

lek. Magdalena Mostowska

**Ocena związku składowych układu RAA
z obrazem klinicznym
i nasileniem zmian morfologicznych w nerkach u chorych
na pierwotne przewlekłe kłębuszkowe zapalenie nerek
oraz analiza wybranych polimorfizmów genów kandydackich
predysponujących do wystąpienia tej choroby**

PRACA DOKTORSKA

Promotor: prof. dr hab. Andrzej Oko

Katedra i Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu
Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

POZNAŃ, 2011 r.

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów.....	3
1. Wstęp.....	6
2. Cel pracy.....	20
3. Materiały.....	21
3.1. Grupa badana.....	21
3.2. Grupa kontrolna.....	23
4. Metody.....	25
4.1. Pobieranie, obróbka i przechowywanie materiału biologicznego.....	25
4.2. Badania biochemiczne.....	25
4.3. Pomiar i analiza ciśnienia tętniczego.....	26
4.4. Ocena patomorfologiczna bioptatów nerki.....	27
4.5. Badania molekularne.....	27
4.6. Materiały i odczynniki chemiczne.....	34
4.7. Aparatura.....	35
4.8. Oprogramowanie komputerowe oraz biologiczne bazy danych.....	35
4.9. Analizy statystyczne.....	36
5. Wyniki.....	38
5.1. Oznaczenie i porównanie stężeń proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu oraz wielkości wydalania TGFβ1 z moczem u chorych ze świeżo rozpoznanym pierwotnym PKZN i w grupie kontrolnej.....	38
5.2. Wyliczenie i porównanie wielkości wskaźnika renina/prorenina u chorych ze świeżo rozpoznanym pierwotnym PKZN oraz w grupie kontrolnej.....	40
5.3. Porównanie stężeń proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu, wskaźnika renina/prorenina oraz wydalania TGF β1 z moczem w grupie chorych z proliferacyjnymi i nieproliferacyjnymi postaciami PKZN.....	41
5.4. Analiza związku stężeń proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu oraz wskaźnika renina/prorenina u chorych ze świeżo rozpoznanym pierwotnym PKZN z BMI, filtracją kłębuszkową (eGFR) i wielkością białkomoczu (TPUR).....	42
5.5. Porównanie stężeń proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu, wielkości wydalania TGFβ1 z moczem oraz wskaźnika renina/prorenina u chorych ze świeżo rozpoznanym pierwotnym PKZN z zespołem nerczycowym i bez zespołu nerczycowego.....	44

5.6. Porównanie stężenia proreniny, reniny, angiotensyny II i aldosteronu w osoczu, wielkości wydalania TGFβ1 z moczem oraz wskaźnika renina/prorenina u chorych ze świeżo rozpoznanym pierwotnym PKZN z nadciśnieniem tętniczym i bez nadciśnienia tętniczego.....	46
5.7. Porównanie stężenia proreniny, reniny, angiotensyny II i aldosteronu w osoczu, wielkości wydalania TGFβ1 z moczem oraz wskaźnika renina/prorenina u chorych ze świeżo rozpoznanym pierwotnym PKZN w grupie dippers i non – dippers.....	47
5.8. Analiza związku stężenia proreniny, reniny, angiotensyny II i aldosteronu w osoczu oraz wskaźnika renina/prorenina z wielkością wydalania TGFβ1 z moczem oraz ze stopniem sklerotyzacji i nasileniem włóknienia w obrazie mikroskopowym nerki u chorych ze świeżo rozpoznanym pierwotnym PKZN....	48
5.9. Analiza polimorfizmów genów <i>ACE</i> , <i>AGT</i> , <i>AGTR1</i> , <i>ATP6AP2</i> , <i>CMA1</i> , <i>CYP11β2</i> i <i>REN</i>	49
6. Dyskusja.....	56
7. Wnioski.....	73
8. Aneks.....	75
9. Piśmiennictwo.....	82
10. Streszczenie.....	102
11. Summary.....	105
Spis rycin.....	108
Spis tabel.....	110

Wykaz stosowanych skrótów

ACE	- enzym konwertaza angiotensyny, <i>ang. angiotensin converting enzyme</i>
ACE	- gen konwertazy angiotensyny (nazwy wszystkich genów napisano kursywą dla odróżnienia od nazw białek, które kodują)
ACEI	- inhibitory konwertazy angiotensyny, <i>ang. angiotensin converting enzyme inhibitors</i>
AGT	- gen angiotensynogenu
AGTR1	- gen receptora typ 1 dla angiotensyny II
Ang	- angiotensyna
Aog	- angiotensynogen
ARO	- aktywność reninowa osocza
ARB	- antagoniści receptorów ATR ₁
ATP6AP2	- gen receptora proreninowo - reninowego
ATR ₁	- receptor typu 1 dla Ang II
ART ₂	- receptor typu 2 dla Ang II
BMI	- wskaźnik masy ciała, <i>ang. body mass index</i>
BNT	- bez nadciśnienia tętniczego
BZN	- bez zespołu nerczycowego
CAGE	- wrażliwy na chymostatynę enzym tworzący Ang II, <i>ang. chymostatin - sensitive Ang II – generated enzyme</i>
chr.	- chromosom
CI	- przedział ufności, <i>ang. confidence interval</i>
CMA1	- gen chymazy
CNP	- polimorfizm liczby kopii, <i>ang. copy number polymorphism</i>
Cr	- kreatynina
CVC	- <i>ang. Cross Validation Consistency</i>
CYP11β2	- gen syntazy aldosteronowej
EDTA	- kwas etylenodiaminotetraoctowy
DBP	- rozkurczowe ciśnienie tętnicze, <i>ang. diastolic blood pressure</i>
eGFR	- wielkość przesączania kłębuszkowego oszacowana na podstawie wzoru MDRD
ELISA	- metoda immunoenzymatyczna, <i>ang. enzyme – linked immunosorbent assay</i>
eNOS	- śródbłonkowa synteza tlenku azotu, <i>ang. endothelial nitric oxide synthase</i>

ERK	- kinaza regulowana przez sygnał zewnątrzkomórkowy, <i>ang. extracellular signal – regulated kinase</i>
ESH	- <i>ang. European Society of Hypertension</i>
ESC	- <i>ang. European Society of Cardiology</i>
ESRD	- schyłkowa niewydolność nerek, <i>ang. end – stage renal disease</i>
F	- włóknienie tkanki cewkowo – śródmiąższowej
FSGS	- ogniskowe i segmentalne stwardnienie kłębuszków nerkowych, <i>ang. focal segmental glomerulosclerosis</i>
g	- gram
HO – 1	- oksydaza hemowa
HRM	- wysokorozdzielcza analiza temperatury topnienia produktów PCR, <i>ang. High-Resolution Melting</i>
HRP	- peptyd regionu chwytanego, <i>ang. handle-region peptide</i>
HW	- prawo Hardy'ego–Weinberga
I/D	- insercyjno - delecyjny
ICAM – 1	- <i>ang. Inter - Cellular Adhesion Molecule 1</i>
IgAN	- nefropatia IgA, <i>ang. IgA nephropathy</i>
IL	- interleukina
MAF	- częstość allelu rzadszego, <i>ang. minor allele frequency</i>
MAPK	- kinazy białek aktywowane mitogenem, <i>ang. miogen – activated protein kinases</i>
MCP – 1	- chemotaktyczne białko -1 dla monocytów, <i>ang. manocyte chemoattractant protein – 1</i>
MHC	- główny układ zgodności tkankowej, <i>ang. major histocompatibility complex</i>
MDRD wzór	- wzór z badania Modification of Diet in Renal Disease
MesPGN	- mezangialne rozplemowe PKZN, <i>ang. mesangial proliferative glomerulonephritis</i>
Min.	- minimum
Max.	- maximum
MN	- nefropatia błoniasta, <i>ang. membranous nephropathy</i>
MPGN	- błoniasto - rozplemowe PKZN, <i>ang. membrano – proliferative glomerulonephritis</i>
MYH9	- <i>ang. non-muscle Myosin heavy chain type II isoform A</i>
NO	- tlenek azotu
NF-κB	- czynnik jądrowy kappa B, <i>ang. nuclear factor κB</i>
NO	- tlenek azotu
NOS	- gen syntazy tlenku azotu

NT	- nadciśnienie tętnicze
OR	- iloraz szans, <i>ang. odds ratio</i>
PAI – 1	- inhibitor-1 aktywatora plazminogenu
PChN	- przewlekła choroba nerek
PCR	- reakcja łańcuchowa polimerazy DNA, <i>ang. polymerase chain reaction</i>
PDGF	- czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego, <i>ang. platelet – derived growth factor</i>
PGF ₂ α	- prostaglandyna F ₂ α
PKZN	- przewlekłe kłębuszkowe zapalenie nerek
(P)RR	- receptor proreninowo - reninowy
RAA układ	- układ renina – angiotensyna - aldosteron
RANTES	- <i>ang. regulated on activation, normal T – cell expressed and secreted</i>
REN	- gen proreniny
RFLP	- analiza polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych, <i>ang. Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RIA	- metoda radioimmunologiczna
RPGN	- gwałtownie postępujące PKZN, <i>ang. rapide progressive glomerulonephritis</i>
rs	- <i>ang. RefSNP accession ID</i>
S	- sklerotyzacja kłębuszków nerkowych
SBP	- skurczowe ciśnienie tętnicze, <i>ang. systolic blood pressure</i>
SF – 1	- steroidogenny czynnika transkrypcyjnego, <i>ang. steroidogenic factor 1</i>
SNP	- polimorfizm pojedynczego nukleotydu, <i>ang. single nucleotide polymorphism</i>
TBA	- <i>ang. Testing Balanced Accuracy</i>
TGFβ1	- transformujący czynnik wzrostu β1, <i>ang. transforming growth factor β1</i>
TPUR	- dobowe wydalanie białka z moczem
Q25	- 25 centyl lub pierwszy kwartył, <i>ang. first quartile</i>
Q75	- 75 centyl lub trzeci kwartył, <i>ang. third quartile</i>
V – ATPaza	- pompa sodowo - potasowa
VEGF	- czynnik wzrostu śródbłonna naczyń, <i>ang. vascular endothelial growth factor</i>
ZN	- zespół nerczycowy
3'UTR	- obszar w genie nieulegający translacji, <i>ang. 3' untranslated region</i>

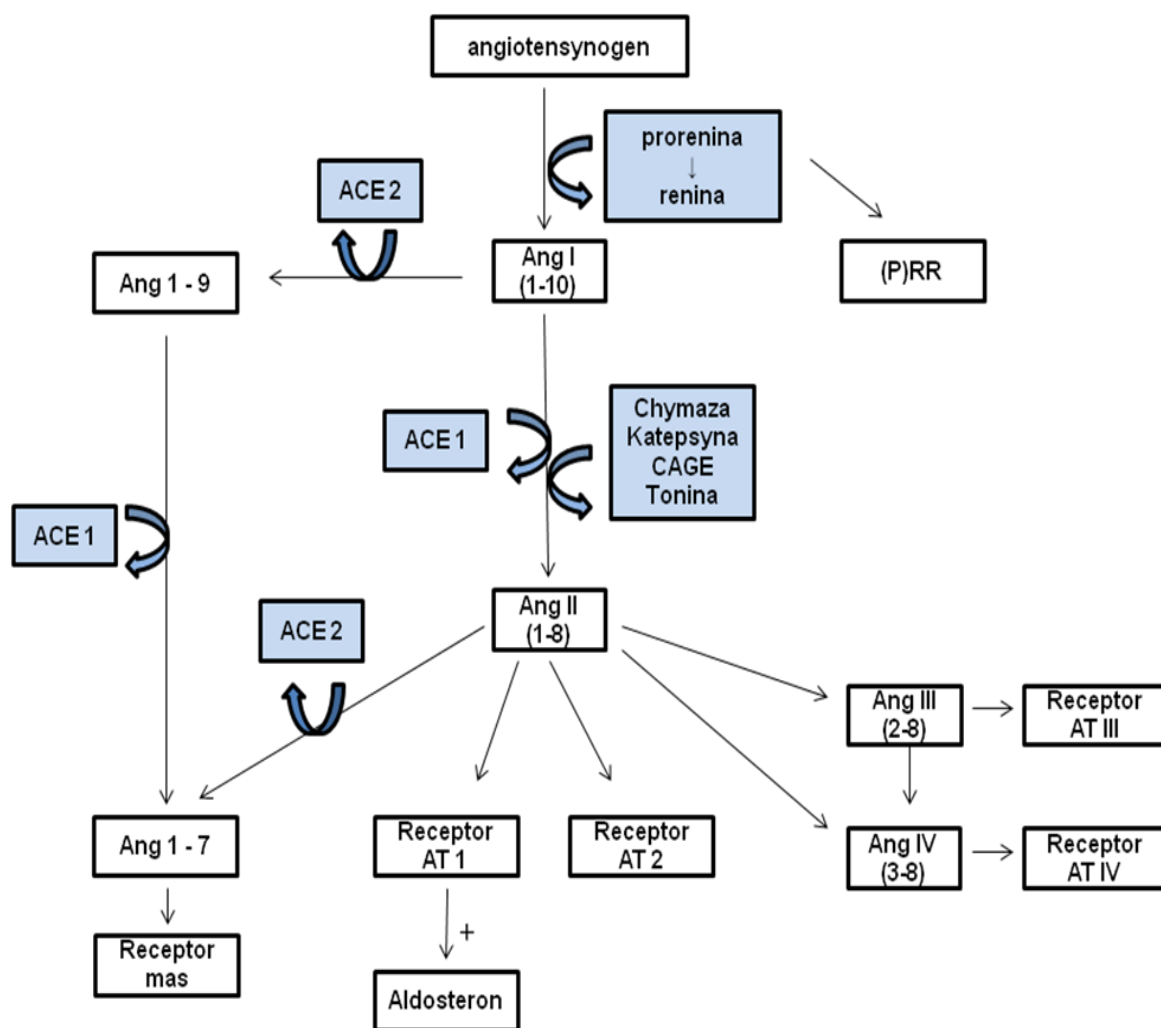
1. Wstęp

Pierwotne przewlekłe kłębuszkowe zapalenie nerek (PKZN) stanowi w większości krajów drugą co do częstości (po cukrzycowej chorobie nerek) przyczynę schyłkowej niewydolności nerek wymagającej leczenia nerkozastępczego. W 2008 r. w Polsce wśród 15980 chorych leczonych nerkozastępczo 2793 osoby (17,48 %) chorowało na PKZN [1]. Średni wiek zachorowania ($34,5 \pm 14,5$ lat) [2], przebieg z okresami remisji i nawrotów, przewlekła terapia, w tym również immunosupresyjna, a także możliwość progresji do schyłkowej niewydolności nerek sprawiają, że choroba stanowi istotne ograniczenie w życiu osobistym i zawodowym. Istotą pierwotnych PKZN nerek jest uszkodzenie kłębuszków nerkowych z wtórnym zajęciem śródmiąższu [3]. Mechanizmy immunologiczne uczestniczące w patogenezie większości pierwotnych kłębuszkowych zapaleń nerek obejmują reakcje humoralne z tworzeniem autoprzeciwciał przeciw antygenom kłębuszkowym, złogów immunologicznych odkładanych z krążenia lub tworzonych *in situ* w kłębuszkach oraz reakcję nadwrażliwości typu późnego, która prowadzi do powstawania nacieków zapalnych w kłębuszkach nerkowych i tkance śródmiąższowej [2]. Najczęstszymi postaciami patomorfologicznymi są nefropatia IgA (IgAN), mezangialne rozplemowe PKZN (mesPGN), nefropatia błoniasta (MN) oraz ogniskowe i segmentalne stwardnienie kłębuszków nerkowych (FSGS) [4]. Spektrum kliniczne obejmuje najczęściej bezobjawowy białkomocz z krwinkomoczem lub bez, zespół nerczycowy i zespół nerytyczny. Obraz kliniczny i przebieg choroby zależą od postaci patomorfologicznej, aktywności procesów zapalnych toczących się w nerce i tzw. nieimmunologicznych czynników ryzyka jak pobudzenie układu renina – angiotensyna – aldosteron (RAA), wielkość filtracji kłębuszkowej w momencie pojawienia się choroby, wiek, płeć oraz obecność nadciśnienia tętniczego, cukrzycy, otyłości, utajonych ognisk zakażenia i stanów zapalnych o lokalizacji pozanerkowej [5, 6, 7, 8, 9].

Nefropatia IgA w większości przypadków ma łagodny przebieg, ale u około 15% chorych w ciągu 10 lat i u 20% - 50% w ciągu 20 lat od rozpoznania może rozwinąć się schyłkowa niewydolność nerek [3, 10, 11]. Większość chorych na mezangialne rozplemowe PKZN z towarzyszącą izolowaną erytrocyturią lub białkomoczem poniżej 1 g/dobę przez wiele lat zachowuje prawidłową funkcję nerek, w przeciwieństwie do chorych z większym białkomoczem, u których schyłkowa niewydolność nerek (*ang. end-stage renal disease, ESRD*) rozwija się szybciej [12]. Zachorowanie na nefropatię błoniastą wzrasta z wiekiem i dotyczy 50% chorych starszych niż 60 lat z zespołem nerczycowym i występuje dwukrotnie

częściej u mężczyzn [13]. Ponad 30% chorych uzyskuje spontaniczne remisje choroby w okresie pierwszych dwóch lat od rozpoznania, kolejne 30 % chorych charakteryzuje się dobrą odpowiedzią na leczenie i wieloletnim utrzymaniem funkcji nerek, u pozostałej części dochodzi do progresji do ESRD [14, 15, 16, 17]. W przypadku FSGS z białkomoczem rzędu zespołu nerczycowego utrzymującym się pomimo leczenia u 50% chorych w ciągu 5 – 10 lat rozwija się ESRD, a w przypadku braku leczenia po 3 – 6 latach [18, 19]. U pacjentów z całkowitą remisją rokowanie jest dobre. Około 90% zachowuje prawidłową funkcję nerek po 10 latach [3].

Aktywacja poszczególnych składowych układu RAA odgrywa istotną rolę w patogenezie przewlekłej choroby nerek, w tym pierwotnego PKZN, nadciśnienia tętniczego, cukrzycy i ich powikłań sercowo – naczyniowych [20, 21, 22, 23, 24]. Najistotniejszym działaniem składowych układu RAA w odniesieniu do pierwotnego PKZN jest działanie mitogenne, proliferacyjne, prozapalne i profibrotyzujące, prowadzące do zmian hemodynamiki nerkowej, podwyższonego ciśnienia wewnątrzklębuszkowego, zwiększonej albuminurii, białkomoczu, rozwoju stwardnienia kłębuszków nerkowych oraz włóknienia tkanki cewkowo – śródmiąższowej i w efekcie postępującego upośledzenia czynności nerek [25]. Schemat układu RAA przedstawiono na Rycinie 1.



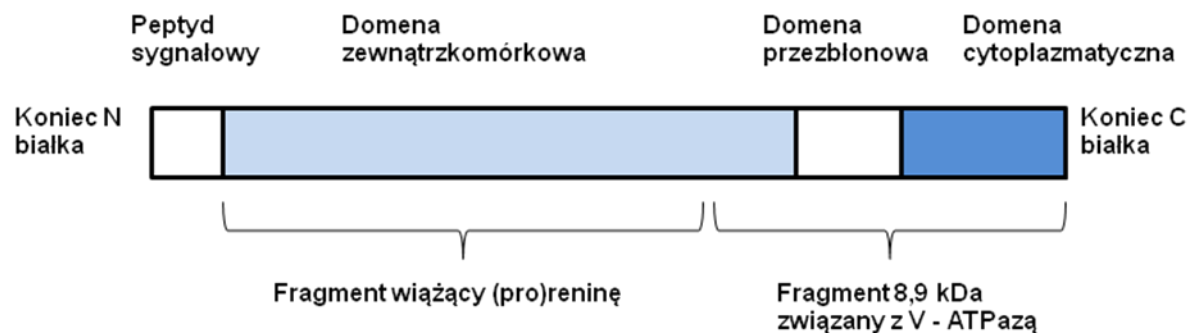
Rycina 1. Schemat układu renina – angiotensyna – aldosteron (RAA)

Ang – angiotensyna, CAGE – wrażliwy na chymostatynę enzym tworzący Ang II, receptor AT – receptor dla angiotensyny, (P)RR – receptor proreninowo - reninowy

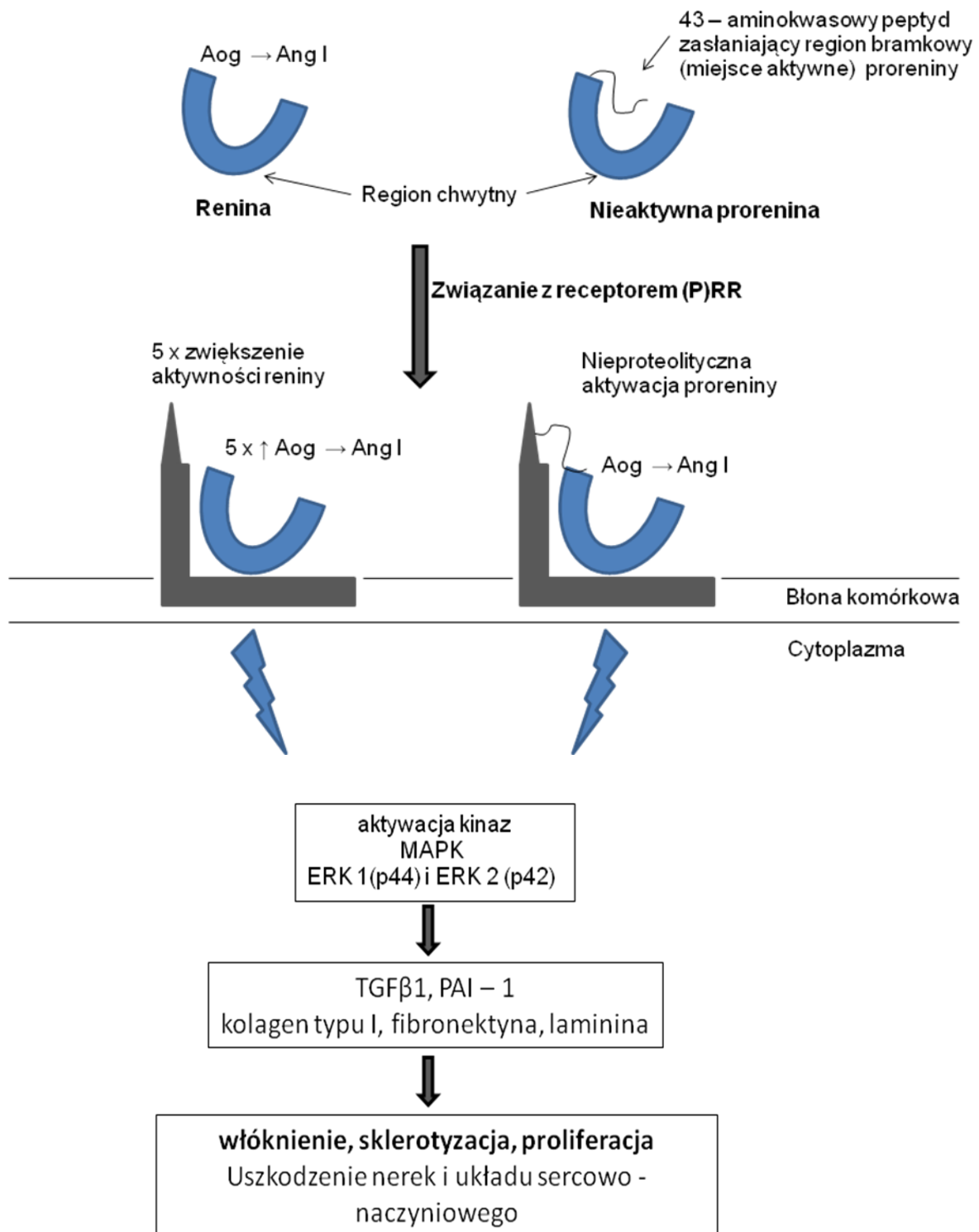
Pierwszym ogniwem tego układu jest prorenina, syntetyzowana przez komórki mioepitelialne aparatu przykłębuszkowego. Niewielkie ilości tego białka są również syntetyzowane w mózgu, oku, nadnerczach, gonadach i łożysku [24, 25, 26, 27]. Prorenina to proenzym ulegający przekształceniu do reniny przez odszczepienie 43-aminokwasowego N - końcowego peptydu za pośrednictwem proteaz m.in. katepsyny i prokonwertazy, plazminy i trypsyny (aktywacja proteolityczna) [28]. Zarówno prorenina jak i renina wydzielane są do układu krążenia po pobudzeniu baroreceptorów w odpowiedzi na obniżenie napięcia kłębuszkowej tętniczki doprowadzającej, obniżenie stężenia chlorku sodu w płynie cewkowym dopływającym do plamki gęstej aparatu przykłębuszkowego, aktywację β -adrenergiczną wywołaną pobudzeniem układu współczulnego, a także pod wpływem

prostaglandyny E_2 , prostacykliny, parathormonu, glukagonu i dopaminy [25]. Uwolniona do krążenia systemowego renina katalizuje reakcję odszczepienia od angiotensynogenu dekapeptydu - angiotensyny I (Ang 1-10), która jest przekształcana do aktywnego biologicznie oktapeptydu – angiotensyny II (Ang 1-8) przez enzym konwertujący 1 (ACE1) [29]. Krążąca w osoczu prorenina stanowi 70 - 90% całkowitej reniny (prorenina + renina) i nie posiada właściwości proteolitycznych reniny [20, 30, 31, 32, 33]. Niezależnie od szlaku angiotensynozależnego prorenina i renina mają swoiste działanie receptorowe. Odkrycie receptorów (pro)renininowych i skutków ich aktywacji ma istotne znaczenie dla poznania złożonego funkcjonowania układu RAA. Do tej pory opisano 3 rodzaje białek wiążących proreninę i reninę, z których dwa wykazują działanie receptorowe [20]. Pierwszy z nich określany jako receptor mannozo-6-fosforanowy lub czynnika wzrostowego insulinopodobnego 2 (M6-P/IGF2R) pełni rolę receptora klirensowego, co oznacza, że prorenina i renina po połączeniu z tym receptorem ulegają internalizacji i rozkładowi [34, 35]. Receptor klirensowy występuje powszechnie w organizmie, m.in. w komórkach śródbłonna [25, 27]. Drugi receptor (pro)reninowy, tzw. specyficzny receptor (pro)reninowy ((P)RR) znajduje się w kłębuszkowych komórkach mezangium, podocytach, komórkach cewek nerkowych, mięśniach gładkich tętnic nerkowych i wieńcowych [34, 35, 36]. Receptor ten jest 350 aminokwasowym białkiem z jedną domeną przezbłonową, którego pozakomórkowy fragment N - końcowy z takim samym powinowactwem wiąże proreninę i reninę [20], a C - końcowy jest związany z V-ATPazą (pompą sodowo – potasową) (Rycina 2). Związanie proreniny lub reniny powoduje poprzez fosforylację uaktywnianie szlaku sygnalizacyjnego kinaz białek aktywowanych mitogenem (ang. miogen activated protein kinases, MAPK) i kinaz regulowanych pozakomórkowo (ang. extracellular - regulated kinaze, ERK1/2). Stymulują one proliferację komórek mezangium oraz syntezę czynników profibrotyzujących takich jak transformujący czynnik wzrostu $\beta 1$ (TGF $\beta 1$), który nasila syntezę macierzy zewnątrzkomórkowej (w tym kolagenu I, IV, fibronektyny i lamininy) i hamuje jej degradację przez wzmożenie produkcji inhibitora-1 aktywatora plazminogenu (PAI-1) i innych inhibitorów metaloproteinaz [37]. TGF $\beta 1$ odpowiada za proces włóknienia i stwardnienia kłębuszków nerkowych i tkanki śródmiąższowej [38, 39]. Ekspresja TGF $\beta 1$ jest zwiększona u chorych, u których rozwija się nasilone włóknienie tkanki cewkowo – śródmiąższowej w nerkach w przebiegu nefropatii IgA, FSGS czy nefropatii cukrzycowej [40, 41]. Istotne znaczenie z punktu widzenia oceny włóknienia w nerkach ma fakt, że tylko poziom ekspresji tkankowego mRNA TGF $\beta 1$ lub jego wydalanie w moczu (nie stężenie w osoczu) odzwierciedla zaawansowanie włóknienia [42, 43, 44, 45]. Związanie proreniny i reniny z receptorem powoduje niezależnie od działania komórkowego pięciokrotne zwiększenie aktywności reniny oraz nieproteolityczną aktywację proreniny, poprzez zmianę konformacji i odsłonięcie miejsca katalitycznego (bramkowego). W efekcie dochodzi do zwiększenia

lokalnego powstawania Ang I i uruchomienia kaskady wewnątrznerkowego układu RAA, który działa na drodze parakrynej i może być w dużej mierze niezależny od osoczowych stężeń reniny czy Ang II [46]. Receptor (pro)reninowy i skutki jego aktywacji przedstawiono na Rycinie 2 i 3.



Rycina 2. Schemat struktury receptora (pro)reninowego V-ATPaza – pompa sodowo - potasowa



Rycina 3. Efekty aktywacji receptora (pro)reninowego (P)PR
 Aog – angiotensynogen; Ang I – angiotensyna I; MAPK – kinazy białek aktywowane mioginem; ERK – kinazy regulowane pozakomórkowo; TGFβ1 – transformujący czynnik β1; PAI – 1 - inhibitor-1 aktywatora plazminogenu

U chorych z cukrzycą występuje podwyższone stężenie proreniny i obniżony wskaźnik renina/prorenina, które wiążą się z obecnością mikroangiopatii, zarówno

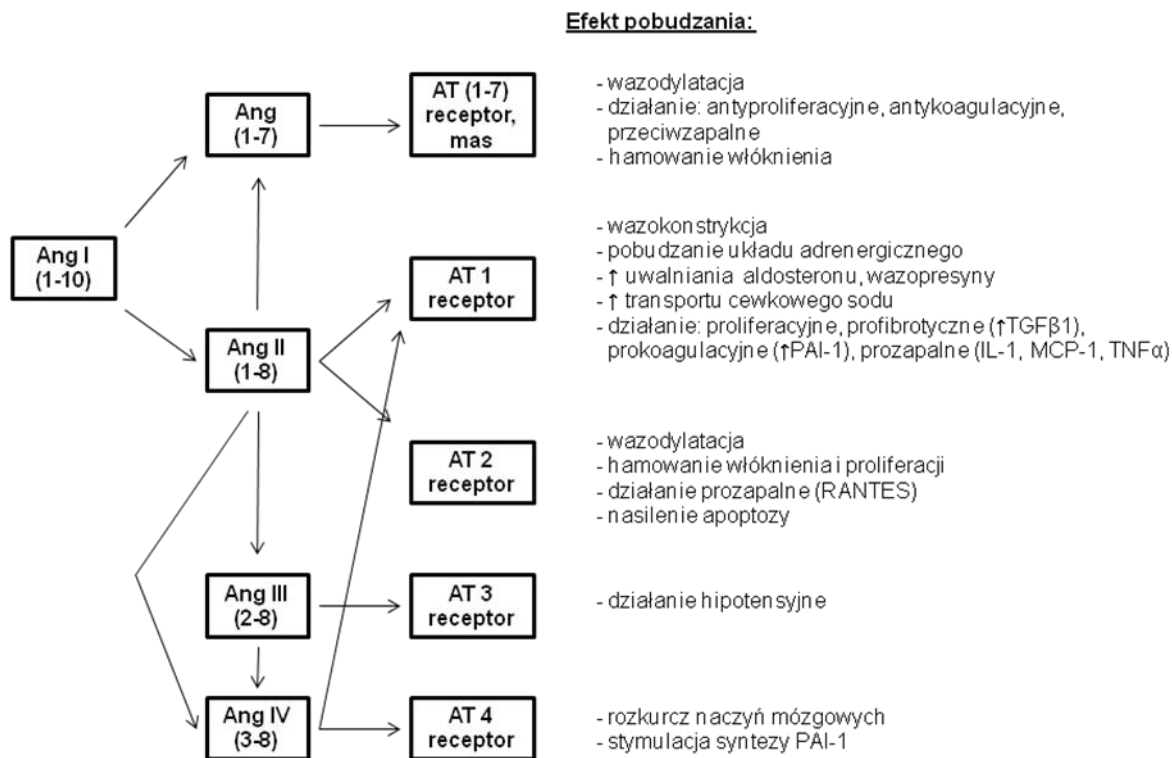
nefropatii (białkomocz, spadek filtracji kłębuszkowej, stwardnienie kłębuszków nerkowych) jak i retinopatii [20, 28, 30, 31, 47 - 49, 50 - 60]. Podwyższone stężenie proreniny i nadekspresja receptorów (pro)reninowych może być również przyczyną nadciśnienia tętniczego, włóknienia mięśnia sercowego i podwyższonego stężenia aldosteronu w osoczu [20, 21]. Po opracowaniu sekwencji aminokwasowej (RILLK-KMPSV) przeciwciała skierowanego przeciw regionowi chwytmemu proreniny (peptyd regionu chwytanego, ang. handle-region peptide, HRP, inna nazwa peptyd „decoy”) rozpoczęto szereg badań naukowych *in vivo* nad receptorem (pro)reninowym poprzez ocenę skutków jego blokowania [30, 61]. Badania Ichihary i wsp. wykazały, że podawanie transgenicznym szczurom z cukrzycą peptydu HRP całkowicie hamowało rozwój stwardnienia kłębuszków nerkowych i że blokada proreninowego szlaku MAPK i ERK1/2 może być skuteczniejszym sposobem zapobiegania tej patologii, niż stosowanie inhibitorów konwertazy angiotensyny (ACEI) czy antagonistów receptorów AT₁ (ARB) [20, 62, 63]. Wykazano również, że u zdrowych szczurów z nadekspresją ludzkiego receptora (pro)reninowego w miarę starzenia rozwijał się białkomocz i stwardnienie kłębuszków nerkowych które nie tylko hamowano, ale i częściowo odwracano przez stosowanie HRP [49]. Odkrycie działania receptorowego proreniny i reniny przyczyniło się do badań nad blokerami receptorów (pro)reninowych i bezpośrednich inhibitorów (pro)reniny. Do tej pory jedynym lekiem zarejestrowanym w leczeniu jest inhibitor reniny – aliskiren. Lek ten hamując aktywność enzymatyczną reniny zmniejsza stężenie Ang I i II, ale nie hamuje szlaku sygnalizacyjnego MAPK i ERK1/2 indukowanego proreniną i reniną, których stężenie przez mechanizm sprzężenia zwrotnego wzrasta [64 - 67]. Mimo to, w badaniach doświadczalnych wykazano zmniejszenie ekspresji czynników prozapalnych i profibrotyzujących w nerkach po stosowaniu aliskirenu [68, 69]. Ponadto, jak wynika z badania AVOID, dodanie aliskirenu do losartanu w terapii chorych z cukrzycą typu 2 powoduje istotne zmniejszenie albuminurii, niezależne od zmian ciśnienia tętniczego [64, 70].

Angiotensyna II jest jednym z najlepiej poznanych regulatorów napięcia układu naczyniowego i stanu gospodarki wodno – elektrolitowej, przez co wpływa na systemowe ciśnienie tętnicze krwi i ciśnienie wewnątrz-kłębuszkowe. Ang II wpływa na ekspresję czynników humoralnych, wzrostowych i cytokin, które jako mediatory na poziomie molekularnym utrzymują homeostazę morfologiczną – czynnościową nerek i układu sercowo – naczyniowego. Efekt hipertensyjny Ang II jest wywierany przez bezpośrednie działanie naczynioskurczowe, aktywację układu współczulnego, zwiększenie resorpcji zwrotnej chlorku sodu na poziomie cewki proksymalnej i dalszych części nefronu, przez pobudzenie wydzielania aldosteronu z warstwy kłębkowatej kory nadnerczy, stymulację syntezy substancji presyjnych jak endotelina oraz wydzielanie wazopresyny. Ang II działa za pośrednictwem dwóch receptorów AT₁ i AT₂ wykazujących ekspresję w prawie wszystkich

elementach strukturalnych nerek (mezangium, podocyty, komórki śródmiaższu, cewki nerkowe), w śródbłonku naczyń krwionośnych (również włósniczek kłębuszka i tętniczek nerkowych), sercu, nadnerczach i ośrodkowym układzie nerwowym. Patologiczne skutki nadmiaru aktywności Ang II są związane głównie z efektem pobudzenia receptorów AT₁ [37, 71, 72]. Przedłużona aktywacja tych receptorów na powierzchni komórek mezangialnych prowadzi (przez zwiększenie ekspresji czynników wzrostowych - TGFβ₁, PDGF, VEGF a także NF-κB i cytokin prozapalnych IL1, IL6, ICAM - 1, MCP - 1) do ich przerostu, proliferacji oraz zwiększonego wytwarzania macierzy pozakomórkowej i postępującego stwardnienia kłębuszków nerkowych [73, 74]. Kolejnym istotnym skutkiem w patologii nerek jest uszkodzenie podocytów związane z zaburzeniem składu i struktury błony szczelinowej podocytów (m.in. zmniejszenie ekspresji nefryny), które skutkuje zwiększeniem przepuszczalności błony filtracyjnej [37]. Morfologicznym wykładnikiem tego stanu jest zlewanie się wypustek stopowatych podocytów, a klinicznym białkomocz. Wielkość białkomoczu oraz ewentualne jego zmiany pod wpływem leczenia są czynnikami rokowniczymi w chorobach nerek oraz pośrednimi markerami uszkodzenia śródbłonka (szczególnie albuminuria). Na poziomie cewki bliższej Ang II poprzez receptory AT₁ pobudza zjawisko odróżnicowania nabłonkowo – mezenchymalnego, czyli zmianę fenotypu komórek nabłonkowych na fibroblastyczne, które migrując w głąb śródmiaższu pobudzają proces włóknienia i bliznowacenia [75]. Ang II poprzez indukcję oksydazy NADPH oraz hemowej (HO-1) jest czynnikiem aktywującym stres oksydacyjny, czego skutkiem jest działanie aterogenne, prozakrzepowe, prozapalne i unieczynnijające tlenek azotu (NO). Wolne rodniki aktywują również układ adrenergiczny, który przez dodatnie sprzężenie zwrotne pobudza systemowy i lokalny układ RAA, co ma istotne znaczenie w patologii nerek i układu sercowo – naczyniowego. Receptory AT₂ mogą również uczestniczyć w uszkodzeniu nerek i układu sercowo – naczyniowego. Aktywacja tych receptorów przez Ang II wpływa na nasilenie procesu apoptozy podocytów. Pojawiające się w podocytopenii odsłonięcie błony podstawnej od strony torebki Bowmana zapoczątkowuje proces sklerotyzacji kłębuszków. Monitorowanie liczby podocytów w osadzie moczu może stać się jedną z metod diagnozowania i monitorowania aktywności kłębuszkowych chorób nerek [76]. Aktywacja receptorów AT₂ wiąże się również z nasileniem procesów zapalnych - prowadzi do pobudzania limfocytów T (za pośrednictwem RANTES - glikoproteiny regulującej aktywację limfocytów T) i migracji monocytów do kłębuszków nerkowych i śródmiaższu oraz ścian naczyń krwionośnych [77, 78 - 80].

Hamowanie opisanych działań biologicznych w odniesieniu do nerek i układu sercowo naczyniowego jest istotą działania ACEI i ARB. Dwie grupy leków z udowodnioną skutecznością stanowią obecnie podstawę leczenia hipotensyjnego oraz kardio- i nefroprotekcijnego. Przeprowadzone badania (np. DETAIL, REENAL) z punktami

końcowymi – albuminuria, białkomocz, spadek filtracji kłębuszkowej, wykazują zbliżoną skuteczność ACEI i ARB w nefroprotekcji [37, 81]. Istotnym zagadnieniem jest zjawisko uniku aldosteronowego lub inaczej ucieczki aldosteronu (*ang. escape phenomenon*). Długotrwała terapia ACEI po przejściowej supresji syntezy Ang II (i w efekcie aldosteronu) prowadzi do uruchomienia alternatywnego szlaku chymazowego a także innych szlaków przemiany Ang I w Ang II, w którym biorą udział enzymy m.in. chymaza, katepsyna, CAGE (wrażliwy na chemostatynę enzym tworzący Ang II, *ang. chymostatin-sensitive Ang II-generated enzyme*), tonina [29]. Zjawisko uniku dotyczy nawet 40% chorych z cukrzycową chorobą nerek [158]. W przypadku sartanów z kolei dochodzi do zwiększenia stężenia Ang II, co uzasadnia dołączanie do ARB (i również ACEI) antagonistów receptora mineralokortykoidowego (nieslektywnego spironolaktonu lub selektywnego eplerenonu) [82, 83]. W związku z tym, że układ RAA jest układem sprzężenia zwrotnego w przypadku obu grup leków dochodzi do zwiększenia stężenia proreniny oraz reniny i w efekcie uruchomienie kaskady angiotensynoniezależnego szlaku uszkodzenia nerek opisanego wcześniej [37]. W 2000 roku wykryto szlak generacji angiotensyny 1-7, która powstaje z angiotensyny I lub II pod wpływem konwertazy angiotensyny 2 (ACE 2). Enzym ACE 2 występuje głównie w cewce proksymalnej i nie ulega blokadzie przez ACEI. Angiotensyna 1-7 działając przez receptor mas wykazuje działanie antagonistyczne w stosunku do działania Ang II - powoduje wazodilatację oraz efekty przeciwzapalne, antyproliferacyjne, przeciwfibrotyczne, przeciwzkrzepowe i antyaterogenne [20, 84 - 87]. Angiotensyny, receptory angiotensynowe i efekty ich pobudzania przedstawiono schematycznie na Rycinie 4.



Rycina 4. Angiotensyny, receptory angiotensynowe i efekty ich pobudzenia

TGFβ1 – transformujący czynnik β1; PAI – 1 - inhibitor-1 aktywatora plazminogenu; IL1 – interleukina 1, MCP – 1 – chemotaktyczne białko -1 dla monocytów; TNFα – czynnik martwicy nowotworów α, RANTES – glikoproteina regulująca aktywację limfocytów T

Aldosteron, ostatnie ogniwo układu RAA, oprócz podstawowej funkcji mineralokortykoidowej, jest również hormonem o działaniu łądząco podobnym do tych, jakie wywiera Ang II. Do uszkodzenia nerek i układu sercowo – naczyniowego w mechanizmie zależnym od aldosteronu dochodzi na skutek wzrostu ciśnienia systemowego i wewnątrzklębuszkowego, aktywacji adrenergicznej, bezpośredniego uszkodzenia podocytów [37, 88 - 90], stymulacji włóknienia oraz sklerotyzacji klębuszków i tkanki śródmiąższowej (TGFβ₁, PDGF), a także aktywacji prozapalnej (NF-κB, IL6, ICAM – 1, MCP – 1, cyklooksygenaza 2, osteopontyna). Synteza aldosteronu, oprócz kory nadnerczy, zachodzi również niezależnie od Ang II w komórkach mięśni gładkich i śródbłónka naczyń, nerkach, kardiomiocytach (szczególnie po przebytych zawale serca i jest wprost proporcjonalna do stopnia niewydolności serca) i ośrodkowym układzie nerwowym [82, 91 - 95]. W doświadczalnej nefropatii cukrzycowej wykazano wzrost ekspresji syntazy aldosteronowej (CYP11β₂) w obrębie klębuszków nerkowych i komórek cewek proksymalnych. Działanie aldosteronu niezależne od Ang II opisano jako tzw. „szybki” efekt aldosteronu. Różni się on od klasycznego mechanizmu działania, przez wzrost ekspresji genu *MDM2*, brakiem interakcji z genomem komórki (*ang. non – genomic effects*) [91, 92].

W badaniach przeprowadzanych od 2003 r. opisano szybki efekt działania aldosteronu na układ naczyniowy u ludzi. W warunkach upośledzonej funkcji śródbłonka aldosteron wywiera działanie zwężające tętniczki nerkowe, przyczyniając się do wzrostu oporu obwodowego [96], a także zmniejszonej aktywności NO, wywierając niekorzystny wpływ na ścianę naczyń [97 - 101].

Istotną rolę, być może kluczową, zarówno w wystąpieniu pierwotnego PKZN jak i jego obrazie klinicznym mogą odgrywać czynniki genetyczne. O genetycznym podłożu pierwotnych PKZN można wnioskować już na podstawie danych epidemiologicznych, gdzie chorobowość różni się znacznie między grupami etnicznymi. Oprócz kilku glomerulopatii związanych z mutacją pojedynczego genu (zespół Alporta, oporny na steroidy zespół nercycowy, rodzinne ogniskowe i segmentalne stwardnienie kłębuszków nerkowych (FSGS), zespół nercycowy związany z mutacją białka kodującego białko WT1 lub CD2AP czy CRIM [50, 102 - 105] podłoże genetyczne pierwotnych PKZN jest zapewne poligenowe i wiąże się, nie tyle z obecnością mutacji genów, co specyficznej kombinacji ich wariantów polimorficznych. Obecność średnio co 1000 par zasad nukleotydowych polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (*ang. single nucleotide polymorphism, SNP*) na 3 miliardy par zasad w całym genomie oraz obecność innych form polimorfizmu genetycznego - polimorfizmów liczby kopii CNP (*ang. copy number polymorphism*) [106, 107] obrazuje, jak złożony może być model genetyczny chorób poligenowych. Identyfikacja wariantów genetycznych odpowiedzialnych za rozwój choroby i jej przebieg może stać się podłożem nowoczesnego diagnozowania - przewidywania grup ryzyka zachorowania, a co za tym idzie, wczesnego wykrywania i terapii. Jednym z najistotniejszych w badaniach genetycznych w nefrologii było odkrycie podłoża genetycznego FSGS i nefropatii nadciśnieniowej [108, 109]. Odkryto, że warianty genetyczne w genie *MYH9* (*ang. non-muscle Myosin heavy chain type II isoform A*), z ekspresją w podocytach, wykazują związek z pięciokrotnym zwiększeniem ryzyka wystąpienia FSGS i dwu- do czterokrotnym wystąpienia schyłkowej niewydolności nerek w przebiegu nefropatii nadciśnieniowej u Amerykanów pochodzenia afrykańskiego. Na podstawie tych odkryć niektórzy badacze zaczęli nawet podważać rozpoznanie nefropatii nadciśnieniowej jako zjawiska wtórnego [7, 108]. Największa liczba prac i publikacji naukowych dotyczy jednak podłoża genetycznego nefropatii IgA, jako najczęstszej postaci PKZN. Wykazano rodzinne występowanie [35, 110 - 113] oraz wyraźne różnice rasowe w podatności na tę chorobę - częstsze występowanie w Japonii i Singapurze (30 - 50 % wszystkich PKZN) oraz rzadkie (około 2%) u osób ciemnoskórych [114 - 116].

Najwcześniejsze badania genetyczne nad nefropatią IgA sięgają lat siedemdziesiątych, kiedy to wykazano związek genów antygenów zgodności MHC klasy II z występowaniem nefropatii IgA: HLA-Bw35 w populacji australijskiej i francuskiej, HLA-DR4

w populacji japońskiej i HLA-DQB1 w brytyjskiej [110 - 115]. Analiza sprzężeń choroby z określonym regionem chromosomalnym (ang. genome – wide association scan, GWAS), która jest najczęstszą obok analizy SNPs genów kandydackich metodą badania genomu, wykazała sprzężenie nefropatii IgA z kilkoma regionami chromosomalnymi: 6q22-23 (locus IGAN1), 4q26-31 (IGAN2), 17q12-23.3 (IGAN3), 15q13, 4q21 i 3q26 [117, 118].

Wyniki badań uwarunkowania genetycznego nefropatii IgA i innych pierwotnych PKZN odnoszą się w mniejszym stopniu do czynników ryzyka ich wystąpienia, a w dużo większej skali do czynników progresji choroby. Najczęściej badane i opisywane w literaturze geny kandydackie dla nefropatii IgA to geny kodujące białka układu RAA oraz cytokiny i czynniki wzrostu. Wybór tych dwóch grup genów jest w pełni uzasadniony, w związku z wpływem białek przez nie kodowanych na zmiany patologiczne w nerkach jak m.in. włóknienie i sklerotyzacja, czy uszkodzenie bariery filtracyjnej, co w odniesieniu do układu RAA opisywano powyżej. Genotyp DD polimorfizmu insercyjno – delecyjnego (I/D) genu konwertazy angiotensyny (*ACE*) predysponuje do wystąpienia i progresji nefropatii IgA [119 - 121]. Istnieją przy tym różnice populacyjne. Genotyp DD jest czynnikiem ryzyka wystąpienia nefropatii IgA w populacji azjatyckiej, ale nie w populacji kaukaskiej [274]. Polimorfizm I/D jest polimorfizmem funkcjonalnym i ma wpływ na ekspresję *ACE* w krążeniu systemowym i tkankach. Obecność insercji (I) wiąże się, ze zmniejszeniem ekspresji genu *ACE*. U homozygot DD aktywność osoczowej *ACE* jest nawet o 60% wyższa niż u homozygot II [122 - 128], co zapewne przekłada się na wyższe tkankowe stężenie Ang II [289]. Genotyp DD jest także czynnikiem progresji cukrzycowej choroby nerek, rozwoju miażdżycy i jej powikłań (choroba wieńcowa, zawał serca, udar mózgu) u chorych z cukrzycową chorobą nerek i bez cukrzycy typu 2 oraz czynnikiem rozwoju i progresji przewlekłej choroby nerek (PCHN) [129 - 131]. Co do związku tego polimorfizmu z nadciśnieniem tętniczym to wyniki są sprzeczne. Część badaczy nie znalazła żadnego związku [132], część wykazała związek z allelem inercyjnym (I) [133], a największa część wykazała związek allelu D, szczególnie w układzie homozygotycznym (DD), z ryzykiem wystąpienia nadciśnienia tętniczego u mężczyzn i rozwojem jego powikłań narządowych (przerost mięśnia lewej komory, choroba niedokrwienna serca, przewlekła choroba nerek) [129 - 132].

Dowodem na poligenowy charakter nefropatii IgA, są sprzężenia między polimorfizmami. Opublikowane wyniki badań na populacji kaukaskiej wykazują związek allelu T uwarunkowanego polimorfizmem rs699 genu angiotensynogenu (*AGT*) z ryzykiem progresji nefropatii IgA, który jest jeszcze bardziej istotny w obecności allelu D w układzie homozygotycznym polimorfizmu I/D genu *ACE* [110, 136]. Podobną zależność między tymi samymi genami wykazano dla ryzyka wystąpienia cukrzycowej choroby nerek [149]. Polimorfizm rs699 genu *AGT* jest również polimorfizmem funkcjonalnym. Obecność allelu T

wiąże się ze zwiększeniem stężenia angiotensynogenu w osoczu, wg danych o około 15% i ryzykiem wystąpienia nadciśnienia tętniczego [136 - 142].

Kolejnym często badanym genem jest gen receptora typu 1 dla angiotensyny II (*AGTR1*). Zarówno w populacji kaukaskiej jak i azjatyckiej nie wykazano związku polimorfizmu -1166A>C (*86A>C, rs5186) *AGTR1* z występowaniem i progresją nefropatii IgA [136, 140, 143 - 146], natomiast udowodniono jego związek z występowaniem pierwotnego nadciśnienia tętniczego [147]. Nie badano tego polimorfizmu w odniesieniu do wpływu na zachorowalność na pierwotne PKZN w populacji polskiej.

Warianty polimorficzne genu syntazy aldosteronowej (*CYP11β2*) mogą mieć istotne znaczenie w patogenetyce pierwotnych PKZN, zwłaszcza że wykazano lokalną ekspresję tego genu w nerkach. W doświadczalnej nefropatii cukrzycowej występuje wzrost ekspresji *CYP11β2* w obrębie kłębuszków nerkowych i komórek cewek proksymalnych ze wszystkimi patologicznymi konsekwencjami lokalnego działania aldosteronu [82, 91, 92]. W odniesieniu do PKZN wykazano, że genotyp CC polimorfizmu -344 C>T (rs 1799998) genu *CYP11β2* jest związany z częstszym występowaniem nadciśnienia tętniczego i zespołu nerczycowego w grupie chorych na PKZN z populacji kaukaskiej [148]. W badaniach nad populacją japońską wykazano, że ten sam polimorfizm jest genetycznym markerem progresji nefropatii IgA, ale tylko u kobiet [149], natomiast w populacji koreańskiej takiego związku nie było [140]. Szczególne zainteresowanie polimorfizmem -344C>T wynika z faktu, że może to być polimorfizm funkcjonalny, tzn. taki którego obecność wpływa na ekspresję genu, a tym samym aktywność czy ilość produktu tego genu - w tym przypadku syntazy aldosteronowej i aldosteronu. Jako pierwsi w 1995 r. White i wsp. wykazali że obecność allelu C czterokrotnie zwiększa wiązanie czynnika transkrypcyjnego SF-1 (*ang. steroidogenic factor 1*) do regionu promotorowego *CYP11β2*, co skutkuje zmianą aktywności enzymu i produkcją aldosteronu [150 - 152]. Od tego czasu przeprowadzono wiele badań, głównie w odniesieniu do sodowrażliwego pierwotnego nadciśnienia tętniczego w różnych populacjach, które nie przyniosły jednoznacznej odpowiedzi czy polimorfizmu -344C>T *CYP11β2* jest funkcjonalny i czy jest genetycznym markerem tej choroby [135, 150, 153, 154].

Wobec odkrycia receptorów (pro)reninowych i skutków ich aktywacji przez proreninę i reninę oraz alternatywnego, chymazowego szlaku powstawania Ang II zasadne wydaje się zbadanie związku polimorfizmów genów tych białek w odniesieniu nie tylko do pierwotnych PKZN, ale i innych chorób nerek, cukrzycy oraz chorób układu sercowo – naczyniowego. W badaniach nad nefropatią cukrzycową wykazano, że genotyp AA polimorfizmu Bgl I (1303G>A, rs10900556) genu reniny *REN* (kodującego w rzeczywistości proreninę) występował częściej u osób z cukrzycą insulinozależną i wiązał się z wyższym stężeniem proreniny w surowicy i obecnością nefropatii cukrzycowej. W tej samej pracy dla polimorfizmu Taql (-4063G>A, rs41317140) genu *REN* takiego związku nie stwierdzono

[149]. Gen *REN* może mieć także znaczenie w patogenezie pierwotnego nadciśnienia tętniczego. Polimorfizm -5312C/T (rs12750834) tego genu wiąże się z wyższymi wartościami ciśnienia rozkurczowego [155]. Z kolei polimorfizm rs5918007 genu receptora (pro)reninowego (*ATP6AP2*) jest związany z występowaniem nadciśnienia tętniczego pierwotnego u mężczyzn w populacji japońskiej i udarów niedokrwiennych mózgu oraz przerostu lewej komory u kobiet tej populacji [156, 157]. Różnice związane z płcią wynikają z lokalizacji genu *ATP6AP2* na chromosomie X. Do tej pory nie badano wariantów polimorficznych genów *REN* i *ATP6AP2* w pierwotnym PKZN, co wydaje się konieczne do stworzenia mapy genów kandydackich biorących udział w patogenezie tej choroby.

2. Cel pracy

1. Porównanie stężeń proreniny, reniny, angiotensyny II i aldosteronu w osoczu, a także wielkości wskaźnika renina/prorenina oraz wydalania TGF β 1 z moczem u chorych ze świeżo rozpoznanym pierwotnym przewlekłym kłębuszkowym zapaleniem nerek (PKZN) z grupą osób zdrowych.
2. Porównanie stężeń proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu, wskaźnika renina/prorenina oraz wydalania TGF β 1 z moczem w grupie chorych z proliferacyjnymi i nieproliferacyjnymi postaciami PKZN.
3. Ocena związku stężenia proreniny, reniny, angiotensyny II i aldosteronu w osoczu oraz wielkości wskaźnika renina/prorenina u badanych chorych z obecnością nadciśnienia tętniczego i występowaniem zjawiska non – dipping, wskaźnikiem masy ciała (BMI), oszacowaną filtracją kłębuszkową (eGFR)
 - a. i nasileniem białkomoczu.
4. Ocena stopnia sklerotyzacji i nasilenia włóknienia w obrazie mikroskopowym bioptatów nerki oraz wydalania TGF β 1 z moczem w odniesieniu do wartości stężeń proreniny, reniny, angiotensyny II i aldosteronu w osoczu u chorych z pierwotnym PKZN.
5. Wykazanie czy obecność wybranych 10 polimorfizmów genów *ACE*, *AGT*, *AGTR1*, *ATP6AP2*, *CMA1*, *CYP11B2* i *REN* kodujących białka układu RAA wiąże się z zachorowaniem na pierwotne PKZN.

3. Materiał

3.1. Grupa badania

Badania oceniające związek składowych układu RAA z obrazem klinicznym i nasileniem zmian morfologicznych w nerkach przeprowadzono u 55 nieleczonych pacjentów ze świeżo rozpoznanym pierwotnym przewlekłym kłębuszkowym zapaleniem nerek (PKZN), potwierdzonym w badaniu biopsyjnym nerki. Kryteriami wyłączenia z badania były otyłość, cukrzyca i aktywne zakażenie. Chorzy wykazywali następujące postaci morfologiczne PKZN: nefropatia IgA (IgAN) (n = 17), mezangialne rozplemowe PKZN (nie będące nefropatią IgA, MesPGN) (n = 16), błoniasto – rozplemowe PKZN (MPGN) (n = 3), submikroskopowe PKZN (minimal change disease, MCD) (n = 2), nefropatia błoniasta (MN) (n = 8) oraz ogniskowe i segmentalne stwardnienie kłębuszków nerkowych (FSGS) (n = 4). U 5 chorych wynik biopsji był niediagnostyczny. Ze względu na ograniczoną liczbę chorych wyodrębniono 2 grupy: z proliferacyjnymi (IgAN, MesPGN, MPGN; n = 36) i nieproliferacyjnymi postaciami PKZN (MN, FSGS, MCD; n = 14).

W badanej grupie było 24 mężczyzn i 31 kobiet, w wieku $39,9 \pm 14,8$ lat, nieleczonych hipotensyjnie i immunosupresyjnie. Oceniono u nich: wartość BMI, wielkość białkomoczu, stężenie kreatyniny w surowicy, oszacowaną filtrację kłębuszkową (eGFR ze wzoru MDRD), stężenie proreniny, reniny, angiotensyny II i aldosteronu w osoczu oraz wydalanie TGF β 1 z moczem. Aby wykluczyć ewentualny wpływ diety (spożycia chlorku sodu) na stężenia oznaczanych składowych układu RAA oznaczono również wydalanie sodu w dobowej zbiorce moczu. Przeprowadzono całodobowy pomiar ciśnienia tętniczego umożliwiający rozpoznanie nadciśnienia tętniczego i zaburzeń jego rytmu (zjawisko non – dipping). W ramach badania patomorfologicznego oceniono stopień włóknienia śródmiąższu i zakres sklerotyzacji kłębuszków nerkowych w materiale biopsyjnym nerki. W zależności od wielkości filtracji kłębuszkowej kwalifikowano chorych ze świeżo rozpoznanym pierwotnym PKZN do 5 stadiów PChN, wg wytycznych NKF [290]. W stadium 1 (eGFR ≥ 90 ml/min/1,73 m²) było 38 chorych, w 2 (eGFR 60 - 89 ml/min/1,73 m²) 10 chorych i w stadium 3 (eGFR 30 - 59 ml/min/1,73 m²) 7 chorych. Nie było chorych w stadium 4 i 5 PChN. Zespół nerczycowy (ZN) rozpoznano u 18 chorych, u pozostałych 37 chorych (BZN) rozpoznano białkomocz nienerczycowy (< 3,5 g/dobę) z erytrocyturią lub bez. Nadciśnienie tętnicze (NT) występowało u 21 chorych. Zaburzenia dobowego rytmu ciśnienia tętniczego rozpoznano u 33 chorych (grupa non – dippers), z czego u 13 chorych z nadciśnieniem tętniczym i u 20 bez nadciśnienia tętniczego (BNT). Średnie wydalanie sodu z moczem mieściło się

w granicach normy laboratoryjnej (N = 25 – 125 mmol/dobę). W badaniu morfologicznym nerek oceniono odsetek zmienionych sklerotycznie kłębuszków nerkowych dzieląc chorych na dwie grupy – ze sklerotyzacją globalną obejmującą $\leq 30\%$ kłębuszków (S $\leq 30\%$, n= 47) i $> 30\%$ (S $> 30\%$, n = 8). Analizując nasilenie włóknienia w tkance śródmiąższowej metodą półilościową wyróżniono 2 grupy chorych z brakiem lub niewielkimi ogniskami włóknienia (F 1, n = 41) oraz z umiarkowanym lub nasilonym włóknieniem (F 2, n = 14). Charakterystykę tej grupy chorych przedstawiono w Tabeli 1A.

Tabela 1A. Charakterystyka chorych ze świeżo rozpoznanym pierwotnym PKZN

Chorzy ze świeżo rozpoznanym pierwotnym PKZN (n = 55)	
Płeć (mężczyźni/kobiety)	24/31
Wiek (lata)	39,9 \pm 14,8 (34; 21 – 71)
BMI (kg/m ²)	24,8 \pm 3,6
Postać morfologiczna PKZN:	
IgAN (n)	17
MesPGN(nie IgA) (n)	16
MPGN (n)	3
MCD PKZN (n)	2
MN (n)	8
FSGS (n)	4
wynik biopsji niediagnostyczny	5
Stężenie kreatyniny w surowicy (mg/dl)	0,75; 0,44 – 1,77
eGFR wg MDRD (ml/min/1,73m ²), stadium PChN	
1 (n = 38)	111,8; 90 – 177,3
2 (n = 10)	75,6; 60,0 – 86,5
3 (n = 7)	51,6; 46 – 58,7
Wielkość białkomoczu (g/dobę)	
u chorych z zespołem nerczycowym (n = 18)	7,85; 3,64 – 35,13
u chorych bez zespołu nerczycowego (n = 37)	1,24; 0,3 – 3,0
Wydalenie sodu z moczem (mmol/dobę)	99; 50 – 153
Chorzy z nadciśnieniem tętniczym (n = 21)	dippers (n = 8)
	non-dippers (n = 13)
Chorzy bez nadciśnienia tętniczego (n = 34)	dippers (n = 14)
	non-dippers (n = 20)
Sklerotyzacja kłębuszków	S1 $\leq 30\%$ (n = 47)
	S2 $> 30\%$ (n = 8)

Włóknienie tkanki śródmiąższowej	F1 (n =41), F2 (n = 14)
---	-------------------------

n – liczba chorych; wartości wyrażono przez średnie i odchylenia standardowe oraz mediany z minimum i maximum

Badania genetyczne przeprowadzono u 148 pacjentów, włączając 55 scharakteryzowanych powyżej chorych, (85 mężczyzn i 63 kobiet) w wieku $40,3 \pm 14,3$ lat z potwierdzonym biopsyjnie pierwotnym PKZN. Uwzględniając obraz histologiczny bioptatu nerki wyróżniono 6 grup chorych: z IgAN (n = 29), MesPGN (nie będącym IgAN) (n = 49), MPGN (n = 5), MCD (n = 4), MN (n = 27) oraz FSGS (n = 24). U 9 chorych wynik biopsji był niediagnostyczny. U wszystkich chorych (n = 148), niezależnie od stadium przewlekłej choroby nerek (PChN) i stosowanego leczenia (w tym również nerkozastępczego) przeprowadzono analizę 10 polimorfizmów genów kodujących białka układu RAA: *ACE*, *AGT*, *AGTR1*, *ATP6AP2*, *CMA1*, *CYP11B2* oraz *REN*. Materiałem do analiz było genomowe DNA izolowane z krwi obwodowej. Charakterystykę tej grupy chorych przedstawiono w Tabeli 1B.

Tabela 1B. Charakterystyka chorych z pierwotnym PKZN, u których wykonano genotypowanie polimorfizmów genów kodujących białka układu RAA

Charakterystyka chorych z pierwotnym PKZN (n = 148)	
Płeć (mężczyźni/kobiety)	85/63
Wiek (lata)	40,3 ± 14,3 (38; 19 – 71)
Postać morfologiczna PKZN:	
IgAN (n)	29
MesPGN (nie IgA) (n)	49
MPGN (n)	5
MCD (n)	4
MN (n)	27
FSGS (n)	24
wynik biopsji niediagnostyczny (n)	9

3.2. Grupa kontrolna

Grupę kontrolną do badań genetycznych stanowiły 193 zdrowe osoby (97 mężczyzn i 96 kobiet) w wieku $30,0 \pm 8,5$ lat. Do badań stężenia proreniny, reniny, angiotensyny II i aldosteronu w osoczu oraz wydalanie TGF β_1 w moczu wybrano dodatkowo 20 zdrowych osób (10 mężczyzn i 10 kobiet) w wieku $36,8 \pm 9,3$ lat, nieróżniących się wartością BMI od grupy badanej. Za osobę zdrową uznano osobę bez pierwotnych i wtórnych chorób nerek, chorób układu sercowo – naczyniowego, otyłości, cukrzycy i chorób układowych oraz niepobierającą żadnych leków.

4. Metody

4.1. Pobieranie, obróbka i przechowywanie materiału biologicznego

Krew pobierano rano, na czczo, w pozycji siedzącej z żyły odłokciowej w ilości 10,2 ml (1 probówka 7,5 ml z heparyną sodową, 1 probówka 2,7 ml z EDTA). Surowicę i osocze uzyskiwano w standardowym wirowaniu (1000 x g przez 5 minut). Do czasu oznaczeń próby przechowywano w temperaturze – 20 °C (badania genetyczne, renina, prorenina, aldosteron) i - 70° (Ang II).

Poranny mocz pobierano do jałowych pojemników. Bezpośrednio po pobraniu mocz wirowano w warunkach standardowych, a uzyskany supernatant przechowywano w temperaturze – 20 °C do czasu wykonania oznaczeń.

4.2. Badania biochemiczne

4.2.1. Stężenie kreatyniny w surowicy (mg/dl) oraz wydalanie sodu z moczem (mmol/dobę) oznaczono standardowo w Centralnym Laboratorium Analityczno – Biochemicznym SK nr 2 w Poznaniu przy użyciu analizatora COBAS INTEGRA 400 plus firmy Roche. Filtrację kłębuszkową oszacowano na podstawie wzoru MDRD, w którym $eGFR$ (ang. estimated glomerular filtration rate, ml/min/1,73 m²) = $186,3 \times Scr$ (mg/dl)^{-1,154} x wiek (lata)^{-0,203} x 0,742 dla kobiet.

4.2.2. Wielkość białkomoczu określono jako dobowe wydalanie białka (TPUR, g/dobę). Zastosowano metodę immunoturbidymetryczną przy użyciu analizatora COBAS INTEGRA 400 plus firmy Roche, norma < 0,15 g/dobę.

4.2.3. Stężenie proreniny, Ang II i aldosteronu w osoczu (ng/ml) i TGFβ1 w moczu oznaczono metodą immunoenzymatyczną (ELISA) przy użyciu spektrofotometru Victor 2 (prorenina - zestaw firmy BioVendor, Ang II i aldosteron – firmy DRG, TGFβ1 zestaw R&D System firmy BIOCOM). Wielkość wydalania TGFβ1 z moczem przedstawiono w przeliczeniu na 1 mg kreatyniny w moczu (pg/mg kreatyniny).

4.2.3.1. Procedura ogólna oznaczania stężenia proreniny, Ang II i aldosteronu w osoczu (ng/ml) oraz TGFβ1 (pg/ml) w moczu.

Badania przeprowadzono na płytkach 96 - dołkowych opłaszczonych przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko odpowiednio: proreninie, Ang II, aldosteronowi i TGFβ1. Do każdej mikrostudzienki nanoszono standardy (wzorce), kontrole oraz osocze lub mocz wraz z odpowiednim roztworem do rozcieńczeń zgodnie z instrukcjami poszczególnych zestawów. Następnie dodawano odczynnik zawierający przeciwciała detekcyjne sprzężone

z biotyną. Po inkubacji płytki przez 2 godz. pod szczelnym przykryciem w temperaturze pokojowej (20 – 25 °C) przemywano dołki trzykrotnie buforem płuczającym w celu usunięcia nadmiaru przeciwciał detekcyjnych. Płukanie płytki przeprowadzono przy użyciu płuczki automatycznej. W kolejnym etapie badania dodawano do mikrostudzienek streptawidynę sprzężoną z peroksydazą chrzanową (*ang. horseradish peroxidase*, HRP). Po drugiej, półgodzinnej inkubacji i trzech cyklach przemywania płytki dodawano substrat dla peroksydazy chrzanowej (tetrametylobenzzydina, TMB). Po 30 minutowej inkubacji zatrzymywano reakcję za pomocą odczynnika blokującego zawierającego kwas siarkowy lub solnym. Absorbancję danego produktu reakcji enzymatycznej mierzono przy pomocy spektrofotometru przy długości fali 450 nm. Dane zostały przetworzone za pomocą zainstalowanego w spektrofotometrze programu Multi Calc. Wartości stężeń proreniny, Ang II i aldosteronu w osoczu oraz TGFβ1 w moczu ustalano na podstawie krzywych wzorcowych. Wielkość wydalania TGFβ1 z moczem wyrażono jako stosunek ilości TGFβ1 (pg) na 1 g kreatyniny w moczu (pg/g kreatyniny).

4.2.4. Stężenie reniny w osoczu (pg/ml) oznaczono metodą radioimmunologiczną (RIA) zestawem firmy DRG, przy użyciu licznika prom-gamma firmy LKB.

4.2.4.1 Procedura oznaczania reniny w osoczu

Do próbek opłaszczonych przeciwciałem monoklonalnym przeciw ludzkiej reninie dodawano 300 µl: standardu, kontroli oraz badanych prób osocza. Następnie do każdej z próbek dodawano po 100 µl znacznika reniny znakowanego ¹²⁵I. Probówki inkubowano przez 3 godz. w temperaturze pokojowej (ze wstrząsaniem 350 rpm). Dekantowano. Następnie do każdej próbki dodawano 2 µl roztworu płuczającego i dekantowano. Procedurę powtarzano dwukrotnie. Pomiar radioaktywności izotopu promieniotwórczego oznaczanych prób mierzono przy pomocy licznika promieni gamma. Wartości stężeń reniny w osoczu ustalano na podstawie krzywych wzorcowych.

4.2.5 Wskaźnik renina/prorenina wyliczono jako iloraz stężenia w osoczu reniny i proreniny.

4.3. Pomiar i analiza ciśnienia tętniczego

Ciśnienie tętnicze analizowano na podstawie całodobowej rejestracji ciśnienia tętniczego. Pomiary ciśnienia tętniczego przeprowadzono na ramieniu niedominującej kończyny górnej przy użyciu aparatu TM-2430 (firmy A&D). Aparat rejestrował wartości ciśnienia tętniczego co 15 minut podczas czuwania (godz. 6.00 – 22.00) i co 30 min w czasie snu (godz. 22.00 – 6.00). Chorzy byli poinformowani o konieczności snu w pozycji „na wznak”, po to by wykluczyć zwwyżki ciśnienia tętniczego na jednym z ramion przy pozycji „na boku”. Analizę wyników uzyskano za pomocą modułu ABP TM-2430 zainstalowanego w komputerze, otrzymując średnie wartości dobowego, dziennego i nocnego ciśnienia skurczowego (SBP, systolic blood pressure) oraz rozkurczowego (DBP, diastolic blood pressure). Nadciśnienie

tętnicze rozpoznawano, gdy średnie ciśnienie tętnicze w ciągu doby było $\geq 130/80$ mmHg lub średnie ciśnienie w czasie czuwania $> 135/85$ mm Hg, lub średnie ciśnienie w ciągu nocy $> 120/70$ mmHg (wg aktualnych zaleceń ESH i ESC). Zaburzony dobowy rytm ciśnienia tętniczego rozpoznawano, gdy spadek ciśnienia skurczowego i rozkurczowego w ciągu nocy był $< 10\%$ w stosunku do ciśnienia w ciągu dnia (non - dipping). Prawidłowy dobowy rytm ciśnienia tętniczego (dipping), gdy spadek ciśnienia skurczowego i rozkurczowego w ciągu nocy był $\geq 10\%$ w stosunku do ciśnienia w ciągu dnia. Procent obniżenia ciśnienia skurczowego i rozkurczowego w nocy w stosunku do wartości w ciągu dnia obliczono wg wzoru: $\text{obniżenie SBP lub DBP (\%)} = (\text{SBP lub DBP dzienne} - \text{SBP lub DBP nocne}) \times 100 / \text{SBP lub DBP dzienne}$.

4.4. Ocena patomorfologiczna bioptatów nerki

Przezskórną biopsję nerki wykonano w Klinice Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Szpitala Klinicznego im. Heliodora Świącickiego w Poznaniu. Ocena histologiczna materiału biopsyjnego w mikroskopie świetlnym została przeprowadzona w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, a badanie immunopatologiczne w Katedrze i Zakładzie Immunologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Na podstawie wyników opisowych biopsji nerki oceniano odsetek zmienionych sklerotycznie kłębuszków nerkowych dzieląc chorych na dwie grupy – ze sklerotyzacją kłębuszków obejmującą $\leq 30\%$ (S1) i $> 30\%$ (S2). Nasilenie włóknienia tkanki śródmiąższowej (F) oceniono metodą półilościową. Zmiany klasyfikowano jako brak lub niewielkie ogniska włóknienia (F1) lub umiarkowane i nasilone włóknienie (F2).

4.5. Badania molekularne

4.5.1 Kryteria wyboru genów i ich wariantów polimorficznych

W wyborze 10 polimorfizmów (Tabela 2) pojedynczego nukleotydu (SNP) 7 genów kandydackich kodujących białka układu RAA (*AGT*, *AGTR1*, *ATP6AP2*, *CMA1*, *CYP11B2*, *REN*) kierowano się następującymi kryteriami: a) udowodniony związek z pierwotnym PKZN lub aktywnością układu RAA, b) położenie w lub w pobliżu rejonów kodujących (eksonów) oraz regionów regulatorowych danego genu, c) funkcjonalność polimorfizmu tzn. wpływ na poziom ekspresji genu lub funkcjonalność kodowanego białka, d) częstość allelu rzadszego (ang. minor allele frequency, MAF) nie mniejsza niż 0,2 (20%) w populacji kaukaskiej, e) wyniki analizy map sprzężeń zamieszczonych na stronie Międzynarodowego Projektu HapMap, które pozwalają identyfikować geny wykazujące związek z daną chorobą poprzez analizę niewielkiej liczby SNP'ów (Rycina 5). W mapach sprzężeń wykorzystywana jest

metoda oparta na sprzężeniach między polimorfizmami (ang. Linkage disequilibrium LD-approach).

Rycina 5. Przykładowa mapa sprzężeń między polimorfizmami genu *REN*

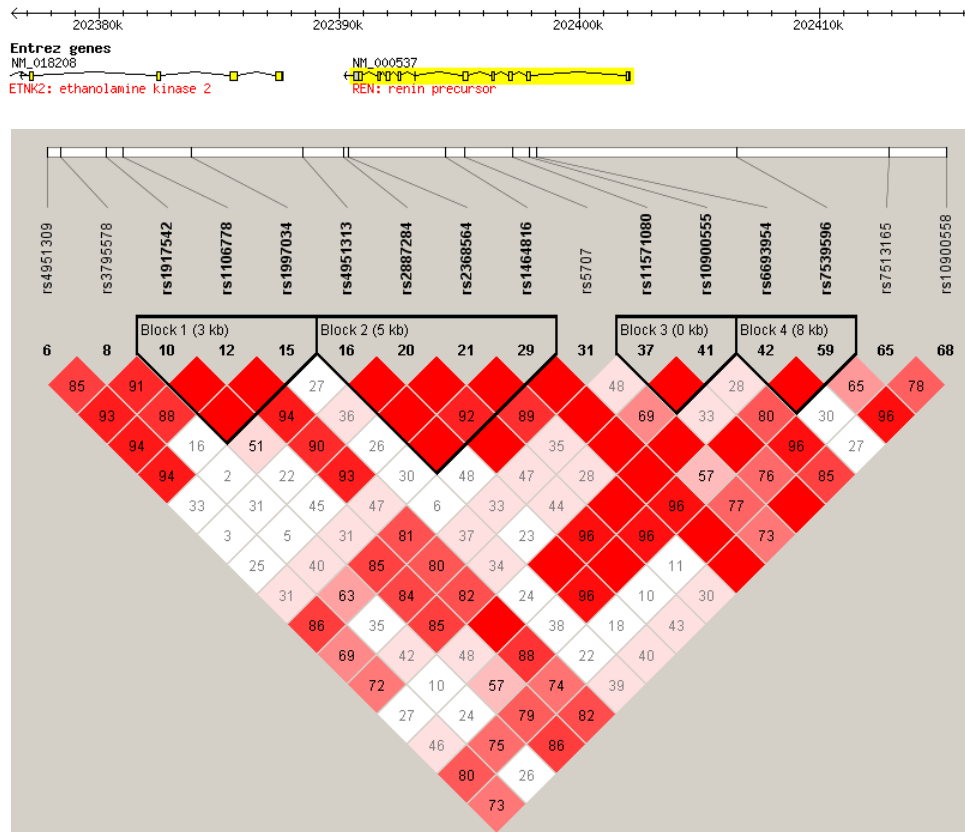


Tabela 2. Szczegółowa charakterystyka polimorfizmów genów układu RAA wybranych do analiz

Gen	Kodowane białko	Numer polimorfizmu	Inne nazwy polimorfizmu	Lokalizacja	Funkcja polimorfizmu ¹	Allele ²	MAF ³
ACE	Konwertaza angiotensyny ACE1	rs4646994	(289BP ALU)/-	17q23.3	intron	D/i ⁴	0,49
AGT	Angiotensynogen	rs699	g.9543T>C; c.803T>C	1q42.2	mutacja niesynomiczna (Met268Thr)	c/T	0,48
AGTR1	Receptor typu 1 dla angiotensyny II (ATR ₁)	rs2971597	g.49331A>C; c.*86A>C	3q24	3'UTR	A/c	0,27
ATP6AP2	Receptor proreniniowo – reninowy (P)RR	rs2968917	g.7603C>T; c.37+2464C>T	Xp11.4	intron	c/T	0,13
		rs2971597	g.3335699T>C	Xp11.4	brak danych	c/T	0,36
CMA1	Chymaza	rs1885108	c.346-21A>G; g.5975509T>C	14q12	intron	a/G	0,20
		rs1956923	g.5977967G>A	14q12	promotor	C/t	0,28
CYP11B2	Synataza aldosteronowa	rs1799998	g.4660T>C; g.57273149A>G	8q24.3	promotor	c/T	0,46
REN	Prorenina	rs11571080	g.8835A>G; c.99-340A>G	1q32.1	intron	A/g	0,29
		rs2368564	g.15601G>A; c.1059+83G>A	1q32.1	intron	C/t	0,26

¹według bazy danych Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP), NCBI

²małą literą oznaczono allel rzadszy w grupie kontrolnej

³częstość allelu rzadszego w grupie kontrolnej (MAF, minor allele frequency)

⁴i, allel z insercją, D, allel z delecją

4.5.2. Izolacja genomowego DNA z krwi obwodowej

DNA genomowe wyizolowano ze świeżej lub mrożonej krwi obwodowej. Krew pobierano do strzykawko – probówek z EDTA. Izolację przeprowadzono stosując metodę wysalania lub korzystając z zestawu AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit firmy Axygen (izolacja genomowego DNA z małych ilości krwi obwodowej do 100 µl). Procedura izolacji DNA metodą wysalania:

- Do 2,5 ml krwi dodano 7,5 ml buforu do lizy i inkubowano na lodzie przez 60 min., wielokrotnie mieszając.
- We wcześniej schłodzonej wirówce (4°C) mieszaninę odwirowano przez 15 min. przy 4000 obr./min., supernatant usunięto, a do pozostałego osadu dodano 2,5 ml roztworu do lizy, po czym ponownie zwirowano przez 15 min przy 3000 obr./min. Procedurę powtarzano, w zależności od jakości krwi, 4 – 5 razy.
- Pozostały osad zawieszono w 1,25 ml buforu SE, następnie dodano 124 µl SDS oraz 6,25 µl roztworu proteinazy K, dokładnie wymieszano i inkubowano przez 16 h w temp. 55°C.
- Po inkubacji dodano 0,375 ml NaCl i wirowano w temp. pokojowej przez 15 min. przy 3000 obr./min.
- Supernatant ostrożnie przeniesiono do nowej probówki, dodano 0,375 ml NaCl i wirowano w 20°C przez 15 min. przy 3000 obr./min., procedurę powtórzono dwukrotnie.
- Supernatant przeniesiono do nowej probówki i wytrącono DNA dwiema objętościami 96% etanolu. Wytrącony DNA przeniesiono do probówki typu eppendorf i dwukrotnie przemyto 500 µl 70% etanolu. Po wysuszeniu osad rozpuszczono w 500 µl jałowej wody dejonizowanej (mQ).
- Jakość i stężenia DNA zostało ocenione elektroforetycznie w 1% żelu agarozowym.

4.5.3. Amplifikacja fragmentów genów *ACE*, *AGT*, *AGTR1*, *ATP6AP2*, *CMA1*, *CYP11B2*, *REN*

Wybrane fragmenty obejmujące warianty polimorficzne badanych genów były amplifikowane przy użyciu metody PCR wykorzystującej reakcję łańcuchową polimerazy DNA (ang. polymerase chain reaction). Cykl reakcji obejmuje następujące etapy: 1) denaturacji dwuniciowego DNA w temp. 95°C, 2) przyłączania startera (annealing), 3) polimeryzacji (syntezy DNA) w 72°C.

Sekwencje starterów do amplifikacji fragmentów genów *AGT*, *AGTR1*, *ATP6AP2*, *CMA1*, *CYP11B2*, *REN* zostały zaprojektowane w programie PRIMER3, a dla genu *ACE* obejmującego polimorfizm rs4646994 zaczerpnięte z publikacji Schena i wsp. [art.53]. Sekwencje starterów służących do amplifikacji w/w genów, długości amplifikowanych

fragmentów oraz temperatury przyłączania starterów, które ustalono poprzez wykonanie PCR w gradiencie temperatur (45 - 68°C), przedstawiono w Tabeli 3.

Reakcje amplifikacji fragmentów genomowego DNA metoda PCR prowadzono w objętości 15 µl. Skład mieszaniny reakcyjnej zamieszczono w Tabeli 4. Reakcje były prowadzone zgodnie z profilem temperaturowo – czasowym podanym w Tabeli 5.

Tabela 3. Charakterystyka starterów do amplifikacji fragmentów genów *ACE*, *AGT*, *AGTR1*, *ATP6AP2*, *CMA1*, *CYP11B2*, *REN*

Gen	Numer polimorfizmu	Startery do amplifikacji PCR (5' – 3')	Temperatura przyłączania startera (°C)	Długość produktów PCR (pz)
<i>ACE</i>	rs4646994	F: CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT ¹ R: GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT	66,0	190/490
<i>AGTR1</i>	rs5186	F: TTTACTGCCCTTTGGAACTG R: CCCACTCAAACCTTTCAACAA	66,3	529
<i>ATP6AP</i>	rs2968917	F: CTCCCAGGGCTAATGTGTTG R: AGTGGCTGGAATCAGTCGTC	62,6	467
<i>CMA1</i>	rs1885108	F: GGAAGAAGACACATGGCAGAA R: GTTGGAGGATCACCTTAAATGC	67,0	551
<i>CMA1</i>	rs1956923	F: GATAGGGTTGCCGTGAAAGT R: GAAAGGAACTTGAGCCCTGA	66,3	603
<i>CYP11B2</i>	rs1799998	F: GATCGGAGATGTCAGGGACT R: TCCAGGGCTGAGAGGAGTAA	66,0	416
<i>REN</i>	rs11571080	F: CCAGCCCCTAGTTTTGACAG R: CGTCCATGTAGTTGGTGAGG	66,0	633
<i>REN</i>	rs2368564	F: GAATCACCTGGGGAACTGA R: R: CTTGCTTGTTCACCTCACA	66,0	493

¹startery na podstawie publikacji

Tabela 4. Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji fragmentów genów metodą PCR

Skład mieszaniny	Stężenie wyjściowe	Objętość
bufor (zawiera 20mM MgCl ₂)	10X	1,5 µl
dNTPs	10 mM	0,2 µl
starter przedni (F)	25 pmol/µl	0,3 µl
starter tylny (R)	25 pmol/µl	0,3 µl
polimeraza ¹	5 µg/µl	0,15 µl
woda mQ	---	11,55 µl
matryca	5 µg/µl	1 µl
objętość końcowa		15 µl

¹DreamTaq Green DNA firmy Fermentas lub KAPATaq firmy KAPABiosystems

Tabela 5. Profil temperaturowo – czasowy metody PCR

95°C 5 minut	94°C 30 sekund	temp. przyłączania starterów (°C) 30 sekund	72°C 30 sekund	72°C 5 minut
ilość cykli: 35				

Po zakończeniu amplifikacji badanych fragmentów, otrzymane produkty reakcji były rozdzielane elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny w buforze 1 x TBE przy napięciu 170 V. Analizę rozdzielonych fragmentów przeprowadzono w świetle UV w obecności wzorca wielkości.

4.5.4. Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (*ang. Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP*)

Amplifikację odpowiednich fragmentów analizowanych genów wykonano zgodnie z opisem zawartym w rozdziale 4.4.2. Trawienie prowadzono w objętości końcowej 20 µl stosując następujący skład mieszaniny reakcyjnej:

produkt reakcji PCR	5 µl
bufor 10x	2 µl
enzym (10 U/µl)	0,1 µl
woda mQ	12,9 µl
<hr/>	
objętość końcowa 20 µl	

Reakcję prowadzono w temp. 37°C przez noc. Wyjątek stanowił enzym Tail, dla którego temperatura inkubacji wynosiła 65°C. Następnie DNA frakcjonowano w 2 % żelu agarozowym. Szczegółowe dane dotyczące prowadzonych reakcji RFLP – stosowane enzymy oraz długości fragmentów restrykcyjnych przedstawiono w Tabeli 6.

Tabela 6. Szczegóły analizy RFLP

Gen	Numer polimorfizmu	Enzym restrykcyjny	Allele ¹	Długości fragmentów restrykcyjnych (pz)	
				Genotyp [1][1] ²	Genotyp[2][2] ²
ACE	rs4646994	---	D/i ³	190	490
AGTR1	rs5186	HpyF3I C/TNAG	A/c	479 + 50	337 + 142 + 50
ATP6AP	rs2968917	Eco571 CTGAAG(16N)/	c/T	367 + 100	188 + 179 + 100
CMA1	rs1885108	Eco471 G/GWCC	a/G	396 + 155	288 + 155 + 108
CMA1	rs1956923	Tail ACGT/	C/t	266 + 193 + 144	459 + 144
CYP11B2	rs1799998	HaeIII GG/CC	c/T	356 + 60	416
REN	rs11571080	MscpI C/CGG	A/g	359 + 274	359 + 140 + 134
REN	rs2368564	MboI /GATC	C/t	493	350 + 143

¹allel rzadszy oznaczony małą literą; ²[1], allel 1; [2], allel 2; ³i, allel z insercją, D, allel z delecją

4.5.5. Wysokorozdzielcza analiza temperatury topnienia produktów PCR (*ang. High – Resolution Melting, HRM*)

Genotypowanie polimorfizmów: genu *AGT* i *ATP6AP2* genu przeprowadzono z pomocą krzywej topnienia dwuniciowych fragmentów DNA z wykorzystaniem zestawu Hot FirePol EvaGreen HRM Mix firmy Solis BioDyne. Szczegóły analizy HRM, skład mieszaniny reakcyjnej, protokół temperaturowo – czasowy zamieszczono w Tabelach 7, 8, 9.

Tabela 7. Szczegóły analizy HRM

Gen	Numer polimorfizmu	Startery do amplifikacji PCR (5' – 3')	Temperatura przyłączenia startera (°C)	Długość produktów PCR (pz)	Przedział temp. topnienia (°C)
AGT	rs699	F: CAGGTTTCATGCAGGCTGTGA R: GTTGAAAGCCAGGGTGCTGT	64,9	82	80 - 90
ATP6AP	rs2971597	F: TGCCATCAACCCTGGATTCT R: TGTTGACCACTGACCCCTCA	60,6	164	78 - 87

Tabela 8. Skład mieszaniny reakcyjnej metody HRM

Składniki mieszaniny reakcyjnej	Stężenie wyjściowe	Objętość (µl)
woda mQ	-	6,84
master Mix	5X	2,00
starter przedni (F)	25 pmol/µl	0,08
starter tylny (R)	25 pmol/µl	0,08
matryca	5 µg/ µl	1,00

Tabela. 9. Profil temperaturowo – czasowy metody HRM

Temperatura	Czas	Ilość pomiarów
Pre - inkubacja		
95°C	15 minut	---
Amplifikacja		
95°C	10 sekund	x 50 cykli
temp. zależy od starterów	10 sekund	
72°C	15 sekund	
Topnienie produktu amplifikacji		
95°C	60 sekund	---
40°C	60 sekund	---
78°C	---	25/°C
90°C	---	25/°C
Chłodzenie		
40°C	10 sekund	---

Obecność poszukiwanych polimorfizmów potwierdzono wykonując sekwencjonowanie zamplifikowanych fragmentów genów dla prób wzorcowych.

4.5.6. Sekwencjonowanie DNA

Wykonanie sekwencjonowania DNA zlecono komercyjnie Instytutowi Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie na kapilarnym sekwenatorze ABI Prism 3730 (Applied Biosystems, USA) z zestawem ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA).

4.6. Odczynniki i materiały chemiczne

Agaroz (Prona, EU), alkohol etylowy (Polmos, Polska), bromek etydy (Sigma, USA), bufor do lizy pH 7,4 (155mM NH₄Cl; 10mM KHCO₃; 0,1 mM Na₂EDTA pH 8,0), bufor SE (75 mM NaCl, 9 mM Na₂EDTA pH 8,0), chlorek amonu (Sigma, USA), chlorek sodu (POCh, Polska), dNTPs mix (10nM) (Fermentas, Litwa), EDTA (Sigma, USA), SDS (Koch-Light Laboratories, Niemcy), enzymy: proteinaza K20mg/ml (Fermentas, Litwa), polimeraza DNA DreamTaq Green (Fermentas, Litwa), polimeraza KAPATaq (KAPABiosystem, RPA), enzymy restrykcyjne: Eco47I, Eco57I, HaeIII, HpyF3I, MboI, MspI, PvuII, Tail, (Fermentas, Litwa), startery do PCR (Oligo, Polska), TBE 10 x (labnet, Polska), zestawy: EZ-10 Spin Column DNA, Gel Extraction Kit (BioBasic Inc, USA), Hot FirePolEvaGreen HRM Mix (Solis BioDyne, Estonia), Human Prorenin ELISA (BioVendor, USA), DRG Aldosterone ELISA (DRG, Niemcy), DRG Angiotensin II (DRG, Niemcy), Renin IRMA (DRG, Niemcy), Quantikine Human TGF-β1 R&D System (BIOCOM, UK), żele agarozowe (1,5 – 2 %).

4.7. Aparatura

Analizator COBAS INTEGRA 400 plus (Roche, Szwajcaria), analizator TM-2430 (A&D, Japonia), aparat do elektroforezy agarozowej (Labnet, Polska), aparat do elektroforezy agarozowej (Max fill Bio com, USA), CFX96 RealTime System (Biorad, Polska), ciepłarka Robbins Scientific 100 (SyngenBiotech, Polska), licznika prom-gamma (LKB Biotech, Polska), mieszadło wirowe Magnetic stirre MSH – 300 (Biosan, USA), mini wirówka klasyczna (Eppendorf, Austria), spektrofotometr Victor 2 (Wallac, USA), strzykawko – probówki z EDTA i heparyną sodową, termocykler DNA C100 Thermal Cycler (Biorad, USA), termocykler DNA Multigene (Labnet, Polska), term blok HB – 1 (Wealtec, USA), termomixer (Eppendorf, Austria), tipsy jednorazowe, waga laboratoryjna (RadWag, Polska), wirówka wielozadaniowa z chłodzeniem 5804R (Eppendorf, Austria), zasilacz do elektroforezy 250EX (Life Technologies, USA), zestaw pipet automatycznych jedno- i wielokanałowych (Eppendorf, Austria).

4.8. Oprogramowanie komputerowe oraz biologiczne bazy danych

- GraphPad In Stad 3.0.1
- Genome tester 1.3
- Finch TV 1.4
- Microsoft Exel 2009
- Microsoft Word 2009
- Moduł ABP T 2430
- Statistica (StatSoft, Polska)
- Printer3 input
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> – National Center for Biotechnology Information (PubMed, OMIM, SNP, Blast)
- <http://genome.ucsc.edu> – UCSC Genome Biotransformatics (genome Browser, Blast)
- <http://www.ensembl.org> – Ensembl Genome Browser
- <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov> – International HapMap Project
- <http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html> - internetowa baza danych enzymów restrykcyjnych
- <http://bioinformatics.weizmann.ac.il/cards> - GeneCards Homepage
- <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2> -Webcutter 2.0, program analizujący miejsca restrykcyjne
- <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl> - Institute of Human Genetics, TU Monachium , Niemcy

4.9. Analizy statystyczne

4.9. 1. Badania układu RAA i analiza obrazu klinicznego pierwotnych PKZN

Analizowane dane przedstawiono w postaci wartości średnich z odchyleniem standardowym dla zmiennych z rozkładem normalnym ($X \pm SD$) oraz mediany z wartościami minimum

i maximum (min-max) oraz 25 i 75 percentyla (pierwszy i trzeci kwartyl; odpowiednio Q25 i Q75) dla zmiennych z brakiem rozkładu normalnego. Do sprawdzenia normalności rozkładu stosowano test Shapiro – Wilka ($p < 0,05$ brak rozkładu normalnego, $p \geq 0,05$ rozkład normalny). Do porównania zmiennych niezależnych z rozkładem normalnym stosowano test parametryczny t – studenta (istotne statystycznie wyniki, gdy $p < 0,05$), a dla zmiennych bez rozkładu normalnego test nieparametryczny U Manna – Whitneya (istotne statystycznie wyniki, gdy $p < 0,05$). Dla oceny korelacji między zmiennymi stosowano test Spearmana (korelacja istotna statystycznie, gdy $p < 0,05$). Współczynnik korelacji rangowej $r \approx 1$ oznacza silną dodatnią zależność monotoniczną (rosnącą), tj. wzrostowi zmiennej niezależnej odpowiada wzrost zmiennej zależnej; $r \approx -1$ oznacza silną ujemną zależność monotoniczną (malejącą), tj. wzrostowi zmiennej niezależnej odpowiada spadek zmiennej zależnej. Uzyskane wyniki zebrano w tabelach. Wyniki istotne statystycznie ($p < 0,05$) przedstawiono dodatkowo w postaci wykresów. Wartości p istotne statystycznie zaznaczono w tabelach tekstem pogrubionym. W celu jak najlepszego zobrazowania uzyskanych wyników na wykresach przedstawiano wartości jako mediany z min i max lub z 25 i 75 percentylem.

4.9.2. Badania molekularne

Do kalkulacji statystycznych wykorzystano program GraphPad InStat. Analiza statystyczna uzyskanych wyników polegała na porównaniu częstości alleli oraz genotypów pomiędzy grupą chorych z PKZN i grupą kontrolną (test χ^2 oraz test Fisher'a), a także na kalkulacji ilorazu szans (OR) przy uwzględnieniu odpowiednich przedziałów ufności (95%CI). Iloraz szans został policzony dla modelu recesywnego (nn vs Nn + NN) oraz dominującego (nn + Nn vs NN), gdzie „n” oznacza allel rzadszy. Wartość OR = 1 świadczy o braku związku danego polimorfizmu z PKZN, OR > 1 oznacza zwiększone ryzyko zachorowania (pozytywna asocjacja), natomiast OR < 1 zmniejszone ryzyko choroby (negatywna asocjacja). Związek danych polimorfizmów z PKZN został także sprawdzony przy pomocy testu Cochran-Armitage trend test. Wszystkie wyniki przyjęto za istotne statystycznie przy wartościach $p < 0,05$. Moc próby była liczona przy użyciu nieskorygowanego testu χ^2 (program Power and Sample Size Calculation Program wersja 2.1.31). Za istotną statystycznie uznawana była moc próby na poziomie $\geq 80\%$. Zgodność z prawem Hardy'ego–Weinberga w grupie chorych oraz grupie kontrolnej sprawdzono testem χ^2 . Analizy statystyczne wyników genotypowania dla polimorfizmów rs2968917 oraz rs2971597 zostały przeprowadzone osobno w grupie kobiet oraz w grupie mężczyzn. Podział na płeć wynikał z lokalizacji genu *ATP6AP2* na chromosomie X. Próby dla których uzyskano niejednoznaczne wyniki analiz molekularnych zostały wykluczone z kalkulacji statystycznych.

W celu sprawdzenia kooperatywnego udziału wybranych genów *ACE*, *AGT*, *AGTR1*, *ATP6AP2*, *CMA1*, *CYP11B2*, *REN* w etiologii pierwotnego PKZN przeprowadzono analizę interakcji między wybranymi polimorfizmami z wykorzystaniem metody MDR (ang. *Genetic Model-free Multifactor Dimensionality Reduction analysis*, MDR version 2.0 beta 5). Szczegółowy opis metody MDR jest dostępny na stronie internetowej <http://chgr.mc.vanderbilt.edu/ritchielab/method.php?method=mdr>. Wynik analizy MDR jest opisywany przez dwie wartości Testing Balanced Accuracy (TBA) oraz Cross Validation Consistency (CVC). TBA jest wartością wskazującą na ile precyzyjnie analiza MDR jest w stanie przewidzieć status chory / kontrola na podstawie analizy genotypów testowanych polimorfizmów. Przedział wartości dla TBA wynosi 0,5 - 1, gdzie 1 oznacza, że na podstawie genotypów na 100% można określić czy dana osoba jest chora na PKZN czy osobą zdrową. Wartości TBA > 0,55 uznaje się za statystycznie znaczące. CVC to wartość wskazująca ile razy dany 2-, 3- i 4-polimorficzny model został wybrany jako najlepszy model przewidujący status chory / kontrola po podziale analizowanych danych na 10 grup i przeprowadzeniu analizy MDR w każdej z nich. Wartości CVC powyżej 5 / 10 uważa się za statystycznie znaczące. Istotność statystyczną otrzymanych wyników sprawdzono z wykorzystaniem testu 1,000 permutacji przy użyciu programu MDR permutation testing module 0.4.9 alpha. Wynik analizy został uznany za istotny statystycznie dla wartości $p < 0,05$.

5. Wyniki

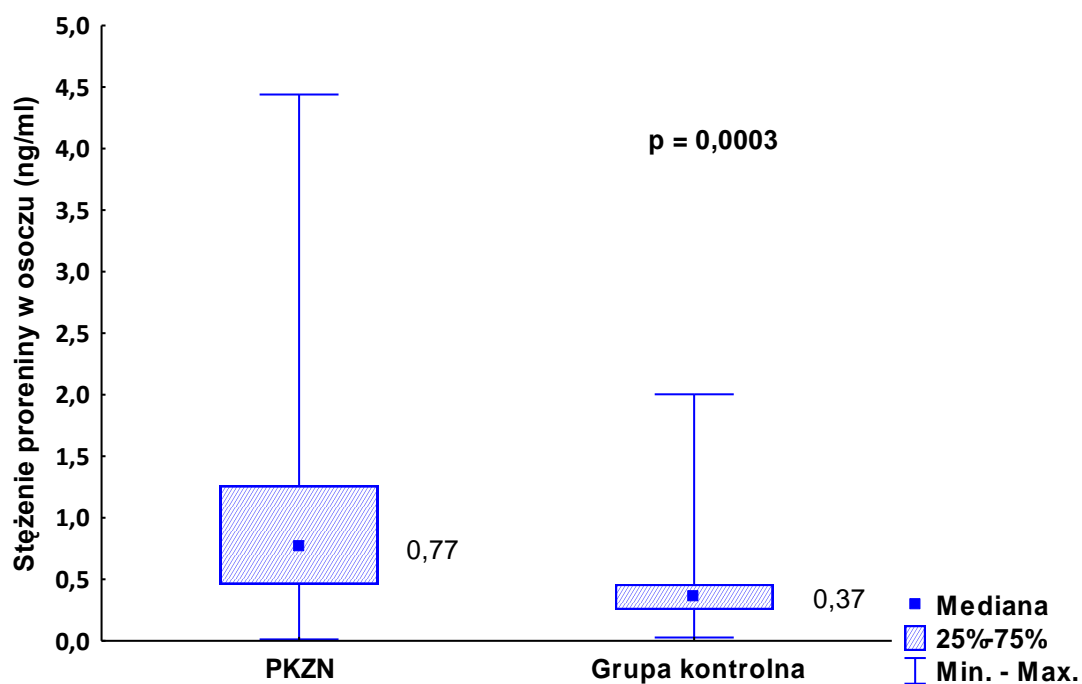
5.1. Oznaczenie i porównanie stężeń proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu oraz wielkości wydalania TGFβ1 z moczem u chorych ze świeżo rozpoznanym pierwotnym PKZN i w grupie kontrolnej

Uzyskane wyniki przedstawiono w Tabeli 10.

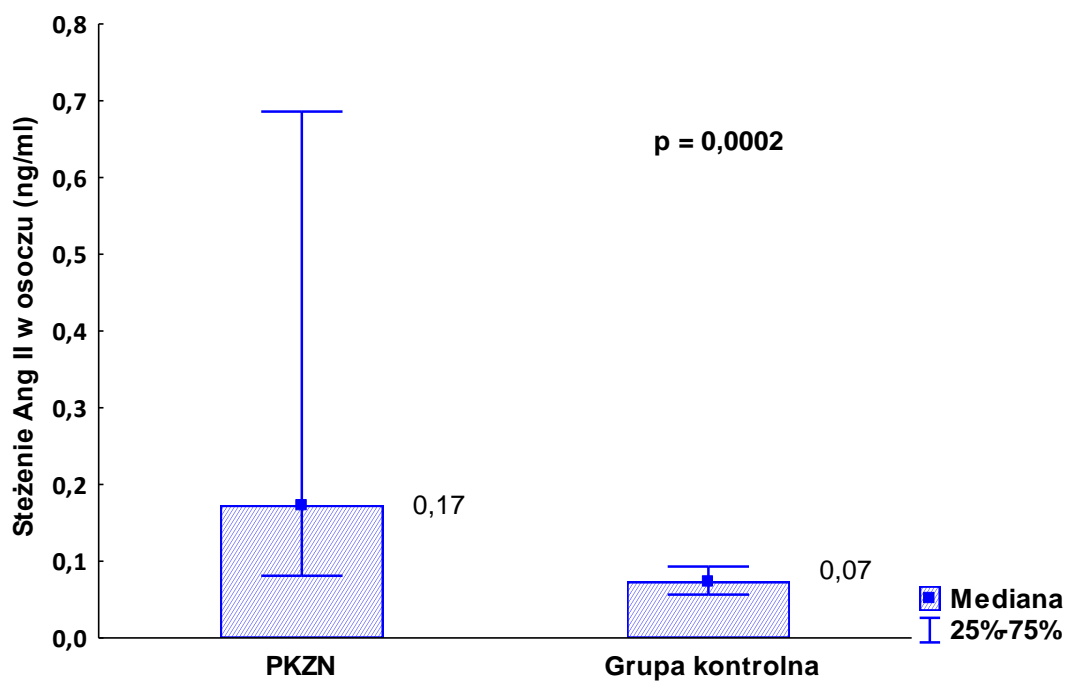
Grupa badana cechowała się istotnie wyższym stężeniem proreniny w osoczu niż grupa kontrolna (odpowiednio: 0,77; 0,01 - 4,44 ng/ml vs 0,37; 0,03 - 2,00 ng/ml, $p = 0,0003$), wyższym stężeniem Ang II w osoczu (odpowiednio: 0,17; 0,03 - 12,15 vs 0,07; 0,03 - 0,96, $p = 0,0002$) i większym wydalaniem TGFβ1 z moczem (odpowiednio: 41,67; 0,98 - 1561,20 pg/mg kreatyniny vs 7,83; 0,44 - 34,54 pg/mg Cr, $p = 0,00003$) (Rycina 6, 7 i 8). Nie wykazano różnicy stężeń reniny i aldosteronu w osoczu w obu grupach.

Tabela 10. Porównanie stężeń proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu oraz wielkości wydalania TGFβ1 z moczem u chorych ze świeżo rozpoznanym pierwotnym PKZN i w grupie kontrolnej

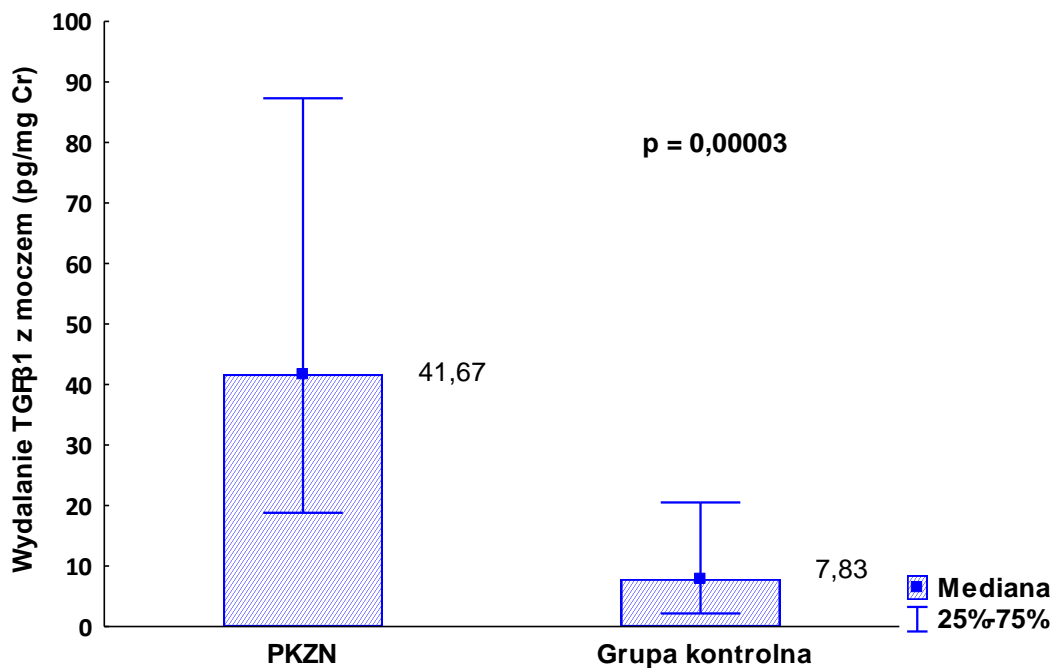
Badane parametry		PKZN	Grupa kontrolna	p
Prorenina (ng/ml)	Mediana	0,77	0,37	0,0003
	min – max	0,01 – 4,44	0,03 – 2,00	
	Q25 Q75	0,46 – 1,26	0,25 – 0,46	
Renina (pg/ml)	Mediana	9,97	10,21	0,84
	min – max	2,41 – 85,05	4,29 – 21,98	
	Q25 Q75	6,50 – 15,02	7,80 – 12,43	
Aldosteron (ng/ml)	Mediana	125,70	179,35	0,06
	min – max	33,50 – 960,20	47,60 – 716,70	
	Q25 Q75	90,60 – 188,40	114,75 – 271,00	
Ang II (ng/ml)	Mediana	0,1725	0,07	0,0002
	min – max	0,03 – 12,15	0,03 – 0,96	
	Q25 Q75	0,08 – 0,69	0,06 – 0,09	
TGFβ1 (pg/mg Cr)	Mediana	41,67	7,83	0,00003
	min – max	0,97 – 1561,20	0,44 – 34,54	
	Q25 Q75	18,81 – 87,31	2,17 – 20,52	



Rycina 6. Porównanie stężenia prolaktyny w osoczu u chorych ze świeżo rozpoznanym pierwotnym PKZN i w grupie kontrolnej



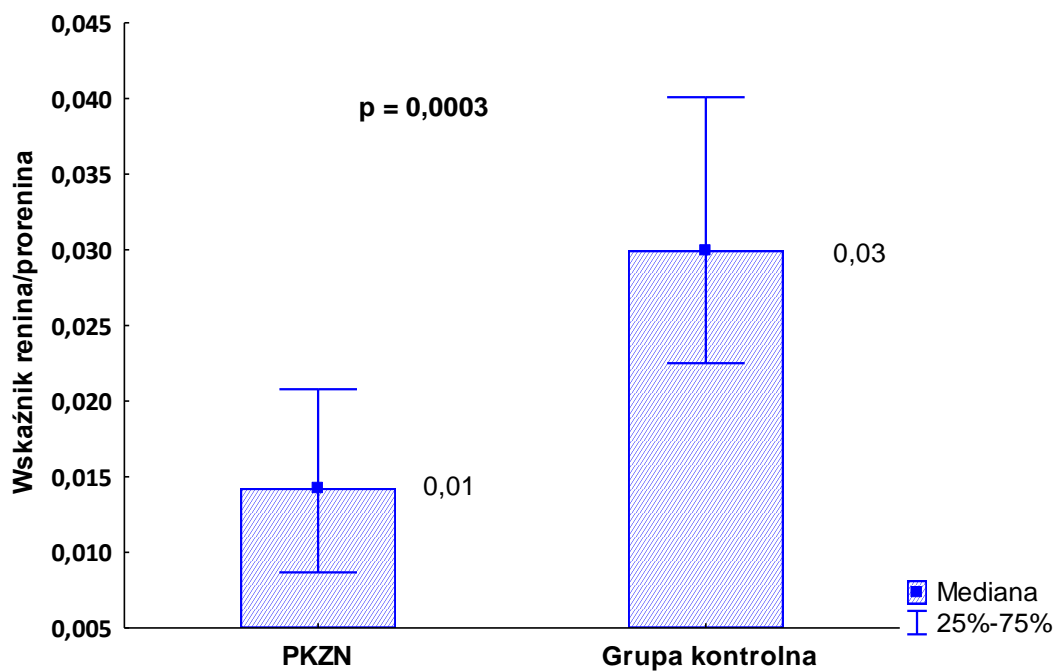
Rycina 7. Porównanie stężenia Ang II w osoczu u chorych ze świeżo rozpoznanym pierwotnym PKZN i w grupie kontrolnej



Rycina 8. Porównanie wielkości wydalania TGFβ1 z moczem u chorych ze świeżo rozpoznany pierwotnym PKZN i w grupie kontrolnej

5.2. Wyliczenie i porównanie wielkości wskaźnika renina/prorenina u chorych ze świeżo rozpoznany pierwotnym PKZN oraz w grupie kontrolnej

Grupa badana cechowała się istotnie niższym wskaźnikiem renina/prorenina w porównaniu z grupą kontrolną (odpowiednio: 0,01; 0,001 - 0,35 vs 0,03; 0,006 - 0,21, $p = 0,0003$) (Ryc.9).



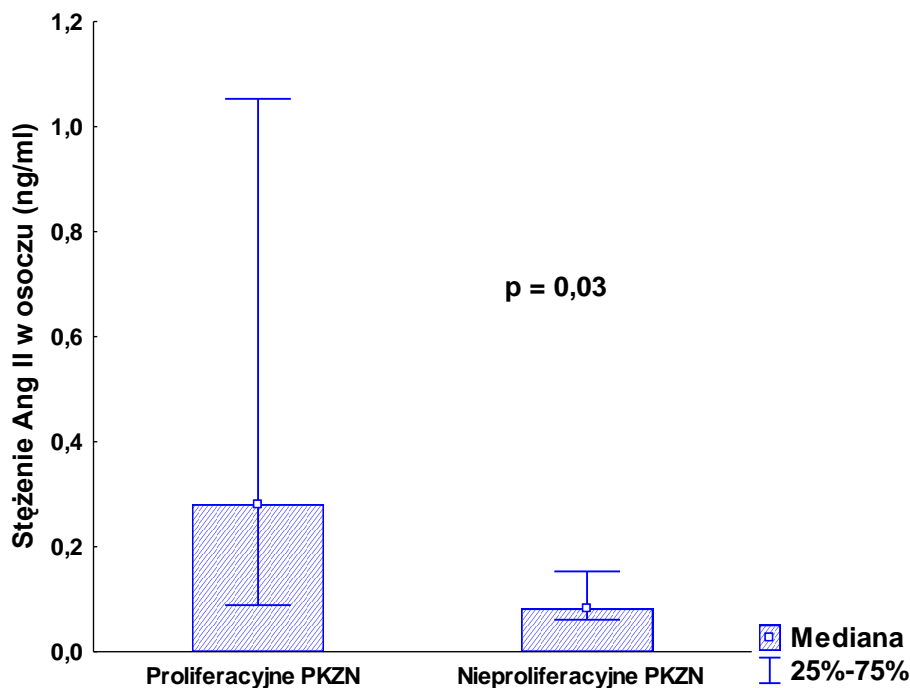
Rycina 9. Porównanie wielkości wskaźnika renina/prorenina u chorych ze świeżo rozpoznany PKZN i w grupie kontrolnej

5.3. Porównanie stężeń proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu, wskaźnika renina/prorenina oraz wydalania TGF β 1 z moczem w grupie chorych z proliferacyjnymi i nieproliferacyjnymi postaciami PKZN

Wyniki przedstawiono w Tabeli 11. Grupa chorych z proliferacyjnymi PKZN (IgAN, MesPGN, MPGN) istotnie różniła się stężeniem Ang II w surowicy, która było wyższe niż w grupie z nieproliferacyjnymi PKZN (MN, FSGS, MCD) (odpowiednio: 0,28; 0,03 – 25,19 vs 0,08; 0,049 – 12,47; p = 0,02), Rycina 10. Grupa chorych z nieproliferacyjnymi PKZN nie różniła się stężeniem Ang II w osoczu od grupy kontrolnej.

Tabela 11. Porównanie stężeń proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu, wskaźnika renina/prorenina oraz wydalania TGF β 1 z moczem w grupie chorych z proliferacyjnymi i nieproliferacyjnymi postaciami PKZN oraz porównanie stężenia Ang II w osoczu chorych z postaciami nieproliferacyjnymi i w grupie kontrolnej

Badane parametry		Proliferacyjne PKZN	Nieproliferacyjne PKZN	p
Prorenina (ng/ml)	Mediana	0,76	1,13	0,12
	min – max	0,01 – 2,91	0,03 – 4,4	
	Q25 Q75	0,43 – 0,92	0,54 – 1,82	
Renina (pg/ml)	Mediana	10,28	10,03	0,94
	min – max	2,41 – 85,05	3,33 – 81,48	
	Q25 Q75	6,75 – 15,02	5,01 – 18,52	
Wskaźnik renina/prorenina	Mediana	0,02	0,012	0,27
	min – max	0,003 – 0,20	0,001 – 0,35	
	Q25 Q75	0,01 – 0,02	0,007 – 0,03	
Aldosteron (ng/ml)	Mediana	123,1	125,65	0,94
	min – max	33,5 – 513,70	54,50 – 960,20	
	Q25 Q75	94,15 – 180,30	82,90 – 191,30	
Ang II (ng/ml)	Mediana	0,28	0,081	0,03
	min – max	0,03 – 25,19	0,05 – 12,47	
	Q25 Q75	0,09 – 0,96	0,06 – 0,12	
TGF β 1 (pg/mg Cr)	Mediana	42,28	23,20	0,23
	min – max	0,97 – 1561,20	1,72 – 270,69	
	Q25 Q75	24,37 – 87,81	7,58 – 47,44	
		Grupa kontrolna	Nieproliferacyjne PKZN	p
Ang II (ng/ml)	Mediana	0,07	0,081	0,31
	min – max	0,03 – 0,96	0,05 – 12,47	
	Q25 Q75	0,06 – 0,09	0,06 – 0,12	



Rycina 10. Porównanie stężenia Ang II w osoczu u chorych z proliferacyjnymi i nieproliferacyjnymi postaciami świeżo wykrytego PKZN

5.4. Analiza związku stężeń proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu oraz wskaźnika renina/prorenina u chorych ze świeżo rozpoznany pierwotnym PKZN z BMI, filtracją kłębuszkową (eGFR) i wielkością białkomoczu (TPUR)

Wyniki przedstawiono w Tabeli 12.

Wykazano:

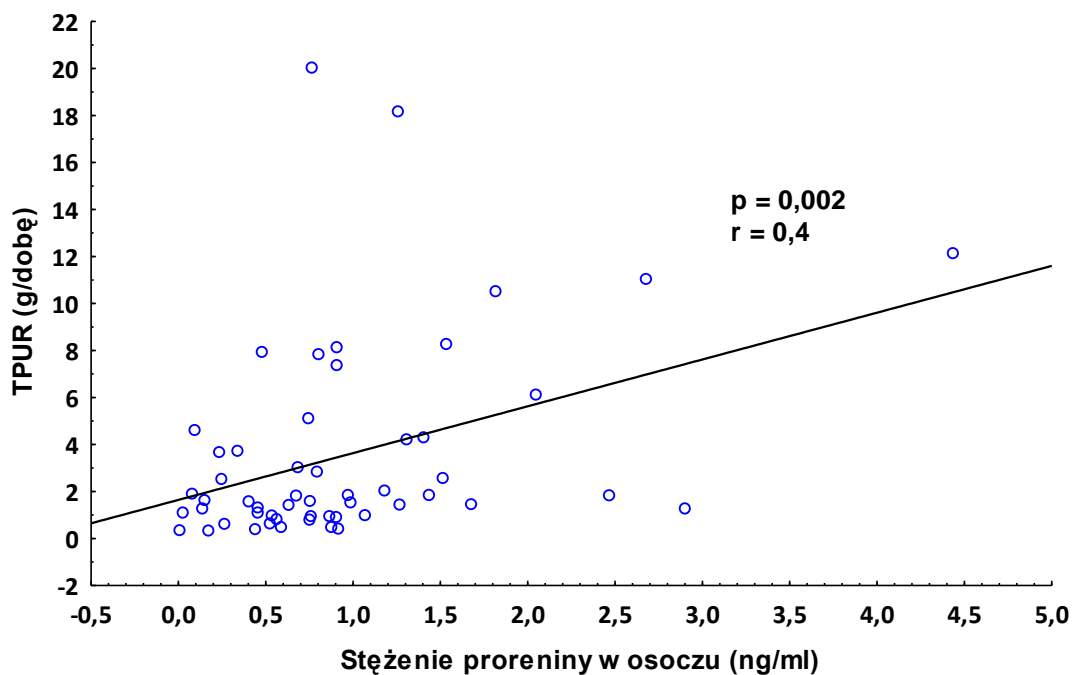
- a) dodatnią korelację między stężeniem proreniny w osoczu, a wielkością TPUR ($p = 0,002$, $r = 0,4$) (Rycina 11)
- b) ujemną korelację między wskaźnikiem renina/prorenina w osoczu z wielkością TPUR ($p = 0,0003$, $r = - 0,48$) (Rycina 12)

Nie wykazano istotnych statystycznie zależności między:

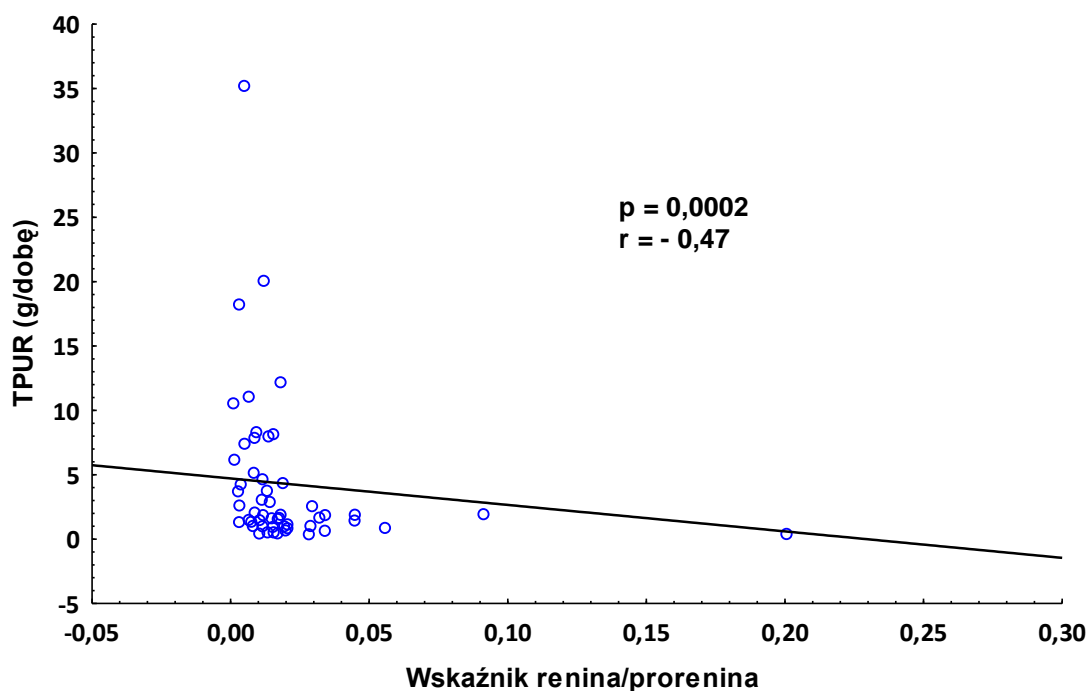
- a) stężeniem proreniny i wielkością wskaźnika renina/prorenina w osoczu a BMI i eGFR
- b) stężeniem reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu a BMI, eGFR i TPUR

Tabela 12. Korelacje stężeń proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu oraz wskaźnika renina/prorenina u chorych ze świeżo rozpoznanym PKZN z BMI, eGFR i TPUR

	p	BMI (kg/m ²)	TPUR (g/dobę)	eGFR (ml/min/1,73m ²)
	r			
Prorenina (ng/ml)	p	0,27	0,002	0,84
	r	-0,15	0,40	-0,028
Renina (ng/ml)	p	0,35	0,68	0,14
	r	-0,14	-0,06	-0,20
Wskaźnik renina/prorenina	p	0,53	0,0003	0,15
	r	0,09	-0,48	0,19
Aldosteron (ng/ml)	p	0,62	0,39	0,87
	r	-0,07	-0,01	0,02
Ang II (ng/ml)	p	0,60	0,07	0,09
	r	-0,30	-0,36	0,30



Rycina 11. Korelacja stężenia proreniny w osoczu i wielkości dobowego białkomoczu (TPUR) u chorych ze świeżo rozpoznanym pierwotnym PKZN



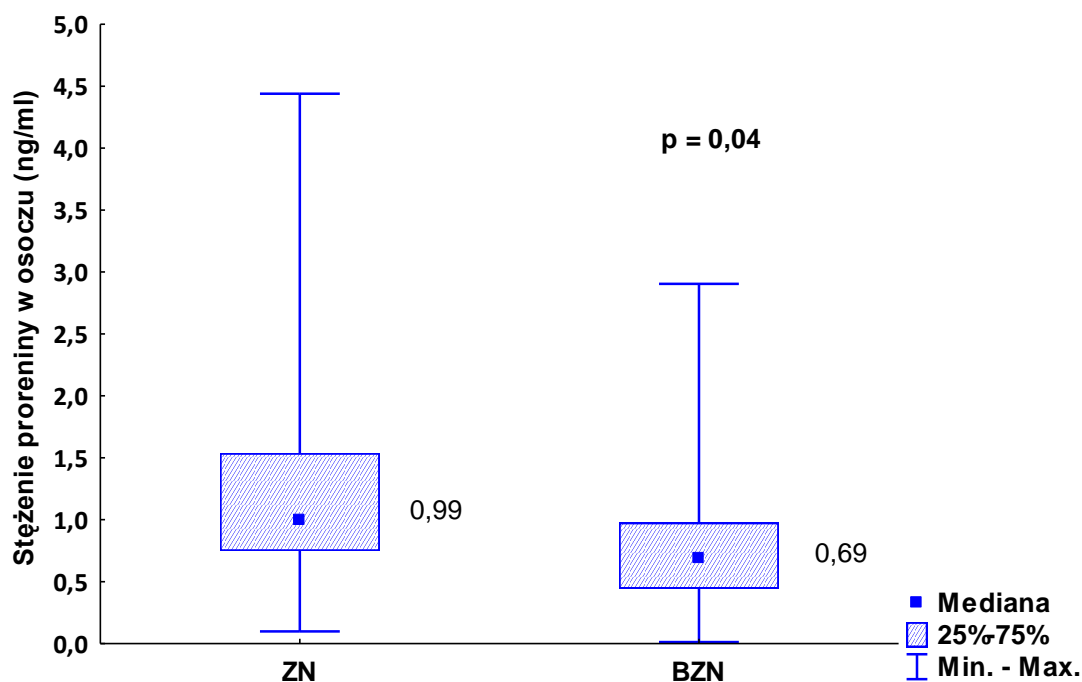
Rycina 12. Korelacja wskaźnika renina/prorenina i wielkości dobowego białkomoczu (TPUR) u chorych ze świeżo rozpoznany PKZN

5.5. Porównanie stężeń proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu, wielkości wydalania TGFβ1 z moczem oraz wskaźnika renina/prorenina u chorych ze świeżo rozpoznany pierwotnym PKZN z zespołem nerczycowym (ZN) i bez zespołu nerczycowego (BZN)

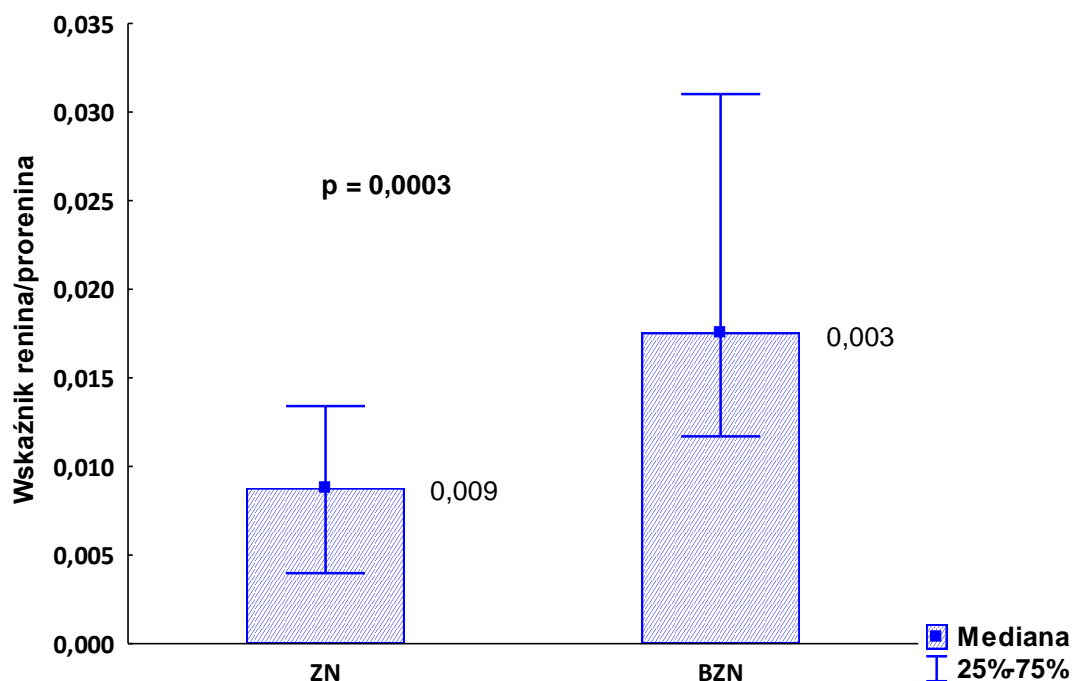
Wyniki przedstawiono w Tabeli 13. U chorych z ZN wykazano wyższe stężenie proreniny w osoczu w porównaniu do chorych BZN (odpowiednio: 0,99; 0,09 – 4,44 ng/ml vs 0,69; 0,01 – 2,91 ng/ml, $p = 0,04$) oraz istotnie niższy wskaźnik renina/prorenina (odpowiednio: 0,008; 0,001 – 0,019 vs 0,017; 0,003 – 0,352) (Rycina 13 i 14). Nie wykazano różnic stężeń Ang II i aldosteronu w osoczu oraz wielkości wydalania TGFβ1 z moczem w grupie chorych z ZN i BZN.

Tabela 13. Porównanie stężeń proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu, wielkości wydalania TGFβ1 z moczem oraz wskaźnika renina/prorenina u chorych z pierwotnym PKZN zespołem nerczycowym (ZN) i bez zespołu nerczycowego (BZN)

Badane parametry		ZN	BZN	p
Prorenina (ng/ml)	Mediana	0,99	0,69	0,04
	min – max Q25 Q75	09 – 4,44 0,75 – 1,54	0,01 – 2,91 0,44 – 0,98	
Renina (pg/ml)	Mediana	7,29	10,59	0,29
	min – max Q25 Q75	3,33 – 81,48 5,22 – 14,84	2,41 – 85,05 7,83 – 15,35	
Aldosteron (ng/ml)	Mediana	106,15	139,90	0,29
	min – max Q25 Q75	54,5 – 298,10 91,00 – 151,90	33,50 – 960,20 90,60 – 191,30	
Ang II (ng/ml)	Mediana	0,12	0,22	0,20
	min – max Q25 Q75	0,02 – 2,77 0,07 – 0,57	0,05 – 25,19 0,09 – 0,79	
Wskaźnik renina/prorenina	Mediana	0,008	0,018	0,0001
	min – max Q25 Q75	0,001 – 0,02 0,004 – 0,01	0,003 – 0,35 0,01 – 0,03	
TGFβ1 (pg/mg Cr)	Mediana	48,10	41,49	0,57
	min – max Q25 Q75	2,54 – 415,67 16,69 – 87,31	0,97 – 1561,20 20,70 – 88,29	



Rycina 13. Porównanie stężenia proreniny w osoczu u chorych z pierwotnym PKZN z zespołem nerczycowym (ZN) i bez zespołu nerczycowego (BZN)



Rycina 14. Porównanie wielkości wskaźnika renina/prorenina u chorych z pierwotnym PKZD z zespołem nerczycowym (ZN) i bez zespołu nerczycowego (BZN)

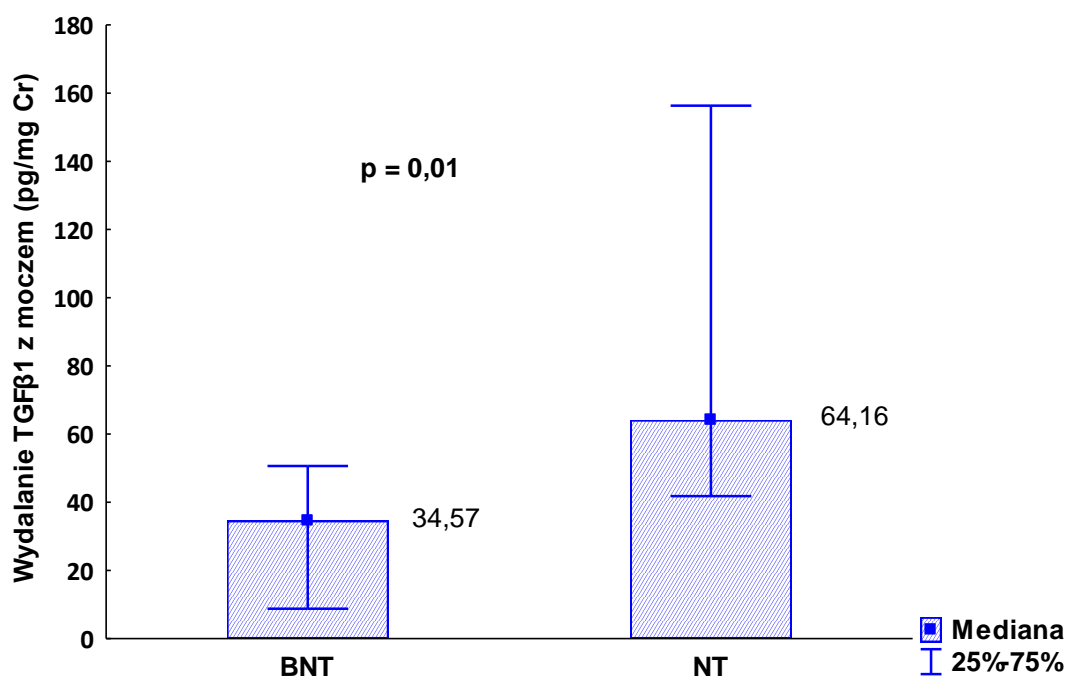
5.6. Porównanie stężenia proreniny, reniny, angiotensyny II i aldosteronu w osoczu, wielkości wydalania TGFβ1 z moczem oraz wskaźnika renina/prorenina u chorych ze świeżo rozpoznany pierwotnym PKZD z nadciśnieniem tętniczym (NT) i bez nadciśnienia tętniczego (BNT)

Wyniki przedstawiono w Tabeli 14. Wykazano większe wydalanie TGFβ1 z moczem u chorych z NT w porównaniu do chorych BNT (odpowiednio: 64,16; 10,53 – 326,45 pg/mg Cr vs 34,57; 0,97 – 1561,20 pg/mg Cr, $p = 0,01$) (Rycina 15). Nie wykazano różnic stężeń proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu oraz wielkości wskaźnika renina/prorenina w grupie chorych z NT i BNT.

Tabela 14. Porównanie stężeń proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu, wielkości wydalania TGFβ1 z moczem oraz wskaźnika renina/prorenina u chorych na pierwotne PKZD z nadciśnieniem tętniczym (NT) i bez nadciśnienia tętniczego (BNT)

Badane parametry		NT	BNT	p
Prorenina (ng/ml)	Mediana	0,69	0,78	0,69
	min – max	0,08 – 2,67	0,01 – 4,44	
	Q25 Q75	0,34 – 1,26	0,53 – 1,07	
Renina (pg/ml)	Mediana	7,83	10,59	0,34
	min – max	4,25 – 85,05	2,41 – 81,48	
	Q25 Q75	5,02 – 16,41	7,49 – 15,02	
Aldosteron (ng/ml)	Mediana	120,50	132,10	0,54

	min – max Q25 Q75	54,50 – 513,70 82,90 – 185,90	33,50 – 960,20 94,10 – 188,40	
Ang II (ng/ml)	Mediana min – max Q25 Q75	0,12 0,02 – 2,77 0,07 – 0,57	0,22 0,05 – 25,19 0,09 – 0,79	0,20
Wskaźnik renina/prorenina	Mediana min – max Q25 Q75	0,01 0,003 – 0,09 0,008 – 0,02	0,02 0,001 – 0,35 0,009 – 0,02	0,57
TGFβ1 (pg/mg Cr)	Mediana min – max Q25 Q75	64,13 10,53 – 326,45 41,81 – 156,33	3,57 0,97 – 1561,20 8,78 – 50,65	0,01



Rycina 15. Porównanie wielkości wydalania TGFβ1 z moczem u chorych z pierwotnym PKZN bez nadciśnienia tętniczego (BNT) i z nadciśnieniem tętniczym (NT)

5.7. Porównanie stężenia proreniny, reniny, angiotensyny II i aldosteronu w osoczu, wielkości wydalania TGFβ1 z moczem oraz wskaźnika renina/prorenina u chorych ze świeżo rozpoznanyim pierwotnym PKZN w grupie dippers i non - dippers

Wyniki przedstawiono w Tabeli 15. Nie wykazano różnic stężeń proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu, wielkości wydalania TGFβ1 z moczem oraz wskaźnika renina/prorenina w grupie chorych dippers i non – dippers.

Tabela 15. Porównanie stężeń proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu, wielkości wydalania TGFβ1 z moczem oraz wskaźnika renina/prorenina u chorych na pierwotne PKZN w grupie dippers i non - dippers

Badane parametry		dippers	non - dippers	p
Prorenina (ng/ml)	Mediana	0,76	0,80	0,21
	min – max	0,01 – 2,68	0,16 – 4,44	
	Q25 Q75	0,24 – 1,08	0,59 – 1,26	
Renina (pg/ml)	Mediana	10,61	9,48	0,79
	min – max	2,41 – 18,52	4,25 – 81,48	
	Q25 Q75	7,38 – 15,02	6,17 – 14,33	
Aldosteron (ng/ml)	Mediana	125,70	128,60	0,48
	min – max	33,50 – 960,20	58,10 – 513,70	
	Q25 Q75	101,40 – 161,00	88,3 – 191,3	
Ang II (ng/ml)	Mediana	0,13	0,16	0,33
	min – max	0,07 – 2,64	0,05 – 12,47	
	Q25 Q75	0,07 – 0,33	0,09 – 1,05	
Wskaźnik renina/prorenina	Mediana	0,01	0,01	0,72
	min – max	0,002 – 0,35	0,003 – 0,06	
	Q25 Q75	0,01 – 0,02	0,009 – 0,02	
TGFβ1 (pg/mg Cr)	Mediana	41,80	42,77	0,66
	min – max	0,97 – 163,17	1,67 – 1561,20	
	Q25 Q75	18,19 – 122,57	19,42 – 66,80	

5.8. Analiza związku stężenia proreniny, reniny, angiotensyny II i aldosteronu w osoczu oraz wskaźnika renina/prorenina z wielkością wydalania TGFβ1 z moczem oraz ze stopniem sklerotyzacji (S1 ≤ 30%, S2 > 30%) i nasileniem włóknienia (F1, F2) w obrazie mikroskopowym nerki u chorych ze świeżo rozpoznany pierwotnym PKZN Wyniki przedstawiono w tabeli 16. Nie wykazano związku między stężeniem proreniny, reniny, angiotensyny II i aldosteronu w osoczu oraz wskaźnikiem renina/prorenina a stopniem sklerotyzacji i nasileniem włóknienia w obrazie mikroskopowym nerki oraz wielkością wydalania TGFβ1 z moczem u chorych ze świeżo rozpoznany PKZN. Grupy chorych S1 i S2 oraz F1 i F2 nie różniły się stężeniem proreniny, reniny, angiotensyny II i aldosteronu w osoczu oraz wskaźnikiem renina/prorenina.

Tabela 16. Analiza związku stężenia proreniny, reniny, angiotensyny II i aldosteronu w osoczu oraz wskaźnika renina/prorenina z wielkością wydalania TGFβ1 z moczem oraz ze stopniem sklerotyzacji kłębuszków nerkowych (S1 ≤ 30%, S2 > 30%) i nasileniem włóknienia tkanki cewkowo – śródmiąższowej (F1= brak lub drobne ogniska włóknienia, F2 = umiarkowane lub rozległe włóknienie) w obrazie mikroskopowym nerki u chorych ze świeżo rozpoznanym pierwotnym PKZN

	TGFβ1 (pg/ mgCr)	Wartość	Włóknienie		p	Sklerotyzacja		p
	p		F1	F2		S1	S2	
Prorenina (ng/ml)	0,26	Mediana min-max Q25 Q75	0,80 0,01 – 4,44 0,44 – 1,07	0,96 0,08 – 2,68 0,76 – 1,27	0,11	0,80 0,01 – 4,44 0,48 – 1,31	0,81 0,16 – 1,27 0,25 – 1,19	0,90
Renina (pg/ml)	0,47	Mediana min-max Q25 Q75	9,66 2,41 – 85,05 6,17 – 15,71	12,06 4,25 – 28,63 6,50 – 14,84	0,74	10,57 2,41 – 85,05 6,75 – 15,71	7,49 5,01 – 13,65 6,5 – 10,68	0,19
Aldosteron (ng/ml)	0,74	Mediana min-max Q25 Q75	125,70 33,50 – 960, 90,60 – 191,30	132,65 54,50 – 272,30 101,40 – 185,90	0,81	120,50 33,30 – 960,20 91,00 – 191,30	139,90 72,60 – 272,30 85,20 – 185,90	0,73
Ang II (ng/ml)	0,26	Mediana min-max Q25 Q75	0,16 0,03 – 12,47 0,09 – 0,86	0,17 0,05 – 3,87 0,07 – 2,79	0,44	0,22 0,03 – 12,15 0,08 – 0,69	0,158 0,06 – 25,19 0,094 – 12,47	0,62
Wskaźnik renina/pro renina	0,78	Mediana min-max Q25 Q75	0,016 0,002 – 0,35 0,01 – 0,02	0,01 0,003 – 0,09 0,007 – 0,02	0,19	0,06 0,001 – 0,35 0,01 – 0,02	0,009 0,08 – 0,032 0,009 – 0,03	0,47

5.9. Analiza polimorfizmów genów *ACE*, *AGT*, *AGTR1*, *ATP6AP2*, *CMA1*, *CYP11β2* i *REN*

Rozkład genotypów analizowanych polimorfizmów był zgodny z prawem Hardy-Weinberga (HW) zarówno w grupie chorych z PKZN oraz w grupie kontrolnej ($p > 0,05$). Jedyne odstępstwo od reguły HW obserwowano w grupie osób zdrowych dla wariantu rs11571080 genu *REN* ($p = 0,004$), co było związane ze stosunkowo małą liczebnością badanych przypadków. Analiza rozkładu genotypów tego polimorfizmu po zwiększeniu liczby kontroli o dodatkowe 100 osób wykazała, że był on zgodny z prawem HW (wyniki nie zostały zaprezentowane w ramach tej pracy). Porównanie częstości alleli oraz genotypów dla polimorfizmów genów *ACE*, *AGT*, *AGTR1*, *ATP6AP2*, *CMA1* oraz *REN* nie wykazało różnic istotnych statystycznie pomiędzy grupą chorych z PKZN oraz grupą kontrolną (Tabela 17 i 18). Także analiza ilorazu szans, przy założeniu zarówno modelu dominującego oraz recesywnego, nie wykazała związku tych wariantów genowych ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia PKZN (Tabela 19, Rycina 16). Uzyskane wyniki wskazują na udział w etiologii PKZN wariantu rs1799998 genu *CYP11β2*. Zarówno częstości alleli jak i genotypów tego polimorfizmu wykazywały różnice istotnie statystycznie porównując grupę chorych z grupą kontrolną ($p = 0,035$ oraz $p = 0,034$, odpowiednio; Tabela 17 i 18). W grupie chorych na

PKZN obserwowano wyższą częstość allelu C (allel ryzyka) w porównaniu do grupy kontrolnej (odpowiednio 0,54 oraz 0,46). Kalkulacja ilorazu szans przy zastosowaniu modelu recesywnego wykazała dwukrotny wzrost ryzyka wystąpienia PKZN u osób posiadających dwie kopie allelu C w porównaniu do osób o genotypie TC lub też TT ($OR_{CCvsTC+TT} = 1,947$, 95%CI: 1,170 – 3,240, $p = 0,0096$). Moc przeprowadzonego testu wynosiła 73% wskazując na dużą wiarygodność otrzymanych wyników. Dla otrzymania mocy testu na poziomie 80% należałoby zwiększyć liczbę analizowanych chorych na PKZN do 173 osób. Osoby o genotypie CC lub też TC nie wykazywały zwiększonego ryzyka zachorowania na PKZN w porównaniu do homozygot TT (model dominujący). Iloraz szans w tym przypadku wynosił 1,246 (95%CI: 0,749 – 2,069, $p = 0,396$). Wartość trendu wyliczona przy użyciu testu Cochran-Armitage wynosiła $p_{trend} = 0,035$, wskazując na wzrost ryzyka zachorowania na PKZN w zależności od liczby kopii allelu ryzyka. Wyniki kalkulacji OR dla polimorfizmu rs1799998 genu *CYP11β2* przedstawiono w Tabeli 19 oraz na Rycinie 16. Nie wykazano zależności stężenia aldosteronu w osoczu chorych na pierwotne PKZN od genotypu - zarówno w układzie dominującym (CC + CT vs TT; $p = 0,556$), jak i recesywnym (CC vs CT + TT; $p = 0,235$).

Analiza interakcji pomiędzy poszczególnymi polimorfizmami przeprowadzona za pomocą metody MDR nie wykazała kooperatywnego udziału tych wariantów genowych w etiologii PKZN (Tabela 20). Żaden z najlepszych 2-, 3- oraz 4-polimorficznych modeli wybranych przez program nie wykazywał statystycznie istotnego związku ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na PKZN (otrzymane wartości $p > 0,05$). Analiza MDR przeprowadzona po wykluczeniu polimorfizmów genu *ATP6AP2* zlokalizowanego na chromosomie X, również dała wynik negatywny (Tabela 21).

Dokumentacja otrzymanych wyników genotypowania dla wszystkich analizowanych polimorfizmów, przedstawiona w postaci wzorcowych żeli agarozowych (analizy RFLP), wykresów zależności fluorescencji od temperatury (analizy HRM) oraz chromatogramów, została zaprezentowana w Aneksie.

Tabela 17. Porównanie częstości alleli polimorfizmów genów kodujących białka układu RAA u chorych na pierwotne PKZN i w grupie kontrolnej

Gen	Nr polimorfizmu	Allele	PKZN Liczba / częstość alleli		Grupa kontrolna Liczba / częstość alleli		p ¹	
			M ²	K ³	M	K	M	K
ACE	rs4646994	D	163 / 0,55		196 / 0,51		0,266	
		I	133 / 0,45		190 / 0,49			
AGT	rs699	T	142 / 0,48		201 / 0,52		0,330	
		C	152 / 0,52		185 / 0,48			
AGTR1	rs2971597	A	201 / 0,69		279 / 0,73		0,192	
		C	91 / 0,31		101 / 0,27			
ATP6AP2	rs2968917	T	158 / 0,93	111 / 0,88	172 / 0,89	163 / 0,85	0,161	0,419
		C	12 / 0,07	15 / 0,12	22/0,11	29 / 0,15		
ATP6AP2	rs2971597	T	116 / 0,70	81 / 0,64	134 / 0,67	112 / 0,62	0,556	0,624
		C	50 / 0,30	45 / 0,36	66 / 0,33	70 / 0,38		
CMA1	rs1885108	G	238 / 0,82		304 / 0,80		0,419	
		A	52 / 0,18		78 / 0,20			
CMA1	rs1956923	C	225 / 0,77		278 / 0,72		0,184 ⁴	
		T	69 / 0,23		108 / 0,28			
CYP11B2	rs1799998	T	134 / 0,46		208 / 0,54		0,035	
		C	158 / 0,54		178 / 0,46			
REN	rs11571080	A	200 / 0,69		273 / 0,71		0,621	
		G	90 / 0,31		113 / 0,29			
REN	rs2368564	C	197 / 0,68		284 / 0,74		0,068	
		T	93 / 0,32		98 / 0,26			

¹test χ^2 , ²M = mężczyźni, ³K = kobiety (podział na płeć w związku z lokalizacją genu *ATP6AP2* na chromosomie X);

⁴test Fishera

Tabela 18. Porównanie częstości genotypów polimorfizmów genów kodujących białka układu RAA u chorych na pierwotne PKZN i w grupie kontrolnej

Gen	Nr polimorfizmu	Genotypy	PKZN Liczba / częstość genotypu		Grupa kontrolna Liczba / częstość genotypu		p ¹		p ²	
			M ³	K ⁴	M	K	M	K	M	K
ACE	rs4646994	DD	43 / 0,29		44 / 0,23		0,417		0,244	
		DI	77 / 0,52		108 / 0,56					
		II	28 / 0,19		41 / 0,21					
AGT	rs699	TT	30 / 0,20		51/0,26		0,434		0,313	
		CC	82/ 0,56		99 / 0,52					
		CC	35/0,24		43 / 0,22					
AGTR1	rs2971597	AA	72 / 0,49		102 / 0,54		0,295		0,200	
		AC	57 / 0,39		75 / 0,39					
		CC	17 / 0,12		13 / 0,07					
ATP6AP2	rs2968917	TT	79 / 0,93	50 / 0,80	86 / 0,89	69 / 0,72	0,322	0,427		0,430
		CT	0 / 0,00	11 / 0,17	0 / 0,00	25 / 0,26				
		CC	6 / 0,07	2 / 0,03	11 / 0,11	2 / 0,22				
ATP6AP2	rs2971597	TT	58 / 0,70	30 / 0,48	67 / 0,67	32 / 0,35	0,677	0,056		0,631
		CT	0 / 0,00	21 / 0,33	0 / 0,00	48 / 0,53				
		TT	25 / 0,30	12 / 0,19	33 / 0,33	11 / 0,12				
CMA1	rs1885108	GG	97 / 0,67		120 / 0,63		0,714 ⁵		0,412	
		AG	44 / 0,30		64 / 0,34					
		AA	4 / 0,03		7 / 0,04					
CMA1	rs1956923	CC	89 / 0,61		100 / 0,52		0,250		0,194	
		CT	47 / 0,32		78 / 0,40					
		TT	11 / 0,07		15 / 0,08					
CYP11β2	rs1799998	TT	32 / 0,22		50 / 0,26		0,035		0,034	
		CT	70 / 0,48		108 / 0,56					
		CC	44 / 0,30		35 / 0,18					
REN	rs11571080	AA	66 / 0,45		87 / 0,45		0,251		0,586	
		AG	68 / 0,47		99 / 0,51					
		GG	11 / 0,08		7 / 0,04					
REN	rs2368564	CC	69 / 0,48		107 / 0,56		0,202		0,076	
		CT	59 / 0,41		70 / 0,37					
		TT	17 / 0,11		14 / 0,07					

¹test χ^2 , ²Cochran – Armitage trend test, ³M = mężczyźni, ⁴K = kobiety (podział na płeć w związku z lokalizacją genu *ATP6AP2* na chromosomie X), ⁵test Fishera

Tabela 19. Związek wariantów polimorficznych genów kodujących białka układu RAA z ryzykiem zachorowania na pierwotne PKZN

Gen	Nr polimorfizmu	Liczba genotypów		Model dominujący ¹		Model recesywny ²		
		PKZN	KONTROLE	Iloraz szans OR (95%CI)	p ³	Iloraz szans OR (95%CI)	p ³	
ACE	rs4646994	43/77/28	44/108/41	0,721 (0,442 – 1,176)	0,189	1,794 (0,842 – 3,826)	0,126	
AGT	rs699	30/82/35	51/99/43	1,507 (0,900 – 2,522)	0,118	1,025 (0,615 – 1,708)	0,925	
AGTR1	rs2971597	72/57/17	102/75/13	0,643 (0,293 – 1,411)	0,268	1,794 (0,842 – 3,826)	0,126	
ATP6AP2	rs2968917	M ⁵	79/0/6	86/0/11	0,594 (0,209 – 1,681)	0,322	0,594 (0,209 – 1,681)	0,322
		K ⁶	50/11/2	69/25/2	0,613 (0,284 – 1,327)	0,212	1,541 (0,211 – 11,237)	0,649 ³
ATP6AP2	rs2971597	M	58/0/25	67/0/33	0,875 (0,467 – 1,639)	0,677	0,875 (0,467 – 1,639)	0,677
		K	30/21/12	32/48/11	0,597 (0,310 – 1,149)	0,121	1,711 (0,702 – 4,169)	0,233
CMA1	rs1885108	97/44/4	120/64/7	0,836 (0,531 – 1,317)	0,439	0,746 (0,214 – 2,598)	0,763 ⁴	
CMA1	rs1956923	89/47/11	100/78/15	0,701 (0,454 – 1,083)	0,109	0,959 (0,427 – 2,157)	0,921	
CYP11β2	rs1799998	32/70/44	50/108/35	1,246 (0,749 – 2,069)	0,396	1,947 (1,170 – 3,240)	0,0096	
REN	rs11571080	66/68/11	87/99/7	0,982 (0,637 – 1,514)	0,936	2,181 (0,824 – 5,774)	0,109	
REN	rs2368564	69/59/17	107/70/14	1,403 (0,909 – 2,164)	0,125	1,36 (0,649 – 2,849)	0,413	

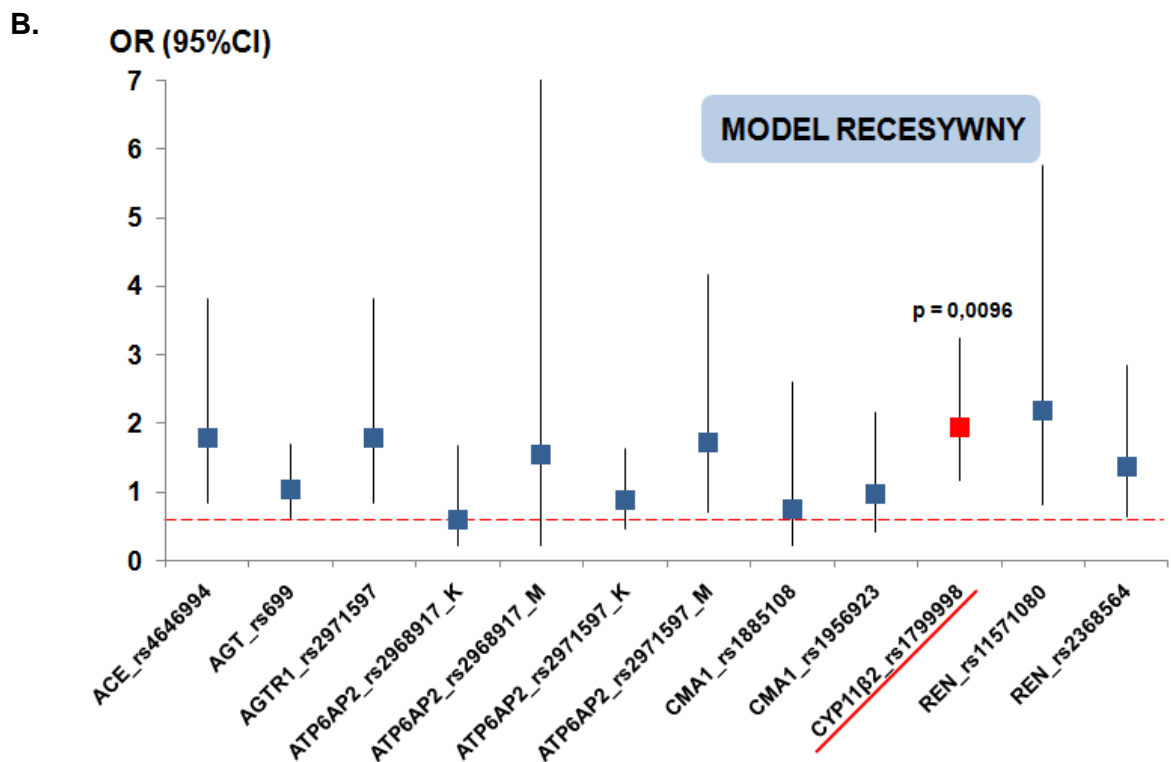
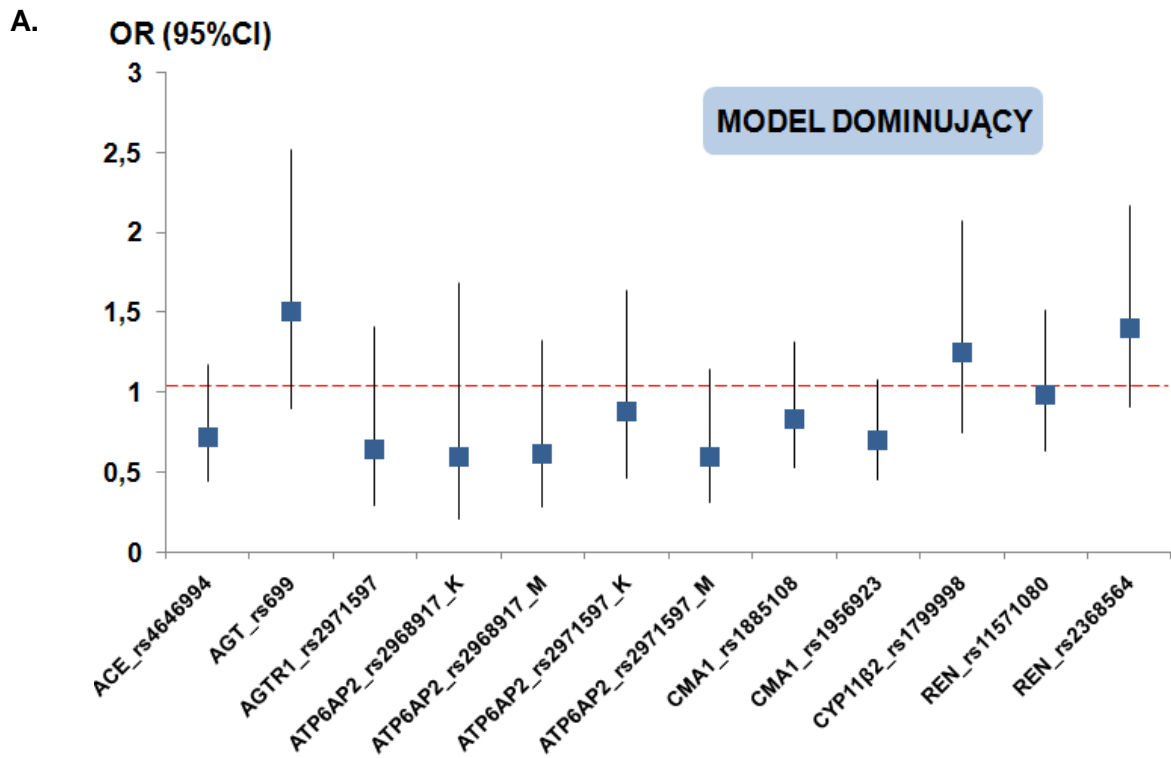
¹nn+nN vs NN

²nn vs nN + NN

³test χ^2

⁴test Fischer'a

⁵M = mężczyźni, ⁶K = kobiety (podział na płeć w związku z lokalizacją genu *ATP6AP2* na chromosomie X)



Rycina 16. Analiza ilorazu szans (OR) w modelu dominującego (A) i recesywnym (B) wariantów polimorficznych genów *ACE*, *AGT*, *AGTR1*, *ATP6AP2*, *CMA1*, *CYP11B2* i *REN*

95%

CI

–

przedział

ufności

Tabela 20. Analiza interakcji pomiędzy polimorfizmami genów układu RAA w pierwotnych PKZN (metoda MDR)

Gen_numer polimorfizmu	Testing Balanced Accuracy ¹	Cross Validation Consistency ²	p ³
<i>AGTR1_rs5186, CMA1_rs1956923</i>	0,5545	6 / 10	0,37
<i>AGTR1_rs5186, CMA1_rs1956923, ATP6AP2_rs2971597</i>	0,4544	2 / 10	0,99
<i>AGTR1_rs5186, CMA1_rs1956923, ATP6AP2_rs2971597, ACE_rs4646994</i>	0,5397	6 / 10	0,53

Tabela 21. Analiza interakcji pomiędzy polimorfizmami genów układu RAA w pierwotnych PKZN (metoda MDR) po wyłączeniu wariantów genu *ATP6AP2* zlokalizowanego na chromosomie X

Gen_numer polimorfizmu	Testing Balanced Accuracy ¹	Cross Validation Consistency ²	p ³
<i>AGTR1_rs5186, CMA1_rs1956923</i>	0,5484	8 / 10	0,42
<i>AGTR1_rs5186, CMA1_rs1956923, CMA1_rs1885108</i>	0,5380	6 / 10	0,52
<i>AGTR1_rs5186, CMA1_rs1956923, CYP11β2_rs1799998, REN_rs2368564</i>	0,5232	7 / 10	0,67

¹Testing Balanced Accuracy (TBA), wartość wskazująca na ile precyzyjnie analiza MDR jest w stanie przewidzieć status chory / kontrola na podstawie analizy genotypów testowanych polimorfizmów; przedział wartości dla TBA 0,5 - 1, gdzie 1 oznacza, że na podstawie genotypów na 100% można określić czy dana osoba jest chorym z PKZN czy też zdrową kontrolą; wartości TBA > 0,55 uznaje się za statystycznie interesujące

²Cross Validation Consistency (CVC), wartość wskazująca ile razy dany 2-, 3- i 4-polimorficzny model został wybrany jako najlepszy model przewidujący status chory / kontrola po podziale analizowanych danych na 10 grup i przeprowadzeniu analizy MDR w każdej z nich; wartości CVC powyżej 5 / 10 uważa się za znaczące;

³wartość p na podstawie testu 1, 000 permutacji

6. Dyskusja

6.1. Aktywność układu RAA u chorych na pierwotne PKZN i jej związek z obrazem klinicznym i nasileniem zmian morfologicznych w nerkach

Wyniki przeprowadzonych analiz biochemicznych wykazały istotne różnice w aktywności układu RAA u chorych na pierwotne PKZN w porównaniu do grupy kontrolnej. U chorych z pierwotnym PKZN stwierdzono istotnie wyższe niż u osób zdrowych stężenia proreniny i Ang II w osoczu. Nie wykazano natomiast różnicy w stężeniach reniny i aldosteronu w osoczu. Istotnym argumentem przemawiającym za tym, że uzyskane wyniki odzwierciedlają rzeczywiste relacje składowych układu RAA w krążeniu chorych z pierwotnym PKZN jest fakt, że nie byli oni leczeni hipotensyjnie i immunosupresyjnie w momencie badania.

Do tej pory w piśmiennictwie nie pojawiły się opisy badań dotyczących oceny stężenia proreniny u chorych z pierwotnym PKZN. Dane literaturowe dotyczą przede wszystkim cukrzycy typu 1 i 2 w odniesieniu do powikłań mikrangiopatycznych oraz pierwotnego nadciśnienia tętniczego i włóknienia mięśnia sercowego [20, 20]. Ponad 20 lat temu Leuther i wsp. oraz Franken i wsp. wykazali, że podwyższone stężenie proreniny w osoczu przepowiada lub wiąże się z obecnością nefropatii (albuminuria, obniżenie GFR) i retinopatii cukrzycowej [30, 47, 59]. W tych samych pracach użyto po raz pierwszy wskaźnika renina/prorenina jako dodatkowego sposobu określenia nadekspresji proreniny w odniesieniu do stężenia reniny i wykazano jego obniżenie. Było to związane z podwyższonym stężeniem proreniny lub dodatkowo z obniżonym stężeniem stężenia reniny u chorych z nefropatią cukrzycową [37, 47, 54, 63, 159 - 162]. W obecnej pracy również wykazano, oprócz podwyższonego stężenia proreniny w osoczu, obniżenie wskaźnika renina/prorenina u chorych na PKZN. Wynika ono tylko z podwyższenia stężenia proreniny, ponieważ różnic w stężeniu reniny w grupie badanej i kontrolnej nie było.

Nasuwa się pytanie jakie są przyczyny podwyższonego stężenia proreniny w osoczu u chorych na pierwotne PKZN? Czy jest to tylko skutek procesu zapalnego toczącego się w nerkach, który aktywuje układ RAA i układ współczulny, czy może również jest to cecha indywidualna związana z mniejszą aktywnością enzymów katalizujących przekształcenie proreniny w reninę? Zapewne jest to wypadkowa czynników stymulujących wydzielanie proreniny, jej metabolizm i degradację. Większość prac poświęconych proreninie dotyczy cukrzycy, a nie kłębuszkowych zapaleniach nerek, co pozwala określić uzyskane wyniki jako

nowatorskie. Wiadomo, że u chorych na pierwotne PKZN występuje zwiększona aktywność układu współczulnego [163, 164], a stymulacja adrenergiczna (przez receptory β) jest czynnikiem pobudzającym produkcję i sekrecję proreniny z komórek mioepitelialnych aparatu przykłębuszkowego. Warto wspomnieć, że prorenina jest produkowana również w innych narządach jak siatkówka, ośrodkowy układ nerwowy czy gonady. Do tej pory nie ustalono udziału tych narządów w produkcji proreniny, ale prawdopodobnie są to ilości nieznaczące w porównaniu do produkcji nerkowej, choć w pracach Franken'a i Ichihary jedną z omawianych opcji podwyższenia stężenia proreniny w osoczu chorych na cukrzycę jest produkcja siatkówkowa [47, 52]. Również aktywność enzymów (katepsyny, prokonwertazy, plazminy, tripsyny) katalizujących reakcję odszczepienia 43 – aminokwasowego polipeptydu od proreniny ma wpływ na jej stężenie w osoczu. W jednej z cyklu prac dotyczących proreniny Ichihara i wsp. wykazali obniżoną aktywność i stężenie katepsyny u szczurów z cukrzycą, co wpływało na zwiększenie stężenia proreniny w osoczu [54]. Aktywność omawianych enzymów proteolitycznych w dużej mierze zależy od wariantów polimorficznych kodujących je genów. Przykładem wpływu polimorfizmu genu na aktywność enzymatyczną w zakresie układu RAA jest omawiany poniżej funkcjonalny polimorfizm inercyjno – delecyjny genu *ACE* kodującego konwertazę angiotensyny (ACE). U homozygot DD aktywność osoczowej ACE jest o 60% wyższa niż u homozygot II [122, 123, 167], co przekłada się na stężenie Ang II. Kolejnym elementem wpływającym na stężenie proreniny u chorych z pierwotnym PKZN może być ekspresja receptorów mannozo-6-fosforanowych (M6-PR) pełniących rolę receptorów klirensowch proreniny i reniny [34, 35, 87]. Franken i wsp. omawiając przyczyny wzrostu proreniny w osoczu chorych z cukrzycą sugerowali również wpływ obniżonego klirensu proreniny z krążenia, który jest związany z patologią naczyń [47]. W pierwotnych PKZN może dochodzić do uszkodzenia naczyń pod postacią pogrubienia ścian włóścików (głównie błoniaste i błoniasto – rozplemowe PKZN). W kontekście uszkodzenia naczyń i podwyższonego stężenia proreniny Veniant i wsp. wykazali uszkodzenie naczyń nerkowych u transgenicznych szczurów z nadekspresją (P)RR bez nadciśnienia tętniczego [168]. Analizowana w obecnej pracy grupa chorych z pierwotnym PKZN kwalifikowała się do stadiów 1 – 3 PChN, co ograniczyło ewentualny wpływ obniżonej filtracji kłębuszkowej na wydalanie proreniny z moczem, choć nie ma jednoznacznych badań stwierdzających, czy i w jakim stopniu jest ona usuwana tą drogą, tym niemniej w kilku pracach z lat 80-tych wykazywano obecność proreniny i reniny w moczu [37, 169, 170].

W badaniach przeprowadzonych w niniejszej pracy wykazano dodatnią korelację między stężeniem proreniny w osoczu i wielkością białkomoczu u chorych na pierwotne PKZN oraz ujemną korelację między wskaźnikiem renina/prorenina i białkomoczem. Mechanizm uszkodzenia kłębuszków nerkowych zależny od proreniny jest związany

z aktywacją (P)RR zlokalizowanych w komórkach mezangium, podocytach, komórkach cewek nerkowych, mięśniach gładkich tętnic nerkowych i jest to mechanizm dwukierunkowy [30, 36, 171]. Z jednej strony związenie proreniny z (P)RR przez szlak sygnalizacyjny kinaz MAPK i ERK1/2 stymulacje proliferację komórek mezangium [37, 172], syntezę czynników profibrotyzującymi (PAI-1, TGFβ1) i zapalnych, które nasilają syntezę macierzy zewnątrzkomórkowej, proces włóknienia i stwardnienia kłębuszków nerkowych [37, 172]. Z drugiej strony prorenina ulega nieproteolitycznej aktywacji i katalizując reakcję przekształcania angiotensynogenu do Ang I zwiększa lokalne powstawanie Ang II, które skutkuje zaburzeniem składu i struktury błony szczelinowej podocytów (m.in. przez zmniejszenie ekspresji nefryny, zlewanie się wypustek stopowatych podocytów), a to z kolei prowadzi do zwiększenia przepuszczalności błony filtracyjnej i białkomoczu [38, 173]. Nadmiar Ang II wytwarzanej wewnątrz-kłębuszkowo przyczynia się również do nasilenia skurczu tętniczek kłębuszkowych (głównie odprowadzających) i przez to zwiększa ciśnienie wewnątrz-kłębuszkowe, które nasila białkomocz i stymuluje apoptozę podocytów [174 - 177]. Należy podkreślić, że wzrost lokalnego (tkankowego) powstawania Ang II wcale nie musi być związany ze wzrostem stężeniem Ang II w osoczu [49, 178]. Dowodem na częściową niezależność lokalnego i systemowego układu RAA oraz patologicznych skutków nieproteolitycznej aktywacji proreniny i (P)RR są badania Ichihary i wsp. Autorzy wykazali, że infuzja peptydu regionu chwytanego (HRP), czyli przeciwciała blokującego receptor (P)RR, u transgenicznym szczurów z nadekspresją (P)RR całkowicie zapobiegała rozwojowi nefropatii cukrzycowej, a także normalizowała zawartość Ang II w nerkach, przy czym nie wpływała na zmiany stężeń Ang I i II w osoczu [179]. W innej pracy tych samych autorów wykazano, że w modelu zwierzęcym cukrzycy powikłanej mikroangiopatią stężenie proreniny w osoczu jest istotnie wyższe, natomiast aktywność reninowa osocza, stężenie Ang I i II są nawet niższe niż u kontroli [30]. Ciekawym odkryciem Allen'a i wsp. odnośnie hiperproreninemii jest fakt, że pojawia się ona u chorych z cukrzycą typu 1 na pięć lat przed wystąpieniem mikroalbuminurii [60]. Być może oznaczanie proreniny w osoczu okaże się przydatne także w prognozowaniu wystąpienia pierwotnego PKZN u osób z grupy ryzyka, tzn. u osób z rodzinnymi postaciami PKZN czy z wariantami polimorficznymi genów predysponującymi do wystąpienia tej choroby *de novo*. Istotnym zagadnieniem jest również rola białkomoczu jako czynnika nefrotoksycznego, który przez działanie prozapalne i aktywujące lokalny układ RAA, uszkadza cewki nerkowe, śródmiąższ nerki, a także kłębuszki nerkowe, przyspieszając progresję choroby nerek [180 - 182]. Zwiększenie wewnątrznerkowego stężenia Ang II towarzyszące białkomoczowi zależy od aktywacji NF-κB - kluczowego czynnika syntezy cytokin prozapalnych IL - 6, ICAM - 1 (cząsteczki adhezyjnej), MCP - 1 i białka RANTES (czynnika chemotaktycznego dla makrofagów i monocytów) [183]. Wielkość białkomoczu oraz ewentualne jego zmiany pod wpływem

leczenia są czynnikami rokowniczymi w pierwotnych PKZN i innych chorobach nerek [8, 181, 184 - 187]. Wielu autorów uważa, że to albuminuria jest lepszym niż białkomocz markerem pozwalającym przewidywać wystąpienie upośledzenia GFR oraz jest niezależnym wskaźnikiem ryzyka sercowo – naczyniowego [188].

Istotą nefroprotekcji, nie tylko w pierwotnym PKZN, jest hamowanie nadmiernej aktywności układu RAA. Uzasadnia to powszechnie stosowanie ACEI i ARB. Przeprowadzone liczne badania (np. DETAIL, REENAL) z punktami końcowymi: albuminuria, białkomocz, spadek filtracji kłębuszkowej, wykazują podobną skuteczność ACEI i ARB w nefroprotekcji [38, 189]. Jednak długotrwała terapia tymi lekami wiąże się ze zwiększeniem stężenia proreniny i reniny w mechanizmie sprzężenia zwrotnego i w efekcie uruchomieniem kaskady angiotensynoniezależnego szlaku uszkodzenia nerek opisanego wcześniej. Badania Ichihary i wsp. wykazały, że podawanie transgenicznym szczurom z cukrzycą peptydu HRP całkowicie hamowało rozwój stwardnienia kłębuszków nerkowych w cukrzycy i że blokada proreninowego szlaku MAPK i ERK1/2 może być skuteczniejszym sposobem zapobiegania tej patologii, niż stosowanie ACEI czy ARB [20, 63]. Wykazano również, że u zdrowych szczurów z nadekspresją ludzkiego receptora (pro)reninowego w miarę starzenia rozwijał się białkomocz i stwardnienie kłębuszków nerkowych które nie tylko hamowano, ale i częściowo odwracano przez stosowanie HRP [49]. Badań takich nie przeprowadzano wprawdzie na modelu klinicznym pierwotnego PKZN, ale wyniki mogłyby być podobne. Wprowadzenie do terapii blokerów receptora (P)RR może okazać się przydatne w leczeniu PKZN, zarówno w hamowaniu toczącego się procesu uszkadzającego struktury nerek, jak i w częściowym odwracaniu jego skutków. Problemem farmakodynamicznym, który może opóźnić wprowadzenie do terapii tej grupy preparatów jest niestabilność biologiczna pentapeptydu HRP, który łatwo ulega rozkładowi proteolitycznemu. Związki peptydowe wykazują krótki okres półtrwania i wymagają ciągłego podawania w infuzji w celu podtrzymania stałego efektu biologicznego [87]. O tym czy skuteczniejsze będzie stosowanie blokerów (P)RR w monoterapii, czy łącznie z ACEI czy ARB pokażą w przyszłości ewentualne badania eksperymentalne i kliniczne. Należy jednak pamiętać o „dwóch twarzach” hamowania układu RAA w terapii blokującej go na kilku poziomach. Nadmierna blokada układu RAA może być szkodliwa, szczególnie dla osób w starszym wieku i obciążonych chorobami układu sercowo – naczyniowego, a angiotensyna II ma nie tylko cechy „diabelskie”, ale też silne korzystne cechy „anielskie” [29].

W przeprowadzonych badaniach własnych stwierdzono wyższe stężenie Ang II w osoczu chorych z pierwotnym PKZN w porównaniu z grupą kontrolną oraz większe jej stężenie w grupie chorych z postaciami proliferacyjnymi PKZN (IgAN, MesPGN, MPGN) w porównaniu do postaci nieproliferacyjnych (MN, FSGS, MCD). Podwyższone stężenie Ang II w osoczu jest niewątpliwym czynnikiem ryzyka progresji chorób nerek i układu sercowo –

naczyniowego. Nadmierna aktywacja, szczególnie receptorów AT₁ na powierzchni komórek mezangialnych i śródmiąższowych prowadzi do ich przerostu, proliferacji oraz zwiększonego wytwarzania macierzy pozakomórkowej, postępującego stwardnienia kłębuszków nerkowych, a także do podocytopatii i podocytopenii skutkującej zwiększeniem przepuszczalności błony filtracyjnej [38, 71, 72, 74].

Wyższe stężenie Ang II w osoczu w postaciach proliferacyjnych PKZN może mieć związek z jej działaniem prozapalnym i mitogennym związanym głównie z IL6, która jest uważana za autokryny czynnik wzrostu komórek mezangialnych [190 - 193]. Troficzne działanie Ang II (prolifерacja i przerost) poprzez receptor AT₁ związane jest również ze stymulacją czynników wzrostu TGFβ₁, PDGF, bFGF i nasileniem ekspresji genów wczesnej odpowiedzi jak c-fos, c-jun i c-myc [25, 194]. Znając patologiczne skutki przedłużonej i nadmiernej aktywacji receptorów AT₁ przez Ang II można było oczekiwać dodatniej korelacji z wielkością białkomoczu czy obecnością nadciśnienia tętniczego. Takiego związku w niniejszej pracy jednak nie wykazano. Podobnie jak w pracy Danielsen'a i wsp., gdzie również nie stwierdzono różnicy w stężeniu Ang II w grupie chorych na PKZN z nadciśnieniem tętniczym i bez [195]. Jest to pośredni dowód na częściową niezależność między lokalnym a systemowym układem RAA, o którym mówiono wcześniej, a także na antagonistyczny efekt pobudzania receptorów AT₁ i AT₂ przez Ang II oraz receptorów mas przez Ang 1 - 7. Prawdopodobnie działanie ACE 2 prowadzące do powstania Ang 1 - 7 może istotnie ograniczać negatywne skutki aktywacji receptorów AT₁, co będzie zapewne wykorzystywane jako nowy kierunek terapii modulującej układ RAA. Aktywatory ACE 2 mogłyby zapobiegać powikłaniom nerkowym i sercowo - naczyniowym zwłaszcza w cukrzycy wobec obserwowanej w modelach zwierzęcych zmniejszonej ekspresji ACE 2 w nerkach w przebiegu tej choroby [85, 87, 196]. Celowo w mojej pracy używam określenia „częściowa niezależność” między systemowym a lokalnym układem RAA, gdyż są doniesienia o ich wzajemnej zależności. W badaniach eksperymentalnych Hiroyuki i wsp. przedstawiono, że przewlekła infuzja Ang II skutkuje wzrostem nerkowej ekspresji angiotensynogenu oraz Ang II [197, 198].

W badaniach własnych nie wykazano związku stężeń proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu z oszacowaną wielkością filtracji kłębuszkowej (eGFR). Być może brak związku wynika z wczesnej fazy PKZN (grupa badana obejmowała pacjentów w stadium 1 - 3 PChN). Przeprowadzenie kilkuletniej obserwacji z punktem końcowym eGFR, w odniesieniu do wyjściowych stężeń omawianych białek, mogłoby wykazać, czy taki związek istnieje.

W badaniach własnych nie wykazano również zależności między BMI a proreniną, reniną, Ang II i aldosteronem w grupie chorych na pierwotne PKZN. Brak związku BMI szczególnie z aldosteronem i Ang II może wynikać z wyłączenia z badania pacjentów

z otyłością ($BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$) po to, aby wykluczyć nefropatię związaną z otyłością, która najczęściej przyjmuje postać FSGS. Tkanka tłuszczowa trzewna jest potencjalnym źródłem angiotensyny II i EKODE (utlenowanej pochodnej kwasu linolowego, *ang. epoxy-keto derivative of linoleic acid*), co stymuluje aldosterogenezę w komórkach warstwy kłębkowej kory nadnerczy [20]. Istnieją badania wskazujące, że u osób z otyłością trzewną i nadciśnieniem tętniczym stężenie aldosteronu w osoczu jest podwyższone w porównaniu z osobami z prawidłową masą ciała i prawidłowym ciśnieniem krwi [82, 120, 121, 199]. Dlatego też istotny jest udział aldosteronu w patogenezie zespołu metabolicznego [122], a otyłości w patogenezie chorób nerek i układu sercowo – naczyniowego [20].

W badaniach własnych wykazano brak różnicy stężenia w aldosteronu w osoczu w grupie chorych z pierwotnym PKZN w stosunku do grupy kontrolnej, a także w grupie chorych z zespołem nerczycowym w porównaniu do chorych bez zespołu nerczycowego. Dane z piśmiennictwa dotyczące tego zagadnienia przedstawiają rozbieżne wyniki. W badaniach Hammond'a i wsp. wykazano wyższe stężenie aldosteronu w osoczu u chorych z zespołem nerczycowym w przebiegu pierwotnych PKZN w porównaniu do osób zdrowych [202]. Również w pracy Borovkovej i wsp. wykazano wyższe stężenia aldosteronu w osoczu w grupie chorych na PKZN [203]. Natomiast Rahman i wsp. wykazali brak różnicy stężenia aldosteronu w osoczu u osób z zespołem nerczycowym i u osób zdrowych [204, 205]. W przebiegu zespołu nerczycowego, w związku ze zmniejszoną objętością osocza i hipoalbuminemią (zwykle $< 20 \text{ g/l}$), dochodzi do aktywacji układu RAA, zwiększonego wydzielania aldosteronu z kory nadnerczy i zwiększonego wydzielania wazopresyny. Nie są to jednak zaburzenia pierwotne. Często przed zmniejszeniem stężenia albumin w osoczu dochodzi, na skutek zwiększonej aktywności układu współczulnego, do osłabienia reakcji na przedsionkowy peptyd natriuretyczny (ANP) i w tym mechanizmie następuje zatrzymanie sodu i wody [163, 206]. Niektórzy autorzy wyróżniają dwie grupy chorych z zespołem nerczycowym – pierwszą z obniżoną objętością osocza, zwiększoną aktywnością reninową osocza (ARO) i stężeniem aldosteronu oraz drugą z prawidłową lub zwiększoną objętością osocza, której towarzyszy prawidłowa ARO i stężenie aldosteronu w osoczu. W drugiej grupie przyjmuje się, że zwiększone wchłanianie zwrotne sodu i wody w nerkach jest pierwotnym zjawiskiem wewnątrznerkowym, niezależnym od czynników układowych [207 - 210]. W ten sposób można by częściowo tłumaczyć wyniki uzyskane w badaniach własnych.

Istotnymi czynnikami wpływającymi na stężenie aldosteronu w osoczu jest również pozycja ciała oraz spożycie soli. W pozycji stojącej stężenie aldosteronu w osoczu jest wyższe niż w pozycji leżącej, a dieta małosolna wzmacnia sekrecję aldosteronu. W badaniach własnych krew od pacjentów pobierano w jednej pozycji (siedzącej), a jako miernik spożycia sodu zastosowano pomiar wydalania sodu z moczem, który nie różnił się statystycznie między grupą chorych z zespołem nerczycowym i bez. Mimo braku różnic w stężeniu

aldosteronu w osoczu między badanymi grupami z zespołem nerczycowym i bez, włączanie antagonistów receptora mineralokortykoidowego (nieslektywnego spironolaktonu lub selektywnego eplerenonu) chorym z zespołem nerczycowym jest jak najbardziej wskazane z uwagi na hamowanie lokalnie działającego aldosteronu. Również występujące w przebiegu leczenia ACEI zjawisko uniku aldosteronowego (*ang. escape phenomenon*) uzasadnia włączanie antagonistów receptora mineralokortykoidowego chorym z PKZN. Skala tego zjawiska może być duża, bo dotyczy nawet 40% chorych z cukrzycową chorobą nerek leczonych ACEI [25, 158, 211]. Blokada receptora mineralokortykoidowego wraz z jednoczesnym stosowaniem ACEI lub ARB skuteczniej redukuje albuminurię u chorych z PKZN i nefropatią cukrzycową [212 - 214]. W dominującej części publikacji analiza stężenia aldosteronu w osoczu dotyczy chorych z pierwotnym i opornym nadciśnieniem tętniczym. Jednoznacznie udowodniono, że w nadciśnieniu tętniczym opornym występuje zwiększona aktywność reninowa osocza i stężenie aldosteronu w osoczu [215 - 217]. Co do nadciśnienia tętniczego pierwotnego to część badań wykazuje zwiększone stężenie aldosteronu w osoczu [82], część nie [218]. Tym niemniej w badaniach nad nadciśnieniem tętniczym pierwotnym wykazano, że dodanie spironolaktonu lub eplerenonu do stosowanej już terapii hipotensyjnej (ACEI/ARB, diuretyki lub amlodypina) redukuje albuminurię i obniża ciśnienie tętnicze [218 - 220].

W badaniach własnych nie stwierdzono różnicy stężenia aldosteronu oraz proreniny, reniny i Ang II w grupie chorych na pierwotne PKZN z nadciśnieniem tętniczym i bez nadciśnienia oraz w grupach z zaburzonym (non – dippers) i prawidłowym rytmem ciśnienia tętniczego (dippers). U większości chorych we wczesnym stadium pierwotnego PKZN występuje zaburzony dobowy rytm ciśnienia tętniczego (nawet do 70%), zarówno w grupie chorych z zespołem nerczycowym jak i mniejszym białkomoczem oraz u chorych z nadciśnieniem tętniczym i z prawidłowymi wartościami ciśnienia tętniczego [163, 221 - 224]. W badaniach własnych zjawisko non - dipping zaobserwowano u 60 % chorych z pierwotnym PKZN. Franken i wsp. nie wykazali, podobnie jak w omawianej pracy, związku istotnie podwyższonego stężenia proreniny i wysokości ciśnienia tętniczego [225]. Z kolei Burcle i wsp. wykazali w modelu eksperymentalnym cukrzycy wystąpienie nadciśnienia tętniczego u zwierząt z nadekspresją receptora (P)RR [226]. Suthanthiran i wsp. nie oceniali wprawdzie stężenia reniny, tylko aktywność reninową osocza, ale wykazali, że wyższa jej aktywność koreluje z wyższymi wartościami ciśnienia tętniczego skurczowego i rozkurczowego [226, 227].

Za jedną z głównych przyczyn zaburzeń dobowego rytmu ciśnienia tętniczego, a także nadciśnienia tętniczego we wczesnych stadiach pierwotnych PKZN uważa się wzmożoną aktywność układu współczulnego. Rahman i wsp. oceniali aktywność układu współczulnego u chorych z zespołem nerczycowym w przebiegu pierwotnych chorób nerek z prawidłową

GFR i u osób zdrowych. Autorzy wykazali znacznie nasilone wydzielanie noradrenaliny w grupie chorych przy podobnej ARO, stężeniu aldosteronu w osoczu i ANP jak w grupie kontrolnej [206]. Kolejnym czynnikiem wpływającym na rozwój nadciśnienia tętniczego i zaburzeń jego rytmu jest omawiana wcześniej nadmierna aktywacja lokalnego układu RAA i wtórny do tej aktywacji niedobór czynników o działaniu naczyniorozszerzającym (endogenny tlenek azotu, prostaglandyny, adrenomedullina, czy urodylatyna) [25]. Istotny wpływ może mieć również białkomocz. Ciekawą koncepcję nadciśnienia tętniczego w zespole nerczycowym prezentuje Remuzzi. Autor uważa, że wchłanianie zwrotne białka w nefronie wybitnie stymuluje produkcję endoteliny 1, które ściśle wiąże się z nadciśnieniem tętniczym [228]. Stefański z zespołem profesora Ritza wykazali występowanie zjawiska non – dipping oraz wyższe o 5 – 10 mmHg wartości ciśnienia tętniczego u chorych z nefropatią IgA z białkomoczem i prawidłowym eGFR w porównaniu do populacji zdrowej [164]. Toth i wsp. pokazali, że u chorych z cukrzycą bez nefro- i neuropatii w momencie pojawienia się albuminurii zmienia się dobowy rytm ciśnienia tętniczego z dipper na non – dipper [229, 230]. Można zatem wnioskować znaczący udział albuminurii/białkomoczu w rozwoju zjawiska non – dipping i nadciśnienia tętniczego w PKZN, oprócz nadmiernej aktywacji lokalnego układu RAA i aktywacji adrenergicznej. Nawet u osób normotensyjnych nieznacznie zwiększona albuminuria wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia nadciśnienia tętniczego w przyszłości, ponieważ jest ona uważana za marker uogólnionej dysfunkcji naczyń nerek i krążenia systemowego [231, 232]. Również wrodzona mała liczba nefronów może być przyczyną nadciśnienia tętniczego. Mniejsza liczba nefronów, a także nasilające się ich uszkodzenie w miarę postępu PKZN, przy występującym przeroście adaptacyjnym nieuszkodzonych lub mniej uszkodzonych nefronów, wiąże się z rozwojem wewnątrznerkowego defektu wydalania sodu, o czym świadczy cecha sodowrażliwości ciśnienia tętniczego występująca u tych chorych [233, 234]. W ten sposób można tłumaczyć brak różnicy stężeń składowych układu RAA w osoczu chorych na pierwotne PKZN z nadciśnieniem tętniczym i zaburzeniem jego rytmu w porównaniu do osób zdrowych, który wykazano w badaniach własnych.

Występowanie zaburzonego dobowego rytmu ciśnienia tętniczego jest niezależnym wskaźnikiem progresji niewydolności nerek i uszkodzenia układu sercowo – naczyniowego [163, 235, 236]. W pracy Csiky i wsp. wykazano, że progresja niewydolności nerek w ciągu 36 miesięcy u chorych z IgAN była istotnie większa w grupie chorych normotensyjnych non – dippers w porównaniu do grupy normotensyjnych dippers [237]. W pracy Timio i wsp. badano z kolei progresję niewydolności nerek u chorych z PChN i nadciśnieniem tętniczym w grupie dippers i non – dippers. Wyniki pokazały szybszy spadek GFR i większy białkomocz u chorych z grupy non – dippers [238, 236]. Aby przeciwdziałać skutkom zjawiska non – dippingu zaleca się stosowanie diuretyku lub ACEI przed snem [230]. W piśmiennictwie

sugeruje się również włączanie leków sympatykolitycznych, ale nie ma doniesień o skuteczności ich działania w chorobach nerek [239]. Co do skuteczności ACEI w obniżaniu nocnego ciśnienia tętniczego należy brać pod uwagę fakt spadku stężenia reniny w nocy, w porównaniu do wyższych wartości w ciągu dnia [221, 240, 241].

Należy również zwrócić uwagę na elementy zależne i niezależne od chorego, które wpływają na wartości pomiaru ciśnienia tętniczego podczas snu, takie jak pozycja ciała i proporcje faz snu NREM [229, 242, 243]. Chorzy biorący udział w badaniu zostali poproszeni o spanie w pozycji "na wznak", po to, by wykluczyć zmiany ciśnienia tętniczego na jednym z ramion przy pozycji „na boku” (różnice nawet do 10 mmHg). Jednak kontrola bezpośrednia przestrzegania protokołu badania była niemożliwa. Co do proporcji faz snu, to wykazano związek zjawiska non – dipping ze skróceniem fazy 4 snu, podczas której ciśnienie tętnicze jest niższe w porównaniu do faz 1 - 3 i fazy REM [244, 245].

W badaniach własnych nie stwierdzono zależności między stężeniem proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu a wydalaniem TGFβ1 z moczem u chorych z pierwotnym PKZN. Stwierdzono natomiast większe wydalanie tej cytokiny z moczem u chorych w porównaniu do grupy kontrolnej. Wynik ten potwierdza dane z piśmiennictwa i nie jest zaskakujący biorąc pod uwagę aktywność procesów patologicznych prowadzących do zwiększenia ekspresji TGFβ1 w nerkach [215, 212, 246]. Wszystkie składowe układu RAA mogą prowadzić do zwiększonej ekspresji TGFβ1 w nerkach, naczyniach krwionośnych i sercu. W badaniach Kaneshiro i wsp. na transgenicznym szczurach z nadekspresją receptora (P)RR wykazano znacznie wyższą ekspresję TGFβ1 w tkance nerkowej oraz większe wydalanie TGFβ1 z moczem w porównaniu z grupą kontrolną [247]. Wyniki te wskazują na istotne znaczenie proreniny i reniny jako pośrednich czynników profibrotyzujących. Agarwal i wsp. wykazali, że dodanie losartanu do pobieranych przewlekle maksymalnych dawek ACEI u chorych z PKZN i nefropatią cukrzycową zmniejsza znacząco poziom TGFβ1 w moczu, bez wpływu na ciśnienie tętnicze i białkomocz [212]. Juknevičius i wsp. wykazali na modelu eksperymentalnym, że wywołany przez wlew aldosteronu hiperaldosteronizm skutkuje zwiększonym wydalaniem TGFβ1 z moczem [248]. Na podstawie wyników uzyskanych w ramach niniejszej pracy – zwiększenie wydalania z moczem TGFβ1 i wyższe stężenia proreniny i Ang II w osoczu w grupie chorych na pierwotne PKZN w porównaniu do osób zdrowych można zakładać sumaryczne działanie tych dwóch białek na zwiększoną ekspresję TGFβ1 w nerkach (proreniny przez receptor (P)RR i Ang II przez receptor AT₁).

W badaniach własnych nie obserwowano różnicy wydalania TGFβ1 z moczem w grupie chorych z zespołem nerczycowym i z mniejszym białkomoczem. Wyniki te pokrywają się z częścią danych prezentowanych w piśmiennictwie. Goumenos oraz Honkanan i wsp. wykazali istotnie większe wydalanie TGFβ1 z moczem u chorych

z zespołem nerczycowym w przebiegu różnych postaci morfologicznych PKZN w porównaniu z grupą kontrolną oraz z chorymi z IgAN i mniejszym białkomoczem [251, 252]. Natomiast Haramaki i wsp. analizowali wydalanie TGFβ1 z moczem u chorych z IgAN, MN oraz RPGN i nie wykazali korelacji z białkomoczem. Również De Muro i wsp. nie wykazali związku wydalania omawianej cytokiny z albuminurią [249]. Ostatnie dwie przytaczane prace sugerują, że wydalanie TGFβ1 w mniejszym stopniu odzwierciedla wielkość białkomoczu, a w większym „produkcję nerkową”, mówiąc tu o proliferacji mezangium, stwardnieniu kłębuszków nerkowych i włóknieniu tkanki cewkowo - śródmiąższowej [249].

W badaniach własnych wykazano większe wydalanie TGFβ1 z moczem w grupie chorych na pierwotne PKZN z nadciśnieniem tętniczym w porównaniu do chorych bez nadciśnienia tętniczego. Dyskusję na tym wynikiem należy rozpocząć od uporządkowania kolejności zdarzeń prowadzących do zwiększenia ekspresji TGFβ1 oraz oceny nadciśnienia tętniczego jako skutku czy przyczyny zwiększonego wydalania tej cytokiny. Nadmierna aktywacja wewnątrznerkowego układu RAA w przebiegu pierwotnych PKZN, która odgrywa istotną rolę w rozwoju nadciśnienia tętniczego w tej chorobie, prowadzi do zwiększonej ekspresji TGFβ1 w nerkach. Możliwy jest udział zarówno proreniny i reniny działających przez (P)RR, Ang II przez ATR₁ i aldosteronu. Działanie TGFβ1 w nerkach jest wielokierunkowe i dotyczy regulacji proliferacji, apoptozy i procesów bliznowacenia. Nadmierna produkcja macierzy pozakomórkowej (matrix) przez komórki mezangium i śródmiąższowe oraz apoptoza podocytów prowadzą do sklerotyzacji kłębuszków nerkowych, włóknienia tkanki śródmiąższowej oraz postępującej utraty czynności nerek [226]. Wiadomo, że częstość występowania nadciśnienia tętniczego zwiększa się wraz z narastaniem niewydolności nerek [233, 253]. Do zwiększonej ekspresji TGFβ1 dochodzi również w ścianach naczyń krwionośnych przy udziale proreniny, Ang II i aldosteronu. Skutkiem działania TGFβ1 na naczynia jest ich remodeling ze wzrostem oporu naczyniowego, zwiększeniem sztywności naczyń i miażdżycą, które uczestniczą w rozwoju nadciśnienia tętniczego [226, 254 - 256]. W eksperymentalnej pracy Zacchigna i wsp. wykazano, że u zwierząt z mutacją unieczynniającą peptyd blokujący powstawanie aktywnego TGFβ1 ciśnienie tętnicze jest istotnie wyższe niż w grupie bez mutacji [art.51]. Również obecność określonych wariantów polimorficznych genu *TGFβ1* ma związek z wyższymi wartościami ciśnienia tętniczego [254]. Suthanthiran i wsp. wykazali dodatnią korelację między stężeniem w osoczu TGFβ1 i nadciśnieniem tętniczym u Afroamerykanów [226, 227].

Nadciśnienie tętnicze, jako wtórne do choroby miąższu nerek może być także przyczyną zwiększenia ekspresji TGFβ1 w nerkach i krążeniu [257]. Zmiany morfologiczne w naczyniach nerkowych (angioskleroza), które powstają pod wpływem nadciśnienia tętniczego są przyczyną niedokrwienia nerek i sklerotyzacji kłębuszków nerkowych

oraz włóknienia tkanki śródmiąższowej, które nakładają się na toczący się pierwotny proces chorobowy [258]. Niedokrwienie kłębuszków nerkowych i tkanki śródmiąższowej skutkuje aktywacją lokalnego układu RAA z uaktywnieniem mitogennego i profibrotującego szlaku działania TGFβ1 [259]. Niimura i wsp. w modelu eksperymentalnym nadciśnienia tętniczego wykazali zwiększoną ekspresję TGFβ1 w tkance nerkowej [258]. Rosario i wsp. [260] oraz Derhaschnig i wsp. [261] wykazali zwiększenie poziomu TGFβ1 w osoczu chorych z nadciśnieniem tętniczym. Istotne znaczenie w nadekspresji TGFβ1 w nerkach generowanej przez nadciśnienie tętnicze ma obecność zaburzenia autoregulacji mikrokrażenia nerkowego, które jest stosunkowo częste w przewlekłych chorobach nerek i jest związane ze wzrostem tkankowego stężenia Ang II. Nadciśnienie tętnicze systemowe przenosi się na podatne kapilary kłębuszków nerkowych wywołując rozciąganie struktur kłębuszka, tzw. „tętnienia” kłębuszka nerkowego (*ang. podocyte stretching, mesangial stretching*). Generowany w ten sposób stres mechaniczny stymuluje hipertrofię komórek mezangialnych i syntezę TGFβ1 [38, 262].

W badaniach własnych nie wykazano związku stężenia proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu oraz wielkości wskaźnika renina/prorenina ze stopniem sklerotyzacji kłębuszków nerkowych i nasileniem włóknienia tkanki cewkowo – śródmiąższowej. Brak jest również danych w piśmiennictwie dotyczących oceny stężenia proreniny i reniny w pierwotnych PKZN w odniesieniu do zmian sklerotycznych i włóknienia w tkance nerkowej. Udział proreniny jest niewątpliwy w rozwoju tych powikłań i potwierdzony w licznych badaniach. Opisywane wcześniej działanie receptorowe (P)RR szlakiem angiotensynoniezależnym prowadzi do procesu stwardnienia kłębuszków nerkowych i tkanki śródmiąższowej. Ichihara i Nguyen niezależnie prezentowali liczne prace pokazujące związek podwyższonego stężenia proreniny w osoczu ze zwiększonym stwardnieniem kłębuszków nerkowych głównie w nefropatii cukrzycowej [20, 34, 62, 87]. Są również prace, w których takiego związku nie obserwowano. Peters i wsp. nie wykazali obecności sklerotyzacji kłębuszków nerkowych u transgenicznych szczurów z wysokimi stężeniami proreniny w osoczu [263]. Odnośnie związku stężenia Ang II i aldosteronu w osoczu z nasileniem zmian sklerotycznych w nerkach publikowane prace dotyczą głównie pierwotnego i opornego nadciśnienia tętniczego, cukrzycy oraz eksperymentalnych modeli hiperaldosteronizmu i stanów związanych z wlewem Ang II. Model przeprowadzanych badań najczęściej opiera się na ocenie skutków blokowania receptorów mineralokortykoidowych oraz stosowania ACEI lub ARB, których efektem jest zmniejszenie uszkodzenia nerek, zarówno w odniesieniu do sklerotyzacji, jak i włóknienia. [212].

Na brak związku stężeń składowych układu RAA w osoczu z nasileniem zmian morfologicznych w nerkach, a zwłaszcza proreniny i Ang II, których stężenia były wyższe niż w grupie kontrolnej, może mieć wpływ kilka czynników. Ocena patomorfologiczna nerek była

wykonana we wczesnym okresie PKZN. Sklerotyzację kłębuszków nerkowych > 30% stwierdzono tylko u 8 chorych. Być może zmiany sklerotyczne kłębuszków nerkowych czy włóknienie tkanki cewkowo – śródmiąższowej rozwinęłyby się po pewnym czasie przy takich właśnie stężeniach składowych układu RAA. Ocena włóknienia była przeprowadzana pośrednią metodą półilościową, a nasilone włóknienie śródmiąższu stwierdzono u 14 na 55 chorych. Warto przy tym przytoczyć doniesienia Goumenosa i wsp., że zwiększona ekspresja TGFβ1 w nerkach w nefropatii IgA wiąże się głównie z proliferacją mezangium, a w mniejszym stopniu ze sklerotyzacją kłębuszków czy włóknieniem tkanki cewkowo - śródmiąższowej [264]. Nefropatia IgA stanowiła przynajmniej 31% (wobec pięciu chorych z wynikiem niediagnostycznym biopsji nerki) przypadków w badaniach własnych. Kolejny element to omawiana wielokrotnie częściowa niezależność lokalnego i systemowego układu RAA.

6.2. Analiza związku genów kandydackich z zachorowalnością na pierwotnych PKZN

W omawianej pracy analizowano 10 polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) 7 genów kandydackich kodujących białka układu RAA: *ACE* (gen konwertazy angiotensyny), *AGT* (gen angiotensynogenu), *AGTR1* (gen receptora typu 1 dla angiotensyny II), *ATP6AP2* (gen receptora proreninowo – reninowego), *CMA1* (gen chymazy), *CYP11β2* (gen syntazy aldosteronowej), *REN* (gen proreniny).

Analizy statystyczne uzyskanych wyników wykazały związek polimorfizmu rs1799998 genu syntazy aldosteronowej ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia pierwotnego PKZN w grupie badanej należącej do populacji polskiej. Dla pozostałych badanych polimorfizmów: rs4646994 *ACE*, rs699 *AGT*, rs5186 *AGTR1*, rs2968917 i rs2971597 *ATP6AP2*, rs1885108 i rs1956923 *CMA1* oraz rs11571080 i rs2368564 *REN* nie wykazano ich związku z wystąpieniem pierwotnego PKZN w grupie badanej, zarówno w odniesieniu do analiz pojedynczego polimorfizmu, jak i kooperatywnego udziału tych wariantów genowych w etiologii tej choroby (analiza interakcji między polimorfizmami z wykorzystaniem metody MDR).

2.1 Polimorfizm rs1799998 genu *CYP11β2*

W omawianej pracy wykazano, że polimorfizm rs1799998 genu *CYP11β2* wiąże się z zachorowalnością na pierwotne PKZN w grupie chorych należących do populacji polskiej. Nosicielstwo allelu C w postaci homozygotycznej (CC) zwiększa ryzyko zachorowania na pierwotne PKZN prawie dwukrotnie. W piśmiennictwie nie ma doniesień o związku omawianego polimorfizmu z zachorowalnością na pierwotne PKZN w populacji polskiej. Dotychczas wykazywano związek polimorfizmu rs1799998 genu *CYP11β2* z progresją nefropatii IgA. Song i wsp. stwierdzili związek nosicielstwa genotypu CC z progresją

nefropatii IgA u kobiet w populacji japońskiej [149], a Bantis i wsp. wykazali, że nosicielstwo allelu C predysponuje do szybszej progresji nefropatii IgA w populacji kaukaskiej [265]. W pracy Kamyshovej i wsp. wykazano związek allelu C omawianego polimorfizmu z występowaniem zespołu nerczycowego i nadciśnienia tętniczego u chorych z nefropatią IgA w populacji kaukaskiej, ale tylko w sprzężeniu z allelem D uwarunkowanym polimorfizmem I/D genu *ACE* i allelem 4a uwarunkowanym polimorfizmem 4a/4b genu endotelialnej syntazy tlenku azotu (*NOS3*) [148]. Wykazano również, że genotyp CC może wiązać się z szybszym rozwojem niewydolności nerek w przebiegu pierwotnego nadciśnienia tętniczego [266].

Polimorfizm rs1799998 genu *CYP11β2* może mieć istotne znaczenie w patogenezie i przebiegu pierwotnych PKZN biorąc pod uwagę fakt, że może być polimorfizmem funkcjonalnym. White i wsp. wykazali, że obecność allelu C polimorfizmu rs1799998 *CYP11β2* wiąże się z czterokrotnie większym wiązaniem czynnika transkrypcyjnego SF – 1 (*ang. steroidogenic factor – 1*) do regionu promotorowego tego genu. Skutkuje to zwiększeniem ekspresji *CYP11β2*, zwiększoną aktywnością syntazy aldosteronowej i ostatecznie zwiększonym stężeniem aldosteronu w tkankach [150, 151]. Zwiększona synteza tkankowego aldosteronu, zależna od wpływu Ang II [153] i wariantu polimorficznego genu *CYP11β2* (genotyp CC), może mieć istotne znaczenie w uszkodzeniu nerek w pierwotnym PKZN. Formułując powyższe wnioski należy brać pod uwagę, że wyniki badań nad funkcjonalnością polimorfizmu rs1799998 *CYP11β2*, przeprowadzane głównie w odniesieniu do pierwotnego nadciśnienia tętniczego, są często niejednoznaczne i wykazują różnice populacyjnie. W badaniach nad populacją azjatycką część badań wykazuje, że obecność allelu C wiąże się ze zwiększonym stężeniem aldosteronu w osoczu i predysponuje do wystąpienia pierwotnego nadciśnienia tętniczego [135, 267]. Inne z kolei wykazują, że zwiększone ryzyko nadciśnienia tętniczego występuje u nosicieli allelu T [150]. W badaniach nad populacją kaukaską wyniki badań są również rozbieżne. Część prac wykazuje, że wiązanie SF – 1 do regionu promotorowego genu *CYP11β2* nie ma wpływu na jego ekspresję [135, 268] i że polimorfizmu rs1799998 *CYP11β2* nie ma związku ani z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym, ani ze stężeniem aldosteronu w osoczu [135]. Część prac wykazuje, że allel C predysponuje do pierwotnego nadciśnienia tętniczego, ale nie wiąże się z osoczym stężeniem aldosteronu [149, 269, 270]. Pozostała część prac pokazuje, że z kolei allel T wiąże się z nadciśnieniem tętniczym i większym wydalaniem tetrahydroaldosteronu z moczem [271 - 273]. Rozbieżność wyników przedstawionych analiz wskazuje na celowość prowadzenia dalszych badań nad ustaleniem funkcjonalności polimorfizmu rs1799998 genu *CYP11β2*. Można przypuszczać, że polimorfizm rs1799998 genu *CYP11β2*, nawet jeśli nie jest funkcjonalny, to może być sprzężony z innymi polimorfizmami funkcjonalnymi odpowiedzialnymi za rozwój pierwotnych PKZN.

Uzyskany w niniejszej pracy wynik wskazujący na brak związku stężenia aldosteronu w osoczu z genotypem uwarunkowanym polimorfizmem rs1799998 *CYP11β2* chorych na pierwotne PKZN, z uwagi na małą liczbę chorych (n = 55), nie upoważnia do wnioskowania o funkcjonalności tego polimorfizmu i wymaga weryfikacji przez zwiększenie liczby chorych.

2.2 Pozostałe polimorfizmy genów kandydackich

Polimorfizm rs4646994 (insercyjno – delecyjny, I/D) genu *ACE*

W badaniach własnych nie stwierdzono związku polimorfizmu I/D genu *ACE* z zachorowalnością na pierwotne PKZN w populacji polskiej. Wyniki są zgodne z danymi z piśmiennictwa, które dotyczą nefropatii IgA. Nie wykazano, aby obecność allelu D w układzie homo- (DD) lub heterozygotycznym (ID) predysponował do wystąpienia nefropatii IgA w populacji kaukaskiej [274 - 276]. W przypadku omawianego polimorfizmu występują różnice populacyjne. Według Qin i wsp. obecność allelu D jest czynnikiem ryzyka wystąpienia nefropatii IgA w populacji azjatyckiej [274], natomiast przeprowadzona przez Schena i wsp. metaanaliza takiego związku nie wykazała [277].

Polimorfizm rs699 genu *AGT*

W badaniach własnych nie stwierdzono związku polimorfizmu rs699 genu *AGT* z zachorowalnością na pierwotne PKZN w populacji polskiej. Dane z piśmiennictwa dotyczą tylko nefropatii IgA i również nie wykazują związku tego wariantu genowego z zachorowalnością na pierwotne PKZN w populacji kaukaskiej [278]. Pomimo braku wpływu na zachorowalność, polimorfizm rs699 genu *AGT* jest związany z progresją nefropatii IgA w populacji kaukaskiej. Częstość allelu T jest większa u chorych z zespołem nerczycowym niż u chorych z mniejszym białkomoczem [278] i obecność genotypu TT wiąże się z szybszą utratą funkcji nerek [136, 278, 279], zwłaszcza przy współistnieniu genotypu DD uwarunkowanego polimorfizmem I/D genu *ACE* [110, 136]. Jest to dowód na poligenowe podłoże choroby z istotnym wpływem sprzężeń między polimorfizmami na jej obraz kliniczny. W piśmiennictwie można również znaleźć prace, które nie potwierdzają wpływu tego polimorfizmu na progresję nefropatii IgA [279, 280] lub potwierdzają go tylko dla płci męskiej w populacji kaukaskiej [140]. W przypadku polimorfizmu rs699 genu *AGT* występują różnice populacyjne. Nie potwierdzono związku tego polimorfizmu z progresją nefropatii IgA w populacji azjatyckiej [140, 281].

Polimorfizm rs5186 genu *AGTR1*

W badaniach własnych nie stwierdzono związku polimorfizmu rs5186 genu *AGTR1* z zachorowalnością na pierwotne PKZN w populacji polskiej. W dostępnych danych, odnoszących się tylko do nefropatii IgA, również nie wykazano związku polimorfizmu rs5186

genu *AGTR1* z zachorowalnością, a także z progresją choroby zarówno w populacji kaukaskiej, jak i azjatyckiej [30, 140, 144]. Mimo wykazanego braku związku jednego z polimorfizmów genu *AGTR1* z nefropatią IgA, kontynuowanie badań nad innymi polimorfizmami tego genu w PKZN ma istotne znaczenie, zwłaszcza w kontekście poszukiwania polimorfizmów funkcjonalnych, które wpływają na ekspresję receptora ATR_1 i jego wrażliwość na Ang II. Dotychczas dane dotyczące funkcjonalności polimorfizmu rs5186 genu *AGTR1* są niejednoznaczne [30, 61, 125].

Polimorfizmy rs2968917 i rs2971597 genu *ATP6AP2*

Przeprowadzone w omawianej pracy analizy nie wykazały związku wybranych polimorfizmów genu receptora proreninowo – reninowego z zachorowalnością na pierwotne PKZN u kobiet i mężczyzn w populacji polskiej. W związku z lokalizacją tego genu na chromosomie X wszystkie analizy statystyczne przeprowadzono osobno dla kobiet i mężczyzn. Również analizę interakcji między polimorfizmami (MDR) przeprowadzono dwukrotnie – łącznie i po wykluczeniu polimorfizmów genu *ATP6AP2*, aby wykluczyć ewentualny wpływ różnej proporcji liczby kobiet do mężczyzn w grupie badanej i kontrolnej. Po identyfikacji genu *ATP6AP2*, dzięki inżynierii genetycznej i zwierzętom transgenicznym, można było poznać patologiczne skutki związane z nadekspresją tego receptora, które są związane głównie z uruchomieniem angiotensynoniezależnego szlaku aktywacji czynników profibrotyzujących, prozapalnych i miogennych w nerkach i układzie sercowo - naczyniowym, co w swoich pracach wielokrotnie udowodniali Ichihara, Nguyen, czy Suzuki [62, 282 - 284]. Natomiast badania nad związkiem genu *ATP6AP2* z zachorowalnością na niektóre choroby trwają dopiero od około 5 lat i dotyczą głównie nadciśnienia tętniczego i jego powikłań. Nie znaleziono prac związanych z wpływem polimorfizmów tego genu na zachorowalność i obraz kliniczny PKZN. Wykazano, że polimorfizm rs5918007 omawianego genu jest związany z występowaniem nadciśnienia tętniczego pierwotnego u mężczyzn w populacji japońskiej i udarów niedokrwiennych mózgu oraz przerostu lewej komory u kobiet tej populacji [156, 157]. Znana jest również mutacja genu *ATP6AP2* ($\Delta 4$ -(P)RR/*ATP6AP2*) skutkująca zmniejszeniem ekspresji receptora (P)RR o 50%, która wiąże się występowaniem padaczki i upośledzenia umysłowego związanego z chromosomem X (ang., X – linked mental retardation, XLMR). Istotne znaczenie z punktu widzenia pierwotnych PKZN miałyby odnalezienie polimorfizmu funkcjonalnego, który wpływałby na ekspresję (P)RR w nerkach. Istotny wydaje się również udział genu *ATP6AP2* w embriogenezie. W badaniach doświadczalnych wykazano, że w wyniku różnych mutacji omawianego genu dochodzi do zaburzeń rozwoju narządów takich jak serce, nerki, wątroba czy jelito [282]. W aspekcie tych odkryć można by rozpatrywać pierwotne PKZN jako powikłanie zaburzenia embriogenezy nerek.

Polimorfizmy rs1885108 i rs1956923 genu *CMA1*

W badaniach własnych nie wykazano związku polimorfizmów rs1885108 i rs1956923 genu *CMA1* z zachorowalnością na pierwotne PKZN. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono prac badających związek tego genu z PKZN. Wykazano udział genu *CMA1* w rozwoju nefropatii cukrzycowej w przebiegu cukrzycy typu 2 [285] i rozwoju kardiomiopatii przerostowej [286]. Kontynuowanie badań nad udziałem polimorfizmów genu chymazy w predyspozycji do zachorowania oraz wpływem na obraz kliniczny pierwotnych PKZN wydaje się istotne, gdyż 40 %, a w cukrzycy nawet więcej, Ang II w nerkach powstaje przy udziale chymazy i enzymów innych niż ACE [48, 286]. Nadekspresja lokalnej Ang II wydaje się być jednym z najważniejszych czynników związanych z uszkodzeniem nerek w PKZN.

Polimorfizmy rs11571080 i rs2368564 genu *REN*

W badaniach własnych nie wykazano związku polimorfizmów rs11571080 i rs2368564 genu *REN* z zachorowalnością na pierwotne PKZN. Nie znaleziono w piśmiennictwie danych dotyczących analiz związku tego genu z pierwotnymi PKZN. Wobec wyniku niniejszej pracy, która pokazała wyższe stężenia proreniny w osoczu chorych i dodatkowo dodatnią korelację z wielkością białkomoczu, zasadne jest kontynuowanie badań nad tym genem zarówno w odniesieniu do zachorowalności, przebiegu choroby i poziomu ekspresji proreniny w tkankach czy osoczu. Polimorfizmy genu *REN* są badane w innych jednostkach chorobowych. W badaniach nad nefropatią cukrzycową wykazano, że genotyp AA polimorfizmu Bgl I (1303G>A, rs10900556) genu reniny *REN* występował częściej u osób z cukrzycą insulinozależną i wiązał się z wyższym stężeniem proreniny w surowicy i obecnością nefropatii cukrzycowej. W tej samej pracy dla polimorfizmu TaqI (-4063G>A, rs41317140) genu *REN* takiego związku nie stwierdzono [149]. Gen *REN* może mieć także znaczenie w patogenezie pierwotnego nadciśnienia tętniczego. Polimorfizm -5312C/T (rs12750834) tego genu wiąże się z wyższymi wartościami ciśnienia rozkurczowego w populacji kaukaskiej [155].

Brak związku analizowanych polimorfizmów genów *ACE*, *AGT*, *AGTR1*, *ATP6AP2*, *CMA1* i *REN* z częstością występowania pierwotnego PKZN w populacji polskiej może wynikać również z:

- zbyt małej liczebności grupy chorych z PKZN oraz grupy kontrolnej, aby możliwe było wykazanie wszystkich istotnych statycznie różnic w częstościach poszczególnych alleli oraz genotypów badanych wariantów genowych
- zbyt małej liczby analizowanych polimorfizmów, aby możliwa była pełna analiza udziału wariantów nukleotydowych danych genów w etiologii PKZN

- wpływu zjawiska różnorodności genetycznej występującego między populacjami, które polega na tym, że w każdej populacji mogą istnieć inne geny lub loci wykazujące związek z ryzykiem wystąpienia PKZN (ang. *genetic heterogeneity*), lub też różne warianty polimorficzne danego genu kandydackiego (ang. *allelic heterogeneity*)
- obecności innych rodzajów polimorfizmów niż pojedynczego nukleotydu – polimorfizmy liczby kopii (ang. *copy number variation*, CNV), insercje czy też delecje
- możliwości wystąpienia epistatycznych interakcji między genami czy polimorfizmami [287]
- wyboru polimorfizmów o częstości allelu rzadszego $MAF \geq 0,2$ (20%) w populacji kaukaskiej zgodnie z zasadą „częsta choroba – powszechny allel”; rzadkie allele (< 1%) również mogą być związane z podatnością na pierwotne PKZN [287]
- obecnością zjawisk epigenetycznych, czyli dziedziczności zmian ekspresji genów niezależnych od sekwencji DNA (opartej głównie na metylacji DNA i posttranslacyjnej modyfikacji histonów) i ich związku z czynnikami środowiskowymi, np. niedobór kwasu foliowego w diecie [50].

7. Wnioski

1. U chorych na pierwotne PKZN w porównaniu do osób zdrowych występują wyższe stężenia proreniny i Ang II oraz porównywalne stężenia reniny i aldosteronu w osoczu.
2. U chorych na pierwotne PKZN występuje obniżony wskaźnik renina/prorenina, co związane jest ze zwiększonym stężeniem proreniny w osoczu.
3. Stężenie proreniny w osoczu koreluje z wielkością białkomoczu u chorych z pierwotnym PKZN, co wskazuje na istotną rolę proreniny w uszkodzeniu nerek w przebiegu tej choroby.
4. Występowanie u chorych z postaciami proliferacyjnymi PKZN wyższego stężenia Ang II w osoczu w porównaniu do chorych z postaciami nieproliferacyjnymi może wskazywać na istotny udział Ang II w procesach proliferacyjnych w nerkach w tej chorobie.
5. Chorzy z pierwotnym PKZN z zespołem nerczycowym i bez zespołu nerczycowego oprócz stężenia proreniny, nie różnią w stężeniami reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu.
6. Chorzy ze świeżo rozpoznanym pierwotnym PKZN z nadciśnieniem tętniczym nie różnią się stężeniem proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu od chorych bez nadciśnienia tętniczego. Podobnie nie ma różnic między chorymi z zaburzeniami rytmu ciśnienia tętniczego (non - dipping) i chorymi z prawidłowym rytmem ciśnienia tętniczego (dipping).
7. Brak związku stężeń proreniny, Ang II, reniny i aldosteronu w osoczu z nasileniem sklerotyzacji kłębuszków nerkowych i włóknieniem tkanki cewkowo - śródmiąższowej oraz wydalaniem TGF β 1 z moczem u chorych z PKZN może wskazywać na to, że:
 - a) stężenia tych białek w osoczu nie są dobrym markerem nasilenia zmian fibrotycznych w nerkach, gdyż lokalny układ RAA jest częściowo niezależny od systemowego;
 - b) lepszym markerem nasilenia zmian fibrotycznych w nerkach w przebiegu pierwotnych PKZN może być ocena ekspresji tkankowej tych białek, a nie ich stężenia w osoczu;
 - c) we wczesnych okresach pierwotnego PKZN zmiany fibrotyczne są zbyt mało nasilone, aby można było wykazać zależność z osoczwymi stężeniami białek układu RAA.

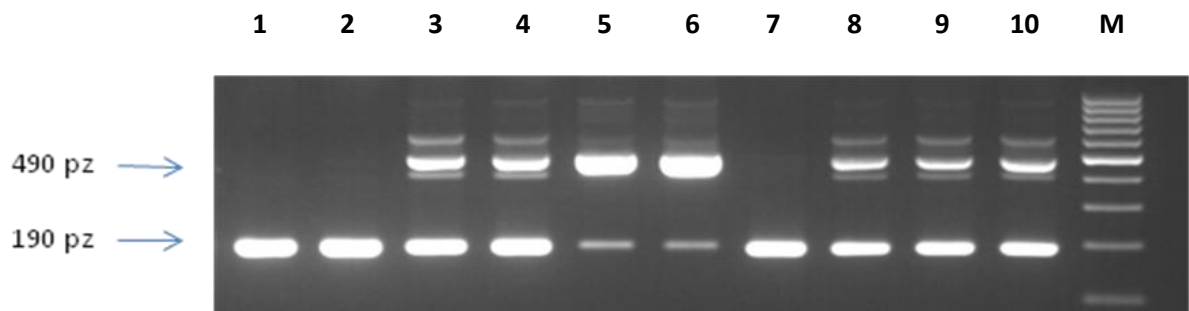
8. U chorych na pierwotne PKZN wydalanie z moczem TGF β 1 jest większe niż u osób zdrowych, co wskazuje na zwiększoną ekspresję tej cytokiny w przebiegu pierwotnego PKZN. Większe wydalanie TGF β 1 z moczem w grupie chorych z nadciśnieniem tętniczym w porównaniu do chorych bez nadciśnienia tętniczego sugeruje, że obecność nadciśnienia tętniczego w pierwotnych PKZN wiąże się ze zwiększoną aktywacją szlaków prowadzących do zwiększonej ekspresji TGF β 1 w tkankach.

9. Polimorfizm rs1799998 genu kodującego syntazę aldosteronową (*CYP11 β 2*) wiąże się z zachorowalnością na pierwotne PKZN w grupie badanej. Obecność allelu C w postaci homozygotycznej (CC) zwiększa ryzyko zachorowania na pierwotne PKZN prawie dwukrotnie.

10. Polimorfizmy genów kodujących białka układu RAA: rs4646994 *ACE*, rs699 *AGT*, rs5186 *AGTR1*, rs2968917 i rs2971597 *ATP6AP2*, rs1885108 i rs1956923 *CMA1* oraz rs11571080 i rs2368564 *REN* nie wykazują związku z ryzykiem zachorowania na pierwotne PKZN w grupie badanej. Polimorfizmy te nie wykazują także kooperatywnego udziału w etiologii PKZN.

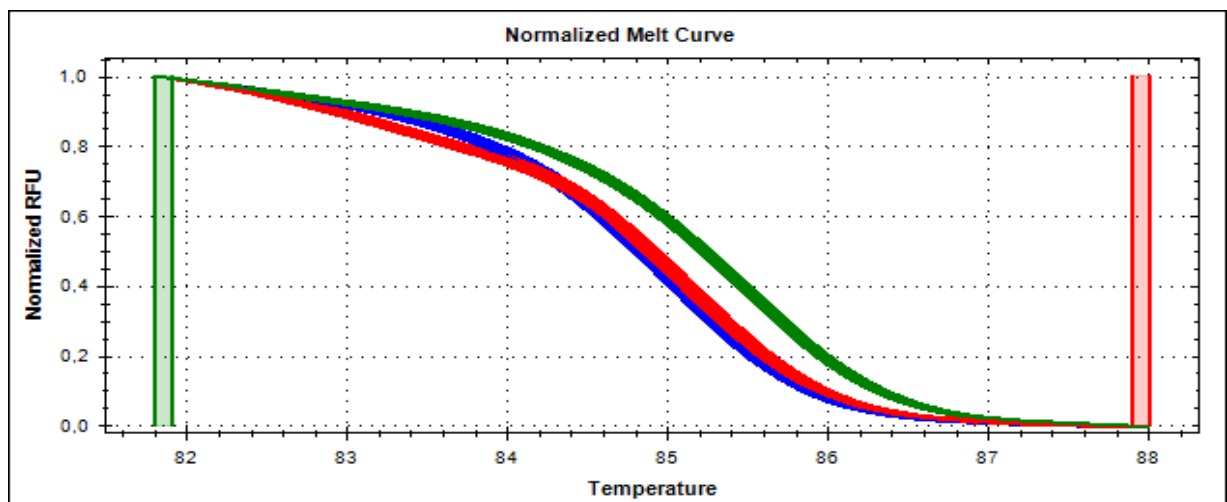
8. Aneks

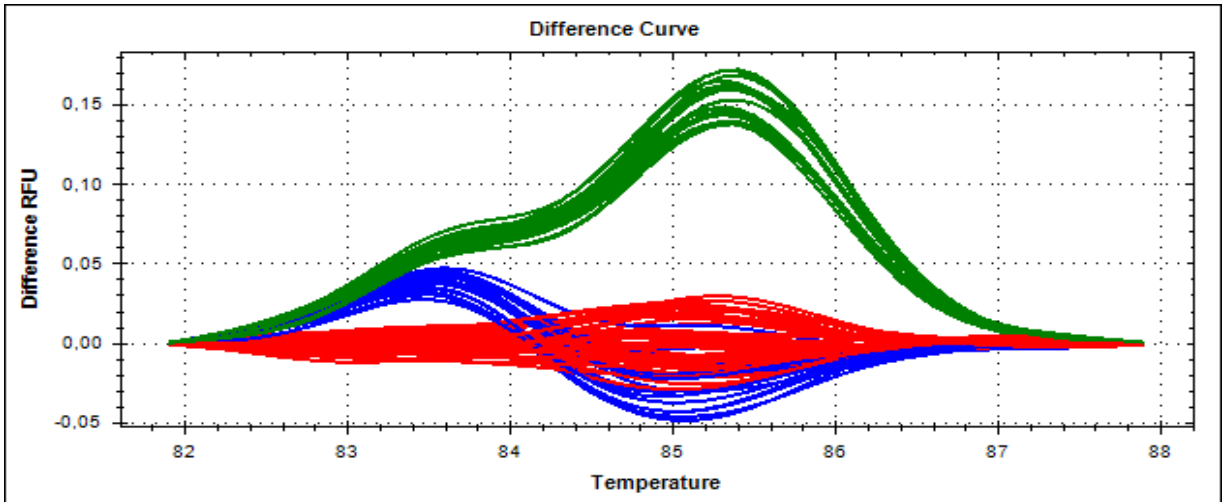
8.1. Analiza polimorfizmu rs4646994 (I/D) genu *ACE*



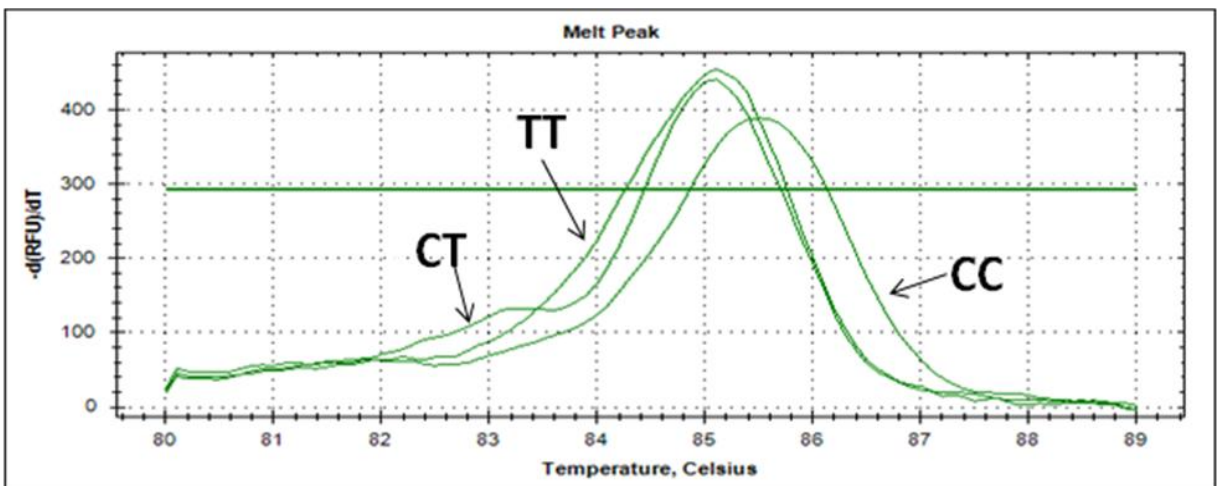
Rycina 17. Analiza PCR polimorfizmu rs4646994 (I/D) genu *ACE*. Allel I (z insercją) - 490 pz, allel D - 190 pz. Ścieżki: 1, 2, 7 - homozygoty DD, 3, 4, 8, 9, 10 - heterozygoty I/D, 5, 6 - homozygota II, M - wzorzec wielkości

2. Analiza polimorfizmu rs699 genu *AGT*

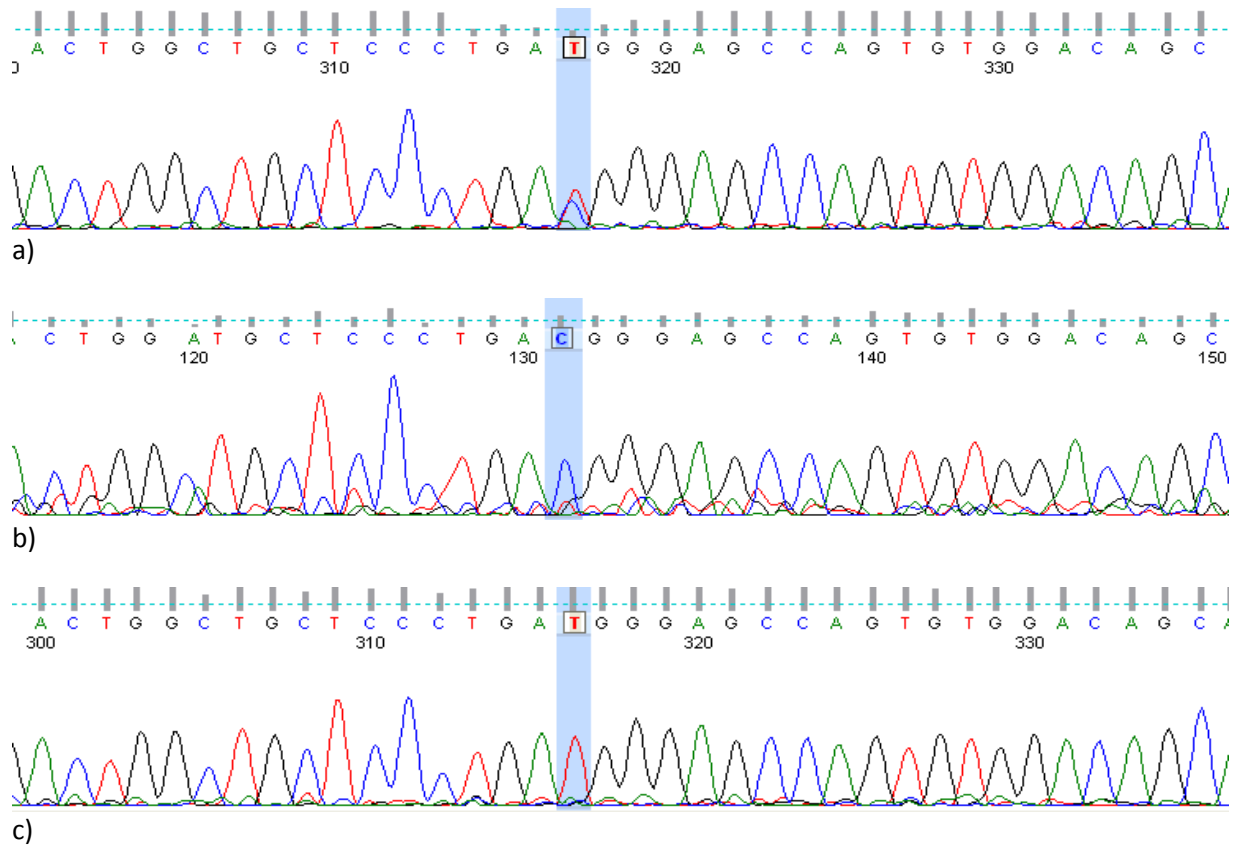




Rycina 18. Analiza krzywych topnienia polimorfizmu rs699 genu *AGT*. Dwie możliwości graficznego przedstawienia analizy. Kolorem zielonym oznaczono homozygoty CC, niebieskim homozygoty TT, czerwonym heterozygoty CT

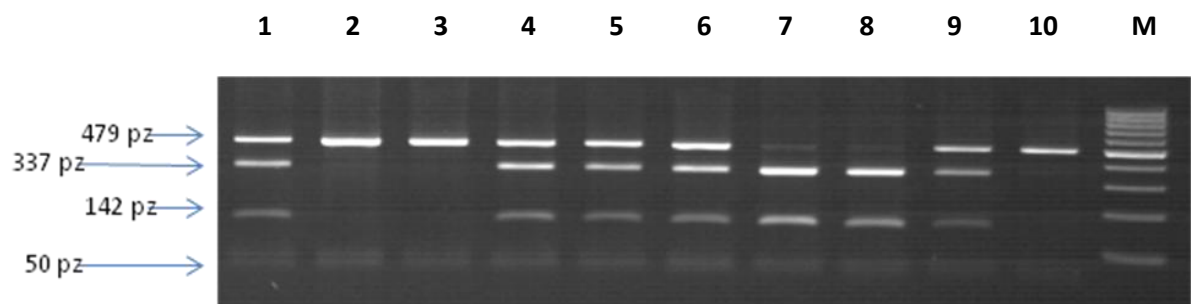


Rycina 19. Analiza pików topnienia DNA polimorfizmu rs699 genu *AGT*



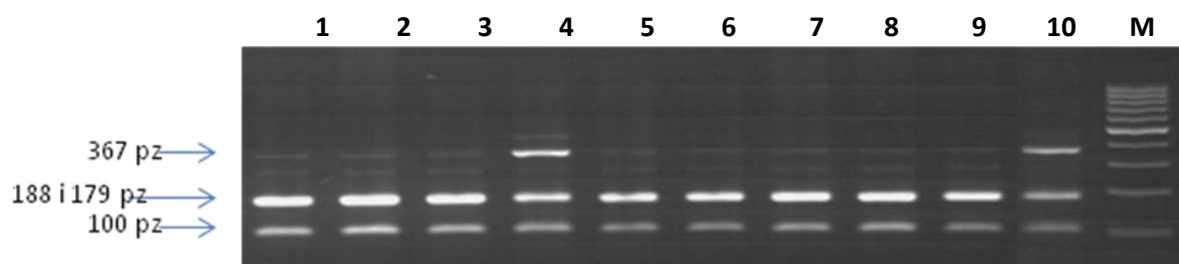
Rycina 20. Analiza sekwencjonowania DNA dla polimorfizmu rs699 genu *AGT*; a) heterozygota CT, b) homozygota CC, c) homozygota TT

3. Analiza polimorfizmu rs2971597 genu *AGTR1*



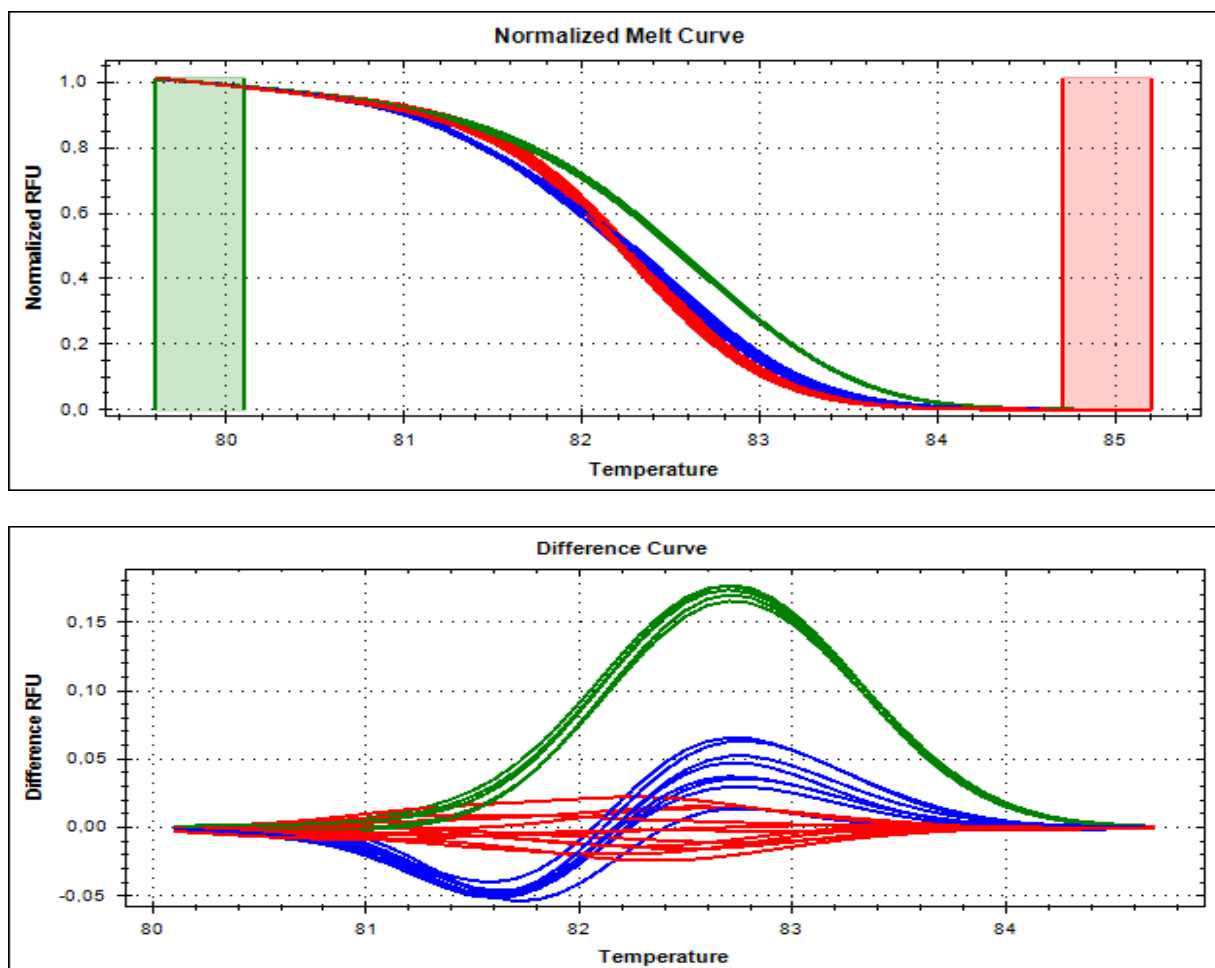
Rycina 21. Analiza RFLP polimorfizmu rs2971597 genu *AGTR1*. Polimorfizm rs2971597 genu *AGTR1* (A/C) powoduje powstanie miejsca restrykcyjnego dla enzymu HpyF3I (C/TNAG). Allel A: 479 +50 pz, Allel C: 337 + 142 + 50 pz. Ścieżka 1, 4, 5, 6, 9 – heterozygoty AC, 2, 3, 10 – homozygoty AA, 7, 8 – homozygoty CC, M – wzorzec wielkości

4. Analiza polimorfizmu rs2968917 genu *ATP6AP2*

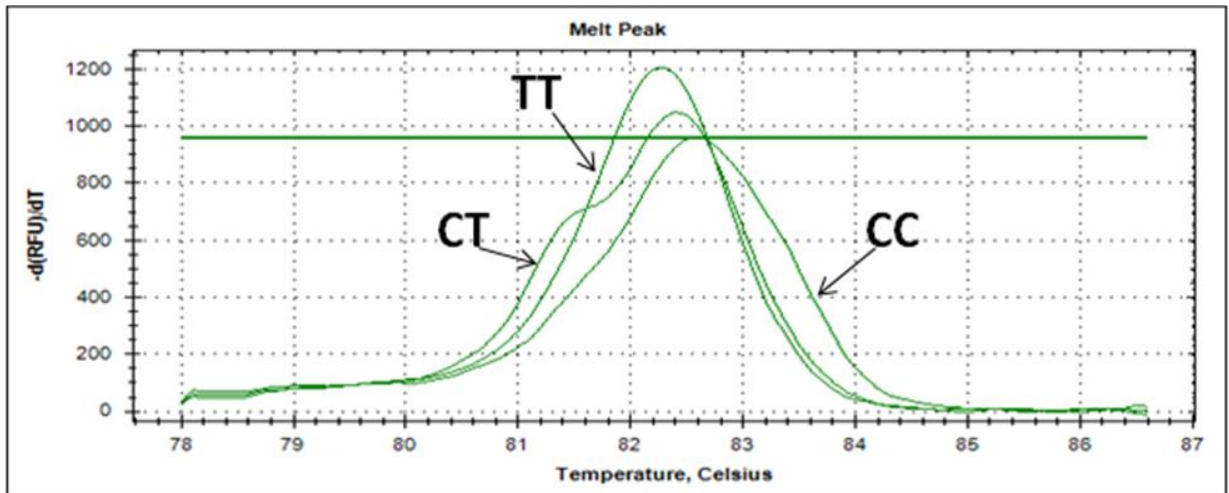


Rycina 22. Analiza RFLP polimorfizmu rs2968917 genu *ATP6AP2*. Polimorfizm rs2968917 genu *ATP6AP2* (C/T) powoduje powstanie miejsca restrykcyjnego dla enzymu *Eco571* (CTGAAG(16N)). Allel C: 367 + 100 pz, Allel T: 188 + 179 + 100 pz. Ścieżka 1 – homozygota CC; 2,3,4,5,7,8,9 – homozygota TT; 6, 10 – heterozygota CT, M – wzorec wielkości

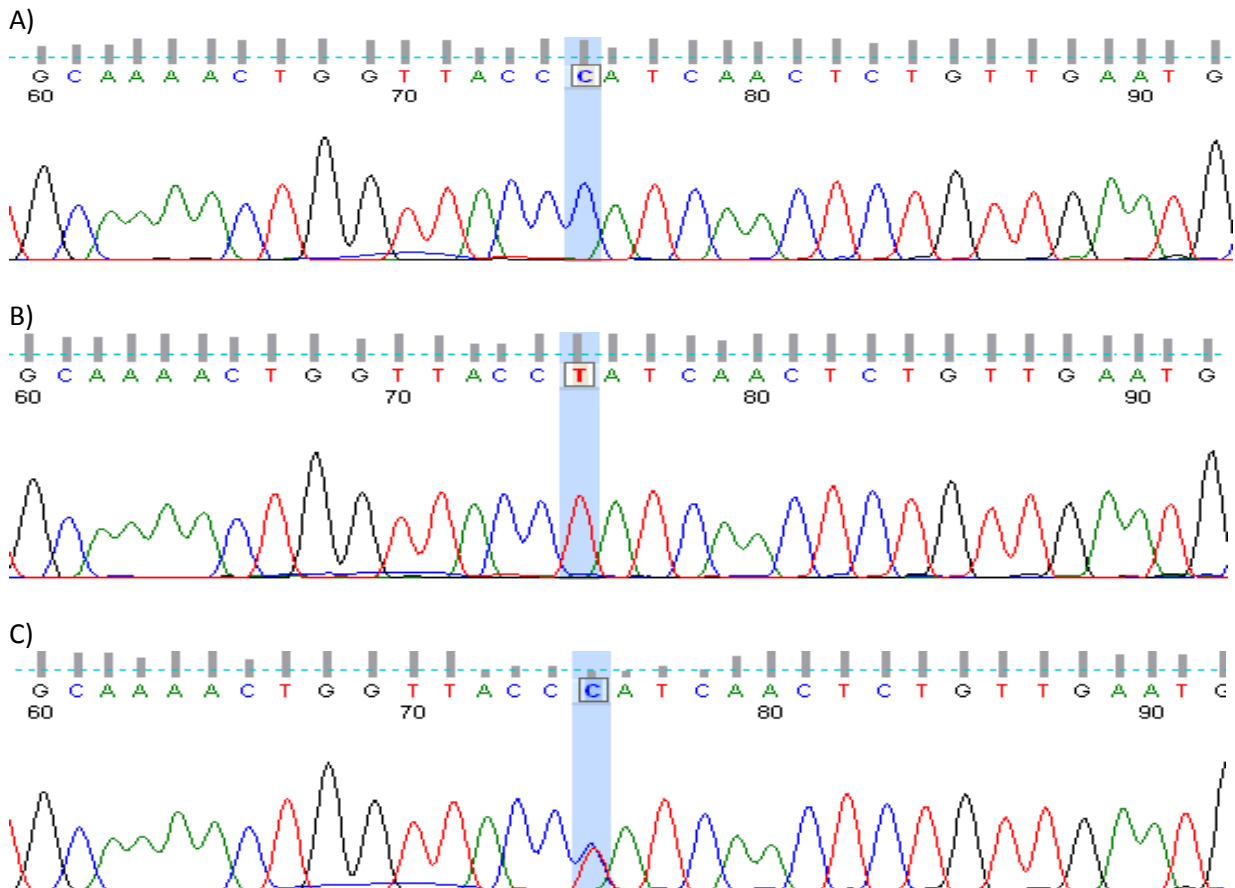
5. Analiza polimorfizmu rs2971597 genu *ATP6AP2*



Rycina 23. Analiza krzywych topnienia polimorfizmu rs2971597 genu *ATP6AP2*. Dwie możliwości graficznego przedstawienia analizy. Kolorem zielonym oznaczono homozygoty CC, niebieskim heterozygoty CT, czerwonym homozygoty TT

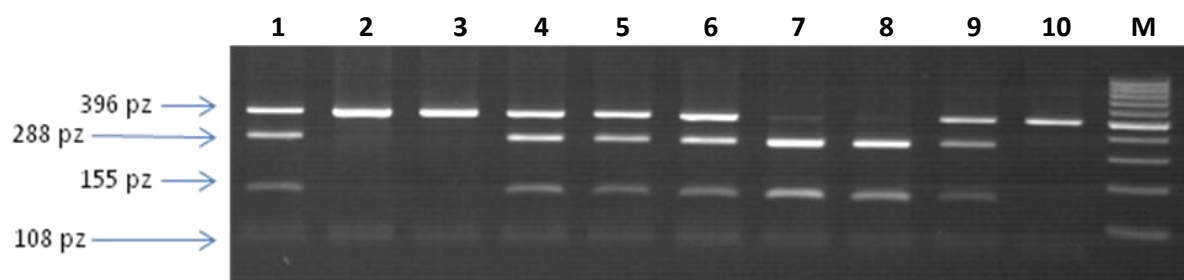


Rycina 24. Analiza pików topnienia DNA polimorfizmu rs2971597 genu *ATP6AP2*



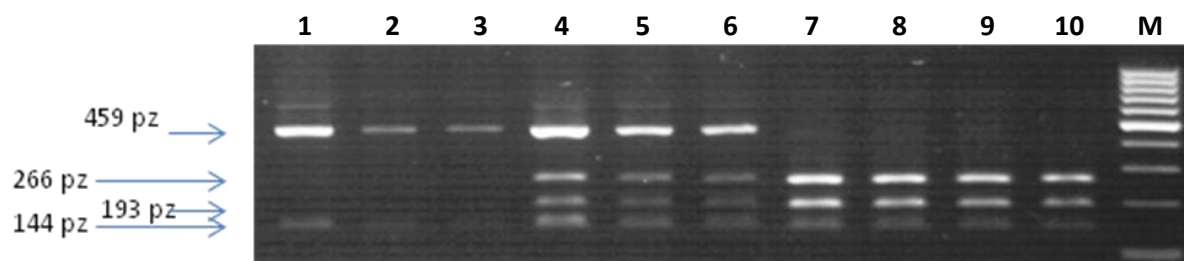
Rycina 25. Analiza sekwencjonowania DNA dla polimorfizmu rs2971597 genu *ATP6AP2*; a) homozygota CC, b) homozygota TT, c) heterozygota CT

6. Analiza polimorfizmu rs1885108 genu *CMA1*



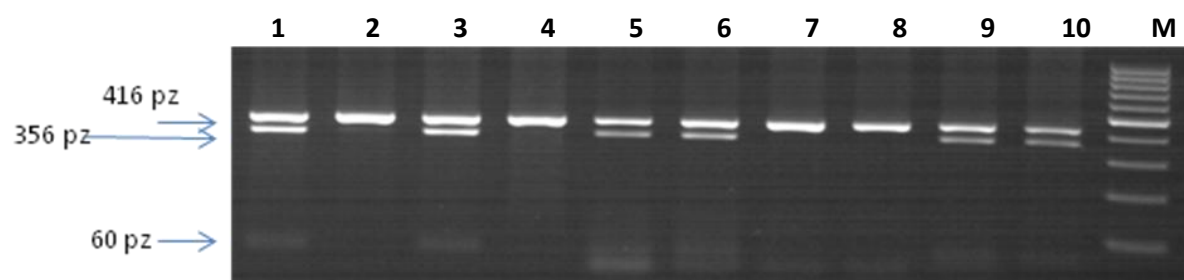
Rycina 26. Analiza RFLP polimorfizmu rs1885108. Polimorfizm rs1885108 genu *CMA1* (A/G) powoduje powstanie miejsca restrykcyjnego dla enzymu Eco4719G/GWCC). Allel A: 396 + 155 pz, Allel G: 288 + 155 + 108 pz. Ścieżka 1, 8, 10 – heterozygoty AG, 9 – homozygota AA, 2, 3, 4, 5, 6, 7 – homozygoty GG, M – wzorzec wielkości

7. Analiza polimorfizmu rs1956923 genu *CMA1*



Rycina 27. Analiza RFLP polimorfizmu rs1956923 genu *CMA1*. Polimorfizm rs1956923 genu *CMA1* (C/T) powoduje zniesienie miejsca restrykcyjnego dla enzymu Tail (ACGT/). Allel C: 266 + 193 + 144 pz; allel T: 459 + 144 pz. Ścieżka 1, 2, 3 – homozygoty TT, 4, 5, 6 – heterozygoty CT, 7, 8, 9, 10 – homozygoty CC, M – wzorzec wielkości

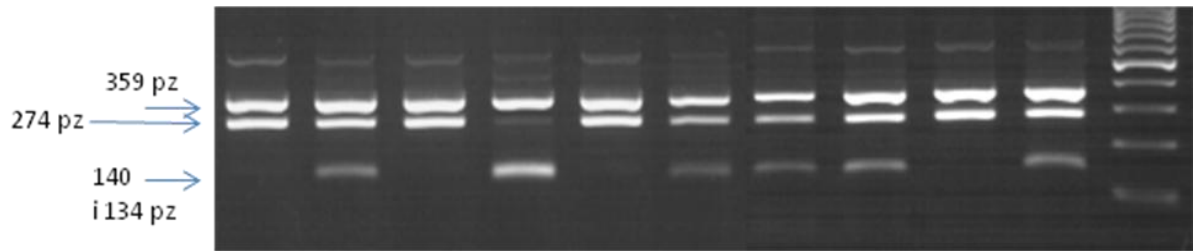
8. Analiza polimorfizmu rs1799998 genu *CYP11B2*



Rycina 28. Analiza RFLP polimorfizmu rs1799998 genu *CYP11B2*. Polimorfizm rs1799998 genu *CYP11B2* (C/T) powoduje zniesienie miejsca restrykcyjnego dla enzymu HaeIII (GG/CC). Allel C: 356 + 60 pz; Allel T: 416 pz. Ścieżka 1, 3, 5, 6, 9, 10 – heterozygota CT, 2, 4, 7, 8 – homozygota TT, M – wzorzec wielkości

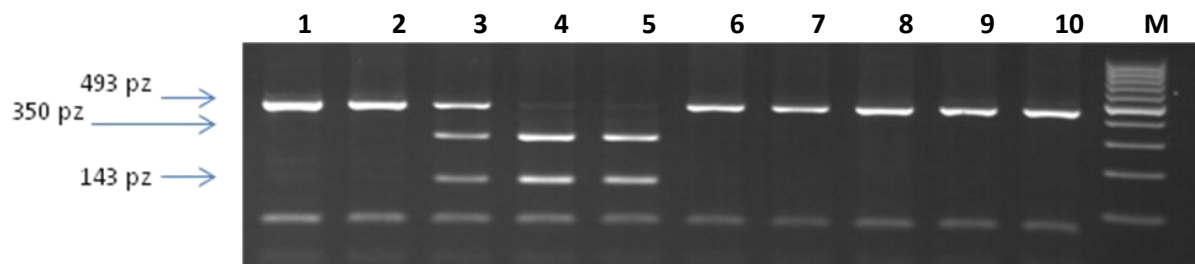
9. Analiza polimorfizmu rs11571080 genu *REN*

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M



Rycina 29. Analiza RFLP polimorfizmu rs11571080 genu *REN*. Polimorfizm rs11571080 genu *REN* (A/G) powoduje powstanie miejsca restrykcyjnego dla enzymu *MspI* (C/CGG). Allel A: 359 + 274 pz; Allel G: 359 + 140 + 134 pz. Ścieżka 1, 3, 5, 9 – homozygoty AA, 2, 6, 7, 10 – heterozygoty AG, 4 – homozygoty GG, M – wzorzec wielkości

10. Analiza polimorfizmu rs2368564 genu *REN*



Rycina 30. Analiza RFLP polimorfizmu rs2368564 genu *REN*. Polimorfizm rs2368564 genu *REN* (C/T) powoduje powstanie miejsca restrykcyjnego dla enzymu *MboI* (/GATC). Allel C: 493 pz; Allel T: 350 + 143 pz. Ścieżka 1, 2, 6, 7, 8, 9, 10 – homozygoty CC, 3 – heterozygoty CT, 4, 5 – homozygoty TT, M – wzorzec wielkości

Piśmiennictwo

- [1] Rutkowski B, Lichodziejewska – Niemierko M, Grenda R: Raport o stanie leczenia nerkozastępczego w Polsce – 2008. 2010; 15 – 16.
- [2] Klinger M, Mazanowska O: Pierwotne kłębuszkowe zapalenie nerek – współczesny algorytm postępowania diagnostycznego i terapeutycznego. *Pol Arch Med. Wewn*, 2008; 118 (10): 567 – 571.
- [3] Myśliwiec M, Antczak A, Pruszczyk P: Wielka interna, tom pt. Nefrologia. 2009; 128 – 129.
- [4] Malafrente P, Mastroianni-Kirsztajn G, Betônico GN et.al.: Paulista Registry of glomerulonephritis: 5 - year data report. *Nephrol Dial Transplant*. 2006 Nov; 21 (11): 3098 - 3105.
- [5] D'Amico G, Minetti L, Ponticelli C et al.: Prognostic indicators in idiopathic IgA mesangial nephropathy. *Q J Med*. 1986 Apr; 59 (228): 363 - 378.
- [6] Alamartine E, Sabatier JC, Guerin C et.al: Prognostic factors in mesangial IgA glomerulonephritis: an extensive study with univariate and multivariate analyses. *Am J Kidney Dis*. 1991 Jul; 18 (1): 12 - 9.
- [7] Bartosik LP, Lajoie G, Sugar L et al.: Predicting progression in IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis*. 2001 Oct; 38 (4): 728 - 735.
- [8] Donarski R, Bednarski K, Manitius J: Białkomocz a postęp przewlekłej choroby nerek. *Diabetologia Praktyczna*. 2006; tom 7 : 194 - 199.
- [9] Marchesi C, Paradis P, Schiffrin EL. : Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends Pharmacol Sci*. 2008 Jul; 29 (7): 367 - 374.
- [10] Goto M, Wakai K, Kawamura T, Ando M, Endoh M, Tomino Y.: A scoring system to predict renal outcome in IgA nephropathy: a nationwide 10-year prospective cohort study. *Nephrol Dial Transplant*. 2009 Oct; 24 (10): 3068 - 74.
- [11] Hsu SI, Ramirez SB, Winn MP, Bonventre JV et al.: Evidence for genetic factors in the development and progression of IgA nephropathy. *Kidney Int*. 2000 May; 57 (5): 1818- 1835.
- [12] Remuzzi G, Benigni A, Remuzzi A.: Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest*. 2006 Feb; 116 (2): 288 - 296.
- [13] Schena FP: Survey of the Italian Registry of Renal Biopsies. Frequency of the renal diseases for 7 consecutive years. The Italian Group of Renal Immunopathology. *Nephrol Dial Transplant*. 1997 Mar; 12 (3): 418 - 426.
- [14] Fervenza FC, Sethi S, Specks U: Idiopathic membranous nephropathy: diagnosis and treatment. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008 May; 3 (3): 905 - 919.

- [15] Passerini P, Pasquali S, Cesana B et al.: Long-term outcome of patients with membranous nephropathy after complete remission of proteinuria. *Nephrol Dial Transplant*. 1989; 4 (6): 525 - 529.
- [16] Donadio JV Jr, Torres VE, Velosa JA et al.: Idiopathic membranous nephropathy: the natural history of untreated patients. *Kidney Int*. 1988 Mar; 33 (3): 708 - 15.
- [17] Schieppati A, Masconi L, Perna A et al.: Prognosis of untreated patients with idiopathic membranous nephropathy. *N. Engl. J. Med*. 1993; 329 (2): 85 - 89.
- [18] Rivera JR, Perez, Hurtado: Factors predictive for renal survival in primary focal segmental glomerulosclerosis. *Nefrologia*. 2008; 4: 439 - 446.
- [19] Troyanov, Wall, Miller et al. for the Toronto Glomerulonephritis Registry Group: Focal and segmental glomerulosclerosis; definition and relevance of partial remission. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2005; 16: 1061 - 1068.
- [20] Hyla - Klekot L, Pulcer B, Kokot F: Układ renina - angiotensyna - aldosteron - nowe aspekty patogenetyczne i lecznicze. *Arterial Hypertension*. 2007; 11: 242 - 274.
- [21] Burcklé CA, Jan Danser AH, Müller DN et al.: Elevated blood pressure and heart rate in human renin receptor transgenic rats. *Hypertension*. 2006 Mar; 47 (3): 552 - 556.
- [22] Kaneshiro Y, Ichihara A, Takemitsu T et al.: Increased expression of cyclooxygenase-2 in the renal cortex of human prorenin receptor gene-transgenic rats. *Kidney Int*. 2006 Aug; 70 (4): 641 - 6.
- [23] Kaneshiro Y, Ichihara A, Takemitsu T et al.: Increased expression of cyclooxygenase-2 in the renal cortex of human prorenin receptor gene-transgenic rats. *Kidney Int*. 2006 Aug; 70 (4): 641 - 646.
- [24] Hyla - Klekot L, Kokot F: (pro)renina i konwertazy angiotensyny - nowe aspekty patofizjologiczne i lecznicze układu reninowo - angiotensynowego (RAS). *Przegląd Kardiometaboliczny* 2008; 3 (3); 209 - 212.
- [25] Czekalski S: Cukrzycowa choroba nerek (nefropatia cukrzycowa) i inne choroby nerek w cukrzycy. Wyd. Termedia, 2007: 44.
- [26] Nguyen G: Renin/prorenin receptors. *Kidney Int*. 2006 May; 69 (9): 1503 - 1506.
- [27] Eijnden MM, Saris JJ, de Bruin RJ et al.: Prorenin accumulation and activation in human endothelial cells: importance of mannose 6-phosphate receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001 Jun; 21 (6): 911 - 916.
- [28] Danser A, Deinum J: Renin, prorenin and the putative (pro)renin receptor. *Hypertension* 2005; 46: 1069 - 1076.
- [29] Więcek A, Nieszporek T: Nadmierne hamowanie aktywności układu renina - angiotensyna - aldosteron nie zawsze jest korzystne. *Postępy Nauk Medycznych*. 2009; 22 (10): 782 - 788.
- [30] Czekalski S: Prorenin/Renin and Their Receptors - a Potential Role in Diabetic Kidney Disease. *Adv Clin Exp Med* 2008; 17 (2); 123 - 128.

- [31] Toffelmire EB, Slater K, Corvol P et al.: Response of plasma prorenin and active renin to chronic and acute alterations of renin secretion in normal humans. Studies using a direct immunoradiometric assay. *J Clin Invest*. 1989 Feb; 83 (2): 679 - 687.
- [32] Derks F, Schalekamp MP, Schalekamp MA: Twostep prorenin – renin – conversion. Isolation of an intermediary form of activated prorenin. *J. Biol. Chem*. 1987; 262: 2472 – 2477.
- [33] Skinner S, Cran E, Corol P et al.: Angiotensin I and II, active and inactive renin, renin substrate, renin activity and angiotensinase in human liquor amnium and plasma. *Am. J. Obstet Gynecol*. 1975; 121: 5028 – 5030.
- [34] Nguyen G; The (pro)renin receptor: pathophysiological roles in cardiovascular and renal pathology. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007; 16: 129 – 133.
- [35] Nguyen G, Delarue F, Burckle C et al.: Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular response to renin. *J Clin Invest* 2002; 109: 1417 – 1427.
- [36] Nguyen G, Delarue F, Berrou J et al.: Specific receptor binding of renin on human mesangial cells in culture increases plasminogen activator inhibitor-1 antigen. *Kidney Int*. 1996 Dec; 50 (6): 1897 - 1903.
- [37] Sihn G, Rousselle A, Vilianovitch L et al.: Physiology of the (pro)renin receptor: Wnt of change? *Kidney Int*. 2010 Aug; 78 (3): 246 - 256.
- [38] Stompór T: Układ renina - angiotensyna – aldosteron w rozwoju i progresji przewlekłej choroby nerek. *Przewodnik Lekarza* 2009; 5: 25 – 33.
- [39] Abassi Z, Winaver J, Feuerstein GZ et al. : The biochemical pharmacology of renin inhibitors: implications for translational medicine in hypertension, diabetic nephropathy and heart failure: expectations and reality. *Biochem Pharmacol*. 2009 Oct 15; 78 (8): 933 - 940.
- [40] Yamamoto T, Noble NA, Cohen AH et al.: Expression of transforming growth factor-beta isoforms in human glomerular diseases. *Kidney Int*. 1996 Feb; 49 (2): 461 - 469.
- [41] Tsakas S, Goumenos DS: Accurate measurement and clinical significance of urinary transforming growth factor-beta1. *Am J Nephrol*. 2006; 26 (2): 186 - 93.
- [42] Khalil MS, El Nahas AM, Blakemore AI: Transforming growth factor-beta1 SNPs: genetic and phenotypic correlations in progressive kidney insufficiency. *Nephron Exp Nephrol*. 2005; 101 (2): 31 - 41.
- [43] Sato F, Narita I, Goto S et al.: Transforming growth factor-beta1 gene polymorphism modifies the histological and clinical manifestations in Japanese patients with IgA nephropathy. *Tissue Antigens*. 2004 Jul; 64 (1): 35 - 42.
- [44] Border WA, Ruoslahti E: Transforming growth factor-beta 1 induces extracellular matrix formation in glomerulonephritis. *Cell Differ Dev*. 1990 Dec 2; 32 (3): 425 - 431.
- [45] Taniguchi Y, Yorioka N, Masaki T et al.: Localization of transforming growth factors beta1 and beta2 and epidermal growth factor in IgA nephropathy. *Scand J Urol Nephrol*. 1999 Aug; 33 (4): 243 - 247.

- [46] Czekalski S: Cukrzycowa choroba nerek (nefropatia cukrzycowa) i inne choroby nerek w cukrzycy. Wyd. Termedia, 2007: 42.
- [47] Franken AA, Derkx FH, Man in't Veld AJ et al.: High plasma prorenin in diabetes mellitus and its correlation with some complications. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990 Oct; 71 (4): 1008-1015.
- [48] Price DA, Porter LE, Gordon M et al.: The paradox of the low-renin state in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 1999 Nov; 10(11): 2382 - 2391.
- [49] Muller D, Friedrich C: Renin Receptor Blockade: A Better Strategy for renal protection Than Renin – Angiotensin System Inhibition? *Current hypertension Reports* 2008; 10: 405 – 409.
- [50] Schmieder R: The potential role of prorenin in diabetic nephropathy. *Journal of Hypertension* 2007; 25: 1323 – 1326.
- [51] Wilson DM, Luetscher JA: Plasma prorenin activity and complications in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1990 Oct 18; 323 (16): 1101 - 1106.
- [52] Danser AH, van den Dorpel MA, Deinum J et al.: Renin, prorenin, and immunoreactive renin in vitreous fluid from eyes with and without diabetic retinopathy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989 Jan; 68(1): 160 - 7.
- [53] Daneman D, Crompton CH, Balfe JW et al.: Plasma prorenin as an early marker of nephropathy in diabetic (IDDM) adolescents. *Kidney Int.* 1994 Oct; 46 (4): 1154 - 1159.
- [54] Ichihara A, Sakoda M: Involvement of (pro)renin receptor in the glomerular filtration barrier. *J Mol Med.* 2008; 86: 629 – 635.
- [55] Hayashi M, Senba S, Saito I et al.: Changes in blood pressure, urinary kallikrein, and urinary prostaglandin E2 in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1983 May; 322 (4): 290 - 294.
- [56] Derkx F, Schalkenkamp M: Human prorenin: pathophysiology and clinical implications. *Clin Exp Hypertens A* 10: 1213 – 1225.
- [57] Nguyen G, Danser A: Prorenin and (pro)renin receptor: a review of available data from in vitro studies and experimental models in rodents. *Exp Physiol* 93; 5: 557 – 563.
- [58] Deinum J, Tarnow L, van Gool JM et al.: Plasma renin and prorenin and renin gene variation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 1999 Aug; 14(8): 1904 - 11.
- [59] Luetscher JA, Kraemer FB, Wilson DM et al.: Increased plasma inactive renin in diabetes mellitus. A marker of microvascular complications. *N Engl J Med.* 1985 May 30; 312 (22): 1412 - 1417.
- [60] Allen TJ, Cooper ME, Gilbert RE: Serum total renin is increased before microalbuminuria in diabetes. *Kidney Int.* 1996 Sep; 50 (3): 902 - 907.

- [61] Suzuki F, Hayakawa M, Nakagawa T: Human prorenin has "gate and handle" regions for its non-proteolytic activation. *J Biol Chem*. 2003 Jun 20; 278 (25): 2217 - 2222.
- [62] Ichihara A, Suzuki F, Nakagawa T: Prorenin receptor blockade inhibits development of glomerulosclerosis in diabetic angiotensin II type 1a receptor - deficient mice. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Jul; 17 (7): 1950 - 1961.
- [63] Ichihara A, Hayashi M, Kaneshiro Y: Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the "handle" region for nonproteolytic activation of prorenin. *J Clin Invest*. 2004 Oct; 114 (8): 1128 - 1135.
- [64] Hyla – Klekot L, Kokot F: Aliskiren – czy tylko alternatywny bloker układu reninowo – angiotensynowo – aldosteronowego (RAA)? *Nephrol. Dial. Pol*. 2009; 13: 189 – 191.
- [65] Nussberger J, Aubert JF, Bouzourene K et al.: Renin inhibition by aliskiren prevents atherosclerosis progression: comparison with irbesartan, atenolol, and amlodipine. *Hypertension*. 2008 May; 51 (5): 1306 - 1311.
- [66] Schalekamp MA, Derkx FH, Deinum J et al.: Newly developed renin and prorenin assays and the clinical evaluation of renin inhibitors. *J Hypertens*. 2008 May; 26 (5): 928 - 937.
- [67] Wiggins KJ, Kelly DJ: Aliskiren: a novel renoprotective agent or simply an alternative to ACE inhibitors? *Kidney Int*. 2009 Jul; 76(1): 23 - 31.
- [68] Pilz B, Shagdarsuren E, Wellner M et al.: Aliskiren, a human renin inhibitor, ameliorates cardiac and renal damage in double-transgenic rats. *Hypertension*. 2005 Sep; 46 (3): 569 - 576.
- [69] Feldman DL, Jin L, Xuan H et al.: Effects of aliskiren on blood pressure, albuminuria, and (pro)renin receptor expression in diabetic TG(mRen-2)27 rats. *Hypertension*. 2008 Jul; 52 (1): 130 - 136.
- [70] Parving HH, Brenner BM, McMurray JJ: Aliskiren Trial in Type 2 Diabetes Using Cardio-Renal Endpoints (ALTITUDE): rationale and study design. *Nephrol Dial Transplant*. 2009 May; 24 (5): 1663 – 1671.
- [71] Brenner BM: Remission of renal disease: recounting the challenge, acquiring the goal. *J Clin Invest*. 2002 Dec; 110 (12): 1753 - 1758.
- [72] Navar LG: The intrarenal renin-angiotensin system in hypertension. *Kidney Int*. 2004 Apr; 65 (4): 1522 - 32.
- [73] Noronha IL, Fujihara CK, Zatz R: The inflammatory component in progressive renal disease - are interventions possible? *Nephrol Dial Transplant*. 2002 Mar; 17 (3): 363 - 368.
- [74] Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Gomez-Guerrero C et al.: Angiotensin II, the immune system and renal diseases: another road for RAS? *Nephrol Dial Transplant*. 2003 Aug; 18 (8): 1423 - 1426.
- [75] Liu Y: Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1 – 12.

- [76] Shankland SJ: The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 2006 Jun; 69 (12): 2131 - 2147.
- [77] Cao Z, Kelly DJ, Cox A et al.: Angiotensin 2 receptor is expressed in the adult rat kidney and promotes cellular proliferation and apoptosis. *Kidney Int* 2000; 58: 2437 – 2451.
- [78] Cao Z, Bonnet F, Candido R: Angiotensin type 2 receptor antagonism confers renal protection in a rat model of progressive renal injury. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Jul; 13 (7): 1773 - 1787.
- [79] Ruiz - Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M: Systemic infusion of angiotensin II into normal rats activates nuclear factor-kappaB and AP-1 in the kidney: role of AT(1) and AT(2) receptors. *Am J Pathol.* 2001 May; 158 (5): 1743 - 1756.
- [80] Wolf G, Wenzel U, Burns KD: Angiotensin II activates nuclear transcription factor-kappaB through AT1 and AT2 receptors. *Kidney Int.* 2002 Jun; 61 (6): 1986 - 1995.
- [81] Ziyadeh FN, Cohen MP: Effects of glycated albumin on mesangial cells: evidence for a role in diabetic nephropathy. *Mol Cell Biochem.* 1993 Aug 11; 125 (1): 19 - 25.
- [82] Januszewicz W, Januszewicz A: Aldosteron – hormone o wielu obliczach. *Postępy Nauk Medycznych*, 2009; 22 (10): 751 – 756.
- [83] Pitt B, Zannad F, Remme WJ: The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.* 1999 Sep 2; 341 (10): 709 - 717.
- [84] Santos RA, Ferreira AJ et al.: Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2007 Mar; 16 (2): 122 - 128.
- [85] Burns KD: The emerging role of angiotensin-converting enzyme-2 in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2007 Mar; 16 (2): 116 - 121.
- [86] Santos RA, Ferreira AJ, Pinheiro SV et al.: Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert Opin Investig Drugs.* 2005 Aug; 14 (8): 1019 - 31.
- [87] Hyla – Klekot L, Kokot F: (Pro)renina I konwertaza 2 angiotensyny – nowe aspekty patofizjologiczne i leczenie układu reninowo – angiotensynowego. *Przegląd Kardiometaboliczny* 2008; 3 (3): 209 – 212.
- [88] Epstein M: Aldosterone receptor blockade and the role of eplerenone: evolving perspectives. *Nephrol Dial Transplant.* 2003 Oct; 18 (10): 1984 - 1992.
- [89] Hostetter TH, Ibrahim HN: Aldosterone in chronic kidney and cardiac disease. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Sep; 14 (9): 2395 - 2401.
- [90] Nagase M, Fujita T: Aldosterone and glomerular podocyte injury. *Clin Exp Nephrol.* 2008 Aug; 12 (4): 233 – 242.
- [91] Takeda Y, Miyamori I, Yoneda T et al.: Production of aldosterone in isolated rat blood vessels. *Hypertension.* 1995 Feb; 25 (2): 170 - 173.

- [92] Takeda Y, Miyamori I, Inaba S: Vascular aldosterone in genetically hypertensive rats. *Hypertension*. 1997 Jan; 29 (1): 45 - 48.
- [93] Dekcayare C: Cardiac aldosterone production and ventricular remodeling. *Kidney Int* 2000; 57: 1346 – 1351.
- [94] Takeda Y, Yoneda T, Demura M et al.: Cardiac aldosterone production in genetically hypertensive rats. *Hypertension*. 2000 Oct; 36 (4): 495 - 500.
- [95] Gomez – Sanchez CE: Aldosterone biosynthesis in the rat brain. *Endocrinology*. 1997; 138: 3369 – 2273.
- [96] Schmidt BM, Sammer U, Fleischmann I et al.: Rapid nongenomic effects of aldosterone on the renal vasculature in humans. *Hypertension*. 2006 Apr; 47 (4): 650 - 655.
- [97] Nagata D, Takahashi M, Sawai K et al.: Molecular mechanism of the inhibitory effect of aldosterone on endothelial NO synthase activity. *Hypertension*. 2006 Jul; 48 (1): 165 - 171.
- [98] Uhrenholt TR, Schjerning J, Hansen PB et al.: Rapid inhibition of vasoconstriction in renal afferent arterioles by aldosterone. *Circ Res*. 2003; 93 (12): 1258 - 1266.
- [99] Arima S, Kohagura K, Xu HL et al.: Endothelium - derived nitric oxide modulates vascular action of aldosterone in renal arteriole. *Hypertension*. 2004 Feb; 43 (2): 352 - 357.
- [100] Schmidt BM, Oehmer S, Delles C et al.: Rapid nongenomic effects of aldosterone on human forearm vasculature. *Hypertension*. 2003; 42 (2): 156 - 160.
- [101] Schmidt BM, Sammer U, Fleischmann I et al.: Rapid nongenomic effects of aldosterone on the renal vasculature in humans. *Hypertension*. 2006; 47 (4): 650 - 655.
- [102] Kokot F, Ficek R: Białkomocz kłębuszkowy – nowe aspekty patogenetyczne. *Pol. Arch. Med. Wewn*. 2003; 110: 1379 – 1386.
- [103] Mathieson P: Update on the podocyte. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens*. 2008; 18: 206 – 211.
- [104] Nystrom J, Hultenby K, Ek S et al.: CRIMI 1 is localized to the podocyte filtration slit diaphragm of the adult human kidney. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2009; 24: 2038 – 2044.
- [105] Pollack M. R.: Inherited podocytopathies: FSGS and nephrotic syndrome from a genetic viewpoint. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2002; 13: 3016 – 3023.
- [106] Charchar F, Zimmerli L, Tomaszewski M: The pressure of finding human hypertension genes: new tools, old dilemmas. *J Hum Hypertens*. 2008; 22 (12): 821-8. Epub 2008
- [107] Altshuler D, Daly MJ, Lander ES: Genetic mapping in human disease. *Science*. 2008; 322 (5903): 881 - 888.
- [108] Ellis JA, Stebbing M, Harrap SB: Association of the human Y chromosome with high blood pressure in the general population. *Hypertension*. 2000; 36 (5): 731 - 733.

- [109] Shankar RR, Charchar FJ, Eckert GJ et al.: Studies of an association in boys of blood pressure and the Y chromosome. *Am J Hypertens*. 2007; 20 (1): 27 - 31.
- [110] Hsu SI, Ramirez SB, Winn MP et al.: Evidence for genetic factors in the development and progression of IgA nephropathy. *Kidney Int*. 2000; 57 (5): 1818 - 1835.
- [111] Tolkoff – Rubin NE, Cosimi AB, Fuller T et al.: IgA nephropathy in HLA – identical siblings. *Transplantation* 1978; 26: 430 – 433.
- [112] MacDonald IM, Dumble LJ, Kingcaid – Smith P: HLA and glomerulonephritis, in HLA and Disease, Paris, *INSERM*, 1976: 203
- [113] Berthoux FC, Gagne A, Sabatier JC et al.: HLA-Bw35 and mesangial IgA glomerulonephritis. *N Engl J Med*. 1978; 298 (18): 1034 - 1035.
- [114] Noël LH, Descamps B, Jungers P et al.: HLA antigen in three types of glomerulonephritis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1978; 10 (1): 19 - 23.
- [115] Hiki Y, Kobayashi Y, Tateno S et al.: Strong association of HLA - DR4 with benign IgA nephropathy. *Nephron*. 1982; 32 (3): 222 - 226.
- [116] Moore RH, Hitman GA, Lucas EY et al.: HLA DQ region gene polymorphism associated with primary IgA nephropathy. *Kidney Int*. 1990; 37 (3): 991 - 995.
- [117] Beerman I, Novak J, Wyatt RJ et al.: The genetics of IgA nephropathy. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2007; 3 (6): 325 - 338.
- [118] Gharavi AG, Yan Y, Scolari F et al.: IgA nephropathy, the most common cause of glomerulonephritis, is linked to 6q22 - 23. *Nat Genet*. 2000 Nov; 26 (3): 354 - 357.
- [119] Bantis C, Ivens K, Kreusser W et al.: Influence of genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system on IgA nephropathy. *Am J Nephrol*. 2004 Mar - Apr; 24 (2): 258 - 267.
- [120] Maruyama K, Yoshida M, Nishio H et al.: Polymorphisms of renin-angiotensin system genes in childhood IgA nephropathy. *Pediatr Nephrol*. 2001 Apr; 16 (4): 350 - 355.
- [121] Poyan Mehr A, Siegel AK, Kossmehl P et al.: Early onset albuminuria in Dahl rats is a polygenetic trait that is independent from salt loading. *Physiol Genomics*. 2003;14 (3): 209 - 216.
- [122] Navis G, van der Kleij FG, de Zeeuw D et al.: Angiotensin - converting enzyme gene I/D polymorphism and renal disease. *J Mol Med*. 1999; 77 (11): 781 - 91.
- [123] Malik FS, Lavie CJ, Mehra MR et al.: Renin-angiotensin system: genes to bedside. *Am Heart J*. 1997; 134 (3): 514 - 526.
- [124] Danser AH, Schalekamp MA, Bax WA et al.: Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism. *Circulation*. 1995 Sep 15; 92 (6): 1387 - 1388.
- [125] Bzoma B, Dębska – Ślizień A, Dudziak M: Potencjalne predyspozycje genetyczne do powikłań nadciśnienia tętniczego u chorych leczonych powtarzanymi hemodializami. *Pol. Merk. Lek.*, 2008, XXV; 147: 209 – 206.

- [126] Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F et al.: An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest*. 1990 Oct; 86 (4): 1343 - 1346.
- [127] Bloem LJ, Manatunga AK, Pratt JH: Racial difference in the relationship of an angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism to serum angiotensin I-converting enzyme activity. *Hypertension*. 1996 Jan; 27 (1): 62 - 66.
- [128] Fujimura T, Yokota M, Kato S et al.: Lack of association of angiotensin converting enzyme gene polymorphism or serum enzyme activity with coronary artery disease in Japanese subjects. *Am J Hypertens*. 1997; 10 (12): 1384 - 1390.
- [129] Cambien F, Poirier O, Lecerf L et al.: Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature*. 1992; 359 (6396): 641 - 644.
- [130] Tarnow L, Cambien F, Rossing P et al.: Insertion/deletion polymorphism in the angiotensin-I-converting enzyme gene is associated with coronary heart disease in IDDM patients with diabetic nephropathy. *Diabetologia*. 1995; 38 (7): 798 - 803.
- [131] Lovati E, Richard A, Frey BM et al.: Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system in end-stage renal disease. *Kidney Int*. 2001; 60 (1): 46 - 54.
- [132] Harrap SB, Davidson HR, Connor JM et al.: The angiotensin I converting enzyme gene and predisposition to high blood pressure. *Hypertens*, 1993; 21: 455 – 460.
- [133] Harrap SB, Davidson HR, Connor JM et al.: The angiotensin I converting enzyme gene and predisposition to high blood pressure. *Hypertension*. 1993 Apr; 21 (4): 455 - 460.
- [134] O'Donnell CJ, Lindpaintner K, Larson MG et al.: Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 1998 May 12; 97 (18): 1766 - 1772.
- [135] Ciechanowicz A 2010.
http://www.esculap.pl/forum_polonii_medycznej/artukul/genetyka_molekularna_w_diagnostyce_nadcisnienia_tetniczego/id,dbbb0d6aa279533294e2576a6806ec7d/
- [136] Bantis C, Ivens K, Kreusser W, Koch M et al.: Influence of genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system on IgA nephropathy. *Am J Nephrol*. 2004; 24 (2): 258 - 267.
- [137] Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV et al.: Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell*. 1992; 71 (1): 169 - 80.
- [138] Paillard F, Chansel D, Brand E et al.: Genotype-phenotype relationships for the renin-angiotensin-aldosterone system in a normal population. *Hypertension*. 1999; 34 (3): 423 - 429.
- [139] Schena FP, D'Altri C, Cerullo G et al.: ACE gene polymorphism and IgA nephropathy: an ethnically homogeneous study and a meta-analysis. *Kidney Int*. 2001 Aug; 60 (2): 732 - 40.

- [140] Kim SM, Chin HJ, Oh YK et al.: Blood pressure-related genes and the progression of IgA nephropathy. *Nephron Clin Pract.* 2009; 113 (4): 301 - 308.
- [141] Jeunemaitre X, Charru A, Chatellier G et al.: M235T variant of the human angiotensinogen gene in unselected hypertensive patients. *J Hypertens Suppl.* 1993; 11 (5): 80 - 81.
- [142] Lifton RP: Genetic determinations of human hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8545 – 8551.
- [143] Woo KT, Lau YK, Choong LH et al.: Polymorphism of renin-angiotensin system genes in IgA nephropathy. *Nephrology.* 2004; 9 (5): 304 - 309.
- [144] Lau YK, Woo KT, Choong HL et al.: Renin-angiotensin system gene polymorphisms: its impact on IgAN and its progression to end-stage renal failure among Chinese in Singapore. *Nephron Physiol.* 2004; 97 (1): 1 - 8.
- [145] Frimat L, Philippe C, Maghakian MN et al.: Polymorphism of angiotensin converting enzyme, angiotensinogen, and angiotensin II type 1 receptor genes and end-stage renal failure in IgA nephropathy: IGARAS-a study of 274 Men. *J Am Soc Nephrol.* 2000; 11 (11): 2062 - 2067.
- [146] Bantis C, Ivens K, Kreusser W et al.: Influence of genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system on IgA nephropathy. *Am J Nephrol.* 2004; 24 (2): 258 - 67.
- [147] Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X et al.: Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension.* 1994; 24 (1): 63 - 69.
- [148] Kamyshova ES, Kutyrina IM, Nosikov W: The role of polymorphic markers of vasoactive hormones genes in clinical characteristics of chronic glomerulonephritis. *Ter Arkh,* 2005; 77 (6): 16 – 20.
- [149] Song J, Narita I, Goto S et al.: Gender specific association of aldosterone synthase gene polymorphism with renal survival in patients with IgA nephropathy. *J Med Genet.* 2003; 40 (5): 372 - 6.
- [150] Sookoian S, Gianotti TF, González CD et al.: Association of the C-344T aldosterone synthase gene variant with essential hypertension: a meta-analysis. *J Hypertens.* 2007; 25 (1): 5 - 13.
- [151] White PC, Slutsker L: Haplotype analysis of CYP11 β 2. *Endocr Res.* 1995 Feb - May; 21 (1 - 2): 437 - 442.
- [152] Bassett MH, Zhang Y, Clyne C et al.: Differential regulation of aldosterone synthase and 11beta-hydroxylase transcription by steroidogenic factor-1. *J Mol Endocrinol.* 2002; 28 (2): 125 - 135.
- [153] Castellano M, Glorioso N, Cusi D et al.: Genetic polymorphism of the renin-angiotensin-aldosterone system and arterial hypertension in the Italian population: the GENIPER Project. *J Hypertens.* 2003; 21 (10): 1853 - 1860.

- [154] Fabris B, Bortoletto M, Candido R et al.: Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system and renal insufficiency in essential hypertension. *J Hypertens*. 2005 Feb; 23 (2): 309 - 316.
- [155] Vangjeli C, Clarke N, Quinn U et al.: Confirmation that the renin gene distal enhancer polymorphism REN-5312C/T is associated with increased blood pressure. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010; 3 (1): 53 - 59.
- [156] Hirose T, Hashimoto M, Totsune K et al.: Association of (pro)renin receptor gene polymorphisms with lacunar infarction and left ventricular hypertrophy in Japanese women: the Ohasama study. *Hypertens Res*. 2011; 34 (4): 530 - 535.
- [157] Hirose T, Hashimoto M, Totsune K et al.: Association of (pro)renin receptor gene polymorphism with blood pressure in Japanese men: the Ohasama study. *Am J Hypertens*. 2009; 22 (3): 294 - 299.
- [158] Sato A, Hayashi K, Naruse M et al.: Effectiveness of aldosterone blockade in patients with diabetic nephropathy. *Hypertens*. 2003; 41 (1): 64 - 68.
- [159] Christlieb AR, Kaldany A, D'Elia JA: Plasma renin activity and hypertension in diabetes mellitus. *Diabetes*. 1976; 25 (10): 969 - 974.
- [160] Fernandez-Cruz A Jr, Noth RH, Lassman MN, Hollis JB, Mulrow PJ: Low plasma renin activity in normotensive patients with diabetes mellitus: relationship to neuropathy. *Hypertens*. 1981; 3 (1): 87 - 92.
- [161] Deinum J, Rønn B, Mathiesen E: Increase in serum prorenin precedes onset of microalbuminuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1999 Aug; 42 (8): 1006 - 1010.
- [162] Stankovic AR, Fisher ND, Hollenberg NK: Prorenin and angiotensin - dependent renal vasoconstriction in type 1 and type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17 (12): 3293 - 3299.
- [163] Łochyńska K, Oko A, Idasiak – Piechocka I: Dobowy rytm ciśnienia tętniczego u chorych we wczesnym okresie pierwotnego przewlekłego kłębuszkowego zapalenia nerek. *Nadciśnienie tętnicze* 2003, 7 (1): 7 - 14.
- [164] Stefanski A, Schmidt KG, Waldherr R: Early increase in blood pressure and diastolic left ventricular malfunction in patients with glomerulonephritis. *Kidney Int*. 1996 Oct; 50 (4): 1321 -1326.
- [165] Lake CR, Chernow B, Goldstein DS: Plasma catecholamine levels in normal subjects and in patients with secondary hypertension. *Fed Proc*. 1984; 43 (1): 52 - 6.
- [166] Abraham WT, Van Putten VJ, Hasbargen JA et al.: Increased norepinephrine secretion in patients with the nephrotic syndrome and normal glomerular filtration rates: evidence for primary sympathetic activation. *Am J Nephrol*. 1993; 13 (4): 266 - 70.
- [167] Głuszek J, Jankowska K: Czy istnieje zależność pomiędzy polimorfizmem A1166C genu receptora AT₁ angiotensyny II a aktywnością osocza, stopniem insulino oporności

i efektem hipotensyjnym w czasie terapii inhibitorem enzymu konwertującego angiotensynę?
Pol. Arch. Med. Wew. 2008; 118 (4): 194 – 200.

[168] Véniant M, Ménard J, Bruneval P et al.: Vascular damage without hypertension in transgenic rats expressing prorenin exclusively in the liver. *J Clin Invest.* 1996; 98 (9): 1966 - 1970.

[169] Nielsen AH, Hermann KL, Mazanti I: Urinary excretion of inactive renin during blockade of the renal tubular protein reabsorption with lysine. *J Hypertens.* 1989; 7 (2): 77 - 82.

[170] Yukimura T, Miura K, Matsushima Y et al.: Urinary excretion of renin and its biochemical properties in dogs. *Hypertension.* 1984; 6 (6): 837 - 42.

[171] Nguyen G: Renin/prorenin receptors. *Kidney Int.* 2006; 69 (9): 1503 - 1506.

[172] Huang Y, Noble NA, Zhang J: Renin-stimulated TGF-beta1 expression is regulated by a mitogen-activated protein kinase in mesangial cells. *Kidney Int.* 2007; 72 (1): 45 - 52.

[173] Gruden G, Setti G, Hayward A et al.: Mechanical stretch induces monocyte chemoattractant activity via an NF-kappaB-dependent monocyte chemoattractant protein-1-mediated pathway in human mesangial cells: inhibition by rosiglitazone. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Mar; 16 (3): 688 - 696.

[174] Czekalski S: Skuteczne leczenie nadciśnienia tętniczego chroni przed uszkodzeniem nerki i serce. *Przewodnik Lekarza.* 2007; (1): 41 – 45.

[175] Macconi D, Abbate M, Morigi M et al: Permselective dysfunction of podocyte-podocyte contact upon angiotensin II unravels the molecular target for renoprotective intervention. *Am J Pathol.* 2006; 168 (4): 1073 -1085.

[176] Petermann AT, Hiromura K, Blonski M: Mechanical stress reduces podocyte proliferation in vitro. *Kidney Int.* 2002; 61 (1): 40 - 50.

[177] Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S et al: Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *J Clin Invest.* 1997; 99 (2): 342 -348.

[178] Huang Y, Wongamorntham S, Kasting J et al.: Renin increases mesangial cell transforming growth factor-beta1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms. *Kidney Int.* 2006; 69 (1): 105 - 113.

[179] Ichihara A, Hayashi M, Kaneshiro Y et al.: Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the "handle" region for nonproteolytic activation of prorenin. *J Clin Invest.*; 114 (8): 1128 - 1135.

[180] Hasslacher C: Natural course of diabetic nephropathy W: C. Hasslacher (red.) *Diabetic nephropathy.* John Wiley & Sons, New York, USA. 2001: 19 – 37.

[181] Goto M, Wakai K, Kawamura T et al.: A scoring system to predict renal outcome in IgA nephropathy: a nationwide 10-year prospective cohort study. *Nephrol Dial Transplant.* 2009; 24 (10): 3068 - 3074.

- [182] Hyla – Klekot L, Kokot F: Białkomocz kłębuszkowy – wybrane aspekty patofizjologiczne wczoraj i dziś. Katowickie seminarium „Postępy w nefrologii i nadciśnieniu tętniczym”. 2009; 10 – 17.
- [183] Grzeszczak W: Cukrzyca. *Via Medica*. 2007; (2): 768
- [184] Remuzzi G, Benigni A, Remuzzi A: Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest*. 2006; 116 (2): 288 - 296.
- [185] Troyanov S, Roasio L, Pandes M: Renal pathology in idiopathic membranous nephropathy: a new perspective. *Kidney Int*. 2006; 69 (9):1641 -1648.
- [186] Bazzi C, Petrini C, Rizza V et al.: A modern approach to selectivity of proteinuria and tubulointerstitial damage in nephrotic syndrome. *Kidney Int*. 2000; 58 (4): 1732 - 1741.
- [187] Takamatsu N, Abe H, Tominaga T, Nakahara K et al.: Risk factors for chronic kidney disease in Japan: a community-based study. *BMC Nephrol*. 2009; 27 (10):34.
- [188] Hillege HL, Janssen WM, Bak AA et al.: Microalbuminuria is common, also in a nondiabetic, nonhypertensive population, and an independent indicator of cardiovascular risk factors and cardiovascular morbidity. *J Intern Med*. 2001; 249 (6): 519 - 526.
- [189] Barnett AH, Bain SC, Bouter P et al. (Exposed to Telmisartan and Enalapril Study Group): Angiotensin-receptor blockade versus converting-enzyme inhibition in type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med*. 2004; 351 (19): 1952 - 1961.
- [190] Gordon C, Richards N, Howie AJ: Urinary IL-6: a marker for mesangial proliferative glomerulonephritis? *Clin Exp Immunol*. 1991; 86 (1): 145 - 149.
- [191] Wada T, Yokoyama H, Su SB et al.: Monitoring urinary levels of monocyte chemotactic and activating factor reflects disease activity of lupus nephritis. *Kidney Int*. 1996; 49 (3): 761 - 767.
- [192] Horii Y, Muraguchi A, Iwano M et al.: Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis. *J Immunol*. 1989; 143 (12): 3949 - 3955.
- [193] Ranieri E, Gesualdo L, Petrarulo F et al.: Urinary IL-6/EGF ratio: a useful prognostic marker for the progression of renal damage in IgA nephropathy. *Kidney Int*. 1996; 50 (6): 1990 - 2001.
- [194] Parving HH, Mauer M, Ritz E. Diabetic nephropathy. W: Brenner BM (red.). *The Kidney*. 2004; 7: 1777 – 1812.
- [195] Danielsen H, Pedersen EB, Christensen NJ: Relationship of angiotensin II, aldosterone, arginine vasopressin, adrenaline and noradrenaline in plasma, blood and extracellular volumes to blood pressure in chronic glomerulonephritis. *Eur J Clin Invest*. 1986; 16 (1): 85 - 90.
- [196] Battle D, Soler MJ, Wysocki J: New aspects of the renin-angiotensin system: angiotensin - converting enzyme 2 - a potential target for treatment of hypertension and diabetic nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2008; 17 (3): 250 - 257.

- [197] Kobori H, Nishiyama A, Harrison-Bernard LM et al.: Urinary angiotensinogen as an indicator of intrarenal Angiotensin status in hypertension. *Hypertension*. 2003; 41 (1): 42 - 49.
- [198] Kobori H, Harrison-Bernard LM, Navar LG: Urinary excretion of angiotensinogen reflects intrarenal angiotensinogen production. *Kidney Int*. 2002; 61 (2): 579 - 585.
- [199] Goodfriend TL, Ball DL, Egan BM et al.: Epoxy-keto derivative of linoleic acid stimulates aldosterone secretion. *Hypertension*. 2004; 43 (2): 358 - 63.
- [200] Redon J, Cifkova R, Laurent S et al.: Mechanisms of hypertension in the cardiometabolic syndrome. *J Hypertens*. 2009; 27 (3): 441 - 451.
- [201] Januszewicz W, Januszewicz A, Prejbisz A: Udział aldosteronu w patogenezie nadciśnienia tętniczego – implikacje praktyczne. *Terapia*. 2008: 211 – 226.
- [202] Hammond TG, Whitworth JA, Saines D et al.: Renin-angiotensin-aldosterone system in nephrotic syndrome. *Am J Kidney Dis*. 1984; 4 (1): 18 - 23.
- [203] Borovkova Nlu, Borovkov NN, Sidnev BN et al.: Correlations between heart rate variability, renin activity and plasma aldosterone concentration in chronic glomerulonephritis with intact function of the kidneys. *Ter Arkh*. 2009; 81 (8): 20 - 3.
- [204] Bentley-Lewis R, Adler GK, Perlstein T ae al.: Body mass index predicts aldosterone production in normotensive adults on a high-salt diet. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92 (11): 4472 - 4475.
- [205] Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS et al.: Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985; 28 (7): 412 - 419.
- [206] Rahman SN, Abraham WT, Van Putten VJ et al.: Increased norepinephrine secretion in patients with the nephrotic syndrome and normal glomerular filtration rates: evidence for primary sympathetic activation. *Am J Nephrol*. 1993; 13 (4): 266 - 270.
- [207] Chapman AB, Zamudio S, Woodmansee W et al.: Systemic and renal hemodynamic changes in the luteal phase of the menstrual cycle mimic early pregnancy. *Am J Physiol*. 1997; 273 (5 Pt 2): 777 - 782.
- [208] Łochyńska K, Oko A, Pawlaczyk K et al.: Częstość występowania nadciśnienia tętniczego we wczesnym okresie przewlekłego kłębuszkowego zapalenia nerek. *Nefrologia i Dializoterapia Polska*. 2003 (3): 37 – 40.
- [209] Geers AB, Koomans HA, Boer P et al.: Plasma and blood volumes in patients with the nephrotic syndrome. *Nephron*. 1984; 38 (3): 170 - 173.
- [210] Meltzer JI, Keim HJ, Laragh JH et al.: Nephrotic syndrome: vasoconstriction and hypervolemic types indicated by renin-sodium profiling. *Ann Intern Med*. 1979; 91 (5): 688 - 696.
- [211] Uresin Y, Taylor AA, Kilo C et al.: Efficacy and safety of the direct renin inhibitor aliskiren and ramipril alone or in combination in patients with diabetes and hypertension. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2007; 8 (4): 190 - 198.

- [212] Rachmani R, Slavachevsky I, Amit M et al.: The effect of spironolactone, cilazapril and their combination on albuminuria in patients with hypertension and diabetic nephropathy is independent of blood pressure reduction: a randomized controlled study. *Diabet Med.* 2004; 21 (5): 471 - 475.
- [213] Bianchi S, Bigazzi R, Campese VM et al.: Antagonists of aldosterone and proteinuria in patients with CKD: an uncontrolled pilot study. *Am J Kidney Dis.* 2005; 46 (1): 45 - 51.
- [214] Marney AM, Brown NJ: Aldosterone and end-organ damage. *Clin Sci (Lond).* 2007;113(6):267-78.
- [215] van den Born BJ, Koopmans RP, van Montfrans GA: The renin-angiotensin system in malignant hypertension revisited: plasma renin activity, microangiopathic hemolysis, and renal failure in malignant hypertension. *Am J Hypertens.* 2007; 20 (8): 900 - 906.
- [216] Genest J, Lemieux G, Davignin A et al.: Human arterial hypertension: a state of mild chronic hyperaldosteronism? *Science.* 1956; 123 (3195): 503 -505.
- [217] Laragh JH, Ulick S, Januszewicz V: Aldosterone secretion and primary and malignant hypertension. *J Clin Invest.* 1960; 39: 1091 - 1106.
- [218] Ulick S, Laragh JH, Lieberman S et al.: The isolation of a urinary metabolite of aldosterone and its use to measure the rate of secretion of aldosterone by the adrenal cortex of man. *Trans Assoc Am Physicians.* 1958; 71: 225 - 235.
- [219] Williams GH, Burgess E, Kolloch RE et al.: Efficacy of eplerenone versus enalapril as monotherapy in systemic hypertension. *Am J Cardiol.* 2004; 93 (8): 990 - 996.
- [220] White WB, Duprez D, St Hillaire R et al: Effects of the selective aldosterone blocker eplerenone versus the calcium antagonist amlodipine in systolic hypertension. *Hypertension.* 2003; 41(5): 1021 - 1026.
- [221] Szelestei T, Kovács T, Barta J et al.: Circadian blood pressure changes and cardiac abnormalities in IgA nephropathy. *Am J Nephrol.* 1999; 19 (5): 546 - 551.
- [222] Middeke M, Klüglich M, Holzgreve H et al.: Circadian blood pressure rhythm in primary and secondary hypertension. *Chronobiol Int.* 1991; 8 (6): 451 - 459.
- [223] Morduchowicz G, Zabłudowski J, Wittenberg C et al.: Ambulatory blood pressure monitoring assessment of blood pressure control in hypertension associated with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant.* 1993; 8 (10): 1169 - 1171.
- [224] Schömig M, Schwenger V, Ritz E: Circadian rhythm of blood pressure in renal disease. *Curr Hypertens Rep.* 2000; 2 (5): 490 - 494.
- [225] Franken AA, Derkx FH, Blankestijn PJ et al.: Plasma prorenin as an early marker of microvascular disease in patients with diabetes mellitus. *Diabete Metab.* 1992; 18 (2 Pt 2): 137 - 143.
- [226] Aihara K, Ikeda Y, Yagi S et al.: Transforming Growth Factor- β 1 as a Common Target Molecule for Development of Cardiovascular Diseases, Renal Insufficiency and Metabolic Syndrome. *Cardiol Res Pract.* 2010; 2011: 175381.

- [227] Suthanthiran M, Gerber LM, Schwartz JE et al.: Circulating transforming growth factor-beta1 levels and the risk for kidney disease in African Americans. *Kidney Int.* 2009; 76 (1): 72 - 80.
- [228] Oko A, Łochyńska K, Idasiak – Piechocka I: Nadciśnienie tętnicze w kłębuszkowym zapaleniu nerek. *Pol. Merk. Lek.* 2003, XV, 88: 344.
- [229] Tóth L, Vörös P, Lengyel Z et al.: Diurnal blood pressure variations in incipient and end stage diabetic renal disease. *Diabetes Res Clin Pract.* 2000; 49 (1): 1 - 6.
- [230] Pickering TG, Kario K: Nocturnal non-dipping: what does it augur? *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2001;10 (5): 611 - 616.
- [231] Czekalski S: Albuminuria – skąd pochodzi, co oznacza. Postępy w nefrologii i nadciśnieniu tętniczym. 2009; 7: 69 – 74.
- [232] Wang TJ, Evans JC, Meigs JB et al.: Low-grade albuminuria and the risks of hypertension and blood pressure progression. *Circulation.* 2005; 111 (11): 1370 - 1306.
- [233] Keller G, Zimmer G, Mall G: Nephron number in patients with primary hypertension. *N Engl J Med.* 2003; 348 (2):101 - 108.
- [234] Mackenzie HS, Tall MW, Luyckx VA et al.: Adaptation to nephron loss. The Kidney, et BM Brenner, WB Saunders Comp, Philadelphia 2000: 1901 – 1942.
- [235] Timio M, Venanzi S, Lolli S et al.: "Non-dipper" hypertensive patients and progressive renal insufficiency: a 3-year longitudinal study. *Clin Nephrol.*; 43 (6): 382 - 387.
- [236] Farmer CK, Goldsmith DJ, Quin JD et al.: Progression of diabetic nephropathy--is diurnal blood pressure rhythm as important as absolute blood pressure level? *Nephrol Dial Transplant.* 1998; 13 (3): 635 - 639.
- [237] Csiky B, Kovács T, Wágner L et al.: Ambulatory blood pressure monitoring and progression in patients with IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 1999; 14 (1): 86 - 90.
- [238] Agarwal R: Ambulatory blood pressure and cardiovascular events in chronic kidney disease. *Semin Nephrol.* 2007; 27 (5): 538 - 543.
- [239] Rump LC, Amann K, Orth S et al.: Sympathetic overactivity in renal disease: a window to understand progression and cardiovascular complications of uraemia? *Nephrol Dial Transplant.* 2000; 15 (11): 1735 - 1738.
- [240] Schnecko A, Witte K, Lemmer B: Effects of the angiotensin II receptor antagonist losartan on 24-hour blood pressure profiles of primary and secondary hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995; 26 (2): 214 - 221.
- [241] Sunaga K, Fujimura A, Siga T: Chronopharmacology of enalapril in hypertensive patients. *Eur J Clin Pharmacol* 195; 48: 441 – 445.
- [242] van der Steen MS, Pleijers AM, Lenders JW et al.: Influence of different supine body positions on blood pressure: consequences for night blood pressure/dipper-status. *J Hypertens.* 2000; 18 (12): 1731 - 1736.

- [243] Cavelaars M, Tulen JH, Man in 't Veld AJ et al.: Assessment of body position to quantify its effect on nocturnal blood pressure under ambulatory conditions. *J Hypertens*. 2000; 18 (12): 1737 - 1743.
- [244] Lusardi P, Mugellini A, Preti P et al.: Effects of a restricted sleep regimen on ambulatory blood pressure monitoring in normotensive subjects. *Am J Hypertens*. 1996; 9 (5): 503 - 505.
- [245] Pedullà M, Silvestri R, Lasco A et al.: Sleep structure in essential hypertensive patients: differences between dippers and non-dippers. *Blood Press*. 1995; 4 (4): 232 - 237.
- [246] Grenda R, Wühl E, Litwin M et al.: Urinary excretion of endothelin-1 (ET-1), transforming growth factor- beta1 (TGF- beta1) and vascular endothelial growth factor (VEGF165) in paediatric chronic kidney diseases: results of the ESCAPE trial. *Nephrol Dial Transplant*. 2007; 22 (12): 3487 - 3494.
- [247] Kaneshiro Y, Ichihara A, Sakoda M: Slowly progressive, angiotensin II-independent glomerulosclerosis in human (pro)renin receptor-transgenic rats. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18 (6): 1789 - 1795.
- [248] Juknevičius I, Segal Y, Kren S: Effect of aldosterone on renal transforming growth factor-beta. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004; 286 (6): 1059 - 1062.
- [249] De Muro P, Faedda R, Fresu P et al.: Urinary transforming growth factor-beta 1 in various types of nephropathy. *Pharmacol Res*. 2004; 49 (3): 293 - 308.
- [250] Murakami K, Takemura T, Hino S et al.: Urinary transforming growth factor-beta in patients with glomerular diseases. *Pediatr Nephrol*. 1997; 11 (3): 334 - 336.
- [251] Honkanen E, Teppo AM, Törnroth T et al.: Urinary transforming growth factor-beta 1 in membranous glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 1997; 12 (12): 2562 - 2568.
- [252] Niemi ZI, Stein H, Noronha IL et al.: PDGF and TGF-beta contribute to the natural course of human IgA glomerulonephritis. *Kidney Int*. 1995; 48 (5): 1530 - 1541.
- [253] Iseki K, Ikemiya Y, Fukiyama K: Blood pressure and risk of end-stage renal disease in a screened cohort. *Kidney Int Suppl*. 1996; 55: 69 - 71.
- [254] Cambien F, Ricard S, Troesch A et al.: Polymorphisms of the transforming growth factor-beta 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Témoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. *Hypertension*. 1996; 28 (5): 881 - 887.
- [255] Dickson K, Philip A, Warshawsky H: Specific binding of endocrine transforming growth factor-beta 1 to vascular endothelium. *J Clin Invest*. 1995; 95 (6): 2539 - 2554.
- [256] Agrotis A, Saltis J, Bobik A: Transforming growth factor-beta 1 gene activation and growth of smooth muscle from hypertensive rats. *Hypertension*. 1994; 23 (5): 593 - 599.
- [257] Grzeszczak W: Cukrzyca. *Via Medica*. 2007; (2): 769

- [258] Meyrier A, Hill GS, Simon P: Ischemic renal diseases: new insights into old entities. *Kidney Int.* 1998; 54 (1): 2 - 13.
- [259] Czekalski S: Uszkodzenie nerek jako przyczyna nadciśnienia tętniczego. *Postępy Nauk Medycznych.* 2009; 22 (10): 757 – 763.
- [260] Scaglione R, Argano C, Duro G: The Relationship between the Transforming Growth Factor β 1 T29C Gene Polymorphism and Left Ventricular Geometry and Function in Hypertensive Subjects. *Int J Hypertens.* 2010; 2010: 647147.
- [261] Derhaschnig U, Shehata M, Herkner H et al.: Increased levels of transforming growth factor-beta1 in essential hypertension. *Am J Hypertens.* 2002; 15 (3): 207 - 211.
- [262] Durvasula RV, Petermann AT, Hiromura K et al.: Activation of a local tissue angiotensin system in podocytes by mechanical strain. *Kidney Int.* 2004; 65 (1): 30 - 39.
- [263] Danser, AH, Nguyen G: Spotlight on Renin. *Renin Report.* 2008; 11: 119 – 123.
- [264] Goumenos DS, Tsakas S, El Nahas A et al.: Transforming growth factor - beta(1) in the kidney and urine of patients with glomerular disease and proteinuria. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17 (12): 2145 - 2152.
- [265] Bantis C, Heering PJ, Siekierka-Harreis M et al.: Impact of Aldosterone Synthase Gene C-344T Polymorphism on IgA Nephropathy. *Ren Fail.* 2011; 33 (4): 393 - 397.
- [266] Fabris B, Bortoletto M, Candido R: Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system and renal insufficiency in essential hypertension. *J Hypertens.* 2005; 23 (2): 309 - 316.
- [267] Davies E, Mackenzie SM, Freel EM et al.: Altered corticosteroid biosynthesis in essential hypertension: A digenic phenomenon. *Mol Cell Endocrinol.* 2009; 300 (1-2): 185 - 91.
- [268] Bassett MH, Zhang Y, Clyne C et al.: Differential regulation of aldosterone synthase and 11beta-hydroxylase transcription by steroidogenic factor-1. *J Mol Endocrinol.* 2002; 28 (2): 125 - 135.
- [269] Pei Y, Scholey J, Thai K et al.: Association of angiotensinogen gene T235 variant with progression of immunoglobulin A nephropathy in Caucasian patients. *J Clin Invest.* 1997; 100 (4): 814 - 820.
- [270] Lovati E, Richard A, Frey BM et al.: Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system in end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2001; 60 (1): 46 - 54.
- [271] Cheng X, Xu G: Association between Aldosterone Synthase CYP11B2 Polymorphism and Essential Hypertension in Chinese: A Meta – Analysis. *Kidney Blood Press Res.* 2009; 32: 128 – 140.
- [272] Davies E, Holloway CD, Ingram MC et al.: Aldosterone excretion rate and blood pressure in essential hypertension are related to polymorphic differences in the aldosterone synthase gene CYP11B2. *Hypertension.* 1999; 33 (2): 703 - 707.

- [273] Kulcenty K, Hołysz M, Trzeciak W: Steroidogenny czynnik 1: struktura, mechanizm działania i rola biologiczna. *Postępy Biologii Komórki*. 2008; 4: 453 – 466.
- [274] Qin YH, Zhou TB, Su LN et al.: Association between ACE polymorphism and risk of IgA nephropathy: A meta-analysis. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2011 Feb 28.
- [275] Kiliś – Pstrusińska K: Genetyczne czynniki ryzyka rozwoju i progresji przewlekłej choroby nerek. *High Med. Dosw*. 2010; 64: 50 – 57.
- [276] Bantis C, Ivens K, Kreusser W et al.: Influence of genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system on IgA nephropathy. *Am J Nephrol*. 2004; 24 (2): 258 – 267.
- [277] Schena FP, D'Altri C, Cerullo G et al.: ACE gene polymorphism and IgA nephropathy: an ethnically homogeneous study and a meta-analysis. *Kidney Int*. 2001; 60 (2): 732 - 740.
- [278] Schmidt S, Bahnisch J, Campise M et al.: The angiotensinogen gene M235T polymorphism and IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 1863.
- [279] Pei Y, Scholey J, Thai K et al.: Association of angiotensinogen gene T235 variant with progression of immunoglobulin A nephropathy in Caucasian patients. *J Clin Invest*. 1997; 15; 100 (4): 814 - 820.
- [280] Hunley TE, Julian BA et al.: Angiotensin converting enzyme gene polymorphism: potential silencer motif and impact on progression in IgA nephropathy. *Kidney Int*. 1996; 49 (2): 571 - 577.
- [281] Goto S, Narita I, Saito N et al.: A(-20)C polymorphism of the angiotensinogen gene and progression of IgA nephropathy. *Kidney Int*. 2002; 62 (3): 980 - 985.
- [282] Sihn G, Rousselle A, Vilianovitch L et al.: Physiology of the (pro)renin receptor: Wnt of change? *Kidney Int*. 2010; 78 (3): 246 - 256.
- [283] Nguyen G, Contrepas A: Physiology and pharmacology of the (pro)renin receptor. *Curr Opin Pharmacol*. 2008; 8 (2): 127 - 32.
- [284] Sakoda M, Ichihara A, Kurauchi-Mito A: Aliskiren inhibits intracellular angiotensin II levels without affecting (pro)renin receptor signals in human podocytes. *Am J Hypertens*. 2010; 23 (5): 575 - 580.
- [285] Zychma MJ, Zukowska - Szczechowska E, Lacka B: Angiotensinogen M235T and chymase gene CMA/B polymorphisms are not associated with nephropathy in type II diabetes. *Nephrol Dial Transplant*. 2000; 15 (12): 1965 - 1970.
- [286] Hollenberg NK, Fisher ND, Price DA: Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue. Evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension*. 1998; 32: 387 – 392
- [287] Gawron – Kiszka M, Żukowska – Szczechowska E, Tomaszewski M: Postępy w genetyce nadciśnienia tętniczego. *Postępy w nefrologii i nadciśnieniu tętniczym*. 2009; 8: 11 - 16.

[289] Łochyńska K, Ciechanowicz A, Pawlaczyk K et al.: Angiotensin – converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism in newly diagnosed primary chronic glomerulonephritis. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2003, 12 (2): 161 – 165.

[290] K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification Kidney Disease Outcomes Quality Initiative. *Am. J. Kidney Dis.*, 2002; 39: 17 – 222.

10. Streszczenie

Wstęp

Pierwotne przewlekłe kłębuszkowe zapalenie nerek (PKZN) jest jedną z najczęstszych przyczyn niewydolności nerek wymagającej leczenia nerkozastępczego. Istotną rolę w patogenezie i obrazie klinicznym choroby może odgrywać aktywność układu renina – angiotensyna - aldosteron (RAA). Poszczególne składowe układu RAA – prorenina, renina, angiotensyna II (Ang II) i aldosteron mogą prowadzić do aktywacji szlaków proliferacyjnych, profibrotycznych i prozapalnych uszkadzających nerki. Pierwotne PKZN jest chorobą poligenową. Identyfikacja polimorfizmów genów predysponujących do wystąpienia pierwotnego PKZN jest konieczna dla ustalenia podłoża genetycznego tej choroby.

Cel pracy

1. Ocena stężeń proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu, wielkości wskaźnika renina/prorenina oraz wielkości wydalania TGF β 1 z moczem u chorych ze świeżo rozpoznanym pierwotnym PKZN i porównanie tych parametrów z grupą osób zdrowych oraz w grupie chorych z postaciami proliferacyjnymi i nieproliferacyjnymi PKZN.
2. Ocena związku stężeń proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu oraz wskaźnika renina/prorenina z obrazem klinicznym i nasileniem zmian morfologicznych w nerkach oraz wydalaniem TGF β 1 z moczem u chorych na pierwotne PKZN.
3. Wykazanie czy obecność wybranych 10 polimorfizmów genów kodujących białka układu RAA: *ACE* (rs4646994), *AGT* (rs699), *AGTR1* (rs5186), *ATP6AP2* (rs2968917 i rs2971597), *CMA1* (rs1885108 i rs1956923), *CYP11 β 2* (rs1799998) i *REN* (rs11571080 i rs2368564) wiąże się z zachorowaniem na pierwotne PKZN.

Materiał

Badania oceniające związek składowych układu RAA z obrazem klinicznym i nasileniem zmian morfologicznych w nerkach przeprowadzono u 55 nieleczonych pacjentów ze świeżo rozpoznanym pierwotnym PKZN, potwierdzonym w badaniu biopsyjnym nerki, w wieku $39,9 \pm 14,8$ lat, w stadium 1 – 3 przewlekłej choroby nerek. Oceniano w tej grupie stężenia proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu oraz: wskaźnik masy ciała (BMI), obecność nadciśnienia tętniczego i zaburzeń jego rytmu (zjawisko non – dipping),

oszacowaną filtrację kłębuszkową, nasilenie białkomoczu, stopień sklerotyzacji kłębuszków nerkowych i włóknienia tkanki cewkowo – śródmiąższowej w nerkach oraz wydalanie TGFβ1 z moczem. Analizę wybranych polimorfizmów przeprowadzono w grupie 148 chorych z potwierdzonym biopsyjnie pierwotnym PKZN w wieku $40,3 \pm 14,3$ lat. Grupę kontrolną do badań układu RAA stanowiło 20 zdrowych osób w wieku $36,8 \pm 9,3$ lat, a do badań genetycznych 193 zdrowe osoby w wieku $30,0 \pm 8,5$ lat.

Metody

Stężenie proreniny, Ang II, aldosteronu w osoczu oraz TGFβ1 w moczu oznaczono metodą immunoenzymatyczną (ELISA), a stężenie reniny w osoczu metodą radioimmunologiczną (RIA). Filtrację kłębuszkową (eGFR) oszacowano przy pomocy uproszczonego wzoru MDRD. Wielkość białkomoczu oceniano na podstawie dobowej zbiórki moczu. Analizę ciśnienia tętniczego przeprowadzono na podstawie całodobowego pomiaru ciśnienia tętniczego. Nasilenie zmian morfologicznych w nerkach oceniano metodami półilościowymi na podstawie obrazu bioptatu nerki w mikroskopie świetlnym. Amplifikację fragmentów genów z badanymi polimorfizmami przeprowadzono przy użyciu metody PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy DNA), a genotypowanie polimorfizmów metodą RFLP (analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych) lub HRM (wysokorozdzielcza analiza temperatury topnienia produktów PCR).

Wyniki

1. U chorych na pierwotne PKZN występują wyższe stężenia proreniny i Ang II w osoczu, większe wydalanie TGFβ1 z moczem oraz niższy wskaźnik renina/prorenina w porównaniu z grupą kontrolną. Chorzy na pierwotne PKZN nie różnią się stężeniami reniny i aldosteronu w osoczu od grupy kontrolnej.
2. U chorych z postaciami proliferacyjnymi PKZN występuje wyższe stężenie Ang II w osoczu w porównaniu do grupy z postaciami nieproliferacyjnymi. Obie grupy nie różnią się stężeniem proreniny, reniny i aldosteronu w osoczu oraz wydalaniem TGFβ1 z moczem.
3. U chorych na pierwotne PKZN występuje dodatnia korelacja między stężeniem proreniny w osoczu a nasileniem białkomoczu.
4. U chorych na pierwotne PKZN z nadciśnieniem tętniczym występuje większe wydalanie TGFβ1 z moczem w porównaniu do chorych bez nadciśnienia tętniczego. Obie grupy nie różnią się stężeniami proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu.
5. Chorzy z zaburzeniem rytmu ciśnienia tętniczego (non – dippers) nie różnią się stężeniami proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu oraz wielkością wydalania TGFβ1 z moczem od chorych bez zaburzeń jego rytmu (dippers).

6. Chorzy na pierwotne PKZN z zespołem nerczycowym i bez zespołu nerczycowego, oprócz stężenia proreniny, nie wykazują różnic w stężeniach reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu.
7. Brak związku stężenia proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu z nasileniem sklerotyzacji kłębuszków nerkowych i włóknienia tkanki cewkowo – śródmiąższowej oraz wydalaniem TGF β 1 z moczem u chorych ze świeżo rozpoznanym pierwotnym PKZN.
8. Polimorfizm rs1799998 genu *CYP11 β 2* wiąże się z zachorowalnością na pierwotne PKZN w grupie badanej. Nosicielstwo allelu C w postaci homozygotycznej (CC) zwiększa ryzyko zachorowania na pierwotne PKZN prawie dwukrotnie.
9. Polimorfizmy rs4646994 genu *ACE*, rs699 genu *AGT*, rs5186 genu *AGTR1*, rs2968917 i rs2971597 genu *ATP6AP2*, rs1885108 i rs1956923 genu *CMA1* oraz rs11571080 i rs2368564 genu *REN* nie wykazują związku z zachorowalnością na pierwotne PKZN w grupie badanej.

Wnioski

U chorych na pierwotne PKZN w porównaniu do osób zdrowych występują wyższe stężenia proreniny i Ang II oraz porównywalne stężenia reniny i aldosteronu w osoczu. Dodatnia korelacja między stężeniem proreniny w osoczu a wielkością białkomoczu u chorych na pierwotne PKZN wskazuje na istotną rolę proreniny w uszkodzeniu nerek w przebiegu tej choroby. Występowanie u chorych z postaciami proliferacyjnymi PKZN wyższego stężenia Ang II w osoczu w porównaniu do chorych z postaciami nieproliferacyjnymi może wskazywać na istotny udział Ang II w procesach proliferacyjnych w nerkach u chorych na pierwotne PKZN. Większe wydalanie TGF β 1 z moczem w grupie chorych z nadciśnieniem tętniczym w porównaniu do chorych bez nadciśnienia tętniczego sugeruje, że obecność nadciśnienia tętniczego w pierwotnych PKZN wiąże się z aktywacją szlaków prowadzących do zwiększonej ekspresji TGF β 1 w tkankach. Wielkość stężeń składowych układu RAA w osoczu nie jest markerem nasilenia zmian fibrotycznych w nerkach we wczesnej fazie pierwotnego PKZN. Polimorfizm rs1799998 genu kodującego syntazę aldosteronową (*CYP11 β 2*) wiąże się z zachorowalnością na pierwotne PKZN w grupie badanej należącej do populacji polskiej.

11. Summary

Background

Primary chronic glomerulonephritis (GN) is one of the main cause of end stage renal disease. Activation of renin – angiotensin – aldosterone system (RAAS) can play the key role in kidney damage in primary GN. The elements of RAAS: prorenin, renin, angiotensin II (Ang II) and aldosterone can induce proliferation, profibrotic and inflammatory pathways and can damage the kidney. Primary chronic GN is the polygenic disease. Identification of candidate genes is necessary to establish the genetic background of this disease.

Aims

1. The evaluation of plasma prorenin, renin, Ang II, aldosterone concentration, renin/prorenin ratio and urinary excretion of TGF β 1 in the group of patients with newly diagnosed, biopsy proven primary chronic GN and comparison of these parameters with control group, and between patients with proliferative and nonproliferative forms of primary chronic GN.
2. The evaluation of the relationship between plasma prorenin, renin, Ang II, aldosterone concentration, renin/prorenin ratio and clinical picture, morphological changes in kidneys and TGF β 1 urinary excretion in patients with primary chronic GN.
3. To evaluate the association between selected 10 polymorphisms of RAAS genes: *ACE* (rs4646994), *AGT* (rs699), *AGTR1* (rs5186), *ATP6AP2* (rs2968917 and rs2971597), *CMA1* (rs1885108 and rs1956923), *CYP11 β 2* (rs1799998), *REN* (rs11571080 and rs2368564) and primary chronic GN.

Material

The first part of the study was performed in the group of fifty five untreated patients with newly diagnosed, biopsy proven primary chronic GN, aged $39,9 \pm 14,8$, in stages 1 – 3 of chronic kidney disease. In this group plasma prorenin, renin, Ang II, aldosterone levels were evaluated. Moreover, body mass index, presence of arterial hypertension (AH), disturbed rhythm of blood pressure (non dipping syndrome), glomerular filtration rate, proteinuria, morphological changes of the kidney like glomerulosclerosis and interstitial fibrosis and urinary TGF β 1 excretion were estimated. The analysis of selected polymorphisms was conducted in the group of 148 patients with biopsy proven primary chronic GN aged $40,3 \pm$

14,3. Control group for RAAS research consisted of 20 healthy persons aged $36.8 \pm 9,3$ years while for genetic research 193 healthy persons aged $30,0 \pm 8,5$ years.

Methods

Prorenin, Ang II and aldosterone plasma concentrations and urinary excretion of TGF β 1 were measured by enzyme - linked immunosorbent assay method (ELISA), while renin plasma concentration by radioimmunological method (RIA). In all patients 24 – hour urinary protein excretion was also evaluated. Glomerular filtration rate (eGFR) was estimated using MDRD formula. The analysis of blood pressure was made based on 24 – hour blood pressure monitoring. Renal biopsy specimens were analysed for the percent of glomerulosclerosis and for the extend of interstitial fibrosis using semiquantitative methods. The amplification of DNA fragments containing selected polymorphisms was performed using polymerase chain reaction (PCR). The genotyping of selected polymorphisms was conducted using RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) or HRM (High - Resolution Melting) analyses.

Results

1. Significantly higher plasma prorenin, Ang II levels, urinary excretion of TGF β 1 and lower renin/prorenin ratio in patients with primary chronic GN as compared to healthy controls were found. There was no difference in plasma renin and aldosterone concentrations.
2. Significantly higher plasma Ang II level in the group of patients with proliferative forms of primary chronic GN as compared to nonproliferative forms was found. There was no difference in plasma prorenin, renin, aldosterone concentration and urinary excretion of TGF β 1.
3. In patients with primary chronic GN significant positive correlation between plasma prorenin concentration and 24 – hour urinary protein excretion was found.
4. Significantly higher urinary excretion of TGF β 1 in the group of patients with AH when compared to group without AH was found. There was no difference in plasma prorenin, renin, Ang II and aldosterone concentration between analysed groups.
5. There was no difference in plasma prorenin, renin, Ang II, aldosterone concentration and urinary excretion of TGF β 1 between the group of patients with disturbed rhythm of blood pressure (non – dippers) and group with normal rhythm (dippers).
6. There was no difference in plasma renin, Ang II and aldosterone concentrations between group of patients with and without nephrotic syndrome. Higher level of plasma prorenin was observed only in patients with nephritic syndrome.

7. There was no correlation between plasma prorenin, renin, Ang II, aldosterone concentrations and glomerulosclerosis, interstitial fibrosis and urinary TGF β 1 excretion in patients with primary chronic GN.

8. Polymorphism rs1799998 of the *CYP11 β 2* gene is associated with primary chronic GN in the group of patients from the Polish population. Individuals carrying two copies of the rs1799998 C allele has nearly twofold increased risk of primary chronic GN.

9. The genetic variations in *ACE* (rs4646994), *AGT* (rs699), *AGTR1* (rs5186), *ATP6AP2* (rs2968917, rs2971597), *CMA1* (rs1885108, rs1956923), *REN* (rs11571080, rs2368564) are not associated with the risk of primary chronic GN.

Conclusions

In patients with primary chronic GN plasma concentrations of prorenin and Ang II are higher comparing to control group. Positive correlation between plasma prorenin concentrations and proteinuria may suggest the role of this prohormone in glomerular damage. Higher plasma Ang II levels in the group of patients with proliferative forms of primary chronic GN as compared to nonproliferative forms can indicate the key role of Ang II in proliferative process in this disease. Significantly higher urinary excretion of TGF β 1 in group of patients with AH compared with group without AH may suggest the connection between AH and increased tissue expression of TGF β 1. In our study plasma levels of prorenin, renin, Ang II and aldosterone were not confirmed as markers of profibrotic changes in kidneys in early stages of primary chronic GN.

Polymorphism rs1799998 of the *CYP11 β 2* gene is associated with primary chronic GN in the group of patients from the Polish population.

Spis rycin

Ryc. 1.	Schemat układu renina – angiotensyna – aldosteron (RAA).....	8
Ryc. 2.	Schemat struktury receptora (pro)reninowego.....	10
Ryc. 3.	Efekty aktywacji receptora (pro)reninowego.....	11
Ryc. 4.	Angiotensyny, receptory angiotensynowe i efekty ich pobudzania.....	15
Ryc. 5.	Przykładowa mapa sprzężeń między polimorfizmami genu <i>REN</i>	28
Ryc. 6.	Porównanie stężenia proreniny w osoczu u chorych ze świeżo rozpoznanym pierwotnym PKZN i w grupie kontrolnej.....	39
Ryc. 7.	Porównanie stężenia Ang II w osoczu u chorych ze świeżo rozpoznanym pierwotnym PKZN i w grupie kontrolnej.....	39
Ryc. 8.	Porównanie wielkości wydalania TGF β 1 z moczem u chorych ze świeżo rozpoznanym pierwotnym PKZN i w grupie kontrolnej.....	40
Ryc. 9.	Porównanie wielkości wskaźnika renina/prorenina u chorych ze świeżo rozpoznanym PKZN i w grupie kontrolnej.....	40
Ryc. 10.	Porównanie stężenia Ang II w osoczu u chorych z proliferacyjnymi i nieproliferacyjnymi postaciami świeżo wykrytego PKZN.....	42
Ryc. 11.	Korelacja stężenia proreniny w osoczu i wielkości dobowego białkomoczu (TPUR) u chorych ze świeżo rozpoznanym pierwotnym PKZN.....	43
Ryc. 12.	Korelacja wskaźnika renina/prorenina i wielkości dobowego białkomoczu (TPUR) u chorych ze świeżo rozpoznanym pierwotnym PKZN.....	44
Ryc. 13.	Porównanie stężenia proreniny w osoczu u chorych z pierwotnym PKZN z zespołem nerczycowym (ZN) i bez zespołu nerczycowego (BZN).....	45
Ryc. 14.	Porównanie wielkości wskaźnika renina/prorenina u chorych z pierwotnym PKZN z zespołem nerczycowym (ZN) i bez zespołu nerczycowego (BZN).....	46

Ryc. 15.	Porównanie wielkości wydalania TGFβ1 z moczem u chorych z pierwotnym PKZN bez nadciśnienia tętniczego (BNT) i z nadciśnieniem tętniczym (NT).....	47
Ryc. 16.	Analiza ilorazu szans (OR) w modelu dominującego i recesywnym wariantów polimorficznych genów <i>ACE</i> , <i>AGT</i> , <i>AGTR1</i> , <i>ATP6AP2</i> , <i>CMA1</i> , <i>CYP11β2</i> i <i>REN</i>	54
Ryc. 17.	Analiza PCR polimorfizmu rs4646994 (289BP ALU)/-) genu <i>ACE</i>	75
Ryc. 18.	Analiza krzywych topnienia polimorfizmu rs699 genu <i>AGT</i>	75
Ryc. 19.	Analiza pików topnienia DNA polimorfizmu rs699 genu	76
Ryc. 20.	Analiza sekwencjonowania DNA dla polimorfizmu rs699 genu <i>AGT</i>	77
Ryc. 21.	Analiza RFLP polimorfizmu rs2971597 genu <i>AGTR1</i>	77
Ryc. 22.	Analiza RFLP polimorfizmu rs2968917 genu <i>ATP6AP2</i>	78
Ryc. 23.	Analiza krzywych topnienia polimorfizmu rs2971597 genu <i>ATP6AP2</i>	78
Ryc. 24.	Analiza pików topnienia DNA polimorfizmu rs2971597 genu <i>ATP6AP2</i>	79
Ryc. 25.	Analiza sekwencjonowania DNA dla polimorfizmu rs2971597 genu <i>ATP6AP2</i>	79
Ryc. 26.	Analiza RFLP polimorfizmu rs1885108.....	80
Ryc. 27.	Analiza RFLP polimorfizmu rs1956923 genu <i>CMA1</i>	80
Ryc. 28.	Analiza RFLP polimorfizmu rs1799998 genu <i>CYP11B2</i>	80
Ryc. 29.	Analiza RFLP polimorfizmu rs11571080 genu <i>REN</i>	81
Ryc. 30.	Analiza RFLP polimorfizmu rs2368564 genu <i>REN</i>	81

Spis tabel

Tab. 1A.	Charakterystyka chorych ze świeżo rozpoznany pierwotnym PKZN	22
Tab. 1B.	Charakterystyka chorych z pierwotnym PKZN, u których wykonano genotypowanie polimorfizmów genów kodujących białka układu RAA.....	23
Tab. 2.	Szczegółowa charakterystyka polimorfizmów genów układu RAA wybranych do analiz.....	29
Tab. 3.	Charakterystyka starterów do amplifikacji fragmentów genów <i>ACE, AGT, AGTR1, ATP6AP2, CMA1, CYP11B2, REN</i>	31
Tab. 4.	Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji fragmentów genów metodą PCR.....	31
Tab. 5.	Profil temperaturowo – czasowy metody PCR.....	32
Tab. 6.	Szczegóły analizy RFLP.....	33
Tab. 7.	Szczegóły analizy HRM.....	33
Tab. 8.	Skład mieszaniny reakcyjnej metody HRM.....	33
Tab. 9.	Profil temperaturowo – czasowy metody HRM.....	34
Tab. 10.	Porównanie stężeń proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu oraz wielkości wydalania TGFβ1 z moczem u chorych ze świeżo rozpoznany pierwotnym PKZN i w grupie kontrolnej.....	38
Tab. 11.	Porównanie stężeń proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu, wskaźnika renina/prorenina oraz wydalania TGF β1 z moczem w grupie chorych z proliferacyjnymi i nieproliferacyjnymi postaciami PKZN.....	41
Tab. 12.	Korelacje stężeń proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu oraz wskaźnika renina/prorenina u chorych ze świeżo rozpoznany PKZN z BMI, eGFR i TPUR.....	43
Tab. 13.	Porównanie stężeń proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu, wielkości wydalania TGFβ1 z moczem oraz wskaźnika renina/prorenina u chorych z pierwotnym PKZN zespołem nerczycowym i bez zespołu nerczycowego.....	45
Tab. 14.	Porównanie stężeń proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu, wielkości wydalania TGFβ1 z moczem oraz wskaźnika renina/prorenina u chorych na pierwotne PKZN z nadciśnieniem tętniczym i bez nadciśnienia tętniczego.....	46

Tab. 15.	Porównanie stężeń proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu w osoczu, wielkości wydalania TGFβ1 z moczem oraz wskaźnika renina/prorenina u chorych na pierwotne PKZN w grupie dippers i non – dippers.....	48
Tab. 16.	Analiza związku stężenia proreniny, reniny, angiotensyny II i aldosteronu w osoczu oraz wskaźnika renina/prorenina z wielkością wydalania TGFβ1 z moczem oraz ze stopniem sklerotyzacji kłębuszków nerkowych i nasileniem włóknienia tkanki cewkowo – śródmiąższowej w obrazie mikroskopowym nerki u chorych ze świeżo rozpoznanym pierwotnym PKZN.....	49
Tab. 17.	Porównanie częstości alleli polimorfizmów genów kodujących białka układu RAA u chorych na pierwotne PKZN i w grupie kontrolnej.....	51
Tab. 18.	Porównanie częstości genotypów polimorfizmów genów kodujących białka układu RAA u chorych na pierwotne PKZN i w grupie kontrolnej.....	52
Tab. 19.	Związek wariantów polimorficznych genów kodujących białka układu RAA z ryzykiem zachorowania na pierwotne PKZN.....	53
Tab. 20.	Analiza interakcji pomiędzy polimorfizmami genów układu RAA w pierwotnych PKZN (metoda MDR).....	55
Tab. 21.	Analiza interakcji pomiędzy polimorfizmami genów układu RAA w pierwotnych PKZN (metoda MDR) po wyłączeniu wariantów genu <i>ATP6AP2</i> zlokalizowanego na chromosomie X.....	55