

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA HUMAR (PREVC)

**DIPLOMSKA NALOGA**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA HUMAR (PREVC)

**ANTIPROTEINURIČNO DELOVANJE HOLEKALCIFEROLA PRI  
IgA NEFROPATIJI**

**ANTIPROTEINURIC ACTION OF CHOLECALCIFEROL IN IgA  
NEPHROPATHY**

Ljubljana, 2015

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za klinično kemijo, pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., in izr. prof. dr. Damjana Kovača, dr. med. Popis podatkov sem opravila na nefrološkem oddelku Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.

### **Zahvala**

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., in somentorju izr. prof. dr. Damjanu Kovaču, dr. med., za strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi Timoteju Homarju za pomoč pri statistični obdelavi podatkov.

Najlepša hvala Andreju, mojim domačim in prijateljem, ki ste mi ob študiju stali ob strani. Še posebej hvala tastu in tašči ter sestrama za varstvo sina v času pisanja diplomske naloge.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., in somentorja izr. prof. dr. Damjana Kovača, dr. med.

Tina Humar

**VSEBINA**

<b>VSEBINA</b> .....	<b>I</b>
<b>POVZETEK</b> .....	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IV</b>
<b>KLJUČNE BESEDE</b> .....	<b>V</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 IgA NEFROPATIJA</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 <i>Etiopatogeneza IgA nefropatije</i> .....	<b>1</b>
1.1.2 <i>Klinično izražanje IgA nefropatije</i> .....	<b>4</b>
1.1.3 <i>Zdravljenje IgA nefropatije</i> .....	<b>5</b>
<b>1.2 PROTEINURIJA</b> .....	<b>6</b>
1.2.1 <i>Oprelitev albuminurije in proteinurije</i> .....	<b>6</b>
1.2.2 <i>Mehanizmi proteinurije</i> .....	<b>7</b>
1.2.3 <i>Škodljivo delovanje proteinurije</i> .....	<b>8</b>
1.2.4 <i>Zniževanje proteinurije</i> .....	<b>8</b>
<b>1.3 VITAMIN D</b> .....	<b>9</b>
1.3.1 <i>Pomanjkanje vitamina D</i> .....	<b>10</b>
1.3.1.1 <i>Pomanjkanje vitamina D pri kronični ledvični bolezni</i> .....	<b>12</b>
1.3.2 <i>Renoprotektivno delovanje vitamina D</i> .....	<b>13</b>
1.3.3 <i>Kalcitriol in holekalciferol</i> .....	<b>14</b>
<b>2 NAMEN</b> .....	<b>15</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1 MATERIALI</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2 METODE</b> .....	<b>16</b>
3.2.1 <i>Določanje 25-hidroksivitamina D</i> .....	<b>16</b>
3.2.2 <i>Preiskovanci in pridobivanje podatkov</i> .....	<b>18</b>
3.2.3 <i>Statistična obdelava podatkov</i> .....	<b>19</b>
<b>4 REZULTATI</b> .....	<b>23</b>

---

<b>4.1</b>	<b>OSNOVNI PODATKI .....</b>	<b>23</b>
<b>4.2</b>	<b>VREDNOSTI PROTEINURIJE PRED IN PO UVEDBI HOLEKALCIFEROLA .....</b>	<b>24</b>
<b>4.3</b>	<b>VREDNOSTI PROTEINURIJE GLEDE NA JEMANJE ZDRAVIL .....</b>	<b>26</b>
<b>4.4</b>	<b>VREDNOSTI PARAMETROV PRED IN PO UVEDBI HOLEKALCIFEROLA .....</b>	<b>28</b>
<b>4.5</b>	<b>VREDNOSTI KORELACIJ MED PARAMETRI .....</b>	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA.....</b>	<b>30</b>
<b>5.1</b>	<b>VREDNOTENJE PROTEINURIJE .....</b>	<b>30</b>
<b>5.2</b>	<b>VREDNOTENJE OSTALIH PARAMETROV .....</b>	<b>31</b>
<b>6</b>	<b>ZAKLJUČKI .....</b>	<b>33</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>34</b>

## POVZETEK

IgA nefropatija je najpogostejša oblika primarnega glomerulonefritisa, ki nastane zaradi kopičenja nepravilno glikoziliranega IgA<sub>1</sub> v krvi in odlaganja imunskih kompleksov v glomerulih, kar povzroči ledvično okvaro. Izraža se kot hematurija, proteinurija, nefrotski sindrom ali akutna ledvična okvara in običajno vodi v kronično ledvično bolezen. Ker pri bolnikih z veliko proteinurijo bolezen pogosteje napreduje do končne odpovedi ledvic, je cilj zdravljenja zmanjšanje proteinurije. IgA nefropatijo večinoma zdravimo z zaviralci renin-angiotenzin-aldosteronskega sistema in kortikosteroidi.

Vitamin D ima pomembno vlogo pri zmanjševanju številnih kroničnih bolezni. Ker je pri ljudeh pogosto pomanjkanje vitamina D, je dopolnjevanje vitamina D postalo učinkovit terapevtski ukrep v nefrologiji. Aktivna oblika vitamina D (kalcitriol) je značilno zmanjšala proteinurijo pri IgA nefropatiji, osnovna oblika vitamina D (holekalciferol) pa je učinkovito zmanjšala albuminurijo pri diabetični nefropatiji in kronični ledvični bolezni. Z diplomsko nalogo smo želeli opredeliti učinkovitost zdravljenja s holekalciferolom na zniževanje proteinurije pri bolnikih z IgA nefropatijo, ki še ni znana.

Vrednotili smo zmanjšanje ocenjene dnevne proteinurije po uvedbi holekalciferola in njeno spremembo glede na jemanje posameznega zdravila, parametre pred in po uvedbi holekalciferola, korelacije serumske koncentracije vitamina D in starosti s posameznimi parametri ter korelacijo krvnega tlaka z dnevno proteinurijo.

Bolnikom z IgA nefropatijo se je z dopolnjevanjem holekalciferola zvečala serumska koncentracija vitamina D. Uspeli smo dokazati, da uvedba holekalciferola pri bolnikih z IgA nefropatijo poveča delež bolnikov, pri katerih se dnevna proteinurija zmanjša. Antiproteinurične učinke holekalciferola nam potrjuje tudi negativna korelacija serumske koncentracije vitamina D z ocenjeno dnevno proteinurijo. S povečanjem proteinurije zaradi večjega krvnega tlaka pa smo potrdili, da je pri terapiji IgA nefropatije zelo pomembna ureditev arterijskega krvnega tlaka.

**ABSTRACT**

IgA nephropathy is the most common form of primary glomerulonephritis, which is caused by the accumulation of incorrectly glycosylated IgA<sub>1</sub> in the blood and deposition of immune complexes in the glomeruli, causing kidney injury. It is expressed as hematuria, proteinuria, nephrotic syndrome or acute kidney injury and usually leads to chronic kidney disease. Because disease often progresses to end-stage renal disease in patients with higher proteinuria, the goal of treatment is reduction in proteinuria. IgA nephropathy is mostly treated with inhibitors of renin-angiotensin-aldosterone system and corticosteroids.

Vitamin D plays an important role in decreasing of many chronic diseases. Because vitamin D deficiency is common in humans, supplementation of vitamin D has become an effective therapeutic measure in nephrology. The active form of vitamin D (calcitriol) significantly reduced proteinuria in IgA nephropathy, the basic form of vitamin D (cholecalciferol) effectively reduced albuminuria in diabetic nephropathy and chronic kidney disease. Efficacy of treatment with cholecalciferol in lowering proteinuria is not yet known in patients with IgA nephropathy and that we wanted to identify with the research.

We have evaluated a reduction of the estimated daily proteinuria after the introduction of cholecalciferol and its change in relation to taking a particular medicine, parameters before and after the introduction of cholecalciferol, correlations of serum level of vitamin D and age with individual parameters and a correlation of blood pressure with daily proteinuria.

Serum concentration of vitamin D has been increased by supplementing cholecalciferol in patients with IgA nephropathy. We have managed to demonstrate, that in patients with IgA nephropathy the introduction of cholecalciferol increases the proportion of patients, in which daily proteinuria reduces. Antiproteinuric effects of cholecalciferol have been also confirmed by a negative correlation of serum concentration of vitamin D with an estimated daily proteinuria. With the increase of proteinuria due to increased blood pressure we have confirmed, that a regulation of arterial blood pressure is very important in the treatment of IgA nephropathy.

## **KLJUČNE BESEDE**

IgA nefropatija

proteinurija

kronična ledvična bolezen

vitamin D

holekalciferol

pomanjkanje vitamina D

## **KEY WORDS**

IgA nephropathy

proteinuria

chronic kidney disease

vitamin D

cholecalciferol

vitamin D deficiency



**SEZNAM OKRAJŠAV**

<b>1,25(OH)<sub>2</sub>D</b>	1,25-dihidroksivitamin D
<b>25(OH)D</b>	25-hidroksivitamin D
<b>ACE zaviralec</b>	Zaviralec encima angiotenzinske konvertaze
<b>AF</b>	Alkalna fosfataza
<b>Cosmc</b>	»core 1 β3-Gal-T-specific molecular chaperone«
<b>DBP</b>	Vitamin D vezavni protein
<b>FGF23</b>	Fibroblastni rastni dejavnik 23
<b>GP-IgA<sub>1</sub></b>	Galaktoza-pomanjkljivi imunoglobulin A <sub>1</sub>
<b>IL-4</b>	Interlevkin-4
<b>IPTH</b>	Intaktni parathormon
<b>MCP-1</b>	Monocitni kemoatraktantni protein-1
<b>MDRD</b>	»Modification of Diet in Renal Disease« – ime raziskave; Izračun ocenjene glomerulne filtracije z MDRD enačbo upošteva spol, starost, raso in koncentracijo S-kreatinina. Rezultat je brez preračunavanja podan na 1,73 m <sup>2</sup> telesne površine.
<b>MMF</b>	Mikofenolat mofetil
<b>NADPH oksidaza</b>	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat-oksidaza
<b>NAG</b>	N-acetil glukozaminidaza
<b>NF-κB</b>	Jedrni dejavnik κB
<b>oDP</b>	Ocenjena dnevna proteinurija
<b>oGF</b>	Ocenjena glomerulna filtracija
<b>RAAS zaviralec</b>	Zaviralec renin-angiotenzin-aldosteronskega sistema
<b>RLU</b>	Relativne svetlobne enote
<b>SW</b>	Štetje celic
<b>TGF-β</b>	Transformirajoči rastni dejavnik-β
<b>TLR4</b>	Tollu podobni receptor 4
<b>VDR</b>	Vitamin D receptor
<b>Wnt</b>	Družina proteinov Wnt

# 1 UVOD

## 1.1 IgA NEFROPATIJA

### Oprelitev in epidemiologija

Imunoglobulin A (IgA) nefropatija je najpogostejša oblika primarnega glomerulonefritisa, vnetja ledvičnih telesc (1). Prizadene oba spola (moške bolj kot ženske) in se pojavi pri katerikoli starosti, najpogosteje v drugem in tretjem desetletju življenja (2). Privede do končne odpovedi ledvic – pri 15–20 % bolnikov v 10 letih in pri 30–35 % bolnikov v 20 letih od nastopa bolezni (3).

### 1.1.1 Etiopatogeneza IgA nefropatije

Ljudje tvorimo dva podrazreda IgA – IgA<sub>1</sub> in IgA<sub>2</sub>. Plazmatke, povezane z respiratornim in gastrointestinalnim traktom, tvorijo tako IgA<sub>1</sub> kot IgA<sub>2</sub>, plazmatke v kostnem mozgu, bezgavkah in vranici, pa v glavnem tvorijo IgA<sub>1</sub>. Pojav IgA nefropatije je lahko povezan z infekcijami zgornjega respiratornega trakta. Zaradi okvare mukoznih T celic je zmanjšana mukozna imunost, ki je delno v povezavi z IgA. Zmanjšan IgA odziv na mukozne antigene lahko poveča tvorbo IgA<sub>1</sub> v kostnem mozgu, kar vodi do povečanih ravni IgA<sub>1</sub> v krvi (2). Povečana sinteza IgA je prisotna tudi v perifernih mononuklearnih celicah. Pri tem ima pomembno vlogo interleukin-4 (IL-4), ki ga izločajo T celice pomagalke tipa 2. IL-4 preko izražanja CD23 povzroča aktivacijo B limfocitov in nastanek protiteles (4). Vendar povečana tvorba IgA ne zadošča za nastanek IgA nefropatije, vzrok je v nepravilnosti IgA molekule. IgA<sub>1</sub> in drugi imunoglobulini so močno glikozilirani (2). Za IgA<sub>1</sub> je značilna prisotnost 18-aminokislinske zgibne regije (5), ki je bogata v serinu, prolinu in treoninu. V zgibni regiji ima spremenljivo število O-glikozilacijskih mest (6), medtem ko IgA<sub>2</sub> in drugi imunoglobulini teh mest nimajo. Pri IgA<sub>1</sub> se na ostanke serina ali treonina preko kisika veže N-acetilgalaktozamin, na katerega se pritrdi galaktoza preko  $\beta$ -1,3 vezi, N-acetilgalaktozaminu in galaktozi pa je dodana sialična kislina (N-acetil nevraminska kislina). Za IgA nefropatijo je značilna okvarjena O-galaktozilacija IgA<sub>1</sub> (2), ki nastane zaradi zmanjšane aktivnosti encima  $\beta$ -1,3-galaktoziltransferaze in/ali prezgodnje in prekomerne sializacije N-acetilgalaktozamina, kar preprečuje dodajanje galaktoze (6).

Pri IgA nefropatiji poznamo več možnih mehanizmov zmanjšane aktivnosti  $\beta$ -1,3-galaktoziltransferaze, vendar ni znano, kaj točno povzroča prekomerno nastajanje galaktoza-pomanjkljivih IgA<sub>1</sub> (GP-IgA<sub>1</sub>). Obstaja alternativna hipoteza o vplivu infekcije na pojav IgA nefropatije. Bakterijski lipopolisaharidi na perifernih monocitih povzročajo prekomerno sintezo Tollu podobnega receptorja 4 (TLR4) (5), transmembranskega receptorja, ki prepozna sestavni del zunanje membrane Gram-negativnih bakterij (7). TLR4 sodeluje pri metilaciji specifičnega molekularnega spremljevalca jedrne  $\beta$ -1,3-galaktoziltransferaze (Cosmc), ki je potreben za delovanje  $\beta$ -1,3-galaktoziltransferaze (5, 8). Metilacija Cosmc tako zmanjša galaktozilacijo IgA<sub>1</sub> preko zmanjšane aktivnosti  $\beta$ -1,3-galaktoziltransferaze. Zmanjšana galaktozilacija IgA<sub>1</sub> je lahko posledica tudi okvare v B limfocitih, ki imajo zmanjšano aktivnost  $\beta$ -1,3-galaktoziltransferaze. Poleg tega je povečan pojav IgA nefropatije povezan s prevlado T celic pomagalk tipa 2, ki izločajo citokin IL-4, ki zmanjša aktivnost  $\beta$ -1,3-galaktoziltransferaze in njenega spremljevalca Cosmc. Zadnje ugotovitve predlagajo, da morda ni resnične okvare v O-galaktozilaciji IgA<sub>1</sub>, ampak je povečanje IgA<sub>1</sub> »mukoznega tipa« v krvi posledica migracije mukoznih B celic v kostni mozeg, kjer tvorijo njihov »pravilni« slabo galaktozilirani IgA<sub>1</sub> (5).

GP-IgA<sub>1</sub> se slabše odstranjuje zaradi zmanjšane vezave na asialoglikoproteinske receptorje v jetrih ali preko motenega odstranjevanja v drugih tkivih (6). Bolniki z IgA nefropatijo imajo tudi slabše izražen IgA receptor na monocitih in zato pomanjkljivo odstranjevanje IgA iz krvi (1). Posledično se GP-IgA<sub>1</sub> kopičijo v presežku v obtoku.

Galaktoza-pomanjkljive IgA<sub>1</sub> najdemo v glomerulih v obliki imunskih kompleksov, ki so sestavljeni iz GP-IgA<sub>1</sub> in IgG avtoprotiteles, usmerjenih k izpostavljenim ostankom N-acetilgalaktozamina v zgibni regiji IgA<sub>1</sub>. Avtoprotitelesa lahko nastanejo zaradi molekularne mimikrije, pri kateri imajo okoljski antigeni (bakterijski ali virusni glikoproteini) podoben epitop kot avtoantigen GP-IgA<sub>1</sub> (6). Molekularna mimikrija razloži pojav makroskopske hematurije po infekciji zgornjega respiratornega trakta. Povečajo se serumske ravni IgG, ki se vežejo na GP-IgA<sub>1</sub>, nastali imunski kompleksi pa nato z aktivacijo mezangijskih celic povzročajo hematurijo (5). Po hipotezi krožečega imunskega kompleksa nastanejo imunski kompleksi v obtoku in se odlagajo v mezangiju zaradi njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti in vezave na mezangijske transferinske receptorje. Po hipotezi in-situ imunskega kompleksa pa je GP-IgA<sub>1</sub> lepljiva molekula, nagnjena k samoagregaciji in vezavi na glikoproteine normalnih glomerulov. Imunski kompleksi se tvorijo in-situ med sicer neškodljivimi depoziti GP-IgA<sub>1</sub> v mezangiju in IgG

avtoprotitelesi. Njihova vezava nato sproži aktivacijo komplementa in drugih mediatorjev, kar povzroči ledvično okvaro (6).

Pri razvoju in napredovanju ledvične poškodbe sodelujejo številni citokini in rastni dejavniki (2). Polimerni anionski IgA<sub>1</sub> aktivira mezangijske celice, da sproščajo dejavnik tumorske nekroze- $\alpha$ , trombocitni aktivacijski faktor in transformirajoči rastni dejavnik- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), ki poškodujejo podocyte in tubulne celice (5). TGF- $\beta$ 1 je fibrozni citokin, ki povzroča glomerulosklerozo, tubulno atrofijo in intersticijsko fibrozo. V mezangijskih celicah IgA<sub>1</sub> poveča tudi sintezo in izločanje interleukina-6, ki spodbuja sintezo makromolekul ekstracelularnega matriksa in proliferacijo mezangijskih celic, pri kateri lahko sodelujejo tudi trombocitni rastni dejavnik (2) in levkotrieni (9).

Najpogostejša sprememba pri IgA nefropatiji je fokalna (prizadetost samo nekaterih glomerulov) in segmentna (v delu glomerula) proliferacija mezangijskih celic in kopičenje matriksa (1). Pomnožitev mezangijskih celic in povečanje matriksa nista specifična za IgA nefropatijo in sta prisotna pri številnih drugih ledvičnih boleznih (2). Značilne so tudi fokalno segmentna endokapilarna proliferacija, segmentna glomerulosklerozoza in tvorba celičnega polmeseca. Če je odstotek ledvičnih telesc s polmeseci ali glomerulosklerozo več kot 50 %, gre za difuzno prizadetost (1). Poleg glomerulnih sprememb se pojavijo različne tubulointersticijske in vaskularne spremembe – intersticijska fibroza, tubulna atrofija, intersticijsko vnetje, vaskularna skleroza ali eritrocitni in proteinski odlitki v ledvičnih tubulih. Ocena teh značilnosti zagotavlja pomembno prognostično informacijo za bolnike z IgA nefropatijo, čeprav jih vidimo pri progresivni ledvični bolezni kateregakoli vzroka (2).

### Diagnostika IgA nefropatije

Diagnozo IgA nefropatije postavimo z ledvično biopsijo, ki vključuje imunofluorescenčno mikroskopsko preiskavo. Za IgA nefropatijo so značilni zrnčasti glomerulni imunski depoziti, ki so razporejeni globalno (v celotnem glomerulu) in difuzno (v vseh glomerulih) (1). V imunskih depozitih prevladuje IgA, ki je izključno podrazreda IgA<sub>1</sub>. V njih se nahajajo tudi IgM, IgG, komponenta komplementa C3 in imunoglobulinski lahki verigi lambda in kapa (2).

### 1.1.2 Klinično izražanje IgA nefropatije

#### **Makroskopska hematurija**

Pojavi se pri 40–50 % bolnikov z IgA nefropatijo. Hematurijo ponavadi opazijo bolniki v 24 urah od pojava simptomov infekcije zgornjih dihal. Urin je prej rjav kot rdeč in običajno ni strdkov. Prihaja lahko do bolečin v ledvenem predelu zaradi napenjanja ledvične kapsule. Makroskopska hematurija spontano izzveni v nekaj dneh, med napadi pa je prisotna stalna mikroskopska hematurija.

#### **Asimptomatska hematurija in proteinurija**

Bolniki z IgA nefropatijo so večinoma asimptomatski in jih lahko odkrijemo s presejalnim testiranjem urina. Pri tem ugotovimo mikroskopsko hematurijo z ali brez proteinurije.

#### **Proteinurija in nefrotski sindrom**

Proteinurija se redko pojavi brez mikroskopske hematurije. Nefrotski sindrom se izrazi pri 5 % bolnikov z IgA nefropatijo. Pojavi se lahko v zgodnji fazi bolezni z minimalno glomerulno spremembo ali z aktivnim mezangioproliferativnim glomerulonefritisom. Lahko pa predstavlja pozno fazo kroničnega glomerulnega brazgotinjenja.

#### **Akutna ledvična okvara**

Pri bolnikih z IgA nefropatijo je zelo redka (< 5 %) (10), čeprav se lahko pojavi pri do 27 % bolnikov, starejših od 65 let (11). Prisotna je lahko huda akutna imunska in vnetna poškodba z nekrotizirajočim glomerulonefritisom in tvorbo polmeseca. Akutno ledvično odpoved lahko povzroči tudi blaga glomerulna poškodba, ki ji sledi tubulna zamašitev z eritrociti zaradi težke glomerulne hematurije.

#### **Kronična ledvična bolezen**

IgA nefropatija pri velikem deležu bolnikov napreduje v kronično ledvično bolezen. Pri približno eni tretjini bolnikov je sicer možna tudi spontana remisija bolezni. Bolniki, pri katerih bolezen poteka zgolj z blago proteinurijo in mikroskopsko hematurijo, ostanejo pogosto nediagnosticirani in tako bolezen odkrijemo šele v napredovali fazi, ko je že prisotna napredovala kronična ledvična bolezen. Poleg tega je pri 5 % bolnikov z IgA nefropatijo prisotna tudi pospešena hipertenzija (10).

### 1.1.3 Zdravljenje IgA nefropatije

Proteinurija je najpomembnejši napovedovalec napredovanja ledvične okvare in dober prognostični označevalec. Ker pri bolnikih s proteinurijo nad 1 g/dan bolezen pogosteje napreduje do končne odpovedi ledvic, je cilj zdravljenja zmanjšati proteinurijo pod 1 g/dan. Zdravljenje boleznij je običajno najprej neimunološko – če to ni dovolj učinkovito, sledi imunološko zdravljenje. Neimunološko zdravljenje zaobjema zdravljenje arterijske hipertenzije na vrednost manj kot 130/80 mmHg – zdravljenje obsega uvedbo zaviralca renin-angiotenzin-aldosteronskega sistema (RAAS), to je zaviralca angiotenzinske konvertaze (ACE) ali blokatorja angiotenzinskega II receptorja (sartana), in omejitev soli v hrani na največ 5 g dnevno. Če bolniku po več mesecih spremljanja z neimunološkim zdravljenjem ne uspemo zmanjšati proteinurije pod 1 g/dan, pričnemo z imunološkim zdravljenjem. Če je bolezen hitro napredujoča, takoj začnemo tudi z imunološkim zdravljenjem. Odziv na terapijo je lahko različen in ni še zdravljenja, ki bi bilo vedno učinkovito in brez stranskih učinkov. Bolniki, pri katerih nam uspe z zdravili zmanjšati proteinurijo, imajo boljšo prognozo ledvične boleznij. Terapevtski ukrepi so različni glede na klinično izražanje boleznij in se glede na odmerke razlikujejo med posameznimi centri:

- Bolniki s ponavljajočo makroskopsko hematurijo ali izolirano mikroskopsko hematurijo: Le letne urinske kontrole.
- Bolniki s proteinurijo pod 1 g/dan: Titriranje RAAS zaviralcev – začnejo z nizkim odmerkom ACE zaviralca in ga postopoma povečujejo do največjega dovoljenega odmerka, če proteinurija vztraja nad 0,5 g/dan. Če imajo intoleranco na ACE zaviralce, na enak način uporabijo blokatorja angiotenzinskega II receptorja.
- Bolniki s proteinurijo nad 1 g/dan in normalno ledvično funkcijo: Titriranje RAAS zaviralcev in kortikosteroidi (najprej pulzno zdravljenje, nato per os v visokem odmerku, skupno 6 mesecev).
- Bolniki s proteinurijo nad 1 g/dan in zmanjšano ledvično funkcijo: Titriranje RAAS zaviralcev in kortikosteroidi (najprej pulzno zdravljenje, nato per os v nizkem odmerku, skupno 6 mesecev).
- Bolniki s hitro napredujočo ledvično okvaro in/ali vaskulitičnimi lezijami pri ledvični biopsiji: Titriranje RAAS zaviralcev in imunosupresivna terapija (kortikosteroidi, najprej pulzno, nato per os v visokem odmerku in sočasno pulzno zdravljenje s ciklofosfamidom).

Druge oblike zdravljenja so mikofenolat (MMF), ribje olje, tonzilektomija (odstranitev mandljev), antitrombotiki, ciklosporin in rituksimab. Mnoge raziskave niso dokazale koristi mikofenolata na ledvično funkcijo in proteinurijo, nedavna študija pa je pokazala boljše ledvično preživetje. Rezultati raziskav z ribjim oljem so neskladni, medtem ko so pred kratkim dokazali dobro učinkovitost ribjega olja v kombinaciji z ACE zaviralci. Tonzilektomijo široko uporabljajo na Japonskem in daje dobre rezultate v zmanjšanju proteinurije. Pri zdravljenju IgA nefropatije so bili pogosto predlagani tudi antitrombotiki, vendar niso priporočljivi zaradi neskladnih rezultatov študij. Za ciklosporin obstaja le ena raziskava, ki je pokazala zmanjšanje proteinurije, po prekinitvi terapije pa se je bolnikom proteinurija hitro povečala. Rituksimab prav tako ni pokazal koristi na proteinurijo in ledvično funkcijo (12).

## 1.2 PROTEINURIJA

### 1.2.1 Opredelitev albuminurije in proteinurije

Glomeruli s filtriranjem krvi proizvajajo primarni urin. Pri tem zadržijo večje proteine, vključno z večino serumskega albumina (molekulska masa > 67 kDa). Proteini z molekulsko maso pod 60 kDa prosto prehajajo skozi glomerulno bazalno membrano in so aktivno reabsorbirani iz tubulnega lumna. Ledvični tubuli reabsorbirajo majhne molekule in majhno količino albumina, ki prosto prehaja skozi glomerule. Na dan izločimo 40–80 mg proteinov, od katerih je 10–15 mg (30–40 %) albumina, ostalo pa so Tamm-Horsfall protein iz epitelijskih celic ascendentnega dela Henlejeve zanke in majhne količine nizko molekularnih proteinov ( $\beta_2$ -mikroglobulin,  $\alpha_1$ -mikroglobulin, retinol vezavni protein). Vrsta proteinov, izločenih v urin, je odvisna od vzroka ledvične bolezni. Izločanje albumina je bolj pogosto pri glomerulni, diabetični ali hipertenzivni ledvični bolezni, nizko molekularni proteini pa so pogosto tubulointersticijskega izvora (13).

Albuminurijo določimo s preiskavo razmerja albumin/kreatinin v drugem jutranjem vzorcu urina (14). Izločanje kreatinina je konstantno in ni odvisno od volumna urina, zato razmerje albumin/kreatinin ocenjuje dnevno izločanje albumina (13). Za albuminurijo se uporabljata dva izraza – mikroalbuminurija in makroalbuminurija. Mikroalbuminurija pomeni povečano izločanje albumina v urin ob še normalni proteinuriji. Pri nas je opredeljena kot razmerje albumin/kreatinin nad 3,0 g/mol, v ZDA pa kot območje 3,4–

34 g/mol (30–300 mg dnevno). Makroalbuminurija pa pomeni razmerje albumin/kreatinin nad 34 g/mol (nad 300 mg dnevno).

Če je albuminurija večja kot 150 mg dnevno, je že v območju proteinurije. Bolezensko proteinurijo določimo z analizo celokupnih proteinov v drugem jutranjem vzorcu urina. S pomočjo določitve kreatinina podamo rezultat kot razmerje proteini/kreatinin [g/mol]. To razmerje lahko pomnožimo s povprečnim dnevnim izločanjem kreatinina, ki je približno 8,8 mmol/dan/1,73 m<sup>2</sup> telesne površine (1000 mg/dan/1,73 m<sup>2</sup>), in tako dobimo ocenjeno dnevno proteinurijo [g/dan/1,73 m<sup>2</sup>]. Proteinurijo delimo na blago (150 mg do 1 g proteinov v 24-urnem urinu), zmerno (1–3 g proteinov v 24-urnem urinu) in nefrotsko (nad 3 g proteinov v 24-urnem urinu ali nad 3,5 g/dan/1,73 m<sup>2</sup>) (14).

### 1.2.2 Mehanizmi proteinurije

Glomerulno filtracijsko bariero sestavljajo 3 plasti, ki prispevajo k prepustnosti albumina: endotelij z glikokaliksom, glomerulna bazalna membrana in podociti (glomerulne epiteljske celice). Povečana glomerulna prepustnost nastane zaradi okvar v glomerulni barieri ali povečanega filtracijskega tlaka. Posledično se pojavi preobremenitvena proteinurija.

Glomerulna bazalna membrana ima le manjši prispevek pri oviranju prehoda proteinov. Pri endotelijski prepustnosti sodelujejo vnetni citokini, reaktivne kisikove snovi, aktivacija renin-angiotenzin-aldosteronskega sistema, dislipidemija in hiperglikemija. Ker negativni naboj glikokaliksa (heparin sulfat proteoglikani) ovira prehod makromolekul, izginotje glikokaliksa povečuje prepustnost za proteine (13). Prehod proteinov ovirajo tudi podociti. Nefrin, ključni protein por glomerulne filtracijske membrane, povezuje podaljške podocitov. Ti s sintezo renina in encima angiotenzinske konvertaze izražajo lokalni renin-angiotenzin-aldosteronski sistem v glomerulih. Angiotenzin II v podocitih zmanjša sintezo nefrina in s tem poveča velikost por glomerulne filtracijske membrane. Poleg tega angiotenzin II v podocitih aktivira NADPH oksidazo, ki tvori reaktivne kisikove snovi. Prekomerni oksidativni stres sproži poškodbo podocitov, kar vodi do proteinurije (15).

Povečano izločanje albumina je lahko posledica disfunkcije dveh procesov – filtracije albumina z glomeruli in reabsorpcije albumina z receptorsko posredovano endocitozo v celicah proksimalnega tubula. Obstaja več receptorjev za tubulni privzem albumina.



Receptorja megalin in kubilin sta odgovorna za privzem velikih filtriranih plazemskih proteinov, med drugim za normalno endocitotno reabsorpcijo filtriranega albumina. Prisotnost albumina v urinu inducira TGF- $\beta$ , ki sodeluje pri povratnem mehanizmu povečanja filtracije albumina in zaviranja z megalinom in kubilinom posredovane endocitoze albumina, kar poveča albuminurijo. Spremembe teh mehanizmov povzročajo tubulno proteinurijo.

### 1.2.3 Škodljivo delovanje proteinurije

Proteini v urinu spodbujajo izražanje vnetnih in fibroznih mediatorjev in tako povzročajo intersticijsko vnetje in fibrozo. Pojavi se tubulointersticijska poškodba, ki dodatno povečuje izločanje proteinov v urin s poslabšanjem reabsorpcije filtriranih proteinov (13). Proteinurija je dejavnik tveganja napredovanja kronične ledvične bolezni, ledvične odpovedi in srčno-žilnih dogodkov, zato je zmanjšanje proteinurije ali albuminurije terapevtska tarča za kronično ledvično bolezen (16). Srčno-žilno tveganje je bolj povezano z albuminurijo ali proteinurijo kot s samo glomerulno filtracijo. Proteinurični bolnik ima celo pri normalni glomerulni filtraciji veliko verjetnost poslabšanja ledvične funkcije v primerjavi z bolnikom z nizkim ali brez izločanja proteinov v urin. Nižje izločanje albumina v urin (celo znotraj normalnega območja) je povezano z nižjim tveganjem za ledvične in srčno-žilne dogodke (13).

### 1.2.4 Zniževanje proteinurije

Povečana proteinurija je povezana s hitrejšo izgubo ledvične funkcije, zato postane njeno zmanjšanje pomemben cilj zdravljenja ledvične proteinurične bolezni (17). Čim bolj znižamo proteinurijo, tem boljša je prognoza napredovanja kronične ledvične bolezni in nastopa ledvične odpovedi. Trenutno uporabljena renoprotektivna zdravila niso bila namenjena za zmanjšanje proteinurije. Razvita so bila za uravnavanje krvnega tlaka, njihov antiproteinurični učinek pa je bil odkrit kot dodaten učinek. Od vseh antihipertenzivnih zdravil so zdravila, ki vplivajo na renin-angiotenzin-aldosteronski sistem, najbolj znana po antiproteinuričnem učinku. Vključujejo ACE zaviralce, blokatorje angiotenzinskega II receptorja, antagonist aldosterona in zaviralce renina (18). RAAS zaviralci zmanjšajo

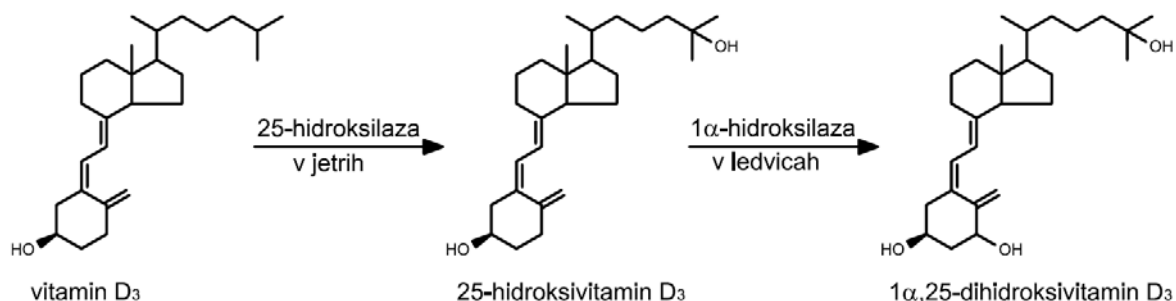
proteinurijo zaradi zmanjšanja por v glomerulih in zaradi znižanja krvnega tlaka (13). Kombinacija ACE zaviralca in blokatorja angiotenzinskega II receptorja dodatno znižuje proteinurijo. Antiproteinurični učinek teh zdravil se lahko poveča z dodatkom diuretika in omejitvijo vnosa natrija s hrano. Drugi antiproteinurični ukrepi, ki nimajo vpliva na krvni tlak, so nizko-proteinske diete (18) in nekirurška izguba telesne teže pri prekomerno prehranjenih bolnikih (19).

Proteinurični bolniki imajo kljub zdravljenju z RAAS zaviralci povečano tveganje za odpoved ledvic, ki je povezano s stopnjo proteinurije (13). RAAS zaviralci pogosto proteinurije ne zmanjšajo dovolj, saj ne vplivajo na vnetno komponento bolezni (3). Kortikosteroidno zdravljenje je učinkovito pri zmanjšanju proteinurije (20), vendar imajo številne neželene učinke (17). Proteinurijo zmanjša tudi levkotrienski antagonist, morda delno z obnovo selektivnosti glomerulne velikosti in zmanjšanjem transglomerulnega prenosa proteinov (9). Zmanjšanje ostanka albuminurije ali proteinurije na najnižjo dosegljivo raven je torej cilj prihodnjih renoprotektivnih zdravljenj (13).

### 1.3 VITAMIN D

Vitamin D dobimo z izpostavljenostjo sončni svetlobi in z vnosom s prehrano in prehranskimi dopolnili. Malo živil naravno vsebuje ali je obogatenih z vitaminom D. Zaužijemo lahko vitamin D rastlinskega (ergokalciferol – vitamin D<sub>2</sub>) ali živalskega izvora (holekalciferol – vitamin D<sub>3</sub>). Vitamin D<sub>2</sub> je v gobah shiitake, vitamin D<sub>3</sub> pa v ribjem olju, lososu in jajčnem rumenjaku. Vitamin D<sub>2</sub> je 30 % tako učinkovit kot vitamin D<sub>3</sub>. Zadostne količine vitamina D zagotavlja dnevno jemanje vsaj 800 i.e. vitamina D<sub>3</sub>. Toliko ga je težko pridobiti iz same prehrane, razen ob pogostem uživanju ribjega olja. Vitamin D<sub>3</sub> nastaja tudi v koži. Sončno ultravijolično B sevanje pretvori 7-dehidroholesterol v previtamin D<sub>3</sub>, ki se s toploto hitro pretvori v vitamin D<sub>3</sub>. Prekomerna izpostavljenost sončni svetlobi ne povzroča zastrupitve z vitaminom D<sub>3</sub>, saj se presežek previtamina D<sub>3</sub> ali vitamina D<sub>3</sub> uniči s sončno svetlobo. Smiselna izpostavljenost soncu zagotavlja ustrezne količine vitamina D<sub>3</sub>, ki se shrani v telesne maščobe in sprosti v zimskem času, ko vitamin D<sub>3</sub> ne nastaja (21). Vitamin D iz kože in prehrane se v jetrih presnovi v 25-hidroksivitamin D [25(OH)D], ki se v obtoku kompleksira z vitamin D vezavnim proteinom (DBP). 25(OH)D–DBP kompleks se filtrira v glomerulih in nato reabsorbira preko megalin-

posredovane endocitoze v proksimalnih tubulih, pri čemer ledvična  $1\alpha$ -hidroksilaza pretvori  $25(\text{OH})\text{D}$  v  $1,25$ -dihidroksivitamin D [ $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ] (16). Ledvična sinteza  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  je uravnavana z nivoji kalcija in fosforja ter nivoji parathormona v krvi (21). Aktivacija vitamina D je prikazana na primeru vitamina  $\text{D}_3$  (slika 1).



**Slika 1: Metabolična aktivacija vitamina  $\text{D}_3$  (prirejeno po 22).**

Hormonska oblika vitamina D,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , povzroča mineralizacijo okostja in poveča serumske koncentracije kalcija in fosfata z absorpcijo kalcija in fosfata v prebavilih, mobilizacijo kalcija iz kosti in reabsorpcijo kalcija v distalnih ledvičnih tubulih. Vitamin D hormon deluje preko vitamin D receptorja, ki se nahaja v enterocitih, osteoblastih in celicah distalnega ledvičnega tubula. Poleg tega ga najdemo tudi v celicah obščitničnih žlez, kožnih keratinocitih, promielocitih, limfocitih ter v celicah debelega črevesa, žleze hipofize in jajčnikov. Vitamin D receptor v teh celicah nakazuje funkcije vitamina D, ki niso vezane na kosti. Vitamin D prepreči proliferacijo celic obščitnične žleze in tako vzdržuje normalno stanje obščitnic. Preprečuje uničenje celic Langerhansovih otočkov v trebušni slinavki (22), povečuje sintezo inzulina, inhibira sintezo renina, povečuje miokardno kontraktilnost (21) in ima pomemben vpliv na imunski sistem (22). Lahko zmanjša tveganje za številne kronične bolezni, kot so srčno-žilna bolezen, rak, avtoimune in infektivne bolezni.

### 1.3.1 Pomanjkanje vitamina D

Merilo za stanje vitamina D je serumska raven  $25(\text{OH})\text{D}$ . Raven  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  se ne sme uporabljati za odkrivanje pomanjkanja vitamina D, ker je lahko normalna ali celo povišana kot posledica sekundarnega hiperparatiroidizma. Pomanjkanje vitamina D je opredeljeno kot serumska raven  $25(\text{OH})\text{D}$  manj kot  $20 \text{ ng/mL}$  ( $50 \text{ nmol/L}$ ). Raven  $21\text{--}29 \text{ ng/mL}$  ( $52\text{--}$

72 nmol/L) 25(OH)D kaže insuficienco vitamina D, medtem ko raven nad 30 ng/mL (75 nmol/L) predstavlja zadostno količino vitamina D. Zastrupitev z vitaminom D je redka. Odmerki, večji kot 50.000 i.e. vitamina D<sub>3</sub> na dan, dvignejo raven 25(OH)D nad 150 ng/mL in povzročajo hiperkalcemijo in hiperfosfatemijo. Odmerki 10.000 i.e. vitamina D<sub>3</sub> na dan do 5 mesecev ne povzročajo toksičnosti.

Neodkrito pomanjkanje vitamina D ni neobičajno, pomanjkanje ali insuficienco vitamina D ima 1 milijarda svetovnega prebivalstva (21). Vitamin D je v veliki meri odsoten v živilih, poleg tega ga pozimi nastane malo v koži pri ljudeh v severnih in južnih delih planeta (22). Ljudje ob ekvatorju, ki so izpostavljeni sončni svetlobi brez zaščite pred soncem, imajo raven 25(OH)D nad 30 ng/mL. Vendar je pomanjkanje vitamina D pogosto celo v najbolj sončnih področjih, ker je večina kože zaščitena pred soncem. Otroci in mladi odrasli imajo visoko tveganje za pomanjkanje vitamina D. Ogrožene so tudi nosečnice in doječe matere kljub jemanju prenatalnega multivitaminskega pripravka.

Pomanjkanje vitamina D ogroža mineralizacijo kosti. Brez ustreznega kalcij-fosfat produkta je mineralizacija kolagenskega matriksa zmanjšana, kar vodi do rahitisa pri otrocih in osteomalacije pri odraslih. Serumska raven 25(OH)D je povezana z mineralno gostoto kosti. Raven 25(OH)D je obratno povezana z nivojem parathormona, dokler prvi ne doseže 30–40 ng/mL, ko se nivo parathormona začne stabilizirati na njegovo najnižjo vrednost. Ko je raven 25(OH)D 30 ng/mL ali manj, pride do zmanjšanja črevesne absorpcije kalcija. Posledično se iz obščitnične žleze poveča izločanje parathormona, ki povečuje tubulno reabsorpcijo kalcija in ledvično sintezo 1,25(OH)<sub>2</sub>D. Parathormon tudi aktivira osteoblaste, da stimulirajo preoblikovanje preosteoklastov v zrele osteoklaste, ki raztopijo mineralizirani kolagenski matriks v kosteh, kar povzroča osteopenijo in osteoporozo ter povečuje tveganje za zlome in padce. V maternici in v otroštvu lahko pomanjkanje vitamina D povzroči zastoj rasti in skeletne deformacije, pozneje v življenju pa poveča tveganje za zlome kolka. Pomanjkanje vitamina D pri odraslih povzroča tudi mišično šibkost. Skeletne mišice imajo vitamin D receptor in lahko potrebujejo vitamin D za maksimalno delovanje.

1,25-dihidroksivitamin D je močan imunomodulator. Monociti in makrofagi ob stiku z lipopolisaharidom ali *Mycobacterium tuberculosis* stimulirajo gen vitamin D receptorja in gen 25-hidroksivitamin D-1 $\alpha$ -hidroksilaze. Povečana sinteza 1,25(OH)<sub>2</sub>D ima za posledico sintezo peptida katelicidina, ki lahko uniči *M. tuberculosis* in druge povzročitelje infekcij. Ko serumska raven 25(OH)D pade pod 20 ng/mL, je preprečena iniciacija tega imunskega

odziva. Ljudje s pomanjkanjem vitamina D so tako bolj nagnjeni k tuberkulozi in imajo bolj agresivno obliko bolezni.

Raven 25(OH)D pod 20 ng/mL je povezana z večjim tveganjem za pojav raka debelega črevesa, prostate in dojk. Ta tkiva izražajo 25-hidroksivitamin D-1 $\alpha$ -hidroksilazo in nastaja 1,25(OH)<sub>2</sub>D za nadzor genov, ki pomagajo pri preprečevanju raka s stabilizacijo celične proliferacije in diferenciacije. Ko celica postane maligna, lahko 1,25(OH)<sub>2</sub>D inducira apoptozo, preprečuje angiogenezo in tako zmanjša možnost preživetja maligne celice. Večja izpostavljenost soncu in višja serumska raven 25(OH)D sta torej povezani z manjšim tveganjem za rakava obolenja.

Zadostne količine vitamina D so povezane z manjšim tveganjem za hipertenzijo, srčno-žilne bolezni, revmatoidni artritis, osteoartritis, Chronovo bolezen, multiplo sklerozo in diabetes tipa 1 in 2. Pomanjkanje vitamina D zmanjša sintezo inzulina in poveča inzulinsko rezistenco. Dopolnjevanje z vitaminom D med nosečnostjo pri otroku zmanjša razvoj avtoprotiteles Langerhansovih otočkov. Zadostne količine vitamina D vplivajo tudi na povečanje forsiranega ekspiracijskega volumna. Otroci žensk, ki so imele med nosečnostjo pomanjkanje vitamina D, imajo povečano tveganje za piskanje v pljučih. Pomanjkanje vitamina D je povezano z večjim pojavom shizofrenije in depresije. Ker zadostne količine vitamina D v maternici in v mladosti zagotavljajo transkripcijsko aktivnost vitamin D receptorja v možganih, so lahko pomembne za sam razvoj možganov, pozneje pa za vzdrževanje mentalne funkcije (21).

### **1.3.1.1 Pomanjkanje vitamina D pri kronični ledvični bolezni**

Bolniki s kronično ledvično boleznijo imajo pogosto pomanjkanje 25(OH)D. Vzroki za 25(OH)D pomanjkanje so zmanjšan vnos živil z vitaminom D, zmanjšana endogena sinteza vitamina D v koži zaradi zmanjšane izpostavljenosti sončni svetlobi (23) in povečana izguba 25(OH)D–DBP v urin zaradi zmanjšane aktivnosti z megalinom-posredovane endocitoze 25(OH)D–DBP (16). Ob napredovanju kronične ledvične bolezni se zmanjša aktivnost ledvične 1 $\alpha$ -hidroksilaze, kar vodi v pomanjkanje 1,25(OH)<sub>2</sub>D (23). Poleg tega k pomanjkanju 1,25(OH)<sub>2</sub>D prispeva tudi fibroblastni rastni dejavnik 23 (FGF23). Ta spodbuja izločanje fosfata skozi ledvice in preprečuje nastanek 1,25(OH)<sub>2</sub>D preko inhibicije 1 $\alpha$ -hidroksilaze in stimulacije 24-hidroksilaze, ki razgrajuje 25(OH)D in

1,25(OH)<sub>2</sub>D. Zaradi okvarjene ledvične funkcije pride do zadrževanja fosfata, kar inducira FGF23, ki zavira sintezo 1,25(OH)<sub>2</sub>D.

Pomanjkanje vitamina D se povečuje z napredovanjem kronične ledvične bolezni in lahko pospeši napredovanje ledvične bolezni. Srčno-žilna bolezen je pogosta pri bolnikih s kronično ledvično boleznijo, nizko stanje vitamina D pa je povezano z večjim tveganjem za srčno-žilne dogodke. Dodajanje vitamina D zmanjšuje srčno-žilno umrljivost, kar opozarja na to, da ima vitamin D močno srčno-žilno zaščitno aktivnost (16). Zato je pri bolnikih s kronično ledvično boleznijo treba serumsko raven 25(OH)D ohranjati nad 30 ng/mL (75 nmol/L). Poleg tega bolniki na kortikosteroidih potrebujejo višje odmerke vitamina D (21).

### 1.3.2 Renoprotektivno delovanje vitamina D

Aktivna oblika vitamina D deluje renoprotektivno preko vitamin D receptorja (VDR) z regulacijo renin-angiotenzin-aldosteronskega sistema, jedrnega dejavnika  $\kappa$ B, Wnt/ $\beta$ -katenin poti in nekaterih strukturnih proteinov. Kronična ledvična bolezen in pomanjkanje vitamina D aktivirata lokalni renin-angiotenzin-aldosteronski sistem v ledvicah, kar poveča lokalno koncentracijo angiotenzina II, ki spodbuja ledvično poškodbo. Vitamin D zavira izražanje renina. Kombinirano zdravljenje z RAAS zaviralci in vitaminom D ima dodatne terapevtske učinke pri zmanjšanju ledvične poškodbe in proteinurije, saj vitamin D blokira kompenzacijsko indukcijo renina, ki jo povzročajo RAAS zaviralci (16). Čeprav vitamin D zmanjša proteinurijo kot negativni regulator renin-angiotenzin-aldosteronskega sistema, serumska raven angiotenzina II ni prizadeta, torej ima morda vlogo alternativni mehanizem. Vitamin D lahko zmanjša proteinurijo z učinki na citokine (9). Zmanjša izražanje vnetnih in profibroznih citokinov (monocitnega kemoatraktantnega proteina-1 [MCP-1] in TGF- $\beta$ ) in tako izboljša ledvično poškodbo (24). Zavira s TGF- $\beta$ -inducirano aktivnost miofibroblastov, kar povzroči inhibicijo nastanka matriksa in s tem zmanjša glomeruloskleroza (9). Vitamin D inhibira ledvično vnetje tudi preko zaviranja aktivacije jedrnega dejavnika  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), ki regulira vnetje, proliferacijo in fibrogenozo pri bolezni ledvic. Angiotenzin II aktivira NF- $\kappa$ B, ki povzroča indukcijo angiotenzinogena, kar vodi v lokalno kopičenje angiotenzina II pri nefropatiji. Začarani krog lahko prekine vitamin D, saj z blokiranjem aktivacije NF- $\kappa$ B inhibira izražanje angiotenzinogena. Na ta način

vitamin D inhibira tudi izražanje MCP-1. Poleg tega vitamin D zmanjša proteinurijo z blokiranjem Wnt/ $\beta$ -katenin poti preko interakcije VDR- $\beta$ -katenin. Aktivacija Wnt/ $\beta$ -katenin poti namreč povzroča poškodbo podocitov in posledično albuminurijo. V podocitih vitamin D spodbuja tudi sintezo nefrina. Povečana sinteza nefrina lahko torej razloži del antiproteinuričnega delovanja vitamina D (16).

### 1.3.3 Kalcitriol in holekalciferol

Zdravljenje s kalcitriolom, aktivno obliko vitamina D, je značilno zmanjšalo proteinurijo in serumsko raven TGF- $\beta$  pri bolnikih z IgA nefropatijo na inhibiciji renin-angiotenzin-aldosteronskega sistema. Antiproteinurični in TGF- $\beta$ -znižujoči učinek je vztrajal vsaj še 4 tedne po prekinitvi terapije (3). Poleg tega so imeli bolniki, zdravljeni s kalcitriolom, znatno večjo verjetnost zmanjšanja proteinurije kot tisti v kontrolni skupini (17). Zdravljenje s holekalciferolom, osnovno obliko vitamina D, je prav tako značilno zmanjšalo albuminurijo in urinski profibrozni citokin TGF- $\beta$ 1 pri bolnikih z diabetično nefropatijo na inhibiciji RAAS. Zmanjšanje TGF- $\beta$ 1 s holekalciferolom ima pri bolnikih na inhibiciji RAAS dodaten koristen učinek pri zavlačevanju napredovanja kronične ledvične bolezni (24). Terapija holekalciferola je učinkovito zmanjšala albuminurijo tudi pri bolnikih s kronično ledvično boleznijo faz 3–4, ki so imeli nizke ravni 25(OH)D in visoke ravni parathormona (25). Pri bolnikih z IgA nefropatijo pa učinek zdravljenja s holekalciferolom še ni znan.

## 2 NAMEN

Namen diplomske naloge je opredeliti učinkovitost zdravljenja s holekalciferolom na zniževanje proteinurije pri bolnikih z IgA nefropatijo. Laboratorijski del naloge je bila določitev serumske koncentracije vitamina D [25(OH)D<sub>3</sub>] pri izbranih bolnikih z IgA nefropatijo.

Z raziskavo smo želeli preveriti hipotezo, da zdravljenje s holekalciferolom zmanjša proteinurijo pri bolnikih z IgA nefropatijo.

Z raziskavo smo želeli tudi preveriti:

- spremembo proteinurije glede na jemanje ACE zaviralca, blokatorja angiotenzinskega II receptorja (sartana), zaviralca renina (aliskirena), kalcitriola in holekalciferola,
- statistično značilnost sprememb parametrov po uvedbi holekalciferola – ocenjene dnevne proteinurije, razmerij proteinov, eritrocitov in levkocitov v urinu, koncentracij albumina in kreatinina v serumu, ocenjene glomerulne filtracije, serumskih koncentracij vitamina D, korigiranega kalcija in fosfata, telesne teže in krvnega tlaka,
- korelacije serumske koncentracije vitamina D z ocenjeno glomerulno filtracijo, ocenjeno dnevno proteinurijo, razmerji proteinov, eritrociti in levkociti v urinu, koncentracijami albumina, kreatinina, korigiranega kalcija in fosfata v serumu, telesno težo, indeksom telesne mase in krvnim tlakom,
- korelacijo krvnega tlaka z ocenjeno dnevno proteinurijo,
- korelacije starosti s krvnim tlakom, ocenjeno glomerulno filtracijo in ocenjeno dnevno proteinurijo.



### **3 MATERIALI IN METODE**

#### **3.1 MATERIALI**

Pri določanju serumske koncentracije 25-hidroksivitamina D z analizatorjem Architect smo uporabili:

- a) komplet reagentov Abbott Architect 25-OH vitamin D, ki vsebuje:
  - mikrodelce,
  - konjugat,
  - raztopino za redčenje,
- b) kontrole Abbott Architect 25-OH vitamin D,
- c) fosfatni pufer (Wash),
- d) alkalno raztopino vodikovega peroksida (Pre-trigger),
- e) raztopino 0,35 M NaOH (Trigger),
- f) redestilirano vodo,
- g) Na-hipoklorit 0,5 %.

Vsi reagenti razen vode in Na-hipoklorita so iz kompletov reagentov Architect proizvajalca Abbott.

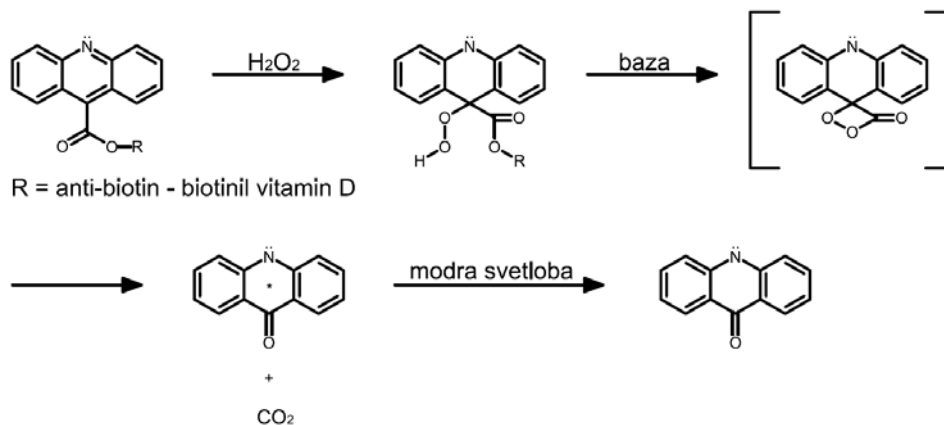
#### **3.2 METODE**

##### **3.2.1 Določanje 25-hidroksivitamina D**

Koncentracijo 25-hidroksivitamina D v serumu smo določali s kemiluminiscenčno metodo na analizatorju Architect 1000 SR proizvajalca Abbott. Naredili smo serijo vzorcev, ki tekoče prihajajo na Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo. Za izbrane bolnike z IgA nefropatijo pa smo rezultate serumske koncentracije 25-hidroksivitamina D poiskali v laboratorijskih izvidih podatkovne baze Hipokrat. Koncentracijo 25-hidroksivitamina D v serumu so takrat določevali s kemiluminiscenčno metodo na analizatorju Liaison proizvajalca DiaSorin.

### Metoda na analizatorju Architect

Določanje koncentracije 25-hidroksivitamina D z analizatorjem Architect je avtomatizirana kompetitivna kemiluminiscenčna imunokemijska metoda. Analizator k vzorcu seruma (150  $\mu$ L) doda raztopino za redčenje in paramagnetne mikrodelce, obložene z anti-vitaminom D. 25-hidroksivitamin D v vzorcu se veže na anti-vitamin D na mikrodelcih. Po inkubaciji aparat doda z akridinom označeni anti-biotin–biotinil vitamin D konjugatni kompleks, ki se veže na nezasedena vezavna mesta anti-vitamina D na mikrodelcih. Po izpiranju s fosfatnim pufrom sledi dodatek alkalne raztopine vodikovega peroksida in raztopine 0,35 M NaOH, ki sproži kemiluminiscenčno reakcijo akridina (slika 2). Analizator Architect izmeri nastali svetlobni signal kot relativne svetlobne enote (RLU), ki so posredno povezane s koncentracijo 25-hidroksivitamina D v vzorcu (26).



Slika 2: Kemiluminiscenčna reakcija akridina (prirejeno po 27).

Potek dela: Reagent z mikrodelci smo pred postavitvijo na analizator premešali, da se je usedlina suspendirala. Reagente iz kompleta (mikrodelce, konjugat in raztopino za redčenje) smo postavili na ustrezna mesta v stojala. Reagente smo odprli, namestili septume in stojala vložili v analizator. Kontrolne vzorce oz. vzorce serumov bolnikov smo postavili v stojala, le-te vložili v aparat in izbrali test določanja koncentracije 25-hidroksivitamina D.

Princip izračuna: S pomočjo kontrolnih vzorcev naredi analizator Architect umeritveno krivuljo ( $x$  = koncentracija 25-hidroksivitamina D,  $y$  = relativne svetlobne enote). Nato iz relativnih svetlobnih enot (RLU) vzorcev preračuna koncentracijo 25-hidroksivitamina D v vzorcih serumov. Analizator nam poda rezultate v ng/mL, koncentracijo 25-

hidroksivitamina D pa podajamo v nmol/L ( $\text{ng/mL} \times 2,5 = \text{nmol/L}$ ); nižje vrednosti od 10 nmol/L podamo kot »< 10 nmol/L«.

### **Metoda na analizatorju Liaison**

Določanje koncentracije 25-hidroksivitamina D z analizatorjem Liaison je direktna kompetitivna kemiluminiscenčna imunokemijska metoda. Pri prvi inkubaciji (10 minut) se 25-hidroksivitamin D loči od vezavnega proteina (DBP) in veže na specifična protitelesa na magnetnih delcih. Pri drugi inkubaciji (10 minut) je dodan na derivat izoluminola vezan 25-hidroksivitamin D, ki se veže na prosta protitelesa. Nevezan material se nato odstrani z izpiranjem. Sledi dodatek  $\text{H}_2\text{O}_2$  in NaOH, ki začeta kemiluminiscenčno reakcijo izoluminola. Pri tem analizator Liaison izmeri relativne svetlobne enote (RLU), ki so obratno sorazmerne s koncentracijo 25-hidroksivitamina D v vzorcu (26).

### **3.2.2 Preiskovanci in pridobivanje podatkov**

V raziskavi smo upoštevali načela Helsinške deklaracije in Oviedske konvencije ter načela Kodeksa medicinske deontologije. Raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko.

Raziskava je klinična, retrospektivna. Bolnike z IgA nefropatijo smo poiskali v patohistoloških izvidih ledvičnih biopsij, ki so bile opravljene na Kliničnem oddelku za nefrologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani v letih 2000–2012. Histološki vzorci ledvičnih biopsij so bili analizirani na Inštitutu za patologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Vključitvena kriterija sta bila IgA nefropatija v biopsijskem vzorcu ledvice in prejemanje holekalciferola.

Izključitvena kriterija sta bila IgA nefropatija na presajeni ledvici in prejemanje kortikosteroidov.

Izmed 330 bolnikov s histološko potrjeno IgA nefropatijo smo tako izbrali 18 bolnikov, ki so izpolnjevali kriterije za vključitev v raziskavo učinkovitosti holekalciferola na zniževanje proteinurije.

Podatke o bolnikih smo pridobili iz klinične podatkovne baze Hipokrat in iz ambulantnih kartonov. Pri izbranih bolnikih smo zbirali podatke ob uvedbi holekalciferola, približno 3 mesece in 6 mesecev pred uvedbo ter 3 mesece in 6 mesecev po uvedbi holekalciferola. Ti podatki so vključevali telesno težo in višino, krvni tlak, izmerjen v ambulanti in doma, med laboratorijskimi izvidi pa smo poiskali naslednje parametre: koncentracijo S-25(OH)D<sub>3</sub>, S-albumina, S-kreatinina, S-korigiranega kalcija, S-fosfata, S-IPTH (intaktnega parathormona), S-AF (alkalne fosfataze), ocenjeno glomerulno filtracijo (oGF [MDRD]), ocenjeno dnevno proteinurijo (oDP), razmerja proteinov v urinu (U-IgG/albumin, U-albumin/kreatinin, U-IgG/kreatinin, U-NAG/kreatinin, U- $\alpha$ 1-mikroglobulin/kreatinin) ter U-eritrocite (SW) in U-levkocite (SW). Podatke za S-IPTH smo iskali tudi v ambulantnih kartonih bolnikov. Poiskali smo podatke o jemanju zdravil, ki zmanjšujejo proteinurijo – ACE zaviralci, blokatorji angiotenzinskega II receptorja (sartani), neposredni zaviralci renina (aliskiren), antagonisti aldosterona (spironolakton), kortikosteroidi (metilprednizolon, hidrokortizon) ter kalcitriol in kalcidiol.

### 3.2.3 Statistična obdelava podatkov

#### **Proteinurija pred in po uvedbi holekalciferola**

Za ocenjeno dnevno proteinurijo smo izračunali razliko parametra pred in po uvedbi holekalciferola (preglednica III), da smo ugotovili, ali se je bolnikom proteinurija povečala ali zmanjšala.

Iz podatkov za ocenjeno dnevno proteinurijo (oDP) smo izračunali spremembo oDP pred uvedbo (oDP 2. pred uvedbo – oDP ob uvedbi, ali oDP 1. pred uvedbo – oDP ob uvedbi, če pri 2. pregledu pred uvedbo ni podatka) in po uvedbi (oDP ob uvedbi – oDP 2. po uvedbi, ali oDP ob uvedbi – oDP 1. po uvedbi, če pri 2. pregledu po uvedbi ni podatka). Bolnike, pri katerih ni bilo možno izračunati spremembe oDP za oba časa (pred in po uvedbi), smo izključili.

Nato smo bolnike razvrstili v 4 skupine:

1. skupina: Bolniki, ki se jim je oDP zmanjšala pred uvedbo holekalciferola.
2. skupina: Bolniki, ki se jim je oDP zmanjšala po uvedbi holekalciferola.
3. skupina: Bolniki, ki se jim je oDP povečala pred uvedbo holekalciferola.
4. skupina: Bolniki, ki se jim je oDP povečala po uvedbi holekalciferola.

V Excelu smo s funkcijo COUNTIF prešteli bolnike, ki spadajo v posamezno skupino, in pripravili kontingenčno tabelo s frekvencami bolnikov po skupinah (preglednica V).

Naredili smo Pearsonov test neodvisnosti (s Hi kvadrat porazdelitvijo) med dvema spremenljivkama – spremembo oDP (zmanjšanje/povečanje) in uvedbo holekalciferola. Postavili smo ničelno ( $H_0$ ) in alternativno ( $H_1$ ) hipotezo.

$H_0$ : Spremenljivki sprememba oDP in uvedba holekalciferola sta neodvisni.

$H_1$ : Spremenljivki sprememba oDP in uvedba holekalciferola nista neodvisni.

Pearsonov Hi kvadrat test testira porazdelitev opazovanih enot v skupine. Frekvence po skupinah smo primerjali s teoretičnimi frekvencami, ki povedo, kakšno bi bilo število enot v posamezni skupini, če bi bili spremenljivki neodvisni (kot predpostavlja ničelna hipoteza). Teoretične frekvence smo izračunali iz vsot po vrsticah in stolpcih v kontingenčni tabeli (preglednica VI). Če ima tabela  $r$  vrstic in  $c$  stolpcev, je enačba za teoretično frekvenco v celici v vrstici  $i$  in stolpcu  $j$ :

$$E_{i,j} = \frac{\left(\sum_{n_c=1}^c O_{i,n_c}\right) \cdot \left(\sum_{n_r=1}^r O_{n_r,j}\right)}{N} \quad (1)$$

$\sum_{n_c=1}^c O_{i,n_c}$  vsota izmerjenih frekvenc v vrstici  $i$

$\sum_{n_r=1}^r O_{n_r,j}$  vsota izmerjenih frekvenc v stolpcu  $j$

$N$  število opazovanih enot

Hi kvadrat vrednost smo izračunali po enačbi odklonov izmerjenih frekvenc po skupinah od teoretičnih frekvenc:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c \frac{(O_{i,j} - E_{i,j})^2}{E_{i,j}} \quad (2)$$

$\chi^2$  Pearsonova testna statistika, porazdeljena s Hi kvadrat porazdelitvijo

- $O_{i,j}$  izmerjena frekvenca v skupini v vrstici  $i$  in stolpcu  $j$   
 $E_{i,j}$  teoretična frekvenca v vrstici  $i$  in stolpcu  $j$   
 $r$  število vrstic v tabeli  
 $c$  število stolpcev v tabeli

Potem smo v Excelu s funkcijo CHIDIST z uporabo Hi kvadrat vrednosti in stopinj prostosti [ $df = (r-1)(c-1)$ ] izračunali P-vrednost. Če je P-vrednost  $< 0,05$ , zavrnamo ničelno hipotezo, da sta sprememba oDP in uvedba holekalciferola neodvisni. Tako dokažemo, da uvedba holekalciferola vpliva na ocenjeno dnevno proteinurijo.

### Učinek zdravil na proteinurijo

Za analizo učinka zdravil na proteinurijo smo v Stati izvedli regresijo s stalnimi učinki po bolnikih. Preprosta regresija brez stalnih učinkov bi dala pristranske rezultate, saj ne bi upoštevala, da se bolniki med seboj razlikujejo in da jemanje večjega odmerka zdravil lahko pomeni, da ima bolnik bolj izraženo bolezen. Regresijska enačba je:

$$oDP_{it} = \beta_0 + \beta_1 ACE_{it} + \beta_2 Sartan_{it} + \beta_3 Alisk_{it} + \beta_4 Kalcit + \beta_5 Holek_{it} + \beta_6 t + u_i + \varepsilon_{it} \quad (3)$$

Odvisna spremenljivka je ocenjena dnevna proteinurija (oDP), neodvisne spremenljivke pa so ACE zaviralec, sartan, aliskiren, kalcitriol, holekalciferol in časovni trend ( $t$ ), ki kontrolira spremembo dnevne proteinurije neodvisno od jemanja zdravil. Indeks  $i$  označuje bolnika, indeks  $t$  pa časovno obdobje, merjeno glede na čas uvedbe zdravljenja s holekalciferolom. Stalni učinek, značilen za bolnika, je predstavljen z  $u_i$ , slučajna napaka pa z  $\varepsilon_{it}$ . Za dobljene regresijske koeficiente smo izvedli t-test. Pri tem smo uporabili robustne standardne napake, ki upoštevajo nekonstantnost variance med pregledi. Posamezni koeficient je statistično značilen, če je P-vrednost  $< 0,05$ .

### Parametri pred in po uvedbi holekalciferola

Za posamezne parametre smo združili podatke ob 1. in 2. pregledu pred uvedbo, ob uvedbi ter ob 1. in 2. pregledu po uvedbi holekalciferola. V Excelu smo izračunali povprečne vrednosti parametrov pred in po uvedbi holekalciferola. Pregled ob uvedbi smo uvrstili v čas pred uvedbo, ker takrat bolniki še niso prejeli holekalciferola. Če pri posameznem

bolniku ni bilo nobenega podatka za parameter pred ali po uvedbi holekalciferola, smo pri tistem parametru bolnika izključili iz statistične obdelave.

Za vsak parameter od vseh bolnikov smo v Excelu izračunali povprečni vrednosti pred in po uvedbi holekalciferola, da smo videli, ali se je zmanjšal/povečal. Za orientacijo smo izračunali tudi standardni odklon pred in po uvedbi holekalciferola. Nato smo v Excelu izvedli parni t-test (funkcija TTEST) in dobili P-vrednost. Če je P-vrednost  $< 0,05$ , je razlika parametra (zmanjšanje/povečanje) statistično značilna, če pa je P-vrednost  $> 0,05$ , razlika ni statistično značilna. Iz P-vrednosti in stopinj prostosti ( $df = n - 1$ ) smo v Excelu izračunali tudi vrednost t-statistike (funkcija TINV). Če je t-statistika višja, je P-vrednost nižja, in sklep je bolj zanesljiv.

Enačba za izračun testne statistike je:

$$t = \frac{\bar{X}_D - \mu_0}{s_D / \sqrt{n}} \quad (4)$$

$t$  testna statistika

$\bar{X}_D$  povprečna izmerjena razlika v vrednosti parametra pred in po uvedbi

$\mu_0$  pričakovana razlika na podlagi ničelne hipoteze (v našem primeru  $\mu_0 = 0$ )

$s_D$  standardni odklon razlike v vrednosti parametra pred in po uvedbi

$n$  število parov (v našem primeru število bolnikov)

### Korelacije med parametri

Korelacijske koeficiente ( $r$ , enačba 4) smo izračunali v Excelu s funkcijo CORREL. Korelacija nam pove, ali je povezava med dvema spremenljivkama pozitivna/negativna in kako močna je, ne pomeni pa nujno vzročne povezave. Vrednost korelacijskega koeficienta je lahko od  $-1$  do  $1$ .

$$r = \frac{\sum (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum (X_i - \bar{X})^2 \times \sum (Y_i - \bar{Y})^2}} \quad (5)$$

## 4 REZULTATI

### 4.1 OSNOVNI PODATKI

**Preglednica I: Spol in starost bolnikov.**

bolnik	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
spol	m	m	m	ž	m	ž	m	m	m	m	m	m	ž	m	m	m	m	ž
starost [leta]	52	46	48	33	61	34	51	55	46	66	52	41	52	43	35	48	25	59

V preglednici I sta predstavljena spol in starost izbranih bolnikov z IgA nefropatijo. Razmerje moški : ženske je bilo 14 : 4. Bolniki so bili stari 25–66 let.

**Preglednica II: Vrednosti koncentracij S-25(OH)D<sub>3</sub> ob petih pregledih.**

bolnik	S-25(OH)D <sub>3</sub> [nmol/L]				
	2. pred uvedbo	1. pred uvedbo	ob uvedbi	1. po uvedbi	2. po uvedbi
1			18		
2			69		
3			18		28
4			41		
5			57		
6			65		
7			36	89	
8		25	77		
9			22		
10			31		
11		30	39		
12			27		39
13			46		80
14		48			60
15					133
16		68		94	93
17		34			
18					

V preglednici II je toliko podatkov o koncentraciji S-25(OH)D<sub>3</sub>, kolikor smo jih našli v laboratorijskih izvidih baze Hipokrat pri bolnikih z IgA nefropatijo. Pri zadnjem bolniku celo ni bilo nobenega podatka. V Sloveniji je pri odrasli moški populaciji referenčna vrednost za S-25(OH)D<sub>3</sub> 50–107 nmol/L (pomladi) in 114–172 nmol/L (jeseni) (28). Vrednosti koncentracij S-25(OH)D<sub>3</sub> so bile pred uvedbo holkalciferola v območju 18–77 nmol/L, kar predstavlja pomanjkanje ali insuficienco vitamina D. Spremembo koncentracije S-25(OH)D<sub>3</sub> po uvedbi holkalciferola pa bomo vrednotili v nadaljevanju.

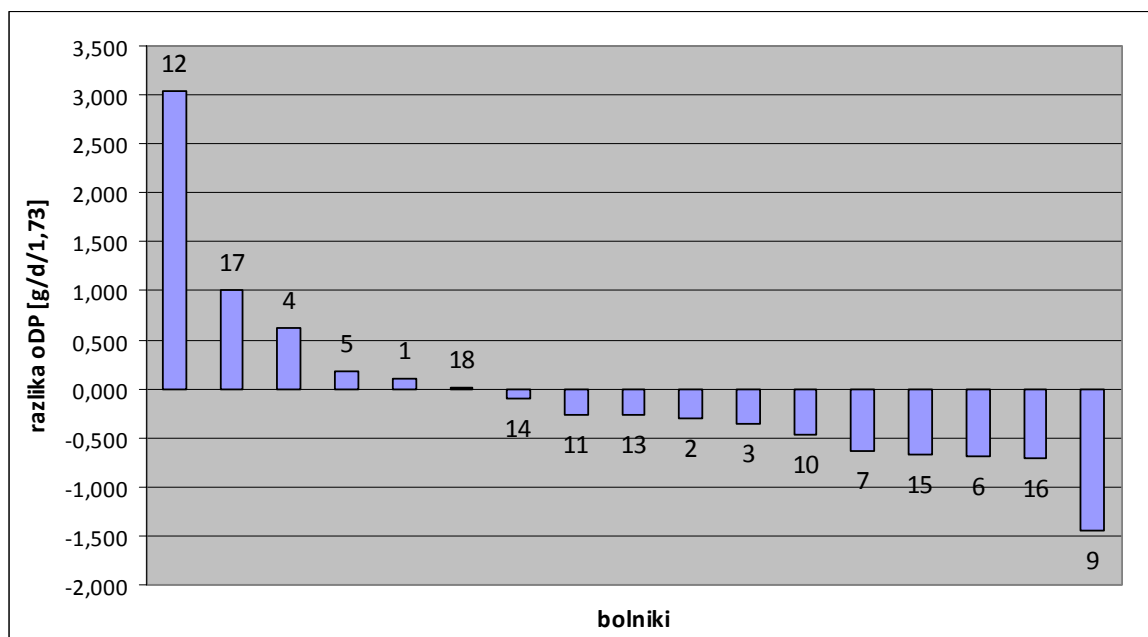


## 4.2 VREDNOSTI PROTEINURIJE PRED IN PO UVEDBI HOLEKALCIFEROLA

V preglednici III so podane vrednosti ocenjene dnevne proteinurije (oDP) pred in po uvedbi holekalciferola in njena razlika po uvedbi. Povečanje/zmanjšanje proteinurije je grafično prikazano na sliki 3.

**Preglednica III: Povečanje/zmanjšanje ocenjene dnevne proteinurije po uvedbi holekalciferola.**

bolnik	oDP [g/d/1,73]		
	pred	po	razlika
12	3,835	6,873	3,038
17	3,643	4,657	1,014
4	0,567	1,195	0,628
5	0,329	0,509	0,180
1	1,940	2,036	0,096
18	0,408	0,413	0,005
14	0,952	0,854	-0,098
11	2,881	2,616	-0,265
13	0,489	0,221	-0,268
2	0,880	0,586	-0,294
3	1,018	0,666	-0,352
10	1,428	0,968	-0,460
7	0,727	0,099	-0,628
15	1,215	0,552	-0,663
6	2,590	1,905	-0,685
16	0,971	0,264	-0,707
9	2,964	1,509	-1,455



**Slika 3: Povečanje/zmanjšanje ocenjene dnevne proteinurije po uvedbi holekalciferola.**

Preglednica IV prikazuje vrednosti ocenjene dnevne proteinurije ob petih pregledih in njeno spremembo pred in po uvedbi holekalciferola. Preglednici V in VI sta kontingenčni tabeli, ki prikazujeta opaženo in pričakovano število bolnikov, ki se jim je ocenjena dnevna proteinurija zmanjšala/povečala pred ali po uvedbi holekalciferola. V preglednici VII pa so nazadnje podani rezultati Pearsonovega Hi kvadrat testa.

**Preglednica IV: Ocenjena dnevna proteinurija in njena sprememba pred in po uvedbi holekalciferola.**

bolnik	oDP [g/d/1,73]					sprememba oDP [g/d/1,73]	
	2. pred uvedbo	1. pred uvedbo	ob uvedbi	1. po uvedbi	2. po uvedbi	pred uvedbo	po uvedbi
1	2,703	1,964	1,153	0,655	3,416	1,550	-2,263
2	1,261	0,381	0,997	0,732	0,440	0,264	0,557
4		0,676	0,457	1,881	0,509	0,219	-0,052
5		0,368	0,290	0,237	0,780	0,078	-0,490
6		2,827	2,352	1,084	2,725	0,475	-0,373
7		1,309	0,145	0,099		1,164	0,046
10	1,320	1,438	1,525	0,985	0,950	-0,205	0,575
11	2,573	3,538	2,531	2,414	2,817	0,042	-0,286
12		3,091	4,578	6,909	6,836	-1,487	-2,258
14	0,857	1,580	0,418	0,999	0,708	0,439	-0,290
15	1,305	1,390	0,950	0,414	0,689	0,355	0,261
16	1,159	1,159	0,594	0,430	0,098	0,565	0,496
17	4,336	3,578	3,015	5,644	3,669	1,321	-0,654

**Preglednica V: Opaženo število bolnikov, ki se jim je oDP zmanjšala/povečala.**

	pred uvedbo	po uvedbi	vsota po vrsticah
število bolnikov, ki se jim je oDP zmanjšala	2	8	10
število bolnikov, ki se jim je oDP povečala	11	5	16
vsota po stolpcih	13	13	26

**Preglednica VI: Pričakovano število bolnikov, ki se jim je oDP zmanjšala/povečala.**

	pred uvedbo	po uvedbi	vsota po vrsticah
število bolnikov, ki se jim je oDP zmanjšala	5	5	10
število bolnikov, ki se jim je oDP povečala	8	8	16
vsota po stolpcih	13	13	26

**Preglednica VII: Rezultati Pearsonovega Hi kvadrat testa.**

Hi kvadrat vrednost	5,85
stopinje prostosti	1
P-vrednost	<b>0,0156</b>

### 4.3 VREDNOSTI PROTEINURIJE GLEDE NA JEMANJE ZDRAVIL

V preglednici IX so za vse bolnike prikazani odmerki zdravil in ocenjena dnevna proteinurija (oDP) ob petih pregledih. Zapis časa pred, ob in po uvedbi holekalciferola smo prekodirali v -2 za 2. pregled pred uvedbo, -1 za 1. pregled pred uvedbo, 0 za pregled ob uvedbi, 1 za 1. pregled po uvedbi in 2 za 2. pregled po uvedbi. Prazna polja pomenijo, da pri posameznem bolniku ni bilo podatka o določenem pregledu ali zgolj ni bilo podatka o dnevni proteinuriji.

Preglednica VIII predstavlja rezultate regresije s stalnimi učinki iz State. Skupina je določena z bolnikom. Opazovanja istega bolnika v različnih časovnih obdobjih tvorijo eno skupino. V regresiji je 74 opazovanj, ki tvorijo 18 skupin, ki se vsaka nanaša na enega bolnika. Koeficient determinacije  $R^2$  znotraj skupine se nanaša na delež pojasnjene variance znotraj skupine opazovanih enot. Vrednost  $R^2 = 0,2398$  znotraj skupine pove, da neodvisne spremenljivke pojasnijo 23,98 % variance v oDP v različnih časovnih obdobjih.

**Preglednica VIII: Rezultati regresije s stalnimi učinki.**

Odkvisna spremenljivka: oDP				
Neodvisne spremenljivke	Koeficient	Standardna napaka	t-statistika	P-vrednost
ACE zaviralec	0,0711	0,0376	1,89	0,076
Sartan	0,0014	0,0027	0,50	0,620
Aliskiren	-0,0044	0,0014	-3,09	0,007
Kalcitriol	3,5095	3,2598	1,08	0,297
Holekalciferol	0,0255	0,0127	2,01	0,061
Časovni trend	-0,3733	0,1513	-2,47	0,025
Št. opazovanj	74			
Št. skupin (bolnikov)	18			
$R^2$ znotraj skupine	0,2398			

Preglednica IX: Odmerki zdravil in ocenjena dnevna proteinurija bolnikov ob petih pregledih.

bolnik	t	ACE	sartan	aliskiren	kalcitriol	holekalciferol	oDP	bolnik	t	ACE	sartan	aliskiren	kalcitriol	holekalciferol	oDP
		mg	mg	mg	µg	št. kpl/teden	g/d/1,73			mg	mg	mg	µg	št. kpl/teden	g/d/1,73
1	-2	0	100	0	0	0	2,703	10	-2	10	100	0	0	0	1,320
1	-1	0	0	0	0	0	1,964	10	-1	10	100	0	0	0	1,438
1	0	0	0	0	0	0	1,153	10	0	8,49	100	0	0	0	1,525
1	1	0	0	0	0	35	0,655	10	1	8,49	0	0	0	15	0,985
1	2	2	0	0	0	35	3,416	10	2	8,49	0	0	0	15	0,950
2	-2	4	0	0	0	0	1,261	11	-2	40	0	0	0	0	2,573
2	-1	0	80	0	0	0	0,381	11	-1	30	0	0	0	0	3,538
2	0	0	80	0	0	0	0,997	11	0	30	0	0	0,25	0	2,531
2	1	0	80	0	0	35	0,732	11	1	30	0	0	0,25	35	2,414
2	2	0	80	0	0	35	0,440	11	2	30	0	0	0,25	35	2,817
3	-2							12	-2						
3	-1							12	-1	20	0	0	0	0	3,091
3	0	0	0	0	0	0	1,018	12	0	20	0	0	0	0	4,578
3	1	0	40	0	0	35	0,279	12	1	20	0	0	0,125	70	6,909
3	2	0	40	0	0	35	1,053	12	2	20	0	0	0,125	70	6,836
4	-2							13	-2						
4	-1	0	80	0	0	0	0,676	13	-1						
4	0	0	80	0	0	0	0,457	13	0	0	120	0	0	0	0,489
4	1	0	80	0	0	35	1,881	13	1	0	120	0	0	35	0,330
4	2	0	160	0	0	35	0,509	13	2	0	120	0	0	35	0,112
5	-2							14	-2	0	160	150	0	0	0,857
5	-1	20	50	0	0	0	0,368	14	-1	0	160	150	0	0	1,580
5	0	20	50	0	0	0	0,290	14	0	0	160	150	0	0	0,418
5	1	20	50	0	0	35	0,237	14	1	0	160	150	0	35	0,999
5	2	0	50	0	0	35	0,780	14	2	0	160	150	0	35	0,708
6	-2							15	-2	0	80	0	0	0	1,305
6	-1	5	0	0	0	0	2,827	15	-1	0	160	0	0	0	1,390
6	0	5	0	0	0	0	2,352	15	0	0	160	0	0	0	0,950
6	1	5	0	0	0	35	1,084	15	1	0	160	150	0	35	0,414
6	2	5	0	0	0	35	2,725	15	2	0	160	150	0	35	0,689
7	-2							16	-2	2	0	0	0	0	1,159
7	-1	0	40	0	0	0	1,309	16	-1	4	0	0	0	0	1,159
7	0	0	80	0	0	0	0,145	16	0	8	0	0	0	0	0,594
7	1	0	80	0	0	35	0,099	16	1	8	0	0	0	35	0,430
7	2							16	2	8	0	0	0	35	0,098
8	-2	40	0	0	0	0	11,784	17	-2	0	0	0	0	0	4,336
8	-1	40	0	0	0	0	4,653	17	-1	0	0	0	0	0	3,578
8	0	0	0	0	0	0	3,081	17	0	5	0	0	0	0	3,015
8	1							17	1	3,4	0	0	0	35	5,644
8	2							17	2	3,4	0	0	0	35	3,669
9	-2							18	-2	5	0	0	0	0	0,502
9	-1							18	-1	7,5	0	0	0	0	0,313
9	0	0	50	0	0	0	2,964	18	0						
9	1	4,5	0	0	0	35	1,040	18	1						
9	2	4,5	0	0	0	35	1,978	18	2	10	0	0	0	35	0,413

#### 4.4 VREDNOSTI PARAMETROV PRED IN PO UVEDBI HOLEKALCIFEROLA

V preglednici X so predstavljene povprečne vrednosti parametrov pred in po uvedbi holekalciferola, standardni odkloni pred in po uvedbi in rezultati parnega t-testa (P-vrednosti).

**Preglednica X: Povprečne vrednosti parametrov pred in po uvedbi holekalciferola in statistika.**

parameter	enote	povprečna vrednost		standardni odklon		P-vrednost
		pred	po	pred	po	
oDP	g/d/1,73	1,58	1,52	1,16	1,79	0,8226
U-IgG/albumin		0,04	0,05	0,02	0,02	0,3506
U-albumin/kreatinin	g/mol	134,63	132,01	102,36	158,12	0,9398
U-IgG/kreatinin	g/mol	5,39	8,16	5,49	16,29	0,5056
U-NAG/kreatinin	μkat/mol	6,26	12,89	2,12	12,12	0,1443
U-α1-mikroglobulin/kreatinin	g/mol	2,63	3,13	1,61	2,71	0,4980
U-eritrociti (SW)	10 <sup>6</sup> /L	123,82	46,41	319,56	75,17	0,2966
U-levkociti (SW)	10 <sup>6</sup> /L	31,53	14,41	106,21	40,49	0,3004
S-albumin	g/L	40,94	42,78	3,80	3,99	0,0086
S-kreatinin	μmol/L	189,11	206,44	143,18	178,81	0,1245
oGF	mL/min/1,73	43,67	43,28	21,51	24,82	0,8813
S-25(OH)D3	nmol/L	40,50	65,00	17,62	27,25	0,0164
S-korigirani kalcij	mmol/L	2,31	2,31	0,11	0,10	0,8502
S-fosfat	mmol/L	1,13	1,11	0,25	0,20	0,7368
telesna teža	kg	82,83	81,88	18,57	18,22	0,2763
sistolni krvni tlak AMB	mmHg	139,50	136,33	16,44	15,40	0,3330
diastolni krvni tlak AMB	mmHg	84,50	85,28	9,13	10,14	0,7023

## 4.5 VREDNOSTI KORELACIJ MED PARAMETRI

V preglednici XI so podani rezultati korelacij serumske koncentracije vitamina D s posameznimi parametri, korelacij krvnega tlaka z ocenjeno dnevno proteinurijo in korelacij starosti s krvnim tlakom, ocenjeno glomerulno filtracijo in ocenjeno dnevno proteinurijo.

**Preglednica XI: Vrednosti korelacijskih koeficientov med dvema parametroma.**

parameter a		parameter b		korel. koef.
S-25(OH)D3	pred	oGF	pred	0,1755
S-25(OH)D3	pred	oDP	pred	-0,1551
S-25(OH)D3	pred	U-IgG/albumin	pred	-0,0592
S-25(OH)D3	pred	U-albumin/kreatinin	pred	-0,1474
S-25(OH)D3	pred	U-IgG/kreatinin	pred	0,1008
S-25(OH)D3	pred	U-NAG/kreatinin	pred	-0,0762
S-25(OH)D3	pred	U- $\alpha$ 1 mikroglobulin/kreatinin	pred	-0,1819
S-25(OH)D3	pred	U-eritrociti (SW)	pred	-0,1086
S-25(OH)D3	pred	U-levkociti (SW)	pred	-0,1143
S-25(OH)D3	pred	S-albumin	pred	0,1876
S-25(OH)D3	pred	S-kreatinin	pred	-0,0277
S-25(OH)D3	pred	S-korigirani kalcij	pred	-0,0729
S-25(OH)D3	pred	S-fosfat	pred	0,1857
S-25(OH)D3	pred	telesna teža	pred	-0,1412
S-25(OH)D3	pred	ITM		-0,2223
S-25(OH)D3	pred	sistolni krvni tlak AMB	pred	-0,0406
S-25(OH)D3	pred	diastolni krvni tlak AMB	pred	-0,0396
sistolni krvni tlak AMB	pred	oDP	pred	0,4721
diastolni krvni tlak AMB	pred	oDP	pred	0,3919
sistolni krvni tlak AMB	po	oDP	po	0,3769
diastolni krvni tlak AMB	po	oDP	po	0,3705
starost		sistolni krvni tlak AMB	pred	-0,1070
starost		diastolni krvni tlak AMB	pred	-0,1652
starost		oGF	pred	-0,1761
starost		oDP	pred	-0,1671

## 5 RAZPRAVA

### 5.1 VREDNOTENJE PROTEINURIJE

Z raziskavo smo želeli potrditi hipotezo, da pri bolnikih z IgA nefropatijo zdravljenje s holekalciferolom zmanjša proteinurijo.

Po uvedbi holekalciferola se je ocenjena dnevna proteinurija 6 bolnikom povečala, 11 bolnikom pa zmanjšala (preglednica III, slika 3). P-vrednost Pearsonovega Hi kvadrat testa [0,0156] (preglednica VII) je manjša od 0,05 in tako lahko zavrnemo ničelno hipotezo, da sta sprememba ocenjene dnevne proteinurije in uvedba holekalciferola neodvisni. Uvedba holekalciferola torej vpliva na delež bolnikov, ki se jim je ocenjena dnevna proteinurija zmanjšala. Zato lahko trdimo, da holekalciferol značilno poveča delež bolnikov, pri katerih pride do zmanjšanja proteinurije. Ti rezultati so v skladu z antiproteinuričnim delovanjem vitamina D (9, 16, 24). Podobno je pri bolnikih z diabetično nefropatijo in bolnikih s kronično ledvično boleznijo faz 3–4 holekalciferol statistično značilno zmanjšal albumin/kreatinin razmerje v urinu (24, 25). Pri bolnikih z diabetično nefropatijo je holekalciferol poleg albuminurije zmanjšal tudi izražanje profibroznega citokina TGF- $\beta$ 1 in s tem izboljšal prognozo ledvične bolezni (24). Antiproteinurične učinke holekalciferola nam potrjujejo tudi blago negativne korelacije serumske koncentracije vitamina D z ocenjeno dnevno proteinurijo in razmerji proteinov v urinu, razen za IgG/kreatinin razmerje smo dobili šibko pozitivno korelacijo – lahko zaradi majhnega števila bolnikov (preglednica XI). V raziskavi bolnikov s kronično ledvično boleznijo faz 3–4 so prav tako dokazali značilno obratno korelacijo med serumsko koncentracijo vitamina D in albumin/kreatinin razmerjem v urinu (25).

Na delež bolnikov, ki se jim je proteinurija zmanjšala, so lahko poleg holekalciferola vplivala tudi druga zdravila in spremembe njihovih odmerkov. Pri vrednotenju antiproteinuričnega učinka holekalciferola smo želeli izključiti vpliv ACE zaviralca, sartana, aliskirena in kalcitriola na proteinurijo. V ta namen smo naredili regresijo s stalnimi učinki po bolnikih. Izračunani regresijski koeficienti (preglednica IX) za ACE zaviralec, sartan, kalcitriol in holekalciferol so pozitivni ( $\beta = 0,0711$  za ACE zaviralec,  $\beta = 0,0014$  za sartan,  $\beta = 3,5095$  za kalcitriol in  $\beta = 0,0255$  za holekalciferol) in čeprav

niso statistično značilni ( $P$ -vrednosti  $> 0,05$ ), so ti rezultati v nasprotju s pričakovanim delovanjem teh zdravil na zmanjšanje proteinurije. Vzroka za pozitivne koeficiente sta premajhno število bolnikov in njihova heterogenost. Bolniki, ki so imeli bolj izraženo bolezen in višjo dnevno proteinurijo, so namreč dobili večji odmerek zdravil. Poleg tega sta kalcitriol prejela samo 2 bolnika, zaradi česar rezultat ni relevanten. Regresijski koeficient za aliskiren pa je statistično značilno negativen ( $\beta = -0,0044$ ,  $P$ -vrednost  $[0,007] < 0,05$ ), čeprav sta zdravilo prav tako prejela samo 2 bolnika. Tudi časovni trend je značilno negativen ( $\beta = -0,3733$ ,  $P$ -vrednost  $[0,025] < 0,05$ ), kar nam potrjuje, da vsa zdravila hkrati zmanjšujejo proteinurijo. Na podlagi dobljenih rezultatov ne moremo sprejeti sklepa o učinkovitosti posameznih zdravil. Da bi razločili vpliv drugih zdravil od učinka holekalciferola, bi morali v raziskavo vključiti večje število bolnikov s podobno stopnjo proteinurije, ki bi jih razdelili v holekalciferolno in kontrolno skupino.

## 5.2 VREDNOTENJE OSTALIH PARAMETROV

Pri bolnikih z IgA nefropatijo se je koncentracija S-25(OH)D<sub>3</sub> po uvedbi holekalciferola statistično značilno povečala ( $P$ -vrednost  $[0,0164] < 0,05$ ). Pri bolnikih z diabetično nefropatijo in bolnikih s kronično ledvično boleznijo faz 3–4 se je podobno serumska koncentracija vitamina D izboljšala z dopolnjevanjem holekalciferola (24, 25). Vitamin D povečuje koncentracijo kalcija in fosfata v serumu (22). Korelacija koncentracije S-25(OH)D<sub>3</sub> s koncentracijo S-fosfata ( $r = 0,1857$ ) je v skladu z delovanjem vitamina D, za koncentracijo S-korigiranega kalcija ( $r = -0,0729$ ) pa smo pričakovali pozitivno korelacijo. Pri naših bolnikih sta koncentraciji S-korigiranega kalcija in S-fosfata po uvedbi holekalciferola v povprečju ostali enaki. Spremembi seveda nista statistično značilni ( $P$ -vrednosti  $[0,8502$  in  $0,7368] > 0,05$ ). V raziskavi bolnikov z diabetično nefropatijo prav tako holekalciferol ni imel vpliva na serumske koncentracije korigiranega kalcija in fosfata (24). Pri bolnikih s kronično ledvično boleznijo faz 3–4 tudi niso potrdili korelacij serumske koncentracije vitamina D s koncentracijama S-korigiranega kalcija in S-fosfata, so pa v holekalciferolni skupini opazili značilen dvig koncentracije S-fosfata in kalcij-fosfat produkta (25).



Vitamin D ugodno vpliva na ledvično delovanje (zmanjša vnetje in glomerulosklerozo, poveča sintezo nefrina) (9, 16), s čimer se zmanjša izguba albumina v urin in lahko izboljša očistek kreatinina. Po uvedbi holekalciferola smo opazili statistično značilno povečanje koncentracije S-albumina (P-vrednost  $[0,0086] < 0,05$ ), koncentracija S-kreatinina pa se ni statistično značilno spremenila (P-vrednost  $[0,1245] > 0,05$ ). Učinek holekalciferola na albumin in kreatinin v serumu nam nakazujeta tudi pozitivna korelacija koncentracije S-25(OH)D<sub>3</sub> s koncentracijo S-albumina ( $r = 0,1876$ ) in negativna korelacija koncentracije S-25(OH)D<sub>3</sub> s koncentracijo S-kreatinina ( $r = -0,0277$ ).

Korelacija koncentracije S-25(OH)D<sub>3</sub> z ocenjeno glomerulno filtracijo je sicer šibko pozitivna ( $r = 0,1755$ ), a se je bolnikom glomerulna filtracija zelo malo zmanjšala, njena sprememba namreč ni statistično značilna (P-vrednost  $[0,8813] > 0,05$ ). Z našo raziskavo torej nismo potrdili renoprotektivnega učinka holekalciferola. Podobno so pri bolnikih s kronično ledvično boleznijo faz 3–4 po terapiji holekalciferola opazili neznačilno zmanjšanje glomerulne filtracije tako v holekalciferolni kot v kontrolni skupini (25), pri bolnikih z diabetično nefropatijo pa holekalciferol ni imel vpliva na ledvično funkcijo (24).

Korelaciji koncentracije S-25(OH)D<sub>3</sub> z U-eritrociti (SW) in U-levkociti (SW) sta blago negativni ( $r = -0,1086$  za eritrocite in  $r = -0,1143$  za levkocite v urinu). Po uvedbi holekalciferola sta se številčni koncentraciji eritrocitov in levkocitov v urinu v povprečju zmanjšali, vendar zaradi velikih standardnih odklonov med bolniki spremembi nista statistično značilni (P-vrednosti  $[0,2966$  in  $0,3004] > 0,05$ ). Spremembi v eritrocituriji in levkocituriji tako nista vplivali na zmanjšanje proteinurije, je pa sicer neznačilno zmanjšanje eritrociturije lahko povezano z zmanjšanjem vnetja zaradi učinka holekalciferola.

Za zmanjšanje proteinurije bi bilo ugodno tudi zmanjšanje telesne teže in krvnega tlaka (13, 19). Korelacije koncentracije S-25(OH)D<sub>3</sub> s telesno težo, indeksom telesne mase, sistolnim in diastolnim krvnim tlakom so sicer blago negativne (korelacijski koeficienti so  $-0,1412$ ,  $-0,2223$ ,  $-0,0406$  in  $-0,0396$ ), vendar nismo pričakovali, da bo holekalciferol vplival na telesno težo in krvni tlak. Zmanjšanje telesne teže po uvedbi holekalciferola namreč ni bilo statistično značilno (P-vrednost  $[0,2763] > 0,05$ ). Sistolni krvni tlak se je po uvedbi holekalciferola v povprečju zmanjšal zelo malo, medtem ko se je diastolni krvni

tlak celo povečal. Spremembi nista statistično značilni (P-vrednosti [0,3330 in 0,7023] > 0,05). S tem smo izključili vpliv telesne teže in krvnega tlaka na spremembo proteinurije. Pri bolnikih s kronično ledvično boleznijo faz 3–4 prav tako po zdravljenju s holekalciferolom niso zaznali sprememb telesne teže in krvnega tlaka (25), pri bolnikih z diabetično nefropatijo pa niso opazili sprememb krvnega tlaka (24).

Povečanje krvnega tlaka lahko vpliva na povečanje proteinurije (13). To povezavo smo potrdili s srednje močno pozitivnimi korelacijami krvnega tlaka s proteinurijo – korelacijska koeficienta sistolnega in diastolnega krvnega tlaka z ocenjeno dnevno proteinurijo (oDP) pred uvedbo holekalciferola sta 0,4721 in 0,3919, korelacijska koeficienta sistolnega in diastolnega krvnega tlaka z oDP po uvedbi pa sta 0,3769 in 0,3705. S starostjo se povečuje krvni tlak in slabša ledvična funkcija, s tem se poveča tudi proteinurija (29, 30). Izračunane korelacije starosti s sistolnim in diastolnim krvnim tlakom, ocenjeno glomerulno filtracijo (oGF) in ocenjeno dnevno proteinurijo so šibko negativne – korelacija starosti z oGF je pravilno negativna ( $r = -0,1761$ ), ostale korelacije pa so v nasprotju s pričakovanji ( $r = -0,1671$  za oDP,  $r = -0,1070$  za sistolni in  $r = -0,1652$  za diastolni krvni tlak).

## 6 ZAKLJUČKI

Bolnikom z IgA nefropatijo se je z dopolnjevanjem vitamina D v obliki holekalciferola zvečala serumska koncentracija vitamina D. Z raziskavo smo dokazali, da zdravljenje bolnikov z IgA nefropatijo s holekalciferolom poveča delež bolnikov, pri katerih pride do zmanjšanja proteinurije. Antiproteinurične učinke holekalciferola nam potrjujejo tudi negativne korelacije serumske koncentracije vitamina D z ocenjeno dnevno proteinurijo in razmerji proteinov v urinu. S korelacijo krvnega tlaka z ocenjeno dnevno proteinurijo pa smo potrdili povečanje proteinurije zaradi večjega krvnega tlaka, kar potrjuje dosedanje ugotovitve, da je pri terapiji IgA nefropatije zelo pomembna ureditev arterijskega krvnega tlaka.

Pomanjkljivosti raziskave so majhen vzorec bolnikov, njihova heterogenost in pomanjkanje podatkov zaradi retrospektivne narave raziskave. Bolnike smo zaradi

manjkajočih podatkov izključili iz statistične obdelave in s tem naredili statistično napako (31).

## 7 LITERATURA

1. Ferluga D, Vizjak A: Histopatologija in patogeneza glomerulonefritisa. Medicinski razgledi 2005; 44: 265–290.
2. Donadio JV, Grande JP: IgA Nephropathy. N Engl J Med 2002; 347: 738–748.
3. Szeto CC, Chow KM, Kwan BC, Chung KY, Leung CB, Li PK: Oral calcitriol for the treatment of persistent proteinuria in immunoglobulin A nephropathy: an uncontrolled trial. Am J Kidney Dis 2008; 51: 724–31.
4. Yano N, Endoh M, Miyazaki M, Yamauchi F, Nomoto Y, Sakai H: Altered production of IgE and IgA induced by IL-4 in peripheral blood mononuclear cells from patients with IgA nephropathy. Clin Exp Immunol 1992; 88: 295–300.
5. Floege J: The pathogenesis of IgA nephropathy: What is new and how does it change therapeutic approaches? Am J Kidney Dis 2011; 58(6): 992–1004.
6. Glassock RJ: The pathogenesis of IgA nephropathy. Curr Opin Nephrol Hypertens 2011; 20: 153–160.
7. Akira S, Hemmi H: Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. Immunology Letters 2003; 85: 85–95.
8. Ju T, Cummings RD: A unique molecular chaperone Cosmc required for activity of the mammalian core 1  $\beta$ 3-galactosyltransferase. Stuart A. Kornfeld, Washington University School of Medicine, St. Louis, 2002; 99: 16613–16618.
9. Shin JI, Lee JS: The beneficial effect of oral calcitriol treatment on proteinuria in IgA nephropathy: another point of view. Am J Kidney Dis 2008; 52: 804–5.
10. Feehally J, Floege J: IgA nephropathy and Henoch-Schönlein nephritis. In: Floege J, Johnson RJ, Feehally J, eds.: Comprehensive clinical nephrology, 4th ed., St. Luis, Elsevier Saunders, 2010; 270–81.
11. Rivera F, Lopez-Gomez JM, Perez-Brea MF, et al.: Clinicopathologic correlations of renal pathology in Spain. Kidney Int 2004; 66: 898–904.
12. Pozzi C: Current treatment of IgA nephropathy. 5. slovenski nefrološki kongres z mednarodno udeležbo, Univerzitetna knjižnica Maribor, Ljubljana, 2012; 52–54.

13. Gorriz JL, Martinez-Castelao A: Proteinuria: detection and role in native renal disease progression. *Transplant Rev (Orlando)* 2012; 26: 3–13.
14. Lindič J: Pregled seča. V: Kovač D, Lindič J, Malovrh M, Pajek J, ur.: *Bolezni ledvic*, 2. izdaja, Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana, 2009; 19–35.
15. Chen S, Meng X-F, Zhang C: Role of NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species in podocyte injury. *BioMed Research International* 2013; ID 839761.
16. Li YC: Vitamin D: roles in renal and cardiovascular protection. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2012; 21: 72–79.
17. Liu LJ, Lv JC, Shi SF, Chen YQ, Zhang H, Wang HY: Oral calcitriol for reduction of proteinuria in patients with IgA nephropathy: a randomized controlled trial. *Am J Kidney Dis* 2012; 59: 67–74.
18. de Zeeuw D: Targeting proteinuria as a valid surrogate for individualized kidney protective therapy. *Am J Kidney Dis* 2008; 51: 713–716.
19. Floege J, Eitner F: Current therapy for IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 1785–94.
20. Pozzi C, Bolasco PG, Fogazzi GB, et al.: Corticosteroids in IgA nephropathy: A randomized controlled trial. *Lancet* 1999; 353: 883–887.
21. Holick MF: Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357: 266–81.
22. DeLuca HF: Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: Suppl: 1689S–96S.
23. Matias P, Ferreira A: 25-hydroxyvitamin D and chronic kidney disease. *Port J Nephrol Hypert* 2011; 25(4): 253–261.
24. Kim MJ, Frankel AH, Donaldson M, Darch SJ, Pusey CD, Hill PD, Mayr M, Tam FWK: Oral cholecalciferol decreases albuminuria and urinary TGF- $\beta$ 1 in patients with type 2 diabetic nephropathy on established renin-angiotensin-aldosterone system inhibition. *Kidney Int* 2011; 80: 851–60.
25. Molina P, et al.: The effect of cholecalciferol for lowering albuminuria in chronic kidney disease: a prospective controlled study. *Nephrol Dial Transplant* 2014; 29: 109–118.
26. <http://clinicallaboratoryconsultants.com/lab-tests/vitamin-d-testing-methods/>
27. Chaichi MJ et al.: The study of chemiluminiscence of acridinium ester in presence of rhodamin B as a fluorescer. *Iran. J. Chem. Chem. Eng.* 2011.

28. Osredkar J, Marc J: Vitamin D in presnovki: fiziologija, patofiziologija in referenčne vrednosti. *Medicinski razgledi* 1996; 35: 543–565.
29. Lindič J: Preiskave ledvičnega delovanja. V: Kovač D, Lindič J, Malovrh M, Pajek J, ur.: *Bolezni ledvic*, 2. izdaja, Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana, 2009; 9–17.
30. Hitij JB: Primarna arterijska hipertenzija. V: Kovač D, Lindič J, Malovrh M, Pajek J, ur.: *Bolezni ledvic*, 2. izdaja, Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana, 2009; 225–232.
31. <http://biostat.mc.vanderbilt.edu/wiki/Main/ManuscriptChecklist>