

Białka w moczu powiązane z rozwojem przewlekłej niewydolności nerek

Barbara LISOWSKA-MYJAK

Katedra i Zakład Biochemii i Chemii Klinicznej,
Warszawski Uniwersytet Medyczny
Kierownik: prof. dr hab. Dariusz Sitkiewicz

Słowa kluczowe:

- przewlekła niewydolność nerek
- proteinuria
- stan zapalny w nerce
- włóknienie nerek

Key words:

- chronic kidney disease
- proteinuria
- renal inflammation
- renal fibrosis

Mimo dewastacyjnego przebiegu i wysokiej częstości występowania przewlekłej niewydolności nerek (Chronic Kidney Disease - CKD), współczesna diagnostyka laboratoryjna nie dysponuje odpowiednio czułymi i specyficznymi parametrami laboratoryjnymi do wykrywania wczesnych oraz identyfikacji kolejnych etapów tej choroby. Lawinowo rozwijające się w ostatnich latach badania naukowe z zakresu biologii molekularnej, genetyki i proteomiki, ułatwiły wyjaśnienie procesów patologicznych związanych z rozwojem uszkodzenia nerek w przebiegu CKD, zaprezentowały wiele parametrów przyczynowo połączonych z patomechanizmem progresywnych zmian w nerkach oraz wyłoniły nowe markery do oceny nieuchwytnego dotychczas okresu od początku choroby do ujawnienia się jej efektów klinicznych. W pracy przedstawiono nowych kandydatów na wczesne i czułe dla rozpoznawania kolejnych etapów rozwoju CKD markery biochemiczne oznaczane w moczu oraz powiązano ich obecność w tym materiale klinicznym z procesami zapalenia (cytokiny, białka układu komplementu, KIM-1, NGAL, AngII) i włóknienia nerek (enzymy proteolityczne i ich inhibitory: metaloproteinazy, plazmina, tkankowe inhibitory metaloproteinaz, PAI-1, tkankowa transglutaminaza, Ang II, chemokiny i ich receptory: TGF- β , HGF, endotelina-1). (NEFROL. DIAL. POL. 2010, 14, 145-150)

Urinary proteins related to the development of chronic kidney disease

At present, the medical laboratories seem to lack sufficiently sensitive and specific markers which would allow detection of CKD (Chronic Kidney Disease - CKD) in its early and following stages. The recent rapid advances of research into the physiology and biochemistry of the kidney, using new molecular biology, genomic and proteomic approaches, our understanding of the pathological processes related to the development of kidney injury has improved. A number of new laboratory markers causally related to the pathogenesis of progressive renal changes have been identified while some candidate markers require evaluation for their actual suitability to detect CKD in the period from its onset to the appearance of first clinical symptoms. The aim of this article is to review the new candidates for sensitive and specific urinary markers whose penetration into the kidney or local synthesis may reflect the extent and severity of renal injury in the course of CKD, causally related to inflammation (cytokines, complement, KIM-1, NGAL, Ang II) and kidney fibrosis (proteolytic enzymes and their inhibitors: plasmin, matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, PAI-1, tissue transglutaminase, Ang II, chemokines and their receptors: TGF- β , HGF, endotelina-1). (NEPHROL. DIAL. POL. 2010, 14, 145-150)

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2007-2008 jako projekt badawczy N N405 2519 33

Istotą problemów klinicznych i finansowych związanych z opieką nad chorymi z przewlekłą niewydolnością nerek (*Chronic Kidney Disease* – CKD) jest postępująca i nieodwracalna utrata funkcji tego narządu. Wzrastającą częstość występowania CKD na całym świecie, zarówno u dorosłych jak i u dzieci, określa się w granicach epidemii. W ciągu następnych 10 lat spodziewane jest podwojenie ilości przypadków ze schyłkową niewydolnością nerek (*End-Stage Renal Disease* – ESRD) oraz więcej niż 50-krotny wzrost częstości wcześniejszych etapów rozwoju tej choroby [14,15,23,38,39,55].

W dotychczasowej praktyce klinicznej tylko niewielka ilość markerów laboratoryjnych znalazła zastosowanie dla monitorowania przebiegu CKD, a ich wartość diagnostyczna jest zbyt niska dla ujawnienia wczesnych etapów uszkodzenia nerek. Liczne współczesne badania eksperymentalne skupiają się na poszukiwaniu nowych markerów CKD nie tylko w surowicy, ale także w moczu – materiale biologicznym bezpośrednio powiązanym z lokalnymi zmianami w nerce, chociaż w praktyce klinicznej stosowanym rzadziej niż surowica. Badanie moczu jest tradycyjnym nieinwazyjnym sposobem diagnozowania, charakteryzowania

Adres do korespondencji:

Dr Barbara Lisowska-Myjak
Katedra i Zakład Biochemii i Chemii Klinicznej,
Warszawski Uniwersytet Medyczny,
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa
Tel.: +48 22 57 20 735, Fax: +48 22 57 20 735
e-mail: basia.myjak@interia.pl

przebiegu i prognozowania wielu chorób nerek. Zadania stawiane parametrom oznaczanym w tym materiale klinicznym dotyczą identyfikacji wczesnych etapów uszkodzenia nerek, wyprzedzającej istotną utratę funkcji nerek (tj. przed spadkiem GFR <60 ml/min/1,73m²), informacji o rozpoczęciu i kolejnych etapach pogarszania funkcji nerek oraz o prognozowaniu rozwoju choroby nerek.

Celem pracy jest prezentacja nowych kandydatów na markery laboratoryjne oznaczane w moczu, specyficznie powiązane ze zmianami patologicznymi w kłębuszku oraz procesami zapalenia i włóknienia miąższu nerek, świadczące o lokalizacji, rozległości i intensywności uszkodzenia narządu w kolejnych etapach rozwoju CKD.

Patomechanizm powstawania i rozwoju CKD

Zespół autorytetów klinicznych w zakresie nefrologii (*The National Kidney Foundation Kidney Disease Outcome Quality Initiative – NFK-K/DOQI*) opracował definicję oraz wytyczył linię postępowania diagnostycznego dla oceny kolejnych stopni progresji CKD, w oparciu o następujące dwa kryteria [39,45,49,61]:

1. uszkodzenie nerek trwające >3 miesięcy, udokumentowane zmianami strukturalnymi i/lub funkcjonalnymi, z lub bez spadku filtracji kłębuszkowej (GFR – *glomerular filtration rate*), manifestującego się albo obecnością zmian morfologicznych albo odchyleniem od normy wartości parametrów laboratoryjnych ocenianych we krwi lub w moczu,

2. spadek GFR <60 ml/min/1,73m², utrzymujący się > 3 miesięcy z lub bez odchylenia od normy parametrów świadczących o uszkodzeniu nerek.

Podstawą do wydzielenia 5 kolejnych etapów CKD jest ocena GFR [39,49,61]:

Etap I.

Uszkodzenie nerek z prawidłowym i podwyższonym GFR > 90 ml/min/1,73 m².

Etap II.

Uszkodzenie nerek z łagodnym spadkiem GFR (60-89 ml/min/1,73 m²).

Etap III.

Uszkodzenie nerek z umiarkowanym spadkiem GFR (30-59 ml/min/1,73 m²).

Etap IV.

Uszkodzenie nerek z ostrym spadkiem GFR (15-29 ml/min/1,73 m²).

Etap V.

Przewlekła niewydolność nerek, wymagająca leczenia nerkowo-zastępczego (GFR <15 ml/min/1,73 m²).

Biorąc pod uwagę, że spadek GFR <60 ml/min/1,73 m² odpowiada utracie ponad 50% czynnego miąższu nerek, prawidłowa a nawet zwiększona wartość GFR u pacjentów z I i II etapem rozwoju CKD uzasadnia powszechne zainteresowanie klinicystów poszukiwaniem czulszych od rutynowo sto-

sowanych wskaźników.

Przebieg CKD charakteryzuje stopniowa skleryzacja kłębuszków oraz włóknienie cewkowo-śródmiąższowe i szklwienie naczyń wewnątrznerkowych. Mimo, że utrata funkcji nerek jest istotnie związana z ostrością zapalenia i włóknienia śródmiąższu, pierwotne źródło znajduje w chorobach kłębuszków, w różny sposób zmieniających środowisko komórek kanalika, włączając rozwój proteinurii. Zaburzona funkcja nerek w przebiegu CKD lepiej koreluje z zakresem uszkodzenia kanalikowo-miąższowego niż z histologicznymi parametrami uszkodzenia kłębuszka [6,9,23,33,38,46-48,61,64].

Głównymi mediatorami, odpowiedzialnymi za początkowe uszkodzenie nerek i przebieg CKD są:

• **Zmiany hemodynamiczne w kłębuszku**

Według popularnej teorii *Brenner*, nieodwracalna utrata i zmniejszenie ilości czynnych nefronów w nerce, są bezpośrednim powodem dalszych, długotrwałych i uszka dzających konsekwencji. Jest to wynik zmian adaptacyjnych w pozostałych nefronach, wywołujących serię niekorzystnych następstw, powiązanych ze wzrostem ciśnienia hydraulicznego w kapilarach wewnątrz kłębuszkowych, wzrostem filtracji w przeliczeniu na nefron (wzbudzającej uszka dzającą hiperfiltrację), zwiększeniem średnicy porów w kapilarach, zaburzeniem funkcji selektywności wielkości w barierze kłębuszkowej oraz wzrostem ultrafiltracji białek osocza do światła kanalika proksymalnego [15,24,28,39]. Głównym peptydem wewnątrznerkowym, kluczowym dla wzrostu ciśnienia w kapilarach wewnątrz kłębuszkowych, przynajmniej częściowo odpowiedzialnym za poszerzenie średnicy porów perforujących barierę kapilarną kłębuszków, zaburzenie funkcji selektywności rozmiaru tej bariery i ultrafiltrację białek, jest Angiotensyna II (AngII). Efekt ten jest pośredniczony przez receptory AT-1 i AT-2. Ang II zwykle produkowana w łożysku naczyniowym, może także być efektem lokalnej, wewnątrznerkowej produkcji z dostarczanego do nerki lub produkowanego w komórkach kanalika proksymalnego angiotensynogenu. Przypuszcza się, że ilościowy udział lokalnie tworzonej Ang II w tkankach i płynie pozakomórkowym nerki może być dużo większy niż wynikałoby to proporcjonalnie ze stężenia tego parametru we krwi obwodowej. Wewnątrz nerki udowodniono obecność wszystkich składników potrzebnych do wytwarzania AngII, tj. reniny wydzielanej przez komórki aparatu przykłębuszkowego oraz konwertazy angiotensyny, obficie występującej w kanalikach proksymalnych, dystalnych i przewodach zbiorczych w nefronie [35,48,50,60].

• **Niedotlenienie przestrzeni kanalikowo-miąższowej**

W eksperymentalnym modelu niedoczynności nerek wykazano 30-krotny wzrost zużycia tlenu w komórkach kanalików proksymalnych. Przyczynami niedotlenienia przestrzeni kanalikowo-miąższowej w przebiegu CKD może być [39,44,55,61]:

– nadciśnienie w kapilarach kłębusz-

ka, wywołane uszkodzeniem strukturalnym tętniczek (w cukrzycy, nadciśnieniu tętniczym) lub uszkodzeniem bariery przepuszczalności w kłębuszku,

– zwężenie naczyń wewnątrznerkowych, w wyniku lokalnego wzrostu stężenia angiotensyny II, endoteliny-1, lokalnej utraty NO,

– włóknienie przestrzeni śródmiąższowej w zaawansowanym stanie uszkodzenia nerek, zaburzające dyfuzję tlenu i jego dostarczenie do kanalików i komórek śródmiąższu, zaostrzające włóknienie nerek przez tworzenie „błędne koła” przewlekłej hipoksji.

Czynniki zagrożenia i rozwoju CKD związane ze stale postępującym pogarszaniem się funkcji nerek obejmują [3,15,37,55,61]:

Cukrzyca – najbardziej powszechną przyczynę ESRD

Nadciśnienie tętnicze – druga, co do częstości przyczyna ESRD. Obwodowe nadciśnienie może przyspieszać spadek funkcji nerek, wzmagając ciśnienie w kapilarach kłębuszka (hiperfiltrację) i konsekwentnie ultrafiltrację białek osocza, szczególnie przy współistniejącej dysfunkcji nąbłonka. Wzrost ciśnienia krwi jest ważnym czynnikiem modyfikującym wpływ innych czynników ryzyka CKD, niezależnie od pierwotnej przyczyny uszkodzenia nerek.

Choroby sercowo-naczyniowe – silnie powiązane z rozwojem CKD. Częstość występowania CKD w chorobach sercowo-naczyniowych waha się od 10% do ponad 60%. Choroby naczyniowo-sercowe są nie tylko czynnikami ryzyka powstawania i progresji CKD, ale także odwrotnie, CKD stanowią jedną z głównych przyczyn śmiertelności i zachorowalności w przebiegu chorób sercowo-naczyniowych. Zgodnie z przyjętymi kryteriami NFK-K/DOQI, w 3 etapie rozwoju CKD istotnie (o 43-100%) wzrasta zagrożenie chorobami sercowo-naczyniowymi w porównaniu z pacjentami z lepszą funkcją nerek.

Ostatnie dowody epidemiologiczne sugerują statystyczne i niezależne powiązanie między poziomem kwasu moczowego w surowicy i progresją choroby nerek. Badania eksperymentalne wskazują na poprzednio nieznane mechanizmy wewnątrznerkowej aktywacji układu renina-angiotensyna oraz układu cyklooksigenazy-2 wywołane hiperurikemią w rozwoju CKD [34].

Wśród innych czynników ryzyka CKD wymienia się: wzrost ilości białka w diecie, hiperlipidemię, palenie tytoniu, otyłość, anemię [23,55,61].

Do czynników zagrożenia zwiększających podatność na zagrożenie CKD należą: predyspozycje genetyczne lub rodzinne, czynniki rasowe (większa częstość CKD wśród Afrykanów), niski ciężar urodzeniowy i niedożywienie noworodków, płeć męska, starszy wiek [45,49,61].

Proteinuria jako marker laboratoryjny i czynnik ryzyka rozwoju CKD

W ostatnich latach zmieniła się opinia nefrologów, dotycząca roli diagnostycznej proteinurii. Obecnie proteinuria jest pojmo-

wana nie tylko jako uznany i praktycznie stosowany marker ostrości uszkodzenia kłębuszka, ale także jako niezależny czynnik ryzyka, aktywnie powiązany z patogenezą progresywnego włóknienia kanalikowo-międźszowego oraz jako silny wskaźnik predykcyjny przebiegu nefropatii i powstawania ESRD.

Przewlekłym chorobom nerek ze wzmożoną przepuszczalnością kłębuszków dla białek osocza towarzyszy rozwój procesów zapalenia i włóknienia kanalikowo-śródmięszowego. Komórki kanalik nerkowego eksponowane na wzrost ilości filtrowanych białek osocza ulegają toksycznemu uszkodzeniu. Chorzy z wysokim stopniem proteinurii w wyniku przewlekłej choroby kłębuszków są bardziej narażeni na rozwój przewlekłego uszkodzenia miąższu nerek niż porównywalna grupa z niskim wydalaniem białka lub bez proteinurii. Proteinuria jest objawem utrwalonego uszkodzenia nerek, istotnie powiązany z spadkiem GFR. Wiele badań klinicznych i eksperymentalnych wykazało istotną korelację między stopniem proteinurii, progresją uszkodzenia nerek i wzrostem patologii morfologicznej w nerce [2,5,16,21,29,46,47,48,58].

Wpływ stężenia i kompozycji indywidualnych białek filtrowanych do moczu pierwotnego na progresję uszkodzenia nerek w przebiegu CKD

Wzrost wydalania białka całkowitego w moczu jest konsekwencją dwóch mechanizmów: nieprawidłowego przekłębkowego pasażu białek i ich zaburzonej reabsorpcji przez komórki nabłonka kanalik proksymalnego. Obydwa te procesy wpływają na jakościowy i ilościowy skład białek w moczu [5,16,49,58].

Każdego dnia w nerce powstaje około 180 litrów moczu pierwotnego. Przeprowadzona w ostatnich latach identyfikacja białek strukturalnych, tworzących wysoko-zorganizowaną, złożoną z 4 kolejnych warstw (glikokaliks, nabłonka, błony podstawnej, błony szczelinowatej) barierę między krwią a moczem, ułatwia zrozumienie mechanizmów molekularnych i zmian ultrastrukturalnych w nerce w rozwoju proteinurii. Za najistotniejszą część błony filtracyjnej, o nadrzędnej decydującej roli w utrzymaniu białek osocza w krążeniu i przebiegu ich filtracji do moczu pierwotnego, uważana jest błona szczelinowata, utworzona przez podocyty kłębuszka, rozpięta między wyrostkami stopowatymi tych komórek. Białka osocza przenikające przez kłębuszek są wychwytywane przez komórki kanalik proksymalnego na drodze endocytozy, z udziałem wysokocząsteczkowych multiligandowych receptorów – megaliny i kubiliny, z prawie całkowitym wykluczeniem obecności w moczu ostatecznym albuminy i większości innych białek osocza [2,5,24].

Nieprawidłowo filtrowane do moczu pierwotnego białka wywierają wewnętrzną toksyczność, poprzez ich zwiększoną reabsorpcję przez komórki kanalik proksymalnego i aktywację procesów zapalenia i włóknienia śródmięszowego. Liczne badania eksperymentalne na modelach zwierzęcych oraz badania kliniczne [2,16,21,58] udowodniły ścisły przyczynowy związek między:

- nieprawidłową przepuszczalnością

bariery kapilarnej kłębuszków dla filtrowanych białek,

- ich akumulacją w cytoplazmie komórek kanalik proksymalnego,
- reakcjami zapalnymi w śródmiąższu i włóknieniem kanalikowo-międźszowym.

Mimo, że wiele dowodów potwierdza uszkodzający wpływ białek osocza lub związków powiązanych z tymi białkami na komórki kanalik proksymalnego, dotychczas nie wiadomo, czy dla progresji zmian w przebiegu CKD mają znaczenie wybiórce, charakterystyczne właściwości indywidualnych białek wykrywanych w moczu. W składzie filtrowanych do moczu pierwotnego białek może występować albumina (m. cząst. 65kD) oraz inne białka osocza, o większej od albuminy masie cząsteczkowej, jak immunoglobuliny (IgG - m. cząst. 150 kD, IgM m. cząst. 900 kD, alfa-2-makroglobulina m. cząst. 720 kD). Pojawienie się w moczu białek większych od albuminy dowodzi progresji w funkcjonalnej i potencjalnie odwracanej nieprawidłowości do utrwalonych zmian strukturalnych w nerkach. Lokalne, toksyczne dla miąższu nerek efekty białek filtrowanych do moczu, mogą wynikać także z ich specyficznych funkcji biologicznych, jak n.p. czynników wzrostu, składników układu komplementu, białek przenoszących żelazo [2,4,6,29,31,46,47].

Z dotychczasowych doniesień literaturowych wynika, że przede wszystkim proteinuria nieselektywna jest wczesnym toksycznym czynnikiem dla nerek. Wykazano także szczególnie uszkodzający efekt mieszaniny białek zawartych we frakcji o masach cząsteczkowych 40-100 kDa. Mimo, że głównymi składnikami tej frakcji są albumina (m. cząst. 65 kD) i transferyna (m. cząst. 77kD), wyizolowane i oczyszczone białka nie wywołały spodziewanych następstw. Być może zjawisko to jest wynikiem kombinacji różnych białek lub transportowanych przez nie substancji, jak kwasy tłuszczowe, hormony, leki i inne komponenty [2,16,21,49,58].

Parametry biochemiczne oznaczane w moczu związane z rozwojem stanu zapalnego w nerce w przebiegu CKD

Uszkodzenie komórek kanalik proksymalnego i zapalenie śródmiąższu uważa się za wcześniejszy objaw, poprzedzający rozwój odkładania macierzy pozakomórkowej i włóknienia śródmiąższu. Główną rolę w rozwoju zapalenia miąższu nerek pełnią mediatory zapalenia – cytokiny, chemokiny, składniki układu komplementu. Wykazano kilka możliwych źródeł wzrostu ich stężenia w nerce w przebiegu CKD [6,9,12,18,19,42,43,49,59,63]:

- wzrost syntezy lub filtracji przez uszkodzony kłębuszek,
- wzrost ekspresji genów nerkowych kodujących cytokiny (MCP-1 – *Monocyte Chemoattractant Protein-1*, RANTES – *Regulated upon Normal T-cell Expressed and Secreted, fraktalkina*) oraz wzmoczoną syntezę w tkance nerkowej odpowiadających im peptydów, wykazujących właściwości chemotaktyczne i aktywujące dla monocytów i/lub makrofagów,
- dostarczanie cytokin do nerki przez napływające makrofagi.

Eksperymenty *in vitro*, na modelach

zwierzęcych oraz badania kliniczne pacjentów z nefropatiami zgodnie potwierdziły hipotezę, że progresywne uszkodzenie nerek indukowane proteinurią jest konsekwencją przeładowania białkiem systemu lizosomalnego w komórkach kanalik proksymalnego. Niejasne są jednak mechanizmy molekularne, wywołujące wzrost ekspresji genowej chemokin w komórkach nabłonka kanalik proksymalnego w wyniku tego zjawiska. Centralnym punktem, powiązanym ze wzrostem syntezy cytokin wywołujących zapalenie w nerce jest aktywacja jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (nuclear factor κ B). NF- κ B występuje w cytoplazmie większości komórek w nieaktywnej formie, przyłączony do białka inhibitorowego I κ B, chroniącego go przed wnikiem do jądra komórki. Pod wpływem różnych bodźców (w tym także przeładowania komórki wchłoniętymi białkami osocza), kompleks z I κ B ulega proteolizie, uwalniając NF- κ B i umożliwiając jego wnikięcie do jądra, przyłączenie się do specyficznej sekwencji genów i aktywację genów kodujących różne chemokiny i inne białka. Doświadczalna ekspozycja komórek nabłonka kanalik na zwiększoną ilość białka indukuje kinazę białkową C oraz tworzenie wolnych rodników tlenowych, odpowiedzialnych za aktywację NF- κ B i konsekwentnie indukcję sygnałów zapalnych zależnych od NF- κ B. Uogólniona aktywacja genów różnych cytokin zależy od czasu trwania i stężenia białka w dawce obciążającej i wskazuje prawdopodobnie na wspólny mechanizm ich ekspresji w komórkach kanalik. Efektem działania tych genów są natomiast różne produkty białkowe, które w różny sposób mogą decydować o rekrutacji komórek zapalnych do miąższu nerek [2,9,12,18,36,42,58,63].

Jednym z głównych mediatorów progresywnego uszkodzenia kanalików i miąższu jest wewnątrznerkowa aktywacja białek układu komplementu. Wykazano 2 podstawowe źródła pochodzenia białek układu komplementu w nerce [1,7,31,43]:

1. Filtracja białek układu komplementu do moczu – białka układu komplementu, charakteryzujące się dużą wielkością cząsteczki (podstawowy składnik C3 – m. cząst. około 200 kD) nie mogą być swobodnie filtrowane do przestrzeni *Bowmana* i światła kanalik i nie są obecne w moczu osób zdrowych oraz pacjentów z niewielkimi uszkodzeniami nerek. Wzrost ultrafiltracji tych białek razem z innymi białkami osocza z jednej strony przyczynia się do uszkodzenia kanalikowo-międźszowego, niezależne od biologicznej funkcji, z drugiej strony składniki komplementu filtrowane w poprzek bariery kłębuszkowej tworzą depozyty wzdłuż luminalnej strony oraz wewnątrz komórek kanalik proksymalnego. Świadczą o tym histologiczne wybarwienia tych białek, zarówno u ludzi jak i na zwierzęcych modelach eksperymentalnych z przewlekłymi chorobami nerek z proteinurią.

2. Wewnątrznerkowa lokalna synteza białek układu komplementu – badania eksperymentalne wykazały zdolność ludzkich hodowlanych komórek nabłonka kanalik proksymalnego do wzrostu regulacji C3mRNA oraz do wzmoczonej syntezy białek komplementu w odpowiedzi na ekspozycję na pełną surowicę oraz na transferynę.

Zarówno nadmiar ultrafiltrowanych jak lokalnie syntetyzowanych w komórkach kanalika proksymalnego białek układu komplementu może mieć znaczenie w powstawaniu i rozwoju stanu zapalnego oraz w procesie uszkodzenia kanalikowo-mięszoowego w przebiegu CKD. Doświadczalne modele nefropatii wykazały, że cytotoksyczne, prozapalne i profibrogenne efekty białek układu komplementu w przewlekłych uszkodzeniach kanalików i mięszu nerek są poprzedzone ich wewnątrznerkową aktywacją. W miejscu uszkodzenia składnik C3 ulega rozkładowi i następującym po sobie zmianom konformacyjnym, prowadzącym do tworzenia kompleksu C5b789 (C5b-9 lub membrane attach complex -MAC), głównego mediatora przewlekłego uszkodzenia mięszu i progresywnego uszkodzenia funkcji nerek. Kompleks ten o zdolności do uszkodzenia błony komórkowej wpływa na tworzenie wolnych rodników tlenowych, a dzięki właściwościom chemotaktycznym ściąga komórki zapalne do śródmięszu. Dowody *in vitro* wykazują predyspozycje komórek kanalika proksymalnego do aktywacji komplementu oraz do tworzenia kompleksu C5b-9 na szczytowej powierzchni komórek kanalika.

Przyspieszona aktywacja C3 w kanalikach proksymalnych w chorobach z proteiniurią oraz w niedoczynności nerek może być wynikiem zwiększonego wewnątrzkanalikowego katabolizmu białek, z towarzyszącym wzrostem syntezy amoniaku – aktywatora alternatywnej ścieżki komplementu [31,43].

KIM-1 (*Kidney Injury Molecule-1*) jest typem 1 glikoproteiny transbłonowej, zawierającej charakterystyczną ektodomenę, białkiem niewykrywalnym w zdrowej nerce, ulegającym istotnej indukcji, głównie w obszarach zapalenia przestrzeni kanalikowo-mięszoowej. Przypuszcza się, że bezpośrednią przyczyną indukcji KIM-1 jest wzrost stężenia białka całkowitego w ultrafiltracie kłębuszkowym oraz obecność waleczków białkowych, sprzyjające niedrożności kanalików, stresowi mechanicznemu oraz wzrostowi ciśnienia w kłębuszku. Niejasna jest rola biologiczna tego białka. Z jednej strony wzrost stężenia KIM-1 w nerce może być konsekwencją uszkodzenia kanalikowo-mięszoowego, z drugiej natomiast białko to dzięki interakcji z innymi białkami, może aktywnie wpływać na przebieg uszkodzenia, tworząc warstwę zabezpieczającą na powierzchni komórek kanalika proksymalnego, ochraniając go przed tworzeniem waleczków. Nasuwa się wymagające wyjaśnienia przypuszczenie, że wzrost indukcji KIM-1 w nerce po niedotlenieniu, toksycznym uszkodzeniu oraz w ostrej proteinurii jest etapem pośrednim, wyprzedzającym dalszą serię niekorzystnych następstw, wywołanych ekspozycją na toksyczny dla kanalików bogatobiałkowy filtrat kłębuszkowy [56].

NGAL (*neutrophil-gelatinase associated lipocalin*) – pierwotnie zidentyfikowany jako 25 kD białko kowalentnie przyłączone do żelatyny ludzkich neutrofilów, ulega ekspresji na bardzo niskim poziomie w wielu ludzkich tkankach, włączając nerkę, tchawicę, płuca, żołądek, jelito. Jest natomiast jednym z maksymalnie indukowanych genów w nerce po jej niedotlenieniu. Znacze-

nie biologiczne NGAL w nerce nie jest jasne. Dożylnie podany myszom ulega szybko wychytowi w komórkach kanalika proksymalnego, obniża liczbę komórek apoptycznych w kanaliku oraz wzmacnia proliferację komórek w kanalikach proksymalnych po ich uszkodzeniu niedotlenieniem. Wykrycie NGAL w proliferujących komórkach nabłonka sugeruje, że białko to może ulegać wzmożonej ekspresji w uszkodzonych kanalikach. Istnieje też hipoteza, że NGAL jest białkiem transportującym lub rezerwuarem dla żelaza uwolnionego z komórek kanalika [8,40,41].

Uznany mediator odpowiedzi zapalnej w nerce jest AngII, której wewnątrznerkowa produkcja wpływa na [50,51,60]:

- aktywację NF- κ B.
- ekspresję genów i produkcję wielu mediatorów prozapalnych uzależnionych od NF- κ B – włączając cytokiny (IL-6, TNF alfa) i chemokiny (MCP-1, RANTES) – w przebiegu uszkodzenia nerek udowodniono wzajemny związek między stężeniem Ang II i TNF-alfa oraz wpływ Ang II na lokalną ekspresję MCP-1.

- ściągnięcie monocytów/makrofagów do lokalnych miejsc uszkodzenia strukturalnego w nerce – wykazano rekrutację tych komórek do kłębuszka, zależną od ekspresji MCP-1 stymulowanej przez AngII.

Parametry biochemiczne oznaczane w moczu związane z włóknieniem nerek w przebiegu CKD

Mimo, że włóknienie jest częścią prawidłowej odpowiedzi na uszkodzenie wielu tkanek, obfita produkcja i akumulacja macierzy pozakomórkowej w nerce w przebiegu CKD oznacza przekształcenie jej prawidłowej architektury, utratę komórek lokalnych oraz zastąpienie ich nieprawidłowym składem macierzy pozakomórkowej (*extracellular matrix* – ECM), ze wzmożonym nagromadzeniem typowych dla organizmu składników, jak fibronektyna, laminina, proteoglikany, tenascina i typ IV kolagenu. Proces ten jest konsekwencją sygnałów przekazywanych z komórek nabłonka lub śródłonka kanalika nerkowego, oraz koncentracji w mięszu nerek komórek zapalnych lub biologicznie aktywnych czynników uwalnianych przez filtr kłębuszkowy [9,23,24,37,38].

Zidentyfikowano 3 rodzaje komórek odpowiedzialnych za proces włóknienia w nerce [45,49,52]:

1. lokalne fibroblasty – w odpowiedzi na uszkodzenie różnicują się z lokalnych komórek prekursorowych do myofibroblastów. Są pierwotnym źródłem i stanowią pulę około 50% wszystkich komórek syntetyzujących kolagen w przebiegu włóknienia nerek. Wykazują zdolność syntezy i wydzielania kolagenu i fibronektyny.

2. fibroblasty EMT - pochodzą z transformacji komórek śródłonka i nabłonka kanalika nerkowego na fenotyp mięszoowy (EMT – *epithelial-mesenchymal transition*). Wysoka plastyczność tych komórek wywołuje przyspieszenie procesu włóknienia i odpowiada za obecność 35% komórek wytwarzających kolagen w nerce. Na proces powstawania komórek EMT wpływa wzrost ilości reabsorbowanych białek w komórkach kanalika proksymalnego.

3. fibrocyty – fibroblasty pochodzące ze szpiku kostnego, tworzą 14-15% populację myofibroblastów odpowiedzialnych za włóknienie nerek. Za regulację infiltracji fibrocytów do mięszu nerek odpowiedzialna jest chemokina SLC/CCL21 (*secondary lymphoid tissue*) i jej receptor CCR7.

Oczywistym wskaźnikiem akumulacji ECM jest równowaga między syntezą i degradacją jej składników. Tempo i zakres niekorzystnych zmian zachodzących w nerce zależy od szybkości i wielkości produkcji (z udziałem czynników transkrypcyjnych i procesów translacji) lub rozkładu jej składników (z udziałem proteaz i ich inhibitorów) oraz od czynników wpływających na podatność białek ECM na ich degradację (glikozylacja, stabilność białek inkorporowanych do macierzy) [21,47,48]. Ekspozycja komórek hodowlanych na białka surowicy wykazała wzrost produkcji pozakomórkowej fibronektyny i kolagenu, potwierdzając wpływ proteinurii na proces włóknienia nerek w przebiegu progresywnych chorób nerek [11].

Z przemianą i kompozycją macierzy pozakomórkowej związane są **enzymy proteolityczne i ich inhibitory**:

- > metaloproteinazy macierzy (metalloproteinases matrix – MMPs), duża rodzina proteinaz (endopeptydazy zawierające cynk), zdolnych do degradacji nie tylko białek ECM, ale także cząsteczek sygnałowych, jak receptory czynników wzrostu i cząsteczki adhezyjne na powierzchni komórek. W oparciu o specyficzność substratów oraz cechy zgodności budowy sklasyfikowano 6 grup MMPs [13]:

1. kolagenazy – rozszczepiają kolagen typu I, II i III w specyficznym miejscu, tworząc dwa fragmenty;

2. żelatynazy – rozszczepiają zdenaturowane formy kolagenu, lamininę, niektóre chemokiny, aktywują nieaktywne formy MMPs;

3. stromelizyny – degradują kolagen, fibronektynę, lamininę, aktywują MMPs;

4. matrilizyny – degradują białka ECM oraz wiele cząsteczek na powierzchni komórek np. E-kadherynę

5. błonowy typ MMPs (*membrane type matrix metalloproteinases*) – strukturalnie podobny do innych klas MMPs, zakotwiczone na zewnętrznej części komórki

6. pozostałe MMPs – nie zakwalifikowane do żadnej z powyższych kategorii, występują w pojedynczych rodzajach tkanek lub komórek.

- > plazmina – proteza serynowa, syntetyzowana w wątrobie, w odpowiedzi na zapalenie ulega często przemieszczaniu do przestrzeni pozanaczyniowej, wpływa na regulację składu ECM, degraduje fibrynę, fibronektynę i lamininę (ale nie elastynę lub natywny kolagen), zdolna do aktywacji nieaktywnych form TGF- β i MMPs. Za aktywację plazminogenu do jego aktywnej formy plazminy odpowiadają aktywatory plazminogenu: t-PA (tkankowy typ aktywatora plazminogenu) i u-PA (aktywator plazminogenu typu urokinazy). O ile tPA, o silnym powinowactwie do fibryny, nie jest wystarczającym aktywatorem plazminogenu bez towarzyszącej fibryny, o tyle uPA nie przyłączający się do fibryny tworzy aktywną plazminę z plazminogenu w przestrzeniach pozanaczynio-

wych. uPA wykazuje silne powinowactwo do nieobecnego w zdrowej nerce receptora uPAR (*urokinase-type Plasminogen Activator Receptor*). Znacząca ilość uPA produkowanego w kanalikach proksymalnych w zdrowej nerce jest wydalana z moczem [62].

Inhibitory proteaz hamują aktywności wewnątrzcząsteczkowych oraz obecnych w przestrzeniach pozakomórkowych proteaz serynowych, przedstawiają złożone interakcje z macierzą, promując jej odkładanie w nerce.

< tkankowe inhibitory metaloproteinaz macierzy (TIMP-1 to 4 – *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*), endogenne specyficzne inhibitory MMPs, przyłączają i hamują wszystkie MMPs, z wyjątkiem TIMP-1, który nie wykazuje zdolności hamowania MMP-14, -16, -24 [30,49].

< Inhibitor-1 aktywatora plazminogenu (PAI-1 – *plasminogen activator inhibitor-1*)-50 kD glikoproteina, członek rodziny SERPIN (*Serine Protease Inhibitor*), pierwotny fizjologiczny inhibitor aktywatorów plazminogenu (t-PA i uPA), hamuje zdolność przemiany plazminogenu w plazminę oraz MMPs do form aktywnych. Pierwotnymi źródłami osoczowej PAI-1 wydają się być wątroba i tkanka tłuszczowa. Inhibitor PAI-1 w osoczu osoczu jest niestabilny jeśli nie jest związany z witronektyną i wzrasta w odpowiedzi na stres jako białko ostrej fazy.

Nie wykryto obecności PAI-1w zdrowej nerce, natomiast w ostrej i przewlekłej chorobie nerek inhibitor ten ulega szybkiej indukcji i produkcji w różnych komórkach wewnątrz nerki. Tworzy trwałe kompleksy z uPA i tPA, ulegając w ten sposób nieodwracalnemu zużyciu. PAI-1 niezależnie od funkcji inhibicyjnej dla tPA i uPA, silnie promuje proces włóknienia w nerce, wpływając na aktywację wielu proenzymów i czynników wzrostu, adhezję i migrację komórek oraz przebudowę i degradację macierzy [20, 22,49,57].

Tkankowa transglutaminaza (tTg) – członek rodziny enzymów zależnych od jonów wapnia, powiązanych z licznymi chorobami płuc, wątroby, serca i nerek przebiegających z włóknieniem.

tTg uwalniana przez komórki kanalików do przestrzeni pozakomórkowej w nerce prezentuje wielokierunkowe działanie [32,54]:

- wpływa na akumulację ECM, dzięki zdolności do tworzenia nieodwracalnych krzyżowych powiązań białek macierzy przez dwupeptydowe mosty ϵ (γ -glutamylolizynowe) między resztami glutaminy,
- zwiększa oporność krzyżowo powiązanych białek macierzy na proteolityczne działanie MMPs i kolagenoz,
- przyłącza nieaktywną formę TgF- β do ECM i powierzchni komórek, ułatwiając jego aktywację.

Wysoki poziom wewnątrzkomórkowej tTg, wywołujący krzyżowe powiązanie białek cytoplazmatycznych, powiązано natomiast z nowym, niezależnym od apoptozy, typem śmierci uszkodzonej komórki wewnątrz przestrzeni kanalików.

Chemokiny i ich receptory wpływają na proces włóknienia, poprzez rekrutację komórek zapalnych do przestrzeni kanali-

kowo-mięszowej oraz stymulację syntezy białek ECM przez sąsiadujące myfibroblasty. Najsilniejszy efekt włóknienia oraz wpływ na dynamikę tego procesu wywierają: TGF- β , TNF- α , endotelina-1, MCP-1/CCL2 i receptor CCR2, RANTES (CCL5) i receptor CCR1 (ale nie CCR5), m-CSF (*macrophage-colony stimulating factor*), osteopontina, receptor 1 fraktalkiny (CX3 CR1), HGF (*Hepatocyte-Growth Factor*) [6,9,52].

TGF- β (transformujący czynnik wzrostu) jest najważniejszą cytokiną promującą rozwój włóknienia we wszystkich narządach mięszowych, główny induktor gojenia i zdrowienia następstw uszkodzenia różnych tkanek. Wydzielana jako nieaktywny 25kDa homodimer niekowalencyjnie powiązany z LAP-*(Latency Associated Protein)*, może ulegać lokalnej aktywacji. W przebiegu włóknienia wzrasta nie tylko produkcja ale i aktywacja z latentnej do biologicznie aktywnej formy TGF- β .

Aktywowany TGF- β ułatwia akumulację macierzy pozakomórkowej przez [10,53]:

- aktywację fibroblastów do produkcji kolagenu typu I i typu IV oraz fibronektyny,
- syntezę integrzyn związanych z gromadzeniem macierzy na powierzchni komórek oraz pośredniczących w interakcjach makrofagów z komórkami mięszu,
- silną stymulację procesu EMT (transformacji komórek śródbłonka i nabłonka kanalików),
- silną chemotaksję dla komórek zapalnych (odwrotnie, aktywowane makrofagi tkankowe i rekrutowane makrofagi stają się głównym źródłem TGF- β w uszkodzonej tkance),
- hamowanie syntezy proteinaz - MMPs i plazminy,
- wzrost syntezy inhibitorów proteinaz - TIMPs i PAI-1,
- modulowanie aktywności tTg .

HGF - czynnik wzrostowy hepatocytów, jeden z najważniejszych i najlepiej poznanych endogennych czynników wzrostowych o zdolności do naprawy i regeneracji uszkodzonych tkanek i narządów [25,26]. Polepszający efekt HGF w przebiegu CKD związany jest z:

- antagonizowaniem fibrogennych właściwości TGF- β (HGF indukuje produkcję MMP-9 i aktywatorów plazminogenu),
- spadkiem akumulacji kolagenu w ECM nerce,
- hamowaniem progresji proteinurii.

Endotelina-1 - (ET-1) - Opisano 3 różne izopeptydy ET: ET-1, ET-2, ET-3, ale tylko ET-1 może być produkowana przez wiele komórek wewnątrz nerki (komórki śródbłonka naczyń i mezangium w kłębuszku, komórki kanalików, fibroblasty, makrofagi). Zgodnie z wynikami badań eksperymentalnych, wzrost ekspresji genu i wydalania ET-1 z moczem istotnie wiąże się z zakresem proteinurii, rozmiarem uszkodzenia nerek oraz z ujemną korelacją z GFR. Na podstawie przedstawionych dowodów eksperymentalnych uważa się, że ET-1 wydalana w moczu jest odbiciem jej produkcji w nerce [17,27].

Wpływ ET-1 na procesy włóknienia po-

lega na [9,24,33,49]:

- zdolności do przyłączania fibroblastów śródmięszowych, inicjowania ich proliferacji i tworzenia macierzy pozakomórkowej.
- właściwościach chemotaktycznych dla makrofagów, konsekwentnie rozwijających sekwencję zdarzeń związanych z związanymi z przebudową i włóknieniem śródmięszu.

Ang II - jest ważnym wewnątrznerkowym czynnikiem sprzyjającym procesom włóknienia [50,60] przez wpływ na:

- wzrost ekspresji genu TGF- β w komórkach kanalików, indukując tym samym wzrost syntezy kolagenu typu IV,
- wzrost ekspresji PAI-1 (niezależnej od TGF- β ścieżki włóknienia nerek).

W odpowiedzi na uszkodzenie nerek udowodniono wzajemne powiązanie między Ang II, TGF- β i PAI-1.

We wczesnej fazie zarówno uszkodzenia jak w reoperacji i przebudowie uszkodzonej tkanki nerek różnorodne role pośredniczące pełnią także komórki ściągane do mięszu nerek w odpowiedzi na uszkodzenie (makrofagi, monocyty i T-limfocyty). Utrzymywanie się aktywowanych makrofagów jest ściśle skorelowane z progresywnym włóknieniem nerek. Makrofagi produkują liczne czynniki promujące włóknienie (TGF- β , ET-1 i TNF- α) oraz wzmagające syntezę macierzy przez lokalne komórki mięszu (MMPs, PAI-1) [19,33,45].

Symptomy choroby nerek w przebiegu CKD ujawniają się zbyt późno w stosunku do rzeczywistych dewastacyjnych zmian narządowych. Dla wczesnego wykrywania choroby, wprowadzenia skutecznej terapii, ochrony lub spowolnienia rozwoju przyspieszonej utraty funkcji nerek niezbędne są praktyczne dla badań masowych metody skringowe. Nie jest możliwe, aby jeden parametr laboratoryjny wykazywał cechy odpowiednio czułego i specyficznego markera wykrywania, oceny dynamiki zmian oraz prognozowania przebiegu kolejnych etapów przewlekłej niewydolności nerek. Złożony patomechanizm powstawania i rozwoju kolejnych etapów CKD wymaga nie pojedynczego markera ale raczej strategicznej kombinacji, tworzącej „panel” wyselekcjonowanych białek oznaczanych w surowicy i moczu.

Najnowsze dane literaturowe prezentują liczne osiągnięcia naukowe z zakresu biologii molekularnej, genetyki i proteomiki, opisujące patogenezę powstawania i rozwoju CKD. Proponowane nowe parametry biochemiczne, także te lokalnie syntetyzowane w nerce, są czułe i specyficzne dla procesów zapalenia i włóknienia w toczącej się progresywnie chorobie. Niejasne jest jednak w jakim stopniu ich ocena w surowicy i w moczu jest specyficzna dla nerek i pozwala na odróżnienie podobnych procesów toczących się w innych narządach. Zebrane informacje świadczą natomiast jednoznacznie, że nowe parametry oznaczane w moczu, przyczynowo powiązane z patologicznymi procesami w nerce, mogą być cennymi czułymi i specyficznymi markerami nasilenia i lokalizacji destrukcji tego narządu, szczególnie w serii ich

oznaczeń w przebiegu choroby.

Piśmiennictwo

1. **Abbate M., Zoja C., Corna D. et al.:** Complement-mediated dysfunction of glomerular filtration barrier accelerates progressive renal injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2008, 19, 1158.
2. **Abbate M., Zoja C., Remuzzi G.:** How does proteinuria cause progressive renal damage? *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006, 17, 2974.
3. **Atkins R.C., Zimmet P.:** Diabetic kidney disease: act now or pay later. *J. Nephrol.* 2010, 23, 1.
4. **Bakoush O., Torffvit O., Rippe B. et al.:** High proteinuria selectivity index based upon IgM is a strong predictor of poor renal survival in glomerular diseases. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2001, 16, 1357.
5. **Bakris G.:** Proteinuria. *Hypertension* 2005, 46, 473.
6. **Benigni A., Remuzzi G.:** How renal cytokines and growth factors contribute to renal disease progression. *Am. J. Kidney Dis.* 2001, 37 (Suppl. 2), S21.
7. **Berger S.P., Roos A., Daha M.R.:** Complement and the kidney: what the nephrologist needs to know in 2006? *Nephrol. Dial. Transplant.* 2005, 20, 2613.
8. **Bolignano D., Coppolino G., Campo S. et al.:** Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is associated with severity of renal disease in proteinuric patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2008, 23, 414.
9. **Boor P., Sebeková K., Ostendorf T. et al.:** Treatment targets in renal fibrosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2007, 22, 3391.
10. **Böttinger E.P., Bitzer M.:** TGF- β signaling in renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002, 13, 2600.
11. **Burton C.J., Combe C., Walls J. et al.:** Fibronectin production by human tubular cells: The effect of apical protein. *Kidney Int.* 1996, 50, 760.
12. **Burton C.J., Combe C., Walls J. et al.:** Secretion of chemokines and cytokines by human tubular epithelial cells in response to proteins. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1999, 14, 2628.
13. **Catania J.M., Chen G., Parrish A.R.:** Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiology. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2007, 292, F905.
14. **Chatziantoniou C., Dussaule J.C.:** Insights into the mechanisms of renal fibrosis: is it possible to achieve regression? *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2005, 289, F227.
15. **Clark W.F., Macnab J.J., Chen S.J. et al.:** Evaluation of GFR estimating equations in the general community: implications for screening. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2006, 1, 787.
16. **D'Amico G., Bazzi C.:** Pathophysiology of proteinuria. *Kidney Int.* 2003, 63, 809.
17. **Dhaun N., Goddard J., Webb D.J.:** The endothelin system and its antagonism in chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006, 17, 943.
18. **Donadelli R., Zanchi C., Morigi M. et al.:** Protein overload induces fractalkine upregulation in proximal tubular cells through nuclear factor β - and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathways. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003, 14, 2436.
19. **Eddy A.A.:** Role of cellular infiltrates in response to proteinuria. *Am. J. Kidney Dis.* 2001, 37 (Suppl. 2), S25.
20. **Eddy A.A.:** Plasminogen activator inhibitor-1 and the kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2002, 283, F209.
21. **Eddy A.A.:** Proteinuria and interstitial injury. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2004, 19, 277.
22. **Eddy A.A., Fogo A.B.:** Plasminogen activator inhibitor-1 in chronic kidney disease: evidence and mechanisms of action. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006, 17, 2999.
23. **Fogo A.B.:** Progression versus regression of chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006, 21, 281.
24. **Fogo A.B.:** Mechanisms of progression of chronic kidney disease. *Pediatr. Nephrol.* 2007, 22, 2011.
25. **Gong R., Rifai A., Dworkin L.D.:** Anti-inflammatory effect of hepatocyte growth factor in chronic kidney disease: targeting the inflamed vascular endothelium. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006, 17, 2464.
26. **Gong R., Rifai A., Tolbert E.M. et al.:** Hepatocyte growth factor modulates matrix metalloproteinases and plasminogen activator/plasmin proteolytic pathways in progressive renal interstitial fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003, 14, 3047.
27. **Grenda R., Wühl E., Litwin M. et al.:** Urinary excretion of endothelin-1 (ET-1), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and vascular endothelial growth factor (VEGF165) in paediatric chronic kidney diseases: results of the ESCAPE trial. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2007, 22, 3487.
28. **Halbesma N., Kuiken D.S., Brantsma A.H. et al.:** Macroalbuminuria is a better risk marker than low estimated GFR to identify individuals at risk for accelerated GFR loss in population screening. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006, 17, 2582.
29. **Haraldsson B., Sörensson J.:** Why do we not all have proteinuria? An update of our current understanding of the glomerular barrier. *News Physiol. Sci.* 2004, 19, 7.
30. **Hörstrup J.H., Gehrman M., Schneider B. et al.:** Elevation of serum and urine levels of TIMP-1 and tenascin in patients with renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2002, 17, 1005.
31. **Hsu S.I.H., Couser W.G.:** Chronic progression of tubulointerstitial damage in proteinuric renal disease is mediated by complement activation: a therapeutic role for complement inhibitors? *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003, 14, S186.
32. **Johnson T.S., El-Koraie A.F., Skill N.J. et al.:** Tissue transglutaminase and the progression of human renal scarring. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003, 14, 2052.
33. **Kang D.H., Kanellis J., Hugo C. et al.:** Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002, 13, 806.
34. **Kang D.H., Nakagawa T.:** Uric acid and chronic renal disease: possible implication of hyperuricemia on progression of renal disease. *Semin. Nephrol.* 2005, 25, 43.
35. **Katsurada A., Hagiwara Y., Miyashita K. et al.:** Novel sandwich ELISA for human angiotensinogen. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2007, 293, F956.
36. **Kikuchi H., Kawachi H., Ito Y. et al.:** Severe proteinuria, sustained for 6 months, induces tubular epithelial cell injury and cell infiltration in rats but not progressive interstitial fibrosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2000, 15, 799.
37. **Kisseleva T., Brenner D.A.:** Fibrogenesis of parenchymal organs. *Proc. Am. Thor. Soc.* 2008, 5, 338.
38. **Liu Y.:** Renal fibrosis: New insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int.* 2006, 69, 213.
39. **MacGregor M.S., Boag D.E., Innes A.:** Chronic kidney disease: evolving strategies for detection and management of impaired renal function. *Q. J. Med.* 2006, 99, 365.
40. **Mishra J., Ma Q., Prada A. et al.:** Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003, 14, 2534.
41. **Mitsnefes M.M., Kathman T.S., Mishra J. et al.:** Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of renal function in children with chronic kidney disease. *Pediatr. Nephrol.* 2007, 22, 101.
42. **Morigi M., Macconi D., Zoja C. et al.:** Protein overload-induced NF- β activation in proximal tubular cells requires H2O2 through a PKC-dependent pathway. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002, 13, 1179.
43. **Morita Y., Ikeguchi H., Nakamura J. et al.:** Complement activation products in the urine from proteinuric patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000, 11, 700.
44. **Nangaku M.:** Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006, 17, 17.
45. **Narula C.A.S., Hooda C.A.K.:** Conservative management of chronic renal failure. *Med. J. Acad. Forc. Ind.* 2007, 63, 56.
46. **Newman D.J., Thakkar H., Gallagher H.:** Progressive renal disease: does the quality of the proteinuria matter or only the quantity? *Clin. Chim. Acta* 2000, 297, 43.
47. **Perico N., Codreanu I., Schieppati A. et al.:** Pathophysiology of disease progression in proteinuric nephropathies. *Kidney Int.* 2005, 67, S79.
48. **Remuzzi G., Bertani T.:** Pathophysiology of progressive nephropathies. *N. Engl. J. Med.* 1998, 339, 1448.
49. **Rossini M., Fogo A.B.:** Mechanisms leading to progression of chronic renal injury: the interstitium. *Drug Discov. Today: Disease Mechanism* 2004, 1, 65.
50. **Ruiz-Ortega M., Rupérez M., Esteban V. et al.:** Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006, 21, 16.
51. **Ruiz-Ortega M., Rupérez M., Lorenzo O. et al.:** Angiotensin II regulates the synthesis of pro-inflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney Int.* 2002, 62, S12.
52. **Sakai N., Wada T., Yokoyama H. et al.:** Secondary lymphoid tissue chemokine (SLC/CCL21)/CCR7 signaling regulates fibrocytes in renal fibrosis. *Spectrophotometers* 2006, 103, 14098.
53. **Schnaper H.W., Hayashida T., Hubchak S.C. et al.:** TGF- β signal transduction and mesangial cell fibrogenesis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2003, 284, F243.
54. **Shweke N., Boulous N., Jouanneau C. et al.:** Tissue transglutaminase contributes to interstitial renal fibrosis by favoring accumulation of fibrillar collagen through TGF- β activation and cell infiltration. *Am. J. Pathol.* 2008, 173, 631.
55. **Shyam C., Duggal A.K., Sunder S.:** Chronic kidney disease: a perspective. *J. Ind. Acad. Clin. Med.* 2007, 8, 150.
56. **Timmeren M.M., Bakker S.J.L., Vaidya V.S. et al.:** Tubular kidney injury molecule-1 in protein-overload nephropathy. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2006, 291, F456.
57. **Torii K., Kimura H., Okada T. et al.:** Diabetic nephropathy and plasminogen activator inhibitor-1 in urine samples. *Rinsho Byori* 2004, 52, 506.
58. **Tryggvason K., Pettersson E.:** Causes and consequences of proteinuria: the kidney filtration barrier and progressive renal failure. *J. Intern. Med.* 2003, 254, 216.
59. **Wang Y., Rangan G.K., Tay Y.C. et al.:** Induction of monocyte chemoattractant protein-1 by albumin is mediated by nuclear factor β in proximal tubule cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1999, 10, 1204.
60. **Yamamoto T., Nakagawa T., Suzuki H. et al.:** Urinary angiotensinogen as a marker of intrarenal angiotensin II activity associated with deterioration of renal function in patients with chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007, 18, 1558.
61. **Yu H.T.:** Progression of chronic renal failure. *Arch. Intern. Med.* 2003, 163, 1417.
62. **Zhang G., Kernan K.A., Collins S.J. et al.:** Plasmin(ogen) promotes renal interstitial fibrosis by promoting epithelial-to-mesenchymal transition: role of plasmin-activated signals. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007, 18, 846.
63. **Zoja C., Donadelli R., Collesi S. et al.:** Protein overload stimulates RANTES production by proximal tubular cells depending on NF- β activation. *Kidney Int.* 1998, 53, 1608.
64. **Zoja C., Morigi M., Remuzzi G.:** Proteinuria and phenotypic change of proximal tubular cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003, 14, S36.