukazuju na aktivan upalni proces.

5.5. Tubointersticijalna fibroza i ACE-genotip

Postojanje renalnog renin-angiotenzin sistema dokazano je mjerenjem koncentracije angiotenzina II u bubregu koja je mnogo viša u glomerularnom filtratu i lumenu proksimalnih kanalića no što je u plazmi (181). U fiziološkim uvjetima stanice juksta-glomerularnog aparata luče renin koji ulazi u cirkulaciju, a epitelne stanice proksimalnih kanalića sintetiziraju vrlo malene količine renina koji vjerojatno djeluje parakrino na renalni renin-angiotenzin sistem (182). Efektorna molekula renin-angiotenzin sistema je sam angiotenzin koji regulira glomerularne hemodinamske uvjete potičući vazokonstrikciju i transport elektrolita u proksimalnim kanalićima. Ujedno angiotenzin II djeluje kao faktor rasta i stimulira sintezu proteina ekstracelularnog matriksa (183). U eksperimentalnom modelu subtotalne nefrektomije kod štakora dokazana je povišena razina mRNA renina i angiotenzina u epitelnim stanicama proksimalnih kanalića (184). Na modelu bubrežne fibroze kod miša pokazana je povišena ekspresija angiotenzina II (epitelne stanice i intersticijalni fibroblasti) i smanjena ekspresija ACE na intersticijalnim fibroblastima (185). Iz kliničke je prakse poznato da terapija ACE-inhibitorima dovodi do smanjenja tubulointersticijalne upale i usporavanja procesa intersticijalne fibroze. Inhibicija ACE smanjuje infiltraciju monocita u intersticij, smanjuje sintezu TGF- β i proliferaciju miofibroblasta (186). U ljudskoj populaciji postoji alel za ACE koji ima deleciju na intronu 16, tako da su prisutna tri ACE-genotipa DD (dva alela sa delecijom), ID (jedan alel sa delecijom) i II (oba alela bez delecije) (187).

Među ispitanicima za koje su bili dostupni podaci o ACE-genotipu bilo je 9 ispitanika sa DD genotipom, i po 7 ispitanika sa ID i II genotipom. Nema mnogo studija o rasprostranjenosti pojedinih genotipa u općoj populaciji. U velikoj Britaniji najčešći je ID-genotip (45%), dok su DD i II genotip podjednako rasprostranjeni (27%, odnosno 28%) (188). Za Hrvatsku nema podataka, pa je nemoguće odgovoriti je li pojedini ACE-genotip učestaliji kod bolesnika sa primarnim glomerulonefritisom no u općoj populaciji. Prema sadašnjim saznanjima nema povezanosti između ACE-genotipa i povećanog rizika za razvoj glomerulonefritisa (189,190). Značajno je primijetiti da kod većine ispitanika sa DD i ID genotipom nije bila prisutna fibroza intersticija, dok je ona bila prisutna kod četiri od sedam ispitanika sa II genotipom. Ong-Ajyooth i suradnici (191) su kod bolesnika sa IgA glomerulonefritisom primijetili da upravo ispitanici sa DD genotipom imaju viši histološki indeks, u koji je bila uključena i intersticijalna fibroza. U većini studija je pokazano da je DD-genotip češće povezan sa bržim razvojem kronične renalne insuficijencije (189) i da terapija ACE-inhibitorima ne donosi kliničko poboljšanje kod bolesnika sa DD-genotipom (192). Bents i suradnici (190) pokazali su na velikom broju ispitanika sa primarnim glomerulonefritisom da su ACE-genotip DD i ID udruženi sa angiotenzinogen-genotipom TT i MT loši prognostički pokazatelji, dok

A1166C polimorfizam gena za angiotenzin II tip 1 receptora nije imao prognostičko značenje. Broj ispitanika u ovoj studiji bio je vrlo malen.

Budući da je u ovom radu pokazano da je odlaganje fibrina/fibrinogena u intersticij loš prognostički pokazatelj zanimalo nas je li ta pojava češća kod osoba jednog od tri genotipa. Pokazano je da je odlaganje fibrina/fibrinogena bilo povezano sa proliferativnim oblicima GN i upalom u intersticiju, i češće kod osoba sa ID i DD genotipom. O povezanosti ACE-genotipa i poremećaja fibrinogeneze i fibrinolize počelo se govoriti u novije vrijeme. Oskudni literaturni podaci ukazuju da osobe sa D-alelom stvaraju više fibrina (193).

U ovom radu podaci o ACE-genotipu bili su dostupni za manje od polovine ispitanika. Vrlo je teško, gotovo nemoguće na tako malenom broju ispitanika donositi zaključke o mogućem utjecaju ACE-genotipa na sklonost bolesnika da brže razvije intersticijalnu fibrozu u sklopu primarnog glomerulonefritisa.

6. ZAKLJUČCI

6.1. Normalno bubrežno tkivo

1. U normalnom bubrežnom tkivu je kolagen tip IV građevni element tubularne bazalne membrane. Kolagen I je slabo pozitivan, difuzno u intersticiju kore i medule bubrega. Fibronektin se u intersticiju nalazi uz samu tubularnu bazalnu membranu. Intersticij medule bubrega je intenzivno tenascin pozitivan, a u intersticiju kore nema tenascina.
2. Stjenke većih krvnih žila bubrega su tenascin, fibronektin i kolagen tip I pozitivne.
3. U normalnom bubrežnom tkivu nema kolagena III, niti fibrina/fibrinogena.

6.2. Tubulintersticijalna upala/fibroza u sklopu primarnog glomerulonefritisa

1. Nema razlike u odlaganju proteina ekstracelularnog matriksa u intersticij između različitih oblika primarnog glomerulonefritisa.
2. Tijekom upale u sklopu primarnog glomerulonefritisa se u intersticij bubrežne kore odlaže *de novo* tenascin. Kod bolesnika sa intersticijalnom upalom postoji statistički značajna razlika u prisutnosti tenascina ($p=0,04$).
3. U intersticij bubrega se u slučajevima fibroze u sklopu primarnog glomerulonefritisa povećano odlažu kolagena tip I i fibronektin, a *de novo* kolagen tip III i tip IV. Kod bolesnika sa intersticijalnom fibrozom postoji statistički značajna razlika u prisutnosti kolagena IV u odnosu na sve ostale promatrane proteine ekstracelularnog matriksa ($p=0,024$).

6.3. Proteini ekstracelularnog matriksa bubrežnog intersticija i klinička slika u času biopsije

1. Nema razlike u intenzitetu proteinurije ili razini serumskog kreatinina, niti u času biopsije ni na kraju praćenja, obzirom na prisutnosti tenascina, fibronektina, kolagena tip I, kolagena tip III i kolagena tip IV u intersticiju bubrega.
2. Prisustvo fibrina/fibrinogena u bubrežnom intersticiju je loš prognostički čimbenik kod bolesnika koji u času biopsije imaju nefrotsku proteinuriju ($p=0,035$).

7. SAŽETAK

Cilj: Klinička prognoza primarnog glomerulonefritisa, osim brzo-progredirajućeg GN, ovisi o stupnju fibroze bubrežnog intersticija. Svrha ovog rada bila je da usporedbom kliničke i histološke slike pokuša ponuditi nove histološke prognostičke čimbenike primarnih glomerulonefritisa.

Postupci: U ovom radu su u skupini 55 bolesnika sa primarnim glomerulonefritisom uspoređivani klinički parametri oštećenja bubrežne funkcije, proteinurija i razina kreatinina u serumu u vrijeme biopsije bubrega i nakon perioda praćenja s histološkim promjenama intersticija. Histološke promjene intersticija promatrane su kroz promjene sastava ekstracelularnog matriksa. Biopsijski materijal preuzet je za svjetlosnu mikroskopiju, imunofluorescenciju, elektronsku mikroskopiju i imunohistokemiju. Histološka dijagnoza glomerulonefritisa postavljena je prema kriterijima Svjetske zdravstvene organizacije (Churg J, Sobin LH: Renal disease. Classification and atlas of glomerular disease. Tokyo, New York: Igaku Shoin, 1982). Imunohistokemijski je određivano prisustvo i rasprostranjenost kolagena tip I (monoklonalno antitijelo dobiveno iz zeca, 1:25), kolagena tip III (monoklonalno antitijelo dobiveno iz miša, klon MC3-HA, 1:10), kolagena tip IV (monoklonalno antitijelo dobiveno iz miša, klon CIV 22, 1:10), fibronektina (poliklonalno antitijelo dobiveno iz zeca, 1:10) i tenascina (monoklonalno antitijelo dobiveno iz miša, klon TN2, 1:25). Imunofluorescencijom je određivano prisustvo i rasprostranjenost fibrina/fibrinogena (primarna antitijela konjugirana sa fluoresceinom). Intenzitet imunohistokemijske reakcije i imunofluorescencije određen je semikvantitativno («-» bez reakcije, «+» slabo pozitivna reakcija, «++» pozitivna reakcija) na 10 velikih vidnih polja (povećanje 400x).

Rezultati: U normalnom bubrežnom tkivu je kolagen tip IV građevni element tubularne bazalne membrane. Kolagen I je slabo pozitivan, difuzno u intersticiju kore i medule bubrega. Fibronektin se u intersticiju nalazi uz samu tubularnu bazalnu membranu. Intersticij medule bubrega je intenzivno tenascin pozitivan, a u intersticiju kore nema tenascina. Stjenke većih krvnih žila bubrega su tenascin, fibronektin i kolagen tip I pozitivne. U normalnom bubrežnom tkivu nema kolagena III, niti fibrina/fibrinogena. Nema razlike u odlaganju proteina ekstracelularnog matriksa u intersticij između različitih oblika primarnog glomerulonefritisa. Tijekom upale u sklopu primarnog glomerulonefritisa se u intersticij bubrežne kore odlaže *de novo* tenascin. Kod bolesnika s intersticijalnom upalom postoji statistički značajna razlika u prisutnosti tenascina ($p=0,04$). U intersticij bubrega se u slučajevima fibroze u sklopu primarnog glomerulonefritisa povećano odlažu kolagena tip I i fibronektin, a *de novo* kolagen tip III i tip IV. Kod bolesnika sa intersticijalnom fibrozom postoji statistički značajna razlika u prisutnosti kolagena tip IV u odnosu na sve ostale promatrane proteine ekstracelularnog matriksa ($p=0,024$). Nema razlike u intenzitetu proteinurije ili razini serumskog kreatinina, niti u času biopsije ni na kraju praćenja, obzirom na prisutnosti tenascina, fibronektina, kolagena tip I, kolagena tip III i kolagena tip IV u intersticiju bubrega. Prisustvo fibrina/fibrinogena u bubrežnom intersticiju je loš prognostički čimbenik kod bolesnika koji u času biopsije imaju nefrotsku proteinuriju ($p=0,035$).

Zaključak: Utvrđeno je da nema razlike u odlaganju proteina ekstracelularnog matriksa u intersticij između različitih oblika primarnog glomerulonefritisa. Tijekom upale u sklopu primarnog glomerulonefritisa se u intersticij bubrežne kore odlaže *de novo* tenascin. U intersticij bubrega se u slučajevima fibroze u sklopu primarnog glomerulonefritisa pojačano odlažu kolagena tip I i fibronektin, a *de novo* kolagen tip III i tip IV. Također je pokazano da nema razlike u intenzitetu proteinurije ili razini serumskog kreatinina, niti u času biopsije ni na kraju praćenja, obzirom na prisutnosti tenascina, fibronektina, kolagena tip I, tip III i a tip IV u intersticiju bubrega. Prisustvo fibrina/fibrinogena u bubrežnom intersticiju je loš prognostički čimbenik kod bolesnika koji u času biopsije imaju nefrotsku proteinuriju

($p=0,035$). Time je pronađen novi histološki prognostički čimbenik primarnih glomerulonefritisa koji do sada nije bio opisan u literaturi.

8. SUMMARY

Aim: The extracellular matrix is a complex superstructure surrounding cells composed of various proteins. In the kidney, ECM proteins are part of basement membranes, glomerular mesangium, interstitium and vessel walls. Their role is not only mechanical support of the cells, but also modification of cell phenotype and mediation of cellular response. The composition of glomerular and interstitial extracellular matrix (ECM) in glomerulonephritis (GN) is changing. Chronic renal insufficiency develops only in those cases of glomerulonephritis in which the lumina of postglomerular capillaries in the renal cortex are narrowed due to expansion of extracellular matrix (ECM). The aim of this study was to elucidate the distribution of extracellular matrix proteins in various forms of primary GN and to compare the composition of interstitial ECM proteins with clinical data in various forms of primary glomerulonephritis (GN).

Methods: We examined renal biopsies from 55 GN patients, while normal renal tissue was obtained from nephrectomy due to small renal tumour. Specimens fixed in B5 and/or Dubosque fixative were analysed by immunohistochemistry (APPAP-method) using a monoclonal antibodies against tenascin (TN), fibronectin (FN), collagen I, III and IV (COI, COIII, COIV) (DAKO). The same fixatives were used for control renal tissue. Clinical data were: proteinuria and creatinine level, obtained by standard laboratory methods, immunotherapy and ACE-genotype.

Results: In normal renal tissue glomerular mesangium is TN, FN and weakly COI positive. Glomerular and tubular basal membrane stained with COIV antibody. FN is found around TBM. There was a weak COI expression in interstitium. Intensive TN staining was found in medulla interstitium only. The wall of larger blood vessels was TN, FN and COI positive. Irrespectably of histological form of GN foci of glomerular sclerosis were TN, FN, COI, COIII and COIV positive. In focal glomerulosclerosis mesangium, apart from sclerotic foci, was FN negative. There was sometimes *de novo* COIII and COIV staining of mesangium in GN with mesangial proliferation. Fibrous crescents showed TN, FN, COI, COIII and COIV staining. Thickened Bowman's capsule expressed COI, COIV and TN. At sites of interstitial inflammation there was a *de novo* TN expression. At sites of interstitial fibrosis FN and COIV were invariably present. TN was found at sites of interstitial fibrosis in 20 of 33 cases with interstitial fibrosis, mainly in biopsies with concomitant interstitial inflammation. COIII staining was found at sites of fibrosis only in 5 biopsies. COI was expressed more intensively in interstitium when inflammation or fibrosis were present.

Fifty patients had proteinuria at time of biopsy and 33 of them continued to have one after follow up period. Patients with persistent proteinuria had more often interstitial fibrosis with elevated content of COI and COIV. Presence of fibrin/fibrinogen deposits in interstitium of patients with nephrotic proteinuria is negative prognostic factor ($p=0,035$). Those patients did not respond well to therapy. There were 12 patients with elevated creatinine at biopsy with similar composition of ECM as patients with proteinuria. Majority of patients with interstitial fibrosis had ACE-genotyp II although this genotype wasn't the most common in the cohort.

Conclusions: Our study showed that persistent proteinuria could be linked to interstitial fibrosis and fibrin deposits.

9. LITERATURA

1. Colvin RB, Fang LST, Tischer CC, Brenner BM.. Renal Pathology with Clinical and Functional Correlations. 1.izd. Philadelphia JB: Lippincott Company, 1994
2. Schreiner GF, Kissane JM. The urinary system. U: Kissane In Andersson's Pathology. 9. izd. St.Louis, Baltimore, Philadelphia, Toronto: The C.V. Mosby Company, 1990; 804-870
3. Frassinetti Fernandes P, Ellis PA, Rodericj PJ, Cairns HS, Hicks JA, Cameron JS. Causes of end-stage renal failure in black patients starting renal replacement therapy. *Am J Kidney Dis* 2000; 36:301-9
4. Painter D, Cloustin D, Ahn E, Kirwan P, Ledoux F, Tivollier LM, Bouvier P, Friend J, Coste P, Masselot JP. The pattern of glomerular disease in New Caledonia: preliminary findings. *Pathology* 1996; 28:32-5
5. Choi IJ, Jeong HJ, Han DS, Lee JS, Choi KH, Kang SW, Ha SK, Lee H, Kim PK. An anlysis of 4,514 cases of renal biopsy in Korea. *Yonsei Med J* 2001; 42:247-54
6. Zaki M, Helin I, Manandhar DS, Hunt MC, Khalil AE. Primary nephrotic syndrome in Arab children in Kuwait. *Pediatr Nephrol* 1989;3 :218-20
7. Gusmano R, Perfumo F. Worlwide demographic aspects of chronic renal failure in children. *Kidney Int Suppl* 1993; 41:S31-35
8. Briganti EM, Dowling J, Finlay M, Hill PA, Jones CL, Kincaid-Smith P, Sinclair R, McNeil JJ, Atkins RC. The incidence of biopsy proven glomerulonephritis in Australia. *Nephrol Dial Transplant* 2000;16:1364-1367
9. Schena FP. IgA nephropathy: a frequent disease in Mediterranean area. *Recenti Prog Med* 1991; 82:338-343
10. Stewart JH, McCarthy SW, Storey BG, Roberts BA, Gallery E, Mahony JF. Diseases causing end-stage renal failure in New South Wales. *Br Med J* 1975; 1:440-443
11. Mittal S, Kher V, Gaulati S, Awarwal LK, Arora P. Chronic renal failure in India. *Ren Fail* 1997;19:763-770
12. Simon P, Ramee MP, Autuly V, LAruelle E, Charasse C, Cam G, Ang K. Epidemiology of primary glomerular disease in French region. Variations according to period and age. *Kidney Int* 1994; 46:1192-1198
13. Schena FP. Survey of the Italian registry of renal biosies. Frequency of the renal disease for 7 consecutive years. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12:418-426
14. Baqi N, Singh A, Balachandra S, Ahmad H, Nicastrì A, Kytinski S, Hon P, Tejani A. The paucity of minimal change disease in adoloscetes with primary nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 1998;12:105-107
15. Korbet Sm, Genchi RM, Borok RZ, Schwartz MM. The racial prevalence of glomeerular lesions in nephrotic adults. *Am J Kidney Dis* 1996; 27:647-651
16. Hoy WE, Hughson MD, Smith SM, Megill DM. Mesangial proliferative glomerulonephritis in southwestern American Indians. *Am J Kidney Dis* 1993; 21:486-496
17. Yahya TM, Pingle A, Boobes Y, Pingle S. Analysis of 490 kidney biopsies: data from the United Arab Emirates Renal disease registry. *J Nephrol* 1998; 11:148-150
18. Srivastava T, Simon SD, Alon US. High incidence of focal segmental glomerulosclerosis in nephrotic syndrome of childhood. *Pediatr Nephrol* 1999; 13:13-18
19. Pontier PJ, Patel TG. Racial differences in the prevalence and presentation of glomerular disease in adults. *Clin Nephrol* 1994; 42:79-84
20. Bakir AA, Share DS, Levy PS, Arruda JA, Dunea G. Focal segmental glomerulosclerosis in adult African Americans. *Clin Nephrol* 1996; 46:306-311
21. Al-Homrany MA. Pattern of renal diseases among adults in Saudi Arabia: a clinicopathologic study. *Ethn Dis* 1999; 9:463-467
22. Coppo R, Giangoglio B, Porcellini MG, Maringhini S. Frequency of renal diseases and clinical indications for renal biopsy in children. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13:293-297

23. Power DA, Muirhead N, Simpson JG, Nicholls AJ, Horne CH, Catto GF, Edward N. IgA nephropathy is not a rare disease in the United Kingdom. *Nephron* 1985; 40:180-184
24. Taguchi T, von Bassewitz DB, Takebayashi S, Harada T. A comparative study of IgA nephritis in Japan and Germany. A approach to its geopathology. *Pathol Res pract* 1987; 182:358-367
25. Woo KT, Chiang GS, Pall A, Tan PH, Lau YK, Chin YM. The changing pattern of glomerulonephritis in Singapore over the past two decades. *Clin Nephrol* 1999; 52:96-102
26. Churg J, Sobin LH. Renal disease. 1. izd. Classification and atlas of glomerular diseases. Tokyo, New York (NY): Igaku Shoin, 1982
27. Habib R. A story of glomerulonephritis: a pathologist's experience. *Pediatr Nephrol* 1993; 7:336-346
28. Churg J, Bernstein J, Glasscock RJ. Renal disease. Classification and atlas of glomerular diseases. 2. izd. Tokyo, New York (NY): Igaku Shoin, 1995
29. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Pathologic basis of disease. 3. izd. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1989
30. Brenner BM, Coe Fi Rector F. Clinical Nephrology. 2. izd. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1992
31. McAdams AJ, Valentini RP, Welch TR. The nonspecificity of focal segmental glomerulosclerosis. The defining characteristics of primary focal glomerulosclerosis, mesangial proliferation and minimal change. *Medicine (Baltimore)* 1997; 76:42-52
32. Magil AB. Focal and segmental glomerulosclerosis. *Modern Pathol* 1991; 4:383-391
33. Zollinger HU, Mihatsch MJ. Renal pathology in biopsy. 1. izd. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1978
34. Mathis BJ, Kim SH, Calabrese K, Haas M, Seidman JG, Sedman CE, Pollak MR. A locus for inherited focal segmental glomerulosclerosis maps to chromosome 19q13. *Kidney Int* 1998; 53:282-286
35. Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, Howell DN, Gross DA, Rogala AR, Smith AH, Graham FL, Bembe M, Quarles LD, Pericak-Vance MA, Vance JM. Clinical and genetic heterogeneity in familial focal segmental glomerulosclerosis. International Collaborative Group for the Study of Familial Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 1999; 55:1241-1246
36. Vats A, Nayak A, Ellis D, Randhawa PS, Finegold DN, Levinson KL, Ferrell RE. Familial nephrotic syndrome: clinical spectrum and linkage to chromosome 19q13. *Kidney Int* 2000; 57:875-881
37. Sakimon R, Gubler MC, Niaudet P. Genetics of the nephrotic syndrome. *Curr Opin Pediatr* 2000; 12:129-134
38. Kambham N, Tanji N, Seigle RL, Markovitz GS, Pulkkinen L, Uitto J, D'Agati VD. Congenital focal segmental glomerulosclerosis associated with beta4 integrin mutation and epidermolysis bullosa. *Am J Kidney Dis* 2000; 36:190-196
39. Korhonen M, Ylanne L, Laitinene L, Virtanene I. The α 1- α 6 subunits of integrins are characteristically expressed in distinct segments of developing and adult human nephron. *J Cell Biol* 1990; 111:1245-1254
40. Frisberg Y, Toledano H, Becker-Cohen R, Feign E, Halle D. Genetic polymorphism in paraoxonase is a risk factor for childhood focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis.* 2000; 36:1253-1261
41. Lenhard V, Dippell J, Muller-Wiefel DE, Schroder D, Seidl S, Scharer P. HLA natigens in children with idiopathic nephrotic syndrome. *Proc Eur Dial Transplant Assoc.* 1980; 17:673-677

42. Goodman DJ, Clarke B, Hope RN, Miach PJ, Dawborn JK. Familial focal glomerulosclerosis: a genetic linkage to the HLA locus? *Am J Nephrol.* 1995; 15:442-445
43. Freedman BI, Spray BJ, Heise ER. HLA associations in IgA nephropathy and focal and segmental glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis.* 1994; 23:352-357
44. Krasowska-Kwiecien A, Snacewicz-Pach K, Pogan A. Class II human leukocyte antigens in minimal change nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis-preliminary study. *Pol Merkuriusz Lek.* 2001;10:256-258
45. Hotta O, Inoue CN, Miyabayashi S, Furuta T, Takeuchi A, Taguma Y. Clinical and pathologic features of focal segmental glomerulosclerosis with mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) gene mutation. *Kidney Int.* 2001; 59:1236-1243
46. Doleris LM, Hill GS, Chedin P, Nochy D, Bellanne-Chantelot C, Hanslik-Bedrossian J, Caillat-Zucman S, Cahen-Versaux J, Bariety J. Focal segmental glomerulosclerosis associated with mitochondrial cytopathy. *Kidney Int.* 2000; 58:1851-188
47. Sotsiou F. Postinfectious glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplan.* 2001; 16 (Suppl 6):68-70
48. Ferrario F, Rastaldi MP. Histopathological atlas of renal diseases: Acute post-streptococcal glomerulonephritis. *J Nephrol.* 2004; 17:747-748
49. Iwafuchi Y, Morita T, Kamimura A, Kunisada K, Ito K, Miyazaki S. Acute endocapillary proliferative glomerulonephritis associated with human parvovirus B19 infection. *Clin Nephrol.* 2002; 57:246-250
50. Montseny JJ, Meyrier A, Kleinknecht D, Callard P. The current spectrum of infectious glomerulonephritis. Experience with 76 patients and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 1995; 74:63-73
51. Hörl WH, Kerjaschki D. Membranous glomerulonephritis. *J Nephrol.* 2000; 13: 291-316
52. Šćukanec-Špoljar M. Čužić S. Bubrezi i mokraćni sustav. U: Specijalna patologija. 1. izd. Zagreb: Medicinska naklada, 2004: 351-398
53. Baud L. Renal Epithelial Cells: Differentiation and Plasticity *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14:S1-S2
54. di Belgijoso GB, Ferrario F, Landriani N. Virus-related glomerular diseases: histological and clinical aspects. *J Nephrol.* 2002; 15:469-479
55. Ferrario F, Rastaldi MP. Membranoproliferative glomerulonephritis. *J Nephrol.* 2004; 17:483-489
56. Hent RC, Bergkamp FJ, Weening JJ, van Dorp WT. Delayed onset of membranoproliferative glomerulonephritis in a patient with type I cryoglobulinaemia. *Nephrol Dial Transplant.* 1997; 12:2155-8.
57. Pucillo LP, Agnello V. Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis B and C viral infections: from viruslike particles in the cryoprecipitate to viral localization in paramesangial deposits, problematic investigations prone to artifacts. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1994; 3:465-470
58. Halimi JM, Lavabre-Bertrand T, Beraud JJ, Canaud B. Nephrotic syndrome associated with chronic lymphocytic leukemia resistant to immunosuppressive drugs: remission obtained by splenectomy. *Clin Nephrol.* 1996; 45:273-276
59. Lou H. Anti-GBM glomerulonephritis: a T-cell mediated autoimmune disease? *Arch Immunol Ther Exp.* 2004; 52:96-103
60. Mustonen J, Syrjanen J, Rantala I, Pasternack A. Clinical course and treatment of IgA nephropathy. *J Nephrol.* 2001; 14:440-446
61. Scolari F. Inherited forms of IgA nephropathy. *J Nephrol.* 2003; 16:317-320

62. Radice A, Sinico RA. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Autoimmunity*. 2005; 38:93-103
63. Bohle A., Wehrmann M., Mackensen-Haen S., v. Gise H., Mickeler E, Xiao T.-C., Muller C., Muller GA: Pathogenesis of chronic renal failure in primary glomerulopathies. *Nephrol Dial Transplant*. 1994; Suppl 3:4-12
64. Bohle A, Muller GA, Wehrmann M, Mackensen-Haen S, Xio J-C.: Pathogenesis of chronic renal failure in the primary glomerulopathies, renal vasculopathies, and chronic interstitial nephritides. *Kidney Int*. 1996; 49:S2-S9
65. Okada H, Strutz F, Danoff TM, Neilson EG.: Possible pathogenesis of renal fibrosis. *Kidney Int*. 1996; 49:S37-S38
66. Ivanyi B, Marcussen N, Kemp E, Olsen TS.: The distal nephron is preferentially infiltrated by inflammatory cells in acute interstitial nephritis. *Virchows Arch A*. 1992; 420:37-42
67. Yang N, Isbel NM, Nikolic-Paterson DJ, Li Y, Ye R, Atkins RC, Lan HY. Local macrophage proliferation in human glomerulonephritis. *Kidney Int*. 1998; 54:143-51
68. Rovin BH, Phan LT. Chemotactic factors and renal inflammation. *Am J Kidney Dis*. 1998; 31:1065-1084
69. Segerer S, Nelson PJ, Schondorff D. Chemokines, chemokine receptors and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol*. 2000; 11: 152-176
70. Kuroiwa T, Schlimgen R, Illei GG, McInnes IB, Boumpas DT. Distinct T cell/renal tubular epithelial cell interactions define differential chemokine production: Implications for tubulointerstitial injury in chronic glomerulonephritides. *J Immunol*. 2000; 164:3323-3329
71. Čužić S. Integrine bei Glomerulonephritis. Doktorarbeit. Ruprecht Karls Universitat Heidelberg, 1991
72. Cameron JS. Tubular and interstitial factors in the progression of glomerulonephritis. *Pediatr Nephrol*. 1992; 6:292-303
73. Saito T, Atkins RC. Interstitial activated IL-2R+ mononuclear cells and Ia antigens in experimental focal glomerulosclerosis. *Pathology*. 1994; 26:403-406
74. Muller GA, Rodemann HP. Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: I. immunophenotyping of cultured tubular epithelial cells and fibroblasts derived from kidneys with histologically proven interstitial fibroblasts. *Am J kidney Dis*. 1991; 17:680-683
75. Neilson EG. Pathogenesis and therapy of interstitial nephritis. *Kidney Int*. 1989; 35: 1257-1270
76. Eddy AA: Interstitial nephritis induced by protein-overload proteinuria. *Am J Pathol*. 1989; 135:719-733
77. McCulloch L, Lui E, Adams J. A relationship between proteinuria and acute tubulointerstitial disease in rats with experimental nephrotic syndrome. *Am J Pathol*. 1991; 138:1111-1123
78. Ritz E. Pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome. *New Eng J Med*. 1994; 330:61-62
79. Kriz W, Hartmann I, Hosser H, Hahnel B, Kranzlin B, Provoost A, Gret N. Tracer studies in rat demonstrate misdirected filtration and peritubular filtrate spreading in nephrons with segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol*. 2001; 12:496-506
80. Rossini M, Fogo AB. Mechanisms leading to progression of chronic renal injury: the interstitium. *Drug Discovery Today*. 2004; 1:65-72
81. Furness PN. Extracellular matrix and the kidney. *J Clin Pathol*. 1996; 49:355-359

82. Fan JM, Huang XR, Ng YY, Nikolic-Peterson DJ, Mu W, Atkins RC, Lau HY. Interleukin-1 induces tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation through a transforming growth factor-beta dependant mechanism in vitro. *Am J Kidney Dis.* 2001; 37:820-831
83. Goumenos DS, Tsamandas AC, Oldroyd S, Sotsiou F, Tsakas S, Petropoulou C, Bonikos D, Al Nahas AM, Vlachojannis JG. Transforming growth factor-beta (1) and myofibroblasts: a potential pathway towards renal scarring in human glomerular disease. *Nephron.* 2001; 87:240-248
84. Eddy AA. Progression in chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2005; 12:353-365
85. Jinde K, Nikolic-Peterson DJ, Huang XR, Sakai H, Kurokawa K, Atkins RC, Lan HY. Tubular phenotypic change in progressive tubulointerstitial fibrosis in human glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis.* 2001; 38:761-769
86. Aufderheide E, Chiquet-Ehrismann R, Ekblom P. Epithelial-mesenchymal interactions in the developing kidney lead to expression of tenascin in the mesenchyme. *J Cell Biol.* 1987; 105:599-608
87. el Nahas AM. Plasticity of kidney cells: role in kidney remodeling and scarring. *Kidney Int.* 2003; 64:1553-1563
88. Haralson MA. Extracellular matrix and growth factors: an integrated interplay controlling tissue repair and progression to disease. *Lab Invest.* 1993; 69:369-371
89. Hynes RO, Yamada KM. Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol.* 1982; 95:369-377
90. Simpson-Haidaris PJ, Rybarczyk B. Tumors and fibrinogen. The role of fibrinogen as an extracellular matrix protein. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;936:406-425.
91. Farrell DH. Pathophysiologic roles of the fibrinogen gamma chain. *Curr Opin Hematol.* 2004 ;11:151-155.
92. Pereira M, Simpson-Haidaris PJ. Fibrinogen modulates gene expression in wounded fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 936:438-443
93. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and function. *J Thromb Haemost.* 2005; 3:1894-904
94. Furness PN, Boyd S. Electron microscopy and immunocytochemistry in the assessment of renal biopsy specimens: actual and optimal practice. *J Clin Pathol* 1996; 49:233-237
95. Yabuki A, Suzuki S, Matsumoto M, Taniguchi K, Nishinakagawa H. A simple method for the specific detection of Ren-1 renin. *Kidney International.* 2002; 62:2294-2299
96. Pavelic ZP, Sever Z, Fontaine RN, Baker VV, Reising J, Denton DM, Pavelic L, Khalily M. Detection of P-glycoprotein with JSB-1 monoclonal antibody in B-5 fixed and paraffin-embedded cell lines and tissues. *Sel Cancer Ther.* 1991; 7:49-58
97. Assad L, Schwartz MM, Virtanen I, Gould VE: Immunolocalization of tenascin and cellular fibronectins in diverse glomerulopathies. *Vierchows Arch.* 1993; 63:307-316
98. Truong LD, Foster SV, Barrios R, D'Agati V, Verani RR, Gonzalez JM, Suki WN. Tenascin is an ubiquitous extracellular matrix protein of human renal interstitium in normal and pathologic conditions. *Nephron.* 1996; 72:579-586
99. Yoshioka K, Tohda M, Takemura T, Akano N, Matsubara K, Oooshima A, Maki S. Distribution of type I collagen in human kidney diseases in comparison with type III collagen. *J Pathol.* 1990; 162:141-148
100. Gubler MC, Dommergues JP, Foulard M, Bensman A, Leroy JP, Broywer M, Habib R. Collagen type III glomerulopathy: a new type of hereditary nephropathy. *Pediatr Nephrol.* 1993; 7:354-360.

101. Roll JF, Madri JA, Albert J, Furthmayer H. Codistribution of collagen types IV and AB2 in basement membranes and mesangium of the kidney. *J Cell Biol.* 1980; 85:597-616
102. Rossini M, Fogo AB. Mechanisms leading to progression of chronic renal injury: the interstitium. *Drug Disc Today* (2004) 1:65-72
103. Timpl R. Structure and biological activity of basement membrane proteins *Eur J Biochem.* 1989; 180:487-502
104. Kosmehl H, Berndt A, Katenkamp D. Molecular variants of fibronectin and laminin: structure, physiological occurrence and histopathological aspects. *Virchows Arch.* 1996; 429:311-322
105. Chatziantoniou C, Boffa J-J, Ardaillou R, Dussaule J-C. Nitric Oxide Inhibition Induces Early Activation of Type I Collagen Gene in Renal Resistance Vessels and Glomeruli in Transgenic Mice. *J Clin Invest.* 1998; 101:2780-2789
106. Muchaneta-Kubara EC, El Nahas M. Myofibroblast phenotypes expression in experimental renal scarring. *Nephrol Dial Transplant.* 1997, 2:904-915
107. Nakatsuji S, Yamate J, Sakuma S. Relationship between vimentin expressing renal tubules and interstitial fibrosis in chronic progressive nephropathy in aged rats. *Virchows Arch.* 1998; 433:359-367
108. Nakatsuji S, Yamate J, Sakuma S. Macrophages, myofibroblasts and extracellular matrix accumulation in interstitial fibrosis of chronic progressive nephropathy in aged rats. *Vet Pathol.* 1998; 35:352-360
109. van Vliet AI, van Alderwegen IE, Baelde HJ, de Heer E, de Killen P, Kalluri RK, Bruijn JA, Bergijk EC. Differential expression of collagen type IV alpha-chains in the tubulointerstitial compartment in experimental serum sickness nephritis. *J Pathol.* 1999; 189:279-87
110. Adhikary LP, Yamamoto T, Isome M, Nakano Y, Yaoita E, Kihara I. Expression profile of extracellular matrix and its regulatory proteins during the process of interstitial fibrosis after anti-glomerular basement membrane antibody induced glomerular sclerosis in Sprague-Dawley rats. *Pathol Int.* 1999; 49:716-725
111. Abe K, Li K, Sacks SH, Sheerin NS. The membrane attack complex, C5b-9, up regulates collagen gene expression in renal tubular epithelial cells. *Clin Exp Immunol.* 2004; 136:60-66
112. Ng Y-Y, Huang T-Po, Yang W-C, Chen Z-P, Yang A-H, Mu W, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC, Lan HY. Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney International.* 1998; 54:864-870
113. Yamamoto T, Noble NA, Miller DE, Border WA. Sustained expression of TGF-beta 1 underlies development of progressive kidney fibrosis. *Kidney Int.* 1994; 45:916-927
114. Yokoi H, Mukoyama M, Sugawara A, Mori K, Nagae T, Makino H, Suganami T, Yahata K, Fujinaga Y, Tanaka I, Nakao K. Role of connective tissue growth factor in fibronectin expression and tubulointerstitial fibrosis *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002; 282: F933-F942
115. Gupta S.; Clarkson M.R.; Duggan J.; Brady H.R. Connective tissue growth factor: Potential role in glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis. *Kidney International.* 2000; 58: 1389-1399
116. Razzaque MS, Shimokawa I, Nazneen A, Higami Y, Taguchi T. Age-related nephropathy in the Fischer 344 rat is associated with overexpression of collagens and collagen-binding heat shock protein 47. *Cell and Tissue Research.* 1998; 293: 471 - 478

117. Han DC, Isono M, Hoffman BB, Ziyadeh FN. High Glucose Stimulates Proliferation and Collagen Type I Synthesis in Renal Cortical Fibroblasts. *J Am Soc Nephrol*. 1999; 10:1891-1899
118. Ellis D, Forest KY-Z, Erbey J, Orchard T J. Urinary measurement of transforming growth factor- β and type IV collagen as new markers of renal injury: application in diabetic nephropathy. *Clinical Chemistry*. 1998; 44:950-956
119. Kado S, Aoki A, Wada S, Katayama Y, Kugai N, Yoshizawa N, Nagata N. Urinary type IV collagen as a marker for early diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract*. 1996; 31:103-108
120. Makino H, Hayashi Y, Shikata K, Hirata K, Akiyama K, Ogura T, Obata K, Ota Z. Urinary detection of type IV collagen and its increase in glomerulonephritis. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 1995; 88:215-223
121. Assad L, Schwartz MM, Virtanen I, Gould VE: Immunolocalization of tenascin and cellular fibronectins in diverse glomerulopathies. *Vierchows Arch*. 1993; 63:307-316
122. Okada M, Takemura T, Murakami K, Hino S, Yoshioka K. Expression of tenascin in normal and diseased human kidneys. *Nippon Jinzo Gakkai Shi*. 1996; 38:213-219.
123. Wagrowska-Danilewicz M, Danilewicz M. Renal interstitial tenascin immunostaining and immune cell infiltration in IgA nephropathy. *Nephrology*. 2001; 6:127-130
124. Laitinen A, Altraja A, Kampe M, Linden M, Virtanen I, Laitinen L. Tenascin Is Increased in Airway Basement Membrane of Asthmatics and Decreased by an Inhaled Steroid. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 156: 951-958
125. Koukoulis GK, Koso-Thomas AK, Zardi L, Gabbiani G, Gould VE. Enhanced tenascin expression correlates with inflammation in primary sclerosing cholangitis. *Pathol Res Pract*. 1999; 195:727-731
126. Sakakura T, Kusano I. Tenascin in tissue perturbation repair. *Acta Pathol Jpn*. 1991; 41:247-58
127. Raghov R. The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. *FASEB J*. 1994; 8: 823-831
128. Rugg CR, Chiquet-Ehrismann R, Alkan SS. Tenascin, an Extracellular Matrix Protein, Exerts Immunomodulatory Activities. *PNAS* 1989; 86:7437-7441
129. Gundersen D, Tran-Thang C, Sordat B, Murali F, Rugg C. Plasmin-induced proteolysis of tenascin-C: modulation by T lymphocyte- derived urokinase-type plasminogen activator and effect on T lymphocyte adhesion, activation, and cell clustering. *J Immunol*. 1997; 158: 1051-1060
130. Chilosi M, Lestani M, Benedetti A, Montagna L, Pedron S, Scarpa A, Menestrina F, Hirohashi S, Pizzolo G, Semenzato G. Constitutive expression of tenascin in T-dependent zones of human lymphoid tissues. *Am J Pathol*. 1993; 143, 1348-1355
131. Kosmehl H, Berndt A, katenkamp D. Molecular variants of fibronectin and laminin: structure, physiological occurrence and histopathological aspects. *Virchows Arch*. 1996; 429:311-322
132. Burger A, Wagner C, Veidt C, Reis B, Hug F, Hansch GM. Fibronectin synthesis by human tubular epithelial cells in culture: Effects of PDGF and TGF-beta on synthesis and splicing. *Kidney Int*. 1998; 54:407-415
133. Shimizu Y, Shaw S. Lymphocyte interactions with extracellular matrix. *FASEB J* 1991; 5: 2292-2299
134. Tang WW, Feng L, Xia Y, Wilson CB. Extracellulr matrix accumulation in immune-mediated tubulointerstitial injury. *Kidney Int*. 1994; 45:1077-84
135. Sanderson RD, Lalor P, Bernfield M. B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regul* (1989) 1: 27-35

136. Shinmizu Y, van Seventer GA, Horgan KJ, Shaw S. Costimulation of proliferative responses of resting CD4+ T-cells by interaction of VLA-4 and VLA-5 with fibronectin or VLA-6 with laminin. *J Immunol* (1990) 145: 59-62
137. Nojima Y, Humpries MJ, Mould AP, Komoriya A, Yamada KM, Schlossman SP, Morimoto C. VLA-4 mediates CD3-dependent CD4+ T-cell activation via the CS1 alternatively spliced domain of fibronectin. *J Exp Med.* 1990; 172:1185-1189
138. Weinberg JB, Phippen AM, Greenberg CS. Extravascular fibrin formation and dissolution in synovial tissue of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1991; 34:996-1005
139. Shorr AF, Hnatiuk OW. Circulating D dimer in patients with sarcoidosis. *Chest.* 2000; 117:1012-1016
140. Nakstad B, Lyberg T, Skjonsberg OH, Boye NP. Local activation of the coagulation and fibrinolysis systems in lung disease. *Thromb Res.* 1990; 57:827-38
141. Hopper KE, Geczy CL, Davies WA. A mechanism of migration inhibition in delayed-type hypersensitivity reactions. I. Fibrin deposition on the surface of elicited peritoneal macrophages on vivo. *J Immunol.* 1981; 126:1052-1058
142. Gray AJ, Bishop JE, Reeves JT, Mecham RP, Laurent GJ. Partially degraded fibrin(ogen) stimulates fibroblast proliferation in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995; 12:684-690
143. Richardson DL, Pepper DS, Kay AB. Chemotaxis for human monocytes by fibrinogen-derived peptides. *Br J Haematol.* 1976; 32:507-13
144. Sueishi K, Nanno S, Tanaka K. Permeability enhancing and chemotactic activities of lower molecular weight degradation products of human fibrinogen. *Thromb Haemost.* 1981; 45:90-94
145. Dvorak HF, Harvey VS, Estrella P, Brown LF, McDonagh J, Dvorak AM. Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest.* 1987; 57:673-86
146. Liu X, Piela-Smith TH. Fibrin(ogen)-induced expression of ICAM-1 and chemokines in human synovial fibroblasts. *J Immunol.* 2000; 165:5255-5261
147. Koretz K, Schlag P, Boumsell L, Moller P. Expression of VLA-a2, VLA-a6 and VLA-b1 chains in normal mucosa nad adenomas of the colon, and in colon carcinomas and their liver metastases. *Am J Pathol.* 1991; 138:741-750
148. Pignatelli M. Integrin cell adhesion molecules and colorectal cancer. *J Pathol.* 1990; 162:95-97
149. Hillis GS, Roy Chaudhury P, Duthie LA, Stewart KN, Brown PAJ, Simpson JG, MacKeod AM. Expression of b1 integrins in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 1997; 12:1137-1142
150. Kagami S, Kondo S. β 1-integrins and glomerular injury. *J Med Invest.* 2004; 51:1-13
151. Sonnenberg A, Linders CJT, Modderman PW, Damsky CH, Aumailley M, Timpl R. Integrin recognition of different cell-binding fragments of laminin (P1, E3, E8) and evidence that α 6 β 1 but not α 6 β 4 functions as a major receptor for fragment E8. *J Cell Biol.* 1990; 110:1265-1273
152. Bacallo R, Fine LG. Molecular events in the organization of renal tubular epithelium: from nephronogenesis to regeneration. *Am J Physiol.* 1989, 257:F913-F924
153. Rybarczyk BJ, Lawrence SO, Simpson-Haidaris PJ. Matrix-fibrinogen enhances wound closure by increasing both cell proliferation and migration. *Blood.* 2003; 102:4035-4043
154. Danen EH, Sonneveld P, Brakebusch C, Fassler R, Sonnenberg A. The fibronectin-binding integrins α 5 β 1 and α v β 3 differentially modulate RhoA-GTP

- loading, organization of cell matrix adhesions, and fibronectin fibrillogenesis. *J Cell Biol.* 2002; 159:1071-86
155. Belkin AM, Tsurupa G, Zemskov E, Veklich Y, Weisel JW, Medved L. Transglutaminase-mediated oligomerization of the fibrin(ogen) alphaC domains promotes integrin-dependent cell adhesion and signaling. *Blood.* 2005; 105:3561-8
 156. Baraldi A, Zambruno G, Furci L, Ballestri M, Tombesi A, Ottani D, Lucchi L, Lusvarghi E. Beta 1 and beta 3 integrin upregulation in rapidly progressive glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 1995; 10:1155-61
 157. Loike JD, Cao L, Budhu S, Hoffman S, Silverstein SC. Blockade of $\alpha_5\beta_1$ Integrins Reverses the Inhibitory Effect of Tenascin on Chemotaxis of Human Monocytes and Polymorphonuclear Leukocytes Through Three-Dimensional Gels of Extracellular Matrix Proteins. *J Immunol.* 2001; 166: 7534-7542
 158. Ben-Horin S, Bank I. The role of very late antigen-1 in immune-mediated inflammation. *Clin Immunol.* 2004; 113:119-29
 159. Wu C, Keightley SY, Leung-Hagesteijn C, Radeva G, Coppolino M, Goicoechea S., McDonald JA, Dedhar S. Integrin-linked Protein Kinase Regulates Fibronectin Matrix Assembly, E-cadherin Expression, and Tumorigenicity. *JBC* 1998; 273:528-536
 160. Li Y, Yang J, Dai C, Wu C, Liu Y. Role for integrin-linked kinase in mediating tubular epithelial to mesenchymal transition and renal interstitial fibrogenesis. *J Clin Invest.* 2003; 112:503-16
 161. Ortega-Velazquez R, Gonzalez-Rubio M, Ruiz-Torres MP, Diez-Marques ML, Iglesias MC, Rodriguez-Puyol M, Rodriguez-Puyol D. Collagen I upregulates extracellular matrix gene expression and secretion of TGF-beta 1 by cultured human mesangial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004; 286:C1335-1343
 162. Weber KT, Sun Y, Katwa LC, Cleutjens JP. Connective tissue: a metabolic entity? *J Mol Cell Cardiol* (1995) 27:107-20
Weinberg JB, Phippen AM, Greenberg CS. Extravascular fibrin formation and dissolution in synovial tissue of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1991; 34:996-1005
 164. Nakatsuji S, Yamate J, Sakuma S. Relationship between vimentin expressing renal tubules and interstitial fibrosis in chronic progressive nephropathy in aged rats. *Virchows Arch.* 1998; 433:359-367
 165. Lee SK, Goyal M, de Miguel M, Thomas P, Wharram B, Dysko R, Phan S, Killen PD, Wiggins RC. Renal biopsy collagen I mRNA predicts scarring in rabbit anti-GBM disease: comparison with conventional measures. *Kidney Int.* 1997; 52:1000-15
 166. Manabe N, Furuya Y, Nagano N, Yagi M, Kuramitsu K, Miyamoto H. Immunohistochemical quantitation for extracellular matrix proteins in rats with glomerulonephritis induced by monoclonal anti-Thy-1.1 antibody. *Nephron.* 1995; 71:79-86
 167. Ozu H. Clinicopathological study on the relationship between appearance of type I or III collagen in IgA nephropathy. *Nippon Jinzo Gakkai Shi* (1992) 34:647-56
Pignatelli M. Integrin cell adhesion molecules and colorectal cancer. *J Pathol.* 1990; 162:95-97
 168. Granaldino G, Monno R, Ranieri E, Gesualdo L, Schena FP, Martino C, Ursi M. Regenerative and proinflammatory effects of thrombin on human proximal tubular cells. *J Am Soc Nephrol.* 2000; 11:1016-1025
 169. Faulk WP, Gargiulo P, McIntyre JA, Bang NU. Hemostasis and fibrinolysis in renal transplantation. *Semin Thromb Hemostasis.* 1989; 15:88 -98
 170. Yamamoto K, Loskutoff DJ. The kidneys of mice with autoimmune disease acquire a hypofibrinolytic/procoagulant state that correlates with the development of glomerulonephritis and tissue microthrombosis. *Am J Pathol.* 1997; 151:725 -734

171. Enestrom S, Druid H, Rammer L: Fibrin deposition in the kidney in post-ischaemic renal damage. *Br J Exp Pathol*. 1988; 69 : 387-394
172. Wang Y, Pratt JR, Hartley B, Evans B, Zhang L, Sacks SH: Expression of tissue type plasminogen activator and type 1 plasminogen activator inhibitor and persistent fibrin deposition in chronic renal allograft failure. *Kidney Int*. 1997; 52:371 -377
173. Wang Y, Pratt JR, Tam FWK, Hartley RB, Wolff JA, Olavesen MG, Sacks SH: Upregulation of type 1 plasminogen activator inhibitor mRNA with thrombotic changes in renal grafts. *Transplantation*. 1996; 61:684-689
174. Wendt T, Zhang YM, Bierhaus A, Kriegsmann J, Deng Y, Waldherr R, Teske T, Luther T, Funfstuk R, Nawroth PP, Stein G: Tissue factor expression in an animal model of hydronephrosis. *Nephrol Dial Transplant*. 1995; 10:1820 -1828
175. Vesey DA, Cheung CW, Kruger WA, Poromink P, Gobe G, Johnson DW. Thrombin stimulates proinflammatory and proliferative responses in primary cultures of human proximal tubule cells. *Kidney Int*. 2005; 67:1315-1320
176. Eddy AA. Plasminogen activator inhibitor-1 and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002; 283:F209-F220
177. Hertig A, Rondeau E. Plasminogen activator inhibitor type 1: the two faces of the same coin. *Current Opinion in Nephrology & Hypertension*. 2004; 13:39-44
178. Matsuo S, Lopes-Giusa JM, CAI X, Okamira DM, Alpers C, Bumbgarner RE, Peters MA, Zhang G, Eddy A. Multifunctionality of PAI-1 in fibrogenesis: Evidence from obstructive nephropathy in PAI-1-overexpressing mice. *Kidney Int* (2005) 67:2221-2229
179. Muchaneta-Kubara EC, El Nahas M. Myofibroblast phenotypes expression in experimental renal scarring. *Nephrol Dial Transplant*. 1997; 2:904-915
180. Grandaliano G, Di Paolo S, Monno R, Stallone G, Ranieri E, Pontrelli P, Gesualdo L, Schena FP. Protease-activated receptor 1 and plasminogen activator inhibitor 1 expression in chronic allograft nephropathy: the role of coagulation and fibrinolysis in renal graft fibrosis. *Transplantation*. 2001; 72:1437-1443
181. Seikaly MG, Arant BS, Seney FD. Endogenous angiotensin concentrations in specific intrarenal fluid compartments of the rat. *J Clin Invest*. 1990; 86:1352-1357
182. Tank JE, Moe OW, Star RA, Henrich WL. Differential regulation of rat glomerular and proximal tubular renin mRNA following uninephrectomy. *Am J Physiol* 199; 270:F776-F783
183. Ruiz-Ortega M, Gomez-Garre D, Alcazar R. Involvement of angiotensin II and endothelin in matrix protein production and renal sclerosis. *J Hypertens* 1994; Suppl 12:S51-S58
184. Ruiz-Ortega M, Gomez-Garre D, Alcazar R. Involvement of angiotensin II and endothelin in matrix protein production and renal sclerosis. *J Hypertens* 1994; Suppl 12:S51-S58
185. Okada H, Inoue T, Kanno Y, Kobayashi T, Watanabe Y., Kopp JB, Carey RM, Suzuki H. Interstitial Fibroblast-Like Cells Express Renin-Angiotensin System Components in a Fibrosing Murine Kidney. *Am J Pathol*. 2002; 160:765-772
186. Klahr S, Morrissey JJ. Comparative study of ACE inhibitors and angiotensin II receptor antagonists in interstitial scarring. *Kidney Int Suppl*.. 1997; 63:S111-S114
187. Ong-Ajyooth S, Ong-Ajyooth L, Limmongkon A, Tiensingh A, Parichatikanon P, Nilwarangkur S. The renin-angiotensin system gene polymorphisms and clinicopathological correlations in IgA nephropathy. *J Med Assoc Thai* 1999; 82:681-689
188. Yip AG, Brayne C, Easton D, Rubinsztein DC, The Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study (MRC CFAS). An investigation of ACE as a

- risk factor for dementia and cognitive decline in the general population. *J Med Genetics* 2002; 39:403-406
189. Navis G, van der Kleij FGH, de Zeeuw D, de Jong PE. Angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism and renal disease. *J Mol Med* 1999; 77:781 – 791
 190. Bantis C, Ivens K, Kreusser W, Koch M, Klein-Vehne N, Grabensee B, Heering P. Influence of Genetic Polymorphisms of the Renin-Angiotensin System on IgA Nephropathy. *Am J Nephrol* 2004; 24:258-267
 191. Ong-Ajyooth S, Ong-Ajyooth L, Limmongkon A, Tiensingh A, Parichatikanon P, Nilwarangkur S. The renin-angiotensin system gene polymorphisms and clinicopathological correlations in IgA nephropathy. *J Med Assoc Thai* 1999; 82:681-689
 192. Wolf G. Molecular mechanisms of angiotensin II in the kidney: emerging role in the progression of renal disease: beyond haemodynamics. *Nephrol Dial Transplant*. 1998; 13:1131-42
 193. Potaczek DP, Undas A, Iwaniec T, Szczeklik A. The angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and effects of quinapril and atorvastatin on haemostatic parameters in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost*. 2005; 94:224-5

POPIS TABLICA I SLIKA

- Tablica 1. Klinički podaci o ispitanicima
- Tablica 2. Rasprostranjenosti proteina ekstracelularnog matriksa u sklopu glomerulonefritisa
- Tablica 3. Učestalost odlaganja fibrina/fibrinogena u intersticij bubrega kod glomerulonefritisa
- Tablica 4. Učestalost promjena u intersticiju bubrega kod bolesnika sa proteinurijom u času biopsije
- Tablica 5. Učestalost promjena u intersticiju bubrega kod bolesnika sa proteinurijom u času biopsije
- Tablica 6. Učestalost promjena u intersticiju bubrega kod bolesnika sa povišenim kreatininom u času biopsije
- Tablica 7. Prikaz prisutnosti proteina ekstracelularnog matriksa kod bolesnika sa proteinurijom
- Tablica 8. Prikaz prisutnosti proteina ekstracelularnog matriksa kod bolesnika sa proteinurijom nakon perioda praćenja
- Tablica 9. Učestalost odlaganja fibrina/fibrinogena kod bolesnika sa nefrotskom proteinurijom
- Tablica 10. Prikaz prisutnosti proteina ekstracelularnog matriksa kod bolesnika sa nefrotskom proteinurijom nakon perioda praćenja
- Tablica 11. Zastupljenost pojedinih ACE-genotipa kod ispitivanih bolesnika
- Tablica 12. Učestalost fibroze intersticija kod bolesnika sa pojedinim tipovima ACE-genotipa
- Tablica 13. Učestalost fibroze intersticija kod bolesnika sa pojedinim tipovima ACE-genotipa (grafički prikaz)
- Tablica 14. Učestalost odlaganja fibrina u intersticij kod bolesnika sa pojedinim tipovima ACE-genotipa (grafički prikaz)
- Tablica 15. Proteini ekstracelularnog matriksa i njihovi β 1-integrinski receptori
-
- Slika 1. Fibronektin u normalnom bubregu
- Slika 2. Kolagen IV u normalnom bubrežnom tkivu
- Slika 3. Kolagen I u bubrežnom intersticiju kod bolesnika sa primarnim glomerulonefritisom
- Slika 4. Kolagen III u bubrežnom intersticiju kod bolesnika sa primarnim glomerulonefritisom
- Slika 5. *De novo* odlaganje kolagena IV u području fibroze intersticija
- Slika 6. *De novo* odlaganje kolagena IV u području upale intersticija
- Slika 7. *De novo* odlaganje tenascina u intersticij
- Slika 8. Pojačano odlaganje fibronektina u intersticij kod fibroze intersticija
- Slika 9. Odlaganje fibrina/fibrinogena u žarištu upale
- Slika 10. Odlaganje fibrina/fibrinogena u manjem žarištu intersticijalne fibroze

ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu 1959. godine, gdje sam završila osnovnu školu i gimnaziju. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 1978. godine, a diplomirala sam u lipnju 1984. godine.

Liječnički staž sam odradila u Centru za medicinske znanosti, KBC Zagreb. Stručni ispit položila sam u siječnju 1986. godine.

U Centru za medicinske znanosti radila sam od 1986. do 1988.

Specijalizaciju iz Anatomske patologije započela sam 1988. godine za KBC Zagreb (Rebro), a nastavila kao specijalizant Sveučilišne bolnice u izgradnji. Tijekom specijalizacije boravila sam 2 mjeseca na Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Ljubljani kod prof. Dušana Ferluge na usavršavanju u području renalne patologije. Dio specijalizacije u trajanju od 13 mjeseci obavila sam na Institut fuer Pathologie, Universitaet Heidelberg, BRD, kao DAAD (Deutsche akademische Austauschdienst) stipendist. Uz redovan posao specijalizanta patologije dodatno sam se školovala u području renalne patologije kod prof. R. Waldherr-a. Tijekom boravka na stipendiji izradila sa Doktorarbeit «Integrine bei Glomerulonephritis» i stekla naziv «dr.med. der Universitaet zu Heidelberg». Specijalistički ispit položila sam u studenom 1992. godine.

Od 1992. do siječnja 2001. godine radila sam kao specijalist patolog u Zavodu za patologiju Rebro, KBC Zagreb.

Od 2001. stalno sam zaposlena kao patolog u PLIVA-Istraživačkom institutu.

Poslijediplomski studij na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, smjer «Kemija-Biokemija» završila sam 1993. godine obranivši magistarski rad pod nazivom «Dendritične stanice kod primarne bilijarne ciroze».

Od 2002. do 2004. godine odslušala sam i položila ispite 8 «modula» u sklopu dodatne edukacije iz područja toksikologije, koje organizira Deutsche Gesellsch. fur experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT).

Sudjelovala sam na više kongresa i seminara trajne edukacije iz područja patologije:

European School of Pathology (1991), International Conference on diseases of Biliary tract, Pancreas and Duodenum (1999)

XIV European Congress of Pathology (1993), Drugi Hrvatski kongres nefrologije, dijalize i transplantacije (1998), XXXth Memorial Meeting for Prof. Janez Plečnik (1999), 11th Ljudevit Jurak International Symposium on Comparative Pathology (2000), 12th Ljudevit Jurak International Symposium on Comparative Pathology (2001), 18th European Congress of Pathology (2001), Adriatic Society of Pathology Annual Meeting (2002), Advances in Nephropathology (2003), 19th European Congress of Pathology (2003), XVII International Meeting (2004), Memorijalni sastanak profesora Saltykova (2004).

Objavila sam 14 radova, od kojih je većina citirana u CC.

- 1) Oberman B, Šćukanec-Špoljar M, Dvornik G, Čužić S: Primarni neuroendokrini karcinom kože (tumor Merkelovih stanica). Lij Vjes (1990) 112: 390-392
- 2) Jakić-Razumović J, Čačić-Pilipović M, Čužić S: Histološki kriteriji za dijagnozu superficijalno širećih melanoma u bolesnika kod kojih su dokazane metastaze. Acta Med Croat (1991) 45:325-333
- 3) Čužić S, Ritz E, Waldherr R: Dendritic cells in glomerulonephritis. Virchow Arch B (1992) 62: 357-363
- 4) Waldherr R, Čužić S, Noronha I: Pathology of the human mesangium in situ. Clin Invest (1992) 70: 865-874

- 5) Šćukanec-Špoljar M, Batinić D, Vrhovec B, Čužić S: The importance of the ultrastructural analysis of renal tissue in the diagnosis of children with isolated microhematuria. *Period Biol* (1993) 95: 279-280
- 6) Čačić M, Čužić S, Jakić-Razumović J: Analysis of renal allograft frozen-sections. *Acta Med Croat* (1995) 49: 151-153
- 7) Kuzmanić D, Jelaković B, Rakušić N, Rončević T, Šćukanec-Špoljar M, Čužić S: Goodpasture's syndrome with normal renal function. *Clin Nephrol* (1999) 51: 319-320
- 8) J. Jakić-Razumović, D Tentor, V. Kušec, S Čužić, T Brkić: Histopathological features of gastritis before and after treatment for *Helicobacter pylori*. *Croat Med J* (2000) 41:159-162
- 9) Laganović M, Jelaković B, Kuzmanić D, Šćukanec-Špoljar M, Rončević T, Čužić S, Ostojić R: Complete remission of cryoglobulinemia glomerulonephritis (HCV-postiva) after high dose interferon therapy. *Wien Klin Wochenschrift* (2000) 112: 604-605
- 10) Banfić Lj, Jelić I, Jelašić J, Čužić S: Heart metastasis of extraskeletal myxoid chondrosarcoma. *Croat Med J* (2001) 42:199-202
- 11) Čužić S, Šćukanec-Špoljar M, Bosnić D, Kuzmanić D, Sentić M. Immunohistochemical analysis of human serum sickness glomerulonephritis. *Croat Med J* (2001) 42:618-623
- 12) Domijan AM, Peraica M, Ferenčić Ž, Čužić S, Fuchs R, Lucić A, radić B. Ochratoxin A-induced apoptosis in rat kidney tissue. *Arh Hig Rada Toksikol* (2004) 55:243-8
- 13) Mira Šćukanec-Špoljar, Snježana Čužić: Bubrezi i mokraćni sustav in: *Specijalna patologija* Ed. Ivan Damjanov and Stanko Jukić, Medicinska naklada, Zagreb (2004)
- 14) MJ Parnham, O Čulić, V Eraković, V Munić, S Popović-Grle, K Barišić, M Bosnar, K Brajša, I Čapelak, S Čužić, I Glojnarčić, Z Manojlović, R Novak-Mirčetić, K Orešković, V Pavičić-Beljak, S Radošević, M Sučić. Modulation of neutrophil and inflammation markers in chronic obstructive pulmonary disease by short-term azithromycin treatment. *Eur J Pharmacol* (2005) 517:132-43.

Redoviti sam član Zbora liječnika Hrvatske, Društva patologa Hrvatske, European Society of Pathologists, Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT).

Govorim tečno engleski i njemački jezik.