

PROTEOMIKA U NEFROLOGIJI

Uredniče,

Otkrićem humanog genoma otvorile su se nove spoznaje o cjelokupnom genetskom materijalu sadržanom unutar ljudskog organizma, no mnoštvo nepoznanica i potrebe za daljnjim istraživanjima su pred nama. Iz navedenog proizlaze i nove istraživačke grane poput funkcionalne genomike koja istražuje vezu između gena i njegovog posttranskripcijskog konačnog produkta proteina.

Proteomika je suvremena znanstvena disciplina koja u svojim istraživanjima obuhvaća biologiju, kemiju i informatiku s ciljem proučavanja proteina. Do sada je istražen i mapiran cijeli genom, no kako jedan genom može imati nekoliko proteoma pred nama je još dug istraživački put.

Za proteine je poznato da su nositelji svih funkcija unutar organizma, pomoću njih možemo razlikovati zdravo od bolesnog, što ih čini zanimljivima, budući da su ciljna mjesta djelovanja lijekova. Proteomika omogućava praćenje promjena koje se u organizmu događaju prilikom bolesti, odnosno određene terapije, s obzirom da je proteom podložan stalnim promjenama kroz interakcije s genomom ili vanjskim utjecajima. Cilj proteomskog istraživanja je identifikacija proteina i komunikacijske mreže između pojedinih proteina, što će naravno dovesti i do razvoja novih kako dijagnostičkih tako i terapijskih mogućnosti.

U području nefrologije postoji mnoštvo istraživačkih mogućnosti pomoću proteomike, a ponajviše su u tijeku istraživanja novih biomarkera.

Akutna ozljeda bubrega

Akutna ozljeda bubrega povezana je s povećanim poboljšavanjem i smrtnosti. Prema sadašnjim kriterijima

RIFLE (*Risk, Injury, Failure, Loss and End Stage Kidney Disease*) kriterijima dijagnozu akutne ozljede bubrega temeljimo na porastu serumskog kreatinina i/ili smanjenju diureze (1). No isto tako je poznato da u trenutku kada se u laboratorijskim nalazima otkrije povišena vrijednost serumskog kreatinina, bilježi pad glomerularne filtracije za preko 50 posto, što s kliničkog staništa znači zakašnjelo postavljanje dijagnoze akutne ozljede bubrega i zakašnjele terapijske postupke. Za sada ne postoji specifičan biljeg - biomarker pomoću kojega bi se akutna ozljeda bubrega prepoznala u ranoj fazi. U tijeku su istraživanja koja se koriste metodom proteomike s ciljem otkrivanja ranih biljega akutne ozljede bubrega.

Biomarkeri akutne ozljede bubrega bi trebali imati sljedeća obilježja: brzu dijagnostiku bubrežne disfunkcije, razlikovanje prerrenalnog zatajenja od renalnog, trebali bi biti specifični za ozljedu bubrega ako postoji istodobna ozljeda drugog ili drugih organskih sustava, trebali bi razlikovati akutno od kroničnog zatajenja bubrega, temeljem biomarkera bi se ozljeda mogla svrstati po težini, te bi njegovo/njihovo određivanje trebalo biti jednostavno i jeftino.

Trenutno, jedini raspoloživi biomarker akutne ozljede bubrega - kreatinin, daleko je od gore postavljenih zahtjeva, s obzirom da njegove vrijednosti izrazito variraju ovisno o dobi, spolu, načinu prehrane, mišićnoj masi, uzimanju lijekova i fizičkoj aktivnosti.

Neki od novih potencijalnih biomarkera akutne ozljede bubrega su *neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL), *cystatin C* (Cys C), *kidney injury molecule-1* (KIM-1), interleukin -18 (IL-18) i *liver-type fatty acid binding protein* (L-FABP) (2,3).

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) pripadnik je porodice lipokalina. Radi se o malom proteinu molekularne mase 25 kDa (4). Kao potencijal-

ni biomarker bubrežnog oštećenja otkriven je tijekom istraživanja na životinjskim modelima, u kojima je bio induciran nastanak akutne ozljede bubrega, obično se radilo o ishemijsko reperfuzijskim ozljedama, a potom je promatrana izraženost gena u bubregu koji su inducirani navedenim oštećenjem. Ubrzo je postalo jasno da smo na tragu otkrića novog biomarkera tubularnog oštećenja, jer je NGAL sekretorni tubularni protein i vrlo brzo nakon nastanka akutnog oštećenja bubrega dolazi do porasta njegove koncentracije u serumu i urinu (5). Nakon inicijalnih spoznaja uslijedilo je mnoštvo studija s ciljem dokazivanja ili opovrgavanja NGAL-a kao biomarkera. Velika većina navedenih studija provedena je na bolesnicima nakon aorto-koronarnog premoštenja. Kod većine ispitanika uočene su povišene vrijednosti NGAL već 2-4 sata nakon kirurškog zahvata kod onih bolesnika koji su daljnjem tijeku liječenja razvili akutnu ozljedu bubrega. Porast u koncentraciji NGAL prethodio je porastu serumskog kreatinina za 24-48 sati (6). Dosada učinjenim studijama pokazano je da se NGAL nalazi u malim količinama u tkivu bubrega, pluća, probavnog sustava, ali da tijekom upalnog procesa ili ozljede epitela dolazi do znatnog porasta, pa su tako verificirane značajno povišene vrijednosti NGAL u plazmi i urinu nakon ishemijske ozljede bubrega i prilikom razvoja kontrastne nefropatije. Naravno da postoje i ograničavajući čimbenici poput sistemske infekcije, anemije, zloćudnih bolesti i svakako su potrebne daljnje multicentrične studije na velikom broju ispitanika za daljnju ocjenu i određivanje referentnog raspona (3).

Cistatin C je neglikozilirani protein veličine 14 kDa, pripadnik porodice cistein proteinaza inhibitora. Proizvode ga sve stanice koje posjeduju jezgru, a možemo ga naći u svim tkivima i tjelesnim tekućinama. Njegova je proizvodnja konstantna, a s obzirom da se ne veže za proteine plazme slobodno se filtrira u glomerulima te se potom reapsorbira u proksimalnim kanalčićima (7). Za Cistatin C za sada postoje kontradiktorni rezultati, s obzirom da je proizvodnja cistatina C konstantna, njegova će serumska koncentracija primarno ovisiti o glomerularnoj filtraciji i samim time ozljede tubula neće imati znatnijeg utjecaja (8,9). U studiji Knighta i suradnika pokazano je da i mnoštvo faktora ne bubrežnog podrijetla mogu dovesti do povišenja serumske razine cistatina C. Kao takvi spominju se starija dob, muški spol, debljina, nikotinizam, hipo- i hipertireoza, povišena vrijednost C-reaktivnog proteina te terapija kortikosteroidima (10). Uslijedilo je još nekoliko studija koje su uspoređivale točnost u predviđanju porasta razine cistatina C u urinu i nastanka akutne ozljede bubrega. S obzirom da se cistatin C inače nalazi u malim, gotovo nemjerljivim koncentracijama u urinu svaki onaj proces koji dovodi do oštećenja tubula dovesti će i do poremećene absorpcije cistatina C te povi-

šenja njegove koncentracije u urinu (11). U tom smislu interesantna je studija Koynera i sur. na 123 bolesnika podvrgnuta kardio-kirurškom zahvatu. U bolesnika su određivani NGAL, cistatin C, KIM-1, HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) te se kao najspecifičniji među njima pokazao upravo urinarni cistatin C. Porast njegove koncentracije najbolje je korelirao sa detekcijom ranog nastanka akutne ozljede bubrega (12).

Kidney injury molecule 1 (KIM-1) je transmembranski glikoprotein veličine 90 kDa. Gen koji kodira KIM-1 inicijalno je uočen na životinjskim modelima kada je nakon ishemije došlo do njegove izrazite izraženosti. U normalnim okolnostima KIM-1 je minimalno izražen u tkivu bubrega i urina (13). Tijekom 2002. godine počinje se spominjati kao mogući biomarker akutne ozljede bubrega. Tada je uočena njegova povećana izraženost u biopstatima bubrega s potvrđenom akutnom tubularnom nekrozom. U navedenoj studiji koncentracija KIM-1 bila je značajno viša prilikom ishemijske akutne ozljede bubrega u odnosu na ostale uzroke akutne ozljede bubrega (14). Liangos i sur. su u prospektivnoj studiji na 103 bolesnika podvrgnuta kardiopulmonalnom premoštenju pratili izražaj 6 biomarkera rane akutne ozljede bubrega. Među njima je KIM-1 istaknut kao najbolji prediktor s obzirom da se porast njegove vrijednosti u urinu mogla detektirati već unutar dva sata od kirurškog zahvata (15). Kako do sada provedenim studijama nije postavljena granična vrijednost KIM-1 koja bi nam ukazivala na nastanak akutne ozljede bubrega, svakako su potrebne daljnje studije na većem broju ispitanika.

Interleukin 18 je proupalni citokin, pripadnik velike porodice interleukina. U raznim stanicama se sintetizira u inaktivnom obliku. Na životinjskim modelima uočena je njegova povišena koncentracija u urinu nakon ishemijske ozljede bubrega (16). Siew i sur. su u prospektivnoj studiji mjerili vrijednosti interleukina 18 unutar 24 sata od prijma u jedinice intenzivnog liječenja različitih skupina bolesnika. Radilo se o ukupno 451 bolesniku od kojih je 86 unutra 48 sati razvilo akutnu ozljedu bubrega. Kod većine tih bolesnika došlo je do porasta razine interleukina 18 nagovještajući tako nepovoljan klinički tijek (17). Značenje interleukina 18 pokazano je i na studiji od 55 bolesnika podvrgnutih kardiopulmonalnom premoštenju. U tih bolesnika uočen je porast IL-18 unutar 4-6 sati nakon zahvata sa vršnom koncentracijom nakon 12 sati u onih bolesnika koji su razvili akutnu ozljedu bubrega, dok je porast serumskog kreatinina u tih bolesnika verificiran tek nakon 48-72h (18).

Fatty-acid protein binding (FABP) porodica je citoplazmatskih proteina veličine 15 kDa zaduženih za untrastanični transport dugolančanih masnih kiselina.

Smatra se da imaju značajnu ulogu u smanjenju oksidativnog stresa vežući na sebe produkte oksidacije masnih kiselina (19). Do sada ih je ukupno identificirano devet, a imena su dobili prema tkivu u kojem su otkriveni.

Liver fatty acid binding protein (L-FABP) nalazimo većinom u jetri, a u malim količinama u bubrezima i tankom crijevu. U urinu u normalnim okolnostima nije ga moguće detektirati, dok njegova izraženost raste tijekom akutne ozljede bubrega (3). Navedene spoznaje također su uočene na životinjskim modelima s induciranom akutnom ozljedom bubrega (20), a kasnije su provedene studije na bolesnicima u jedinica- ma intenzivnog liječenja. Jedna od posljednjih studija objavljenih na tu temu provedena je na 77 bolesnika podvrgnutih kardio-kiruškom zahvatu, a praćene su vrijednosti L-FABP i NAG u procjeni nastanka akutne ozljede bubrega. U konačnici je zaključeno da L-FABP ima visoku osjetljivost dok NAG ima visoku specifičnost te da bi kombinacija navedenih dvaju biomarkera bila bolja za procjenu u odnosu na pojedinačno određivanje (21).

Iako pokazuju potencijal daleko bolji od sadašnjeg biomarkera - kreatinina, za sada se navedeni rezultati temelje na malim istraživanjima unutar jednog centra, na malom broju ispitanika i za sada još nije poznat referentni raspon ni za jedan od njih.

Dijabetička nefropatija

Drugo veliko važno područje nefrologije svakako je i dijabetička nefropatija koja je u današnje doba u razvijenim zemljama vodeći uzrok razvoja završnog stadija kronične bubrežne bolesti (22) zbog čega se ulažu veliki naponi radi otkrivanja ranih specifičnih biomarkera dijabetičke nefropatije. Dosadašnji kriterij makroalbuminurije ne korelira sa stupnjem oštećenja bubrežne funkcije i potrebni su novi rani pokazatelji bubrežnog oštećenja (23). Zurbig i sur. su proveli proteomsku analizu mokraće bolesnika s dijabetesom tipa I i II. Uzorci mokraće su pripremani pomoću kapilarne elektroforeze a potom propušteni u maseni spektrometar, a dobiveni rezultati su uspoređivani s od ranije poznatim panelom peptida izoliranih iz urina. Za one peptide koji su detektirani u nižim koncentracijama u mokraći bolesnika oboljelih od dijabetesa u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu pokazana je vrlo dobra korelacija s razvojem makroalbuminurije (24). Upravo takvi rezultati istraživanja imaju veliko značenje s obzirom da bi se na taj način otvorila mogućnost ranog otkrivanja bubrežnog oštećenja te ranije započinjanje terapijskih postupaka i prevencije napredovanja kronične bubrežne bolesti.

IgA nefropatija

IgA nefropatija ima vrlo varijabilnu kliničku sliku i napredovanje bolesti i svakako je za definitivnu dijagnozu i prognozu bolesti potrebna biopsija bubrega. U istraživanje je bilo uključeno 49 bolesnika s IgA nefropatijom i 40 zdravih ispitanika kao kontrolna skupina. Analizom mokraće bolesnika s IgA nefropatijom potvrđena su dva proteina u značajno višim koncentracijama - laminin G-like 3 i slobodni laki lanci k. Istraživači vjeruju da bi se pomoću njih moglo procijeniti aktivnost bolesti neinvazivnom metodom (25).

Tumori bubrega

Kako i u svim ostalim dijelovima nefrologije, tako i u području onkologije pomoću metoda proteomike postoji težnja za pronalaskom novih prognostičkih biljega.

Metastatski karcinom bubrega jedan je od na terapiju najrezistentnijih malignoma s izrazito lošom prognozom i petogodišnjim preživljenjem manjim od 10 %. Identifikacija biljega koji bi u ranoj fazi bolesti ukazivali na prisutnost metastaza značajno bi poboljšala ishod liječenja.

Trenutno su verificirana tri potencijalna prognostička biomarkera: profilin-1 (Pfn 1), 14-3-3 zeta/delta, galectin-1 (Gal-1) (26). Proteomskim analizama uočen je specifičan profil izraženosti proteina. Upravo gore navedeni proteini dovode se u vezu s proširenošću bolesti i lošijim ishodom bolesnika s karcinomom bubrega. Dosadašnja istraživanja ukazuju da se radi o disregulatornim proteinima koji utječu na razvoj stanice omogućivši tako rast i progresiju tumora te širenje metastaza (27).

Transplantacija bubrega

Poznato je da je transplantacija metoda izbora u liječenju završnog stadija kronične bubrežne bolesti. U odnosu na ostale metode nadomještanja bubrežne funkcije ima bolje preživljenje, povećanu kvalitetu života, ali isto tako nosi sa sobom specifične komplikacije. Jedan od vodećih uzroka gubitka presatka je kronična disfunkcija presatka. Obično se tek nakon porasta serumskog kreatinina učini biopsija presatka te se patohistološkom analizom nađe intersticijska fibroza i tubularna atrofija (IFTA). Jedan od uzroka kronične disfunkcije presatka je nefrotoksičnost inhibitora kalcijneurina. Traga se za neinvazivnim dijagnostičkim metodama prepoznavanja disfunkcije presatka pomoću kojih bi se u ranoj fazi otkrile promjene u funkciji

ji presatka te bi se eventualno mogla individualizirati imunosupresivna terapija i na taj način odgoditi zatajivanja njegove funkcije. Istraživanja uzoraka urina bolesnika s presađenim bubregom ukazuju na značajno više koncentracije uromodulina i kininogena u odnosu na kontrolnu skupinu, čime su ocijenjeni kao potencijalni biomarkeri (28).

Pomoću metoda proteomike pokušava se detektirati poremećaj na molekularnoj razini koji dovodi do akutnog odbacivanja bubrežnog presatka. Nađena je pojačana izraženost 5 faktora transkripcije: *activator protein 1 i 4* (AP-1, AP-4), *signal transducer and activator of transcription* (STATx), *myelocytomatosis viral oncogene homologue* (c-Myc) i tumor protein (p53) u uzorcima bioptata bubrega s akutnim odbacivanjem (29).

Zaključno, nove istraživačke metode poput proteomike pružaju mnoštvo mogućnosti i već sada se ulažu veliki naponi u otkrivanju novih biomarkera, a daljnjim razvojem ove tehnologije i daljnjim otkrićima cilj je stvoriti i nove terapijske mogućnosti.

U našem Centru do sada provedena bazična istraživanja iz područja transplantacijske medicine, nefrologije i urologije prije svega su se temeljila na imunohistokemijskim metodama. Ideje za daljnja istraživanja svakako postoje, no jedan od ograničavajućih faktora je izvor financiranja te ograničene tehnološke mogućnosti.

L I T E R A T U R A

1. Srisawat N, Hoste EE, Kellum JA. Modern classification of acute kidney injury. *Blood Purif* 2010;29:300-7
2. Ho J, Dart A, Rigatto C. Proteomics in acute kidney injury-current status and future promise. *Pediatric Nephrology*; 2013, Apr 18
3. Tsigou E, Psallida V, Demponeras C, Boutzouka E, Baltopoulos G. Role of new biomarkers: functional and structural damage. *Crit Care Res Pract*.2013;2013:361078
4. 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;14:2534-43.
5. Schmidt-Ott KM. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of acute kidney injury – where do we stand today? *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:762-4.
6. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* 2005;365:1231-8.
7. Seronie V. Cystatin C: current position and future prospects. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:1664-86.
8. Trof RJ, di Maggio F, Leemreis J, Groeneveld ABJ. Biomarkers of acute renal injury and renal failure. *Shock* 2006;26:245-53.
9. Coca SG, Yalavarthy R, Concato J, Parikh CR. Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: a systematic review. *Kidney Int* 2008;73:1008-16.
10. Knight EL, Verhave JC, Spiegelman D, et al. Factors influencing serum cystatin C levels other than renal function and the impact on renal function measurement. *Kidney Int* 2004;40:221-6.
11. Conti M, Mouterau S, Zater M, et al. Urinary cystatin C as a specific marker of tubular dysfunction *Clin Chem Lab Med* 2006;44:288-91.
12. Koyner JL, Vadya VS, Bennett MR, et al. Urinary biomarkers in the clinical prognosis and early detection of acute kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;14:423-31.
13. Ichimura T, Bonventre JV, Bailly, et al. Kidney injury molecule-1, a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem* 1998;273:4134-42.
14. Vaidya VS, Ramirez V, Ichimura T, Bobadilla NA, Bonventre JV. Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *Am J Physiol -Renal Physiol* 2006;290:517-29.
15. Liangos O, Tighiouart H, Perianayagam MC, et al. Comparative analysis of urinary biomarkers for early detection of acute kidney injury following cardiopulmonary bypass. *Biomarkers* 2009;14:423-31.
16. Melnikov VY, Ecder T, Fantuzzi G, et al. Impaired IL-18 processing protects caspase-1-deficient mice from ischemic acute renal failure. *J Clin Invest* 2001;107:1145-52.
17. Siew ED, Ikizler TA, Gebretsadik T, et al. Elevated urinary IL-18 levels at the time of ICU admission predict adverse clinical outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:1497-505.
18. Parikh CR, Mishra J, Thiessen-Philbrook H, et al. Urinary IL-18 is an early predictive biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. *Kidney Int* 2006;70:199-203.
19. Wang G, Gong Y, Anderson J, et al. Antioxidative function of L-FABP in L-FABP stably transfected Chang liver cells. *Hepatology* 2005;42:871-879
20. Yamamoto T, Noiri E, Ono Y, et al. Renal L-type fatty acid binding protein in acute ischemic injury. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2894-902.
21. Katagiri D, Doi K, Honda K, et al. Combination of two urinary biomarkers predicts acute kidney injury after adult cardiac surgery. *Ann Thorac Sur* 2012;93:577-83.
22. Perkins BA, Ficociello LH, Silva KH, Finkelstein DM, Warram JH, Krolewski AS. Regression of microalbuminuria in type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2003;348:2285-93.
23. Perkins BA, Ficociello LH, Ostrander BE, et al. Microalbuminuria and the risk for early progressive renal function decline in type 1 diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:1353-61.
24. Zürlbig P, Jerums G, Hovind P, et al. Urinary proteomics for early diagnosis in diabetic nephropathy. *Diabetes* 2012;61:3304-13.

25. Rocchetti MT, Papale M, Suriano IV, et al. Association of urinary laminin g-like-3 and free k light chains with disease activity and histological injury in IgA nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013;8:1115-25.
26. Dihazi H. Prognosis markers for metastatic renal cell carcinoma: quantitative proteomics approach. *Expert Rev Proteomics* 2013;10:21-4.
27. Masui O, White NM, DeSouza LV, Krakovska O, Matta A, Metias S, Khalil B, Romaschin AD, Honey RJ, Stewart R, Pace K, Bjarnason GA, Siu KW, Yousef GM. Quantitative proteomic analysis in metastatic renal cell carcinoma reveals a unique set of proteins with potential prognostic significance. *Mol Cell Proteomics*. 2013;12:132-44.
28. Quintana LF, Campistol JM, Alcolea MP, Bañon-Maneus E, Sol-González A, Cutillas PR. Application of label-free quantitative peptidomics for the identification of urinary biomarkers of kidney chronic allograft dysfunction. *Mol Cell Proteomics*. 2009;8:1658-73.
29. Sui W, Lin H, Peng W, Huang Y, Chen J, Zhang Y, Dai Y. Molecular dysfunctions in acute rejection after renal transplantation revealed by integrated analysis of transcription factor, micro RNA and long noncoding RNA. *Genomics*, 2013

INES MESAR i NIKOLINA BAŠIĆ-JUKIĆ

Klinika za unutarnje bolesti,
Zavod za nefrologiju, arterijsku hipertenziju,
dijalizu i transplantaciju
Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb