

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**RENAL AA AMİLOİDOZ HASTALIĞININ KARŞILAŞTIRMALI İDRAR
PROTEOMİK VE METABOLOMİK ANALİZİ VE KLİNOPATOLOJİK
ÖZELLİKLER İLE KORELASYONU**

Dr. Deniz Aral ÖZBEK
UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA
2022

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**RENAL AA AMİLOİDOZ HASTALIĞININ KARŞILAŞTIRMALI İDRAR
PROTEOMİK VE METABOLOMİK ANALİZİ VE KLİNOPATOLOJİK
ÖZELLİKLER İLE KORELASYONU**

Dr. Deniz Aral ÖZBEK
UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Bülent ALTUN

ANKARA
2022

TEŞEKKÜR

Bu tezin oluşmasında büyük katkıları olan tez danışmanım Prof. Dr. Bülent Altun başta olmak üzere Prof. Dr. Yunus Erdem, Prof. Dr. Emirhan Nemutlu, Prof. Dr. İnicilay Lay, Prof. Dr. Nurhan Özlü, Prof. Dr. Tolga Yıldırım, Doç. Dr. Arzu Sağlam Ayhan, Doç. Dr. İdil Yet, Öğr. Gör. Dr. Meral Üner, Dr. Nazlı Ezgi Özkan Küçük ve Uzm. Dr. Sıla Cankurtaran Koç'a; Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nın ve Nefroloji Bilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine ve uzmanlarına; Koç Üniversitesi Translasyonel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hücre Biyolojisi ve Proteomiks Laboratuvarı'nın tüm öğretim görevlisi kadrosuna ve çalışanlarına, çalışmanın gerçekleştirilmesindeki maddi katkıları nedeniyle Türk Hipertansiyon ve Böbrek Hastalıkları Derneği'ne ve en önemlisi de her zaman yanımda olarak beni destekleyen eşim Ezgi Demirel Özbek'e ve aileme sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Özbek D.A. Renal AA Amiloidoz Hastalığının Karşılaştırmalı İdrar Proteomik Ve Metabolomik Analizi Ve Klinopatolojik Özellikler İle Korelasyonu, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara, 2022. Proteomik ve metabolomik analizlerin biyoinformatik çözümlemesi tanısal ve prognostik açıdan kritik olup literatürde renal AA amiloidoz hastalarında yapılmış bir üriner omiks analizi bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı renal AA Amiloidoz hastalarında karşılaştırmalı idrar proteomik ve metabolomik analizi yapmaktır. Yeni tanı almış 8 AA Amiloidoz (AA), 8 Membranöz Nefropati (MN), 8 IgA Nefropati (IgAN), 7 Fokal Segmental Glomerüloskleroz (FSGS) ve 6 kişilik kontrol grubunun idrar örnekleri alındı. nLC-MS/MS-QTOF ile AA, MN ve kontrol grubunda proteomik ve tüm hastalarda GC/MS aracılığıyla metabolomik analizler yapıldı. Patolojik preparatlar tübüler atrofi (TA) ve interstisyel fibrozis (IF) derecelerine göre skorlandı. Proteomik analizler sonucunda AA grubunda kontrol grubuna göre düzeyi anlamlı olarak daha düşük olan 51 proteinin arasında epitelyal büyüme faktörü, megalin, kübülün ve kaderinler izlendi. Üromodulin AA grubunda MN grubuna göre daha düşükken; ribonükleaz 1 ve α -1-mikroglobulin AA grubunda daha yüksek düzeyde izlendi. Gen Ontolojisi (GO) analizinde *fold enrichment* değeri en yüksek biyolojik süreç sindirim ve homofilik hücre adezyonu olarak görüldü. Metabolomik analizler sonucunda myo-inositol ve ürat AA grubunda MN grubuna göre yüksek olarak saptanırken D-mannitol ve N-asetilglutamat AA grubunda kontrol grubuna göre yüksek olarak saptandı. IF ve TA skorları AA grubunda diğer gruplardan daha yüksek saptandı (medyan 2, [3-0]). Çalışmamızda karşılaştırmalı idrar omiks analizi sonucunda AA amiloidoz grubunu diğer gruplardan ayıran başlıca moleküller yüksek tübülointerstisyel hasar ile ilişkilendirildi. Ayrıca *network* ve GO analizlerinin tübül hücreleri arasındaki adezyonu proteinlerine işaret etmesi olası bir artmış üriner kayma gerilmesi kuvvetini düşündürdü.

Anahtar Kelimeler: AA Amiloidoz, Proteomiks, Metabolomiks, Üromodulin, α -1-mikroglobulin

Destekleyen Kuruluşlar: Türk Hipertansiyon ve Böbrek Hastalıkları Derneği

ABSTRACT

Ozbek D.A. Comparative Urine Proteomics and Metabolomic Analysis of Renal AA Amyloidosis and Correlation with Clinopathologic Scores, Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Internal Diseases Residency Thesis, Ankara, 2022. Bioinformatic analysis of proteomic and metabolomic studies is critical in terms of diagnostic and prognostic aspects and no urinary omics analysis has been reported in renal AA amyloidosis patients. The aim of this study is to perform comparative urine proteomics and metabolomics analysis in renal AA amyloidosis. Urine samples of 8 newly diagnosed AA Amyloidosis (AA), 8 Membranous Nephropathy (MN), 8 IgA Nephropathy (IgAN), 7 Focal Segmental Glomerulosclerosis (FSGS) patients with control groups were collected. Proteomic analyzes were performed with nLC-MS/MS-QTOF in the AA, MN and control groups; and metabolomic analyzes were performed by GC/MS in all patients. Pathological specimens were scored according to tubular atrophy (TA) and interstitial fibrosis (IF) grades. As a result of proteomic analysis, epithelial growth factor, megalin, cubulin and cadherins were observed among 51 proteins whose levels were significantly lower in the AA group compared to the control group. While uromodulin was lower in the AA group than in the MN group; ribonuclease 1 and α -1-microglobulin were observed at higher levels in the AA group. In Gene Ontology (GO) analysis, the biological processes with the highest fold enrichment value were digestion and homophilic cell adhesion. Myo-inositol and urate were higher in the AA compared to MN, while D-mannitol and N-acetylglutamic acid were higher in the AA compared to control group in metabolomic analysis. IF and TA scores were higher in the AA compared to other groups (median 2, [3-0]). In our comparative urine omics analysis, the main molecules that distinguish the AA amyloidosis were associated with high tubulointerstitial damage. In addition, network and GO analyzes indicated downregulate adhesion proteins between tubule cells, suggesting a possible increased urinary shear stress.

Keywords: AA Amyloidosis, Proteomics, Metabolomics, Uromodulin, α -1-microglobulin

Supporting Organizations: Turkish Hypertension and Kidney Diseases Association

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Glomerüler Hastalıklar	3
2.1.1. Membranöz Nefropati	3
2.1.2. Fokal Segmental Glomerüloskleroz	8
2.1.3. IgA Nefropatisi	12
2.2. Amiloidoz	16
2.2.1. Epidemiyolojik Özellikler	16
2.2.2. Organ Tutulumlarına Bağlı Klinik Özellikler	17
2.2.3. Tanısal Yaklaşım ve Patoloji	19
2.3. AA Amiloidoz	20
2.3.1. Renal AA Amiloidoz	25
2.4. Nefroloji Biliminde Proteomiks ve Metabolomiks	27
2.4.1. Glomerüler Hastalıklarda Proteomiks Uygulamaları	30
2.4.2. Glomerüler Hastalıklarda Metabolomiks Uygulamaları	32
3. YÖNTEM	34
3.1. Hastaların Dahil Edilme ve Dışlanma Kriterleri	34
3.2. Hastaların Laboratuvar Verileri	35
3.3. Hastaların Patoloji Verileri	35
3.4. Üriner Proteomik Analiz	37

3.5. Üriner Metabolomik Analiz	37
3.6. Protein/Metabolitlerin Belirlenmesi ve Biyoinformatik Analiz	38
3.7. İstatistiksel Yöntemler	39
3.8. Çalışmanın Etik İzni ve Mali Desteği	40
4. BULGULAR	41
4.1. Klinik ve Laboratuvar Bilgiler	41
4.3. Patolojik Özellikler	43
4.4. Proteomik Analiz	44
4.5. Metabolomik Analiz	51
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	79
7. KAYNAKLAR	80

SİMGELER ve KISALTMALAR

2D-PAGE:	<i>2-dimension Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i>
A1M:	Alfa-1-mikroglobulin
AA:	AA Amiloidoz
AAA:	Ailevi Akdeniz Ateşi
ADPKD:	<i>Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease</i>
AFib:	Fibrinojen ilişkili Amiloidoz
ALP:	Alkalen fosfataz
AMY2A:	Pankreatik amilaz
APN:	Alanin Aminopeptidaz
aPPT:	<i>Activated partial thromboplastin time</i>
ATTRv:	Varyant tip Transtiretin ilişkili Amiloidoz
ATTRwt:	<i>Wild tip Transtiretin ilişkili Amiloidoz</i>
BUN:	<i>Blood Urea Nitrogen</i>
CAPSOD:	<i>Community Acquired Pneumonia and Sepsis Outcome Diagnostic</i>
CIC:	<i>Circulating Immun Complexes</i>
ClC-5:	<i>Chlorine Channel-5</i>
CPHPC:	Miridesap

CRP:	C-reaktif Protein
C-STRIDE:	<i>Cohort Research of Chronic Kidney Disease</i>
DBP :	Vitamin D bağlayıcı protein
DDCRT 21:	<i>Diabetes Distress and Care Registry at Tenri</i>
DNASE1:	Deoksiribonükleaz 1
EDN:	<i>Eosinophil-derived neurotoxin</i>
EEG:	Elektroensefalogram
EGF:	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR:	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EKG:	Elektrokardiyogram
ELISA:	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMG:	Elektromiyogram
EXT:	Ekzostosin
FAVORIT:	<i>Folic Acid for Vascular Outcome Reduction in Transplantation</i>
FSGS:	Fokal Segmental Glomerüloskleroz
G:	Glomerüloskleroz
GC:	<i>Gas Chromatography</i>
Gd-IgA1:	<i>Galactose deficient IgA1</i>
GFR:	Glomerüler Filtrasyon Hızı

GO:	Gen Ontolojisi
GTT:	Gama-glutamil transpeptidaz
GVHD:	<i>Graft versus Host Disease</i>
GWAS:	<i>Genom Wide Associaton Study</i>
HBV:	Hepatit B virüsü
HCV:	Hepatit C virüsü
HDL:	<i>High Density Lipoprotein</i>
HPLC:	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HIV:	<i>Human Immundeficiency Virus</i>
IEF:	<i>Isoelectric focusing electrophoresis</i>
IF:	İnterstisyel Fibrozis
IgAN:	IgA Nefropatisi
IL:	İnterlökin
IF:	İmmünfloresan
İNDEED:	<i>Incident, Development, and Prognosis of DKD</i>
JMS:	<i>Jones' Methenamine Silver Stain</i>
KBH:	Kronik böbrek hastalığı
KDIGO:	<i>Kidney Disease Improving Global Otucomes</i>
KEGG:	<i>Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes</i>

KIM-1:	<i>Kidney Injury Molecule-1</i>
KLL:	Kronik Lenfositik Lenfoma
LC:	<i>Liquid Chromatography</i>
LDL:	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LECT2:	<i>Leukocyte Chemotaxis Factor-2</i> ilişkili Amiloidoz
L-FABP:	<i>Liver type fatty acid binding globulin</i>
LFQ:	<i>Label free quantification</i>
Log ₂ FC:	<i>log₂fold change</i>
LRP2:	<i>Low Density Related Protein 2</i> (Megalin)
MALDI:	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MALT:	<i>Mucosa Associated Lymphoid tissue</i>
MXRA8:	<i>Matrix-remodelling protein 8</i>
MBL:	Mannan Bağlayıcı Lektin
MCD:	Minimal Değişim Hastalığı
MCP-1:	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MEFV:	<i>Mediterranean Fever Gene</i>
MN:	Membranöz Nefropati
MRG:	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MS:	<i>Mass Spectroscopy</i>

NCAM1:	Nöronal Hücre Adhezyon Molekülü 1
NCC:	Sodyum-klor kotransport proteini
NELL-1:	Nöronal Epidermal Büyüme Faktörü Benzeri Protein 1
NGAL:	Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin
NHE:	<i>Sodium-hydrogen exchanger 3</i>
NKCC2:	Sodyum-Potasyum-Klor kotransport proteini
NMR:	Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
PAI:	Plazminojen Aktivatörü İnhibitörü-1
PAMS:	<i>Periodic acid methenamine silver</i>
PAS:	<i>Periodic acid schiff</i>
PCDH7:	Protokadherin 7
PLA2R:	M-tip Fosfolipaz A2 Reseptörü
PT:	<i>Prothrombin time</i>
QTOF:	<i>Hybrid Quadripole Time-of-flight</i>
RAAS:	Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi
RAGE:	<i>Receptor for Advanced Glycation End Products</i>
RBP:	Vitamin A/retinol bağlayıcı protein
REGARDS:	<i>Reasons for Geographic and Racial Differences in Stroke</i>
RNASE:	Ribonükleaz

SAA:	Serum Amiloid A proteini
SAP:	Serum Amiloid P bileşeni
SDRNT1BIO:	<i>Scottish Diabetes Research Network Type 1 Bioresource</i>
SEMA3B:	Semaforin 3B
SKIPOGH:	<i>Swiss Kidney Project on Genes in Hypertension</i>
SPSS:	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TA:	Tübüler Atrofi
TGF- β :	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
THSD7A:	Trombospondin Tip 1 7A içeren Domain
TNF- α :	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
TOF:	<i>Time-of-flight</i>
uEGF:	<i>Urinary EGF</i>
UHPLC:	<i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i>
UMOD:	Üromodulin
VEGF:	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Membranöz nefropatide Glomerüler bazal membran kalınlaşması, Bowman kapsülüne sineşi odağı , IF mikroskopide periferal granüler IgG birikimi, JMS boyamasında bazal membranlar boyunca vakuoler PAMS boyaması ve periferal kapiller duvarlarında fuksinofilik globüler birikimler	7
Şekil 2.2. IgA nefropatide glomerüllerde mezengial hücre artışı, JMS boyamasında global sklerotik glomerül ve çevresine lokalize tübüler atrofi ve interstisyel fibrozis, eozinofil lökositlerin de yer aldığı inflamatuvar hücre reaksiyonu	15
Şekil 2.3. AA amiloidozda mezengial alanda amiloid ile uyumlu homojen eozinofilik amorf madde birikimi, Kongo kırmızısı ile amiloid birikim pozitif boyanma	22
Şekil 4.1. Proteomik sonuçların PCA analizi	47
Şekil 4.2. Proteomik sonuçların ısı haritası analizi	48
Şekil 4.3. Proteomik sonuçların GO analizi	49
Şekil 4.4. GO Hücresel Kompartman alt domainleri	49
Şekil 4.5. GO Biyolojik süreç alt domainleri	50
Şekil 4.6. GO moleküler fonksiyon alt domainleri	50
Şekil 4.7. Proteomik sonuçların ağ analizi (STRING)	51
Şekil 4.8. Metabolomik sonuçların PCA analizi	53
Şekil 4.9. Metabolomik sonuçların ısı haritası analizi	54
Şekil 4.10. Metabolomik sonuçların ağ analizi (Metaboanalyst)	55

TABLolar

Tablo 2.1. Sekonder MN etiyolojileri ve başlıca örnekleri	4
Tablo 2.2. Sekonder AA amiloidoz etiyolojileri ve başlıca örnekler	23
Tablo 4.1. Hastaların demografik ve klinik verileri	41
Tablo 4.2. Hastaların laboratuvar verileri	42
Tablo 4.3. Hastaların patolojik verileri	43
Tablo 4.4. Hastaların tübüler atrofi/nterstisyel fibrozis skorları çapraz tablosu	44
Tablo 4.5. Hastaların glomerüloskleroz skorları çapraz tablosu	44
Tablo 4.6. Hastaların total renal kronisite skorları çapraz tablosu	44
Tablo 4.7. Proteomik analiz sonucunda AA Amiloidoz ile kontrol grubu arasında düzeyi anlamlı ölçüde farklılık gösteren proteinler	45
Tablo 4.8. GO biyolojik süreç analizindeki domainlerin <i>fold enrichment</i> analizi	48
Tablo 4.9. Metabolomik analiz sonucunda AA Amiloidoz ile diğer gruplar arasında düzeyi anlamlı ölçüde farklılık gösteren proteinler	52

1.GİRİŞ ve AMAÇ

AA Amiloidoz ülkemizde özellikle Ailevi Akdeniz Ateşi' nin yüksek prevalansı nedeniyle önemli bir komplikasyon olup böbrek tutulumu AA Amiloidoz hastalığının en sık organ tutulumudur. Bu çalışmadaki temel amacımız, uygun kontrol ve karşılaştırma grupları kullanarak idrarda karşılaştırmalı proteomik ve metabolomik analiz ile yeni tanı renal AA Amiloidoz hastalarında özgül protein ve metabolitler saptamaktır.

Saptanabilecek olası biyobelirteçler ve bu biyobelirteçler ile ileride validasyon grubu içeren daha kapsamlı çalışmalarda oluşturulabilecek bir tanı paneli ile (*classifier*) yakın gelecekte proteinüri etiyojisi belirsiz olarak kliniğe başvuran hastalarda böbrek biyopsisi ihtiyacını azaltacak şekilde non-invazif bir tanı alternatifi oluşturulabilecek ve özellikle ülkemizdeki görece yüksek AAA prevalansı nedeniyle nefroloji pratiğinde nadir olmayacak şekilde görülen renal AA amiloidoz tanısının böbrek biyopsisi olmaksızın tanı konulabilmesine yolunda önem arz edebilecektir. Gelişen yapay zeka ve makine öğrenme programları birden çok biyobelirteci içeren tanı panellerinin modellenmesine imkan sağlamaktadır.

Renal AA Amiloidoz üzerine olan bu omiks çalışmamızda klinik örnek olarak idrar kullanılması hastaya herhangi bir invazif girişim yapmaksızın kolay elde edilebilmesi, rutin nefroloji pratiğinde klinisyen tarafından sıkça istenmesi, hedef organ ile olan yakın ilişkisi nedeniyle diagnostik ve patofizyolojik açıdan daha doğrudan altta yatan mekanizmaları yansıtabilmesi ve diğer biyolojik örneklerle kıyasla 24 saatlik örnekler elde edilebildiğinden gerektiğinde yüksek hacimlere ulaşılabilmesi nedeniyle önemli olup çalışmamızın gelecekte nefrolojik açıdan ülkemizde önemli bir hastalık olan AA Amiloidoz konusundaki üriner omiks çalışmalarına katkı sağlaması hedeflenmektedir.

Girişimsel olmayan tanı olanaklarına ek olarak, keşfedilebilecek yeni biyobelirteçler standart proteinüri ölçümüne renal tutulumdan daha erken şüphelenme olanağı sağlayabilecek ve hastalığının patofizyolojisinde cevaplanmamış sorulara yanıt olabilecektir. Yine bu biyobelirteçlerin pek çok klinik faktör ile ilişkisi

ve uzun dönem hastalığın prognozu ile ilişkisi araştırılacaktır. Renal amiloidoz grubunda istatistiksel olarak anlamlı yüksek yeni protein/metabolitlerin renal patoloji örneklerindeki hyalinozis, fibrozis, tübülointerstisyel atrofi ve amiloidoz toplam alan yüzdesi gibi patolojik değişkenlerle; bulmayı hedeflediğimiz biyobelirteçler arasında korelasyon çalışmaları yaparak biyobelirteçler ile pek çok patolojik faktör arasındaki ilişki de araştırılacaktır. Bu bağlamda renal AA Amiloidoz hastalığında literatürde ilk kez yapılmış olan üriner omiks çalışması ile kişiselleştirilmiş tıp ve *precision medicine* yaklaşımlarına bu alanda bir zemin ve veri sağlanması amaçlanmaktadır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Glomerüler Hastalıklar

Böbreklerin en küçük ve temel fonksiyonel birimi olan nefron gerek fizyolojik gerek histolojik açıdan farklı bölümlerden oluşmaktadır. Renal korpüskül nefronun filtrasyon görevinden sorumlu kompartımanı olup; yoğun bir kapiller yumağın oluşturduğu glomerül ve bu yapıyı çevreleyen çift katlı Bowman kapsülünün meydana getirdiği kompleks bir alt birimdir (1). Kapiller endotel hücreleri ve kapsülün viseral epitel tabakası olan podositler arasında oluşan glomerüler bazal membran filtrasyonun permeabilite ve selektivite gibi temel fizyolojik özelliklerinden sorumlu olurken mezangial hücrelerin oluşturduğu bağ doku olan mezangiyum renal korpüskülün temel destek dokusunu oluşturarak podositler ve endotel hücreleri arasında sitokin alışverişi, büyüme hormonu salgılama ve kapiller kan akışını düzenleme gibi pek çok yardımcı fizyolojik rol de üstlenmektedir (2).

Günümüzde kronik böbrek hastalığının (KBH) diyabet ve hipertansiyondan sonra en sık görülen etiyojisini oluşturan glomerüler hastalıklar glomerüler bazal membran, mezangiyum, endotel ve epitel hücrelerini çeşitli inflamatuvar mekanizmalar ile etkileyen çok geniş bir hastalık spektrumunu oluşturmaktadır. Glomerüler hastalıklar sebep oldukları morbidite ve mortalite nedeniyle Nefroloji biliminin önemli bir hastalık grubudur. Membranöz Nefropati (MN), Fokal Segmental Glomerüloskleroz (FSGS) ve IgA Nefropati (IgAN) gerek primer gerek sistemik bir hastalığa sekonder olarak gelişebilen ve klinikte en sık görülen glomerüler hastalıklar arasında yer almaktadır.

2.1.1. Membranöz Nefropati

Membranöz Nefropati, patolojik olarak iyi tanımlanmış ve spesifik bir glomerül hasar paterninin görüldüğü, sıklıkla nefrotik sendrom ile prezante olan otoimmün bir glomerüler hastalıktır (3). Non-diyabetik erişkin bireylerde idiyopatik nefrotik sendromun en sık nedenini oluşturan hastalık tüm yaş gruplarında görülebilmekle birlikte pikini 50-60 yaş aralığında yapmakta ve henüz net olarak

bilinmeyen nedenlerde 2:1 oranında erkeklerde daha sık olarak saptanmaktadır (4, 5). %80 olguda altta yatan başka bir hastalık saptanamazken (Primer MN); vakaların %20' sinde hastalık altta yatan sistemik bir etiyoloji ile ilişkilendirilmekte ve bu grup Sekonder MN olarak sınıflandırılmaktadır (3, 6) (**Tablo 1**).

Tablo 1. Sekonder MN etiyolojileri ve başlıca örnekleri (3, 6)

Sekonder MN Etiyolojisi	Başlıca Örnekler
Enfeksiyon etkenleri	HBV, HCV, HIV, malaria, filariazis, sifiliz, kist hidatit, lepra
Malignansiler	Akciğer, meme, prostat, kolon, multipl myelom, KLL, Hodgkin ve Non-Hodgkin lenfomalar
Otoimmün hastalıklar	Sistemik Lupus Eritromatozus (SLE), Sjögren sendromu, mikst bağ doku hastalıkları, romatoid artrit, tiroidit, diyabet, ANCA-ilişkili hastalık, IgG4-ilişkili hastalık, <i>Graft versus Host</i> Hastalığı, (GVHD), transplant glomerülopati
İlaçlar	NSAID, altın, D-Penisilamin, busilamin, kaptopil, probenesid, anti TNF- α inhibitörleri
Toksinler	Hidrokarbonlar, cıva, lityum, formaldehit, hava kirliliği

MN patofizyolojik olarak otoimmün bir hastalık olup podosit membranında bulunan M-tip Fosfolipaz A2 Reseptörü (PLA2R)' ne karşı gelişen otoantikörler primer MN olgularının %70' inde saptanan en sık otoantikör grubunu oluşturmaktadır (7). Podosit canlılığı için önemi net olmayan PLA2R transmembran bir glikoprotein olup glomerüler podosit membranında önemli bir miktarda eksprese edilmektedir (4). Bu proteinin fosfolipaz A2 gibi toksik olabilecek enzimleri

glomerüler bazal membrandan geçerken internalize edebildiği düşünülmektedir (8). Hastalığın ilk dönemlerinde glikoprotein N-terminal sistein zengin bölgesine bağlanan ve hastalık izleminde dominant olarak IgG4 alt tipinde olan Anti-PLA2R IgG antikorlarının oluşturdukları immün kompleksler alternatif ve mannan bağlayıcı lektin (MBL) kompleman yollarının aktivasyonuna yol açarak glomerüler bazal membranda hasara neden olduğu düşünülmektedir (9-11). Zamanla epitop yayılması fenomeni ile antijenlerin farklı bölgelerini hedef alan otoantikorlar izlenebilmekte ve bu süreç kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir (12, 13). Baskın kompleman immünohistokimyasal boyamanın patolojik preparatlarda C3 olarak izlenmesine karşın hastalığın ilk dönemlerinde IgG1 ve IgG3 alt tipinde IgG antikorlarının saptanmış olması; en azından hastalığın ilk dönemlerinde klasik kompleman yolağının da aktif olabileceğini düşündürmektedir (14).

Anti-PLA2R otoantikorlarının patofizyolojideki önemini anlaşılması sonucu yapılan prospektif çalışmalarda antikor titresinin hastalık aktivitesinin belirlenmesindeki yeri gösterilmiş ve klinik olarak proteinürideki değişikliklerden çok daha önce antikor titresindeki değişimlerin olduğu izlenmiştir (15, 16). Yapılan doku proteomiks çalışmalarında Trombospondin Tip 1 Domain içeren 7A (THSD7A), Nöronal Epidermal Büyüme Faktörü Benzeri Protein 1 (NELL-1), Ekzostozin 1 ve 2 (EXT1 ve 2), Semaforin3B (SEMA3B), Nöronal Hücre Adhezyon Molekülü 1 (NCAM1), bir serin proteaz olan HTRA1 ve Protokadherin 7 (PCDH7) antijenleri; anti-PLA2R negatif olan vakalarda patogeneze sorumlu olduğu düşünülen diğer antijenler olarak saptanmış olup hastalığın küçük bir alt grubunda otoantikorlar yalnızca böbrek dokusunda saptanmakta ve periferik dolaşımında bulunmamaktadır (4, 17). Özellikle THSD7A ve NELL-1 pozitif olan vakalarda farklı serilerde değişen ancak önemli oranlarda malignite saptandığı akıld tutulmalıdır (18, 19). Günümüzde primer ve sekonder MN ayrımının bazı olgularda net olarak yapılamaması; patogeneze sorumlu antijenlerin her iki grupta da saptanması ve prognoz ile ilişkili olmaları nedeniyle bazı araştırmacılar tarafından MN vakalarının gelecekte primer/sekonder ayrımından ziyade antijen bazlı bir sınıflama ile ifade edilmesi gerektiğini belirtmektedir (20).

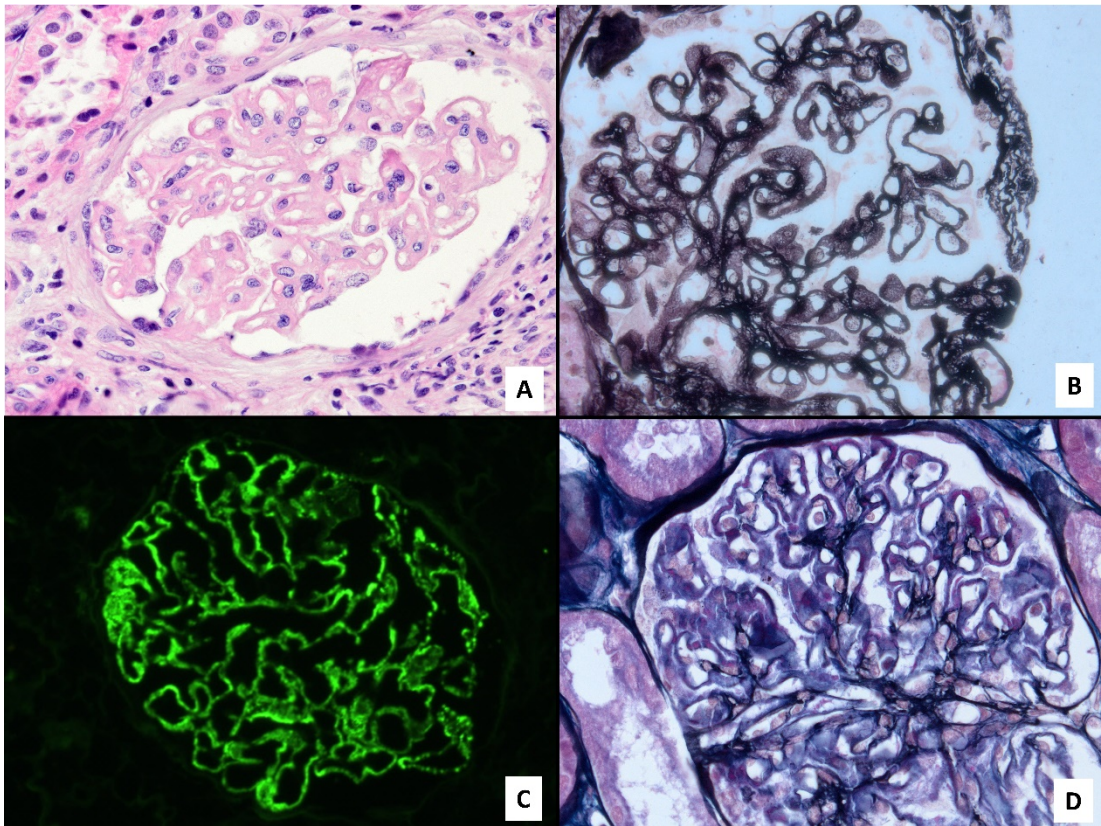
Klinik olarak vakaların %60-80 'inde nefrotik sendrom kliniği saptanırken diğer olgular subnefrotik (<3.5 gr/gün) proteinüri ile prezante olmakta; bu hastaların

da yarısından fazlası tedavi edilmediği takdirde özellikle PLA2R pozitifliği durumunda nefrotik düzeyde proteinüri ile prezante olmaktadır (3, 21). Mikroskopik hematüri hastaların %50' sinde görülebilmekte; ancak makroskopik hematüri nadiren izlenmektedir (4). Olguların %80' inde tanı anında glomerüler filtrasyon hızı (GFR) ve kan basıncı değerleri normal aralıkta izlenmektedir.

Diğer etiyojilere bağlı nefrotik sendrom vakalarına benzer şekilde tromboza yatkınlık (renal ven trombozu, derin ven trombozu, pulmoner tromboemboli vb.), immüsupresyon ve karma tip hiperlipidemisinin eşlik edebilmektedir (22). LDL ve total kolesterol değerlerinde yükseklik ile HDL değerlerinde düşüklüğün görüldüğü dislipidemi tablosu hastalarda miyokard infarktüsü, koroner ölüm ve tromboembolizm riskini sağlıklı bireylere göre anlamlı ölçüde arttırmaktadır (22). Patogenezi henüz net olarak bilinmemesine rağmen tromboza yatkınlık MN vakalarında diğer nefrotik sendrom etiyojilerine göre daha sık olarak izlenmekte ve özellikle hipoalbuminemi trombozun önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (23). Bu kapsamda hastaların klinik özellikleri ve albümin değerleri baz alınarak uzun dönem antikoagülan veya antiagregan tedavi endikasyonlarının belirlemeyi amaçlayan algoritmalar geliştirilmiştir (24). Yeni tanı almış özellikle ileri yaş membranöz nefropati hastalarının bu komplikasyonların yanı sıra yaşlarına uygun olarak malign hastalıklar açısından da taranması önerilmekte; ayrıca her hastanın sekonder olası nedenler açısından araştırılması gerektiği güncel kılavuzda vurgulanmaktadır (25).

Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO)' nun 2021 yılında yayımladığı güncel glomerüler hastalıklar kılavuzunda anti-PLA2R antikor pozitif olan ve nefrotik sendrom kliniği ile başvuran vakalarda tanı için böbrek biyopsisine gerek olmadığı belirtilse de subnefrotik proteinürisi olan, atipik klinik prezantasyon ile gelen, sekonder MN olabileceği düşünülen ve immüsupresif tedavi verilmesi planlanan hastalarda böbrek biyopsisi önerilmekte ve biyopsi tanı ve prognoz tayininde halen altın standart olarak kabul edilmektedir (25). Patolojik olarak 4 evrede tanımlanan hastalıkta ilk evrede dağınık yerleşimli ve küçük subepitelyal depozitler izlenirken evre 2' de artan depozit birikimi ile dikensi çıkıntılar (spike) ve bazal membranda kalınlaşma izlenmektedir (26). Evre 3 hastalıkta depozitlerin tamamen bazal membran tarafından çevrelendiği izlenirken son evrede glomerüler

bazal membran büyük ölçüde düzensiz ve kalın izlenmekte; depozitlerin elektron yoğunluğunun ise azaldığı görülmektedir (**Şekil 2.1**). İmmünfloresan mikroskopide IgG ve C3 boyamalarının pozitif olduğu hastalıkta mezengial veya endokapiller proliferasyon ise tipik olarak izlenmemekte ve serolojik olarak MN tanısı alan hastalarda sekonder etiyolojilerin hastalıkta rol oynayabileceğini düşündürmektedir (27). MN düşünülen tüm vakalarda serolojik olarak negatif olması durumunda bile patolojik olarak pozitif olabileceğinden öncelikle PLA2R ve negatif gelmesi halinde diğer sorumlu antijenlere yönelik immünohistokimyasal boyama önerilmektedir (28).



Şekil 2.1. Glomerüler bazal membran kalınlaşmasının seçilebildiği membranöz glomerülopati tanısı alan bir vaka, Bowman kapsülüne sineşi odağı (A,B). IF mikroskopide periferik granüler IgG birikimi ve JMS boyamasında bazal membranlar boyunca vakuoler değişim (C). Bir başka vakada PAMS boyaması ile periferik kapiller duvarlarında fuksinofilik globüler birikimler (D).

Tüm glomerüler hastalıklarda olduğu gibi tedavi yaşam tarzı değişiklikleri ve Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi (RAAS) inhibitörleri ile başlamakta ve günde <2 gr sodyum (Na) olacak şekilde tuz kısıtlaması hem semptom kontrolünde hem hastalık progresyonunun durdurulabilmesinde büyük önem arz etmektedir (25). Temel tedavi seçeneklerini siklofosfamid/steroid kombinasyonu, rituksimab ve kalsinörin inhibitörleri oluşturmaktadır (29). İmmüsupresif tedavi açısından uygun hastaların belirlenmesi hem gereksiz hem de eksik tedavinin önüne geçilmesi için kritik olup tedavi bu risk gruplarına göre bireyselleştirilmelidir (25). İlerleyen bölümlerde de ayrıntılandırılacağı üzerine kişiselleştirilmiş tıp uygulamaları kapsamında yapılacak çalışmalar, hangi hastaların immüsupresif tedaviden yarar göreceği konusundaki kanıt bazlı karar verme yetimizi arttıracaktır.

2.1.2. Fokal Segmental Glomerüloskleroz

Fokal Segmental Glomerüloskleroz tek bir hastalığı ifade etmekten ziyade patolojik olarak spesifik bir podosit hasar paternine işaret etmekte olup farklı etioloji ve klinikte hastalık alt gruplarını yapısında barındıran bir patolojidir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)' nde son dönem böbrek yetmezliğine en sık yol açan glomerüler patoloji olan FSGS prevalansı global olarak artmaktadır (30). Her yaş grubunda görülen ve konjenital nefrotik sendromun da önemli nedenlerinden birini oluşturan hastalık ABD' de yapılan geniş kapsamlı bir toplum çalışmasında erkeklerde kadınlara göre yaklaşık 1,5 kat daha sık görülmektedir (31). Hastalık insidansı etnik kökene bağlı olarak gelişmekte; siyahi ve hispanik popülasyonda beyaz ırka göre daha sık görülmektedir.

FSGS 6 farklı klinik/patolojik alt tip olarak incelenmektedir.

Primer FSGS: Diğer sistemik ve genetik etkenlerin ekarte edilmesiyle tanımlanan primer (idiyopatik) FSGS alt tipinin patogenezinde henüz tanımlanmamış kan dolaşımı kaynaklı bir faktörün sorumlu olduğu düşünülmektedir. Olası sorumlu moleküller arasında ApoA1b (ApoA1 izoformu), Kardiyotrofin-benzeri Sitokin Faktörü, anti-CD40 antikoru ve Serum İdrar Plazminojen Aktivatör Reseptörü (suPAR) yer almaktadır (32).

Adaptif FSGS: Sekonder FSGS vakalarının önemli bir kısmını oluşturan adaptif FSGS' de glomerüler kapasitenin üzerinde olan bir filtrasyon yükünün yarattığı uyumsuzluk, podosit hasarı ile neticelenecek mekanizmalarını tetiklemektedir. Konjenital olarak düşük nefron ağırlığına neden olan durumlar, orak hücreli anemi, vezikoureteral reflü, obezite, diğer nedenlere bağlı kronik böbrek hastalığı, yüksek protein içerikli beslenme ve androjen kullanımı araştırılması gereken etiyojiler arasında yer almaktadır (33, 34). Normal albümin değerleri, subnephrotik aralıkta proteinüri, nefrotik sendrom kliniğinin çoğunlukla gelişmemesi ve hastalığın yalnızca RAAS inhibitörleri ile remisyona girebilmesi adaptif FSGS düşündürülen klinik parametrelerdir (35).

İnfeksiyon ilişkili FSGS: Viral etkenler hem doğrudan podosit hasarı hem de dolaylı olarak inflamatuvar mekanizmalar ile FSGS tablosuna yol açabilmektedir. HIV-1 en iyi bilinen etken olup hastalığın çökme varyantı (*collapsing variant*) ile ilişkilendirilirken Parvovirüs-B19, CMV, EBV diğer olası viral etkenlerdir (36). Özellikle endemik bölgelerde Plasmodium türleri, *Schistosoma mansoni* ve filariyazis nadir paraziter etkenler olarak karşımıza çıkmaktadır (30).

İlaç ilişkili FSGS: Sınırlı sayıda ilaç FSGS etkeni olabilmektedir. İnterferonlar ve bifosfonat tedavisi ile çökme varyant FSGS gelişen vaka serileri bildirilmiştir . Lityum tedavisi Minimal Değişiklik Hastalığı ven Membranöz Nefropati hastalıklarının yanı sıra FSGS etkeni de olabilmektedir (37). Antrasiklin türevi kemoterapi ajanları da FSGS ile ilişkilendirilmiş olup doksorubisin deneysel FSGS fare modellerinin oluşturulmasında kullanılmaktadır (38, 39).

APOL1 ilişkili FSGS: APOL1 geni 22.kromozomda bulunan APOL gen ailesinin 6 üyesinden biri olup çeşitli lokasyonlarda amino asit değişimlerine neden olan mutasyonlar G1 ve G2 olarak isimlendirilen yüksek riskli varyantlara neden olmaktadır (40, 41). 2 yüksek riskli APOL1 varyantına sahip bireylerde FSGS' ye ek olarak hipertansiyon ilişkili son dönem böbrek hastalığı ve HIV-ilişkili nefropati riskinde de ciddi bir risk artışı olduğu gösterilmiş olup bu bağlamda bu hastalıkları APOL1 ilişkili nefropati spektrumunda değerlendirmek patofizyolojik açıdan daha uygun görülmektedir (42, 43). APOL1 yüksek riskli allelleri ayrıca lupus nefriti ve

membranöz nefropati hastalarında da kötü prognoza sahip varyantlar ile ilişkilendirilmektedir (44, 45).

Genetik FSGS: Yarık diyafram proteinlerinde (NPHS1, NPHS2 ve CD2AP), podosit membran proteinlerinde (β 4-integrin, CD151, PTPRO, TRPC6 ve laminin β 2), aktin iskeletinde (formin, miyozin IIA, α -aktinin-4), lizozom proteinlerinde (SCARB2/LIMP-2), mitokondriyal proteinlerde [COQ2, tRNA(Lösin) ve COQ6] ve nükleus transkripsiyon faktörlerinde (WT1) oluşan çeşitli mutasyonların proteinüri ile prezante olduğu ve patolojik olarak FSGS tanısı aldığı bilinmektedir (46). Genetik FSGS olgularının çoğu otozomal resesif kalıtım göstermekte ve sıklıkla hayatın ilk yılında prezante olmaktadır. Bu olgularda NPHS1 (Nefrin) ve NPHS2 (Podosin) en sık mutasyona uğrayan proteinleri oluşturmaktadır (46). Otozomal dominant formlar (α -aktinin-4, TRPC6) adolesan ve erişkin yaşlarda da görülebilmekle birlikte erişkin popülasyonda FSGS etiyolojisinin %15' inden daha az bir oranı genetik nedenlere bağlanmaktadır (47, 48).

Hastalığın tanısında böbrek biyopsisi merkezi rolü oynasa da her hastada detaylı bir klinik değerlendirme yapılmalıdır. Ayrıntılı anamneze ek olarak kullanılan ilaçlar, aile öyküsü, doğum ağırlığı, çeşitli sendromik durumları düşündürülen organomegaliler ve anatomik anomaliler, işitme kaybı, kardiyak disfonksiyon ve cilt lezyonları her hastada değerlendirilmelidir. Klinik değerlendirme sonrasında serum albümin düzeyi ve idrarda proteinüri etiyolojik sınıflandırmanın temelini oluşturmaktadır (35).

Primer FSGS tipik olarak yüksek derecede proteinüri ve nefrotik sendrom kliniği ile prezante olmakta ve bazı serilerde muhtemelen tanı almamış sporadik genetik olguların da primer FSGS olarak değerlendirilmesi sonucunda nefrotik sendromun prevalansı %70-90' a ulaşmaktadır (49, 50). Sekonder FSGS hastaları ise çoğunlukla subnefrotik aralıkta proteinüri ile tanı almakta ve proteinürinin derecesi nefrotik aralıkta olsa bile nadiren nefrotik sendrom kliniği geliştirmektedir (50-52). Çocukluk döneminde tanı alan otozomal resesif FSGS vakaları büyük ölçüde nefrotik sendrom ile tanı alırken erişkin başlangıçlı otozomal dominant genetik FSGS hastaları daha düşük oranda proteinüri ve nefrotik sendrom ile kliniğe başvurmaktadır (53).

Columbia klasifikasyonu patolojik olarak FSGS lezyonlarını altta yatan etiyolojiden bağımsız olarak çökme (*collapsing*), uç (*tip*), selüler, perihiler ve başka şekilde sınıflandırılmayan (*not otherwise specified*, NOS) olarak sınıflandırılmaktadır (54). NOS en sık varyant olup hem primer hem sekonder FSGS hastalarında benzer oranda görülmekte; perihiler lezyonlar ise sekonder FSGS vakalarında daha sıklıkla izlenmektedir (55). Uç lezyonları tedaviye en iyi cevap veren varyant olarak ifade edilirken çökme varyantı en kötü prognoza sahip olan varyant olarak görülmekte; APOL1 ve Afro-Amerikan bireylerde daha sık prezante olmaktadır (54, 55).

Primer FSGS hastaları genellikle hızlı gelişen bir nefrotik sendrom ile kliniğe başvurduklarından ötürü progresif olarak proteinürisi artan sekonder FSGS hastalarına göre daha düşük oranda parankimal ve glomerüler hasara sahip olabilmektedirler. Ancak ilerlemiş primer FSGS olgularında görülen kronik glomerüler ve tübülointerstisyel hasar ile sekonder FSGS' den ayırım ışık mikroskopisinde mümkün olmamaktadır (35). Glomerülomegali obezite, reflü nefropatisi, düşük doğum ağırlığı ve azalmış nefron miktarı ile ilişkilendirilmiş sekonder FSGS olgularında sıklıkta saptanmasına rağmen primer FSGS olgularının da %10-30' unda görülebilmekte ve yine ışık mikroskopisini primer-sekonder FSGS ayırımında yetersiz kılmaktadır (52, 55).

İmmünfloresan mikroskopisi FSGS vakalarında temel olarak olası bir post-inflamatuvar süreç sonrasında gelişen non-spesifik segmental sklerozu dışlamak için kullanılmaktadır. Granüler IgM ve C3 segmental skleroz ile birlikte saptanabilmekte ve bu süreç aktif bir inflamatuvar süreçten ziyade makromoleküler pasif birikim ile ilişkilendirilmektedir (35). Elektron mikroskopisi incelemesinde görülen temel patolojik bulgu ayaksı çıkıntı efansmanıdır (*foot process effacement*). Primer FSGS olgularında çoğunlukla difüz ayaksı çıkıntı efansmanı görülürken genetik FSGS vakalarında gerek difüz gerek segmental patern görülebilir. Ancak sekonder FSGS vakalarında difüz patern beklenmeyen ve dışlayıcı bir patolojik özelliği ifade etmektedir. Yüksek proteinüri miktarında eşlik eden mikrovillüs transformasyonu ve podosit vakuolizasyonu bu bağlamda etiyolojik olarak primer FSGS tanısını telkin etmektedir (35).

FSGS tanısı olan tüm hastalara yukarıda da bahsedilen ve RAAS inhibisyonu, optimal kan basıncı kontrolü, tuz kısıtlaması ve yaşam tarzı değişikliklerini kapsayan etkin konservatif tedavi önerilmelidir (25). Sekonder olguların yöntemini altta yatan hastalığın tedavisi oluşturmakta olup sekonder FSGS olgularında immüsupresif tedavinin yararlı olabileceğine dair kanıt bulunmamaktadır (56). Primer FSGS olduğu gösterilen ve nefrotik sendromu olan vakalarda temel tedavi konservatif tedaviye ek olarak verilen steroid tedavi rejimidir. Nefrotik sendromu olmayan ancak nefrotik sınırın üstünde proteinürisi olan hastalarda ise literatür kısıtlı olup güncel KDIGO kılavuzu bu hastaların konservatif tedavi altında yakın olarak izlenmesini ve nefrotik sendrom geliştiğinde immüsupresif tedavi açısından değerlendirilmesi gerektiğini belirtmektedir (25).

2.1.3. IgA Nefropatisi

Ülkemizde ve dünyada en sık görülen glomerülo nefrit IgA Nefropatisi hastalığıdır (57, 58). Çoğunlukla Avrupa ve Kuzey Amerika' daki merkezlerden biyopsi bazlı yapılan bir derlemede hastalığın insidansı 2,5/100.000 olarak ifade edilmiştir (59). Ancak hastalık sıklığı coğrafi bölgeye ve seçilen epidemiyolojik yöntemlere göre değişkenlik göstermektedir. Otopsi ve genom çapında ilişkilendirme (GWAS) çalışmalar IgA Nefropatisi sıklığının Uzakdoğu ve Pasifik Asya' da daha yüksek olduğuna işaret etmektedir (60-62). Bu bulgular prevalanstaki coğrafi bölgelere göre oluşan değişikliklerin yalnızca biyopsi endikasyonu ve epidemiyolojik yöntemlere bağlı olmadığını göstermektedir.

Hastalığın patogenezi günümüzde en sık 4 Vuruş Hipotezi ile açıklanmaktadır. 1.Vuruş Galaktozillenme defekti olan IgA1 antikorlarının oluşumu olup bu tip IgA1 molekülleri (gd-IgA1) hastaların kan, idrar ve glomerüllerinde yüksek miktarda bulunmakta ve lektin bazlı testler ile ölçülebilmektedir (63, 64). Galaktozillenme bozukluğunun temel sorumluları ve bu sürecin nerede geliştiği kesin olarak bilinmemekte birlikte kanıtlar spesifik bir mikrobiyota ve çevresel etmenler varlığında mukoza ilişkili lenfoid dokuda bu moleküllerin oluştuğuna işaret etmektedir (65, 66). B hücrelerinin bu yöndeki aktivasyonunda APRIL ve BAFF gibi transkripsiyon faktörlerinin yol oynadığı düşünülmektedir (67).

2.vuruş anti-gd-IgA1 otoantikörlerinin oluşumu olarak ifade edilmektedir. Gd-IgA1 moleküllerine karşı gelişen otoantikörler IgA Nefropatisi hastalarında gösterilmiş ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmişlerdir (68). Bu antikörlerin gd-IgA1 moleküllerinde oluşan neo-epitoplara aracılığıyla veya mikrobiyal N-asetilgalaktozamine karşı oluşup moleküler mimikri yoluyla gd-IgA1 moleküllerine bağlandığı düşünülmektedir (69, 70).

3.vuruş Gd-IgA1 içeren immün komplekslerin oluşumu olup gerek anti-gd-IgA1 IgA ve IgG antikörleri gerek yalnızca gd-IgA1 molekülleri kan dolaşımında saptanabilen immün kompleksler oluşturabilirler. Monomerik gd-IgA1 moleküllerinin aksine bu immün komplekslerin glomerüllerde mezengial proliferasyon ve inflamasyonun temel tetikleyicileri olduğu düşünülmektedir (71). 4.vuruşun ise tüm bu süreçler sonrasında artan sitokin üretimi ve kompleman yolağı aktivasyonu ile gelişen glomerüler inflamasyon, proliferasyon ve fibrozisi olduğu belirtilmektedir (72, 73).

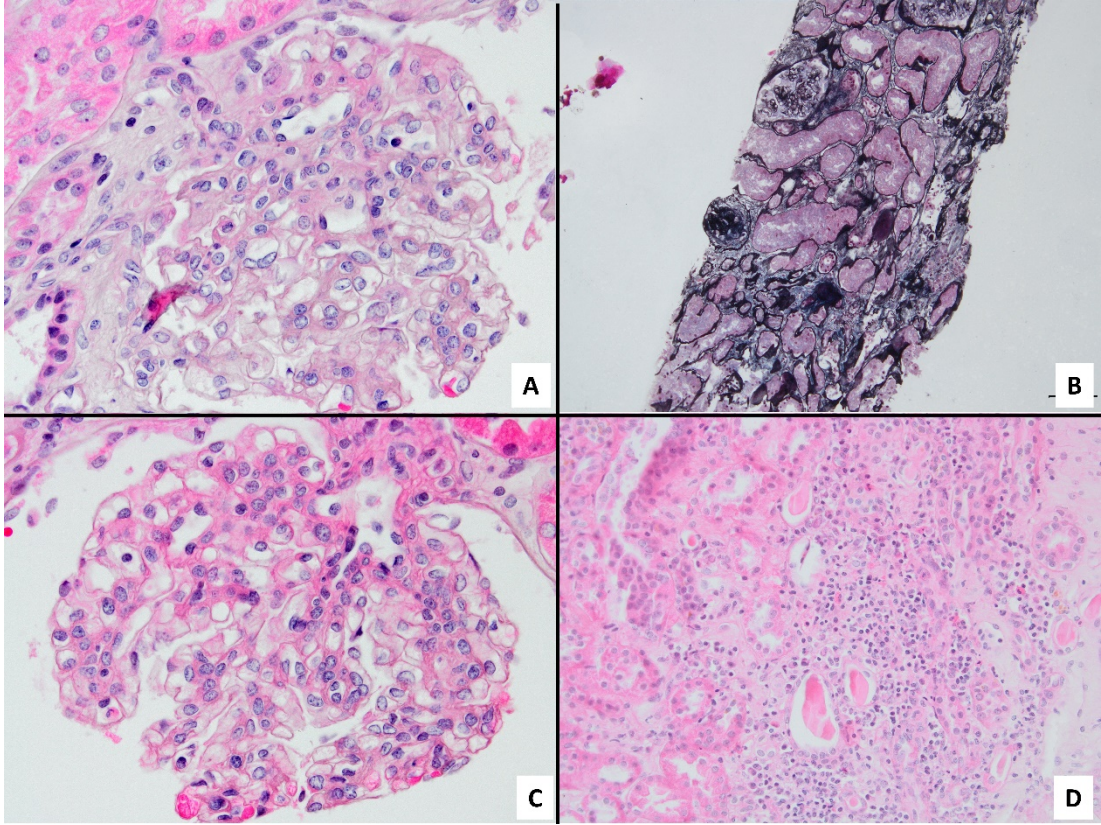
IgA Nefropati hastalığının en sık iki klinik prezantasyonu asemptomatik hematüri ve progresif kronik böbrek hastalığıdır (58). Subnefrotik proteinürinin eşlik ettiği asemptomatik mikroskobik hematüri iyi prognoz ile ilişkilendirilmiştir (74). Ancak uzun dönemde bu popülasyonun da bir kısmı son dönem böbrek hastalığına ilerleyebilmektedir (75). Uzun dönemde değişik hızlarda ilerleyen GFR kaybı pek çok kohortta izlenmiş olup 10 yıllık renal sağkalım %57-91 arasında değişmektedir (76). Hipertansiyon, proteinüri, etnik köken ve tanı anında düşük GFR kötü sonuçlanımlar ile ilişkilendirilmiştir (77). Farenjit ile eş zamanlı makroskobik hematüri hastalığın iyi bilinen bir diğer klasik prezantasyonudur. Bu klinik çoğunlukla genç bireylerde görülmekte ve tüm vakaların %10-15' ini oluşturmaktadır (78). Tekrarlayan makroskobik hematüri her ne kadar iyi prognoz ile ilişkilendirilmiş olsa da uzun dönemde proteinüri ve progresif hastalık kliniği görülebilmektedir (79).

Nefrotik düzeyde proteinüri IgA Nefropatisi' nde çok sık olmamakla beraber görülebilirken saf nefrotik sendrom kliniği nadir olarak izlenmektedir (80). Bu durumun neden olabilecek iyi tanımlanmış bir sendrom IgA Nefropatisi ile Minimal Değişiklik Hastalığı beraberliğidir ve bu olguların genel olarak steroid tedavisine iyi yanıt verdikleri bilinmektedir (81, 82). Ayrıca IgA Nefropatisi sistemik tutulumun

eşlik ettiği bir vaskülit tablosu olan Henoch-Schönlein Purpura kliniği ile de prezante olabilmektedir. Sistemik tutulum palpabl purpura, artralji veya artrit ve gastrointestinal vaskülite sekonder kanama, iskemi, nekroz gibi klinikler ile görülebilmektedir (83). Sistemik IgA vaskülit pediatrik popülasyonda daha sık görülmekle birlikte erişkinlerde hastalığın daha sık kronik böbrek hastalığı ve tanı anında daha düşük GFR ile prezante olabileceği unutulmamalıdır (84).

Patolojik olarak mezengial dominant IgA birikimini göstermek IgA Nefropatisi hastalığının kesin tanısı için gereklidir (85). Ek olarak ışık mikroskopisinde hastalığın kronisitesi ile orantılı olarak mezengial/endokapiller proliferasyon, tübüler atrofi, interstisyel fibrozis, segmental skleroz ve kresentler sıklıkla görülebilmektedir (86) (**Şekil 2.2**). Patolojik prognoz faktörleri ile yapılan çalışmalar mezengial hiperselülarite (M), endokapiller hiperselülarite (E), segmental glomerüloskleroz (S) ve tübüler atrofi/interstisyel fibrozis (T) ve kresentik oluşumların (C) renal fonksiyon kaybını en iyi predikte eden patolojik özellikler olduğu gösterilmiş ve lezyonların skorları kollektif olarak MEST-C veya Oxford skoru olarak ifade edilmiş olup günümüzde IgA Nefropatisi hastalığının patolojik tanısında rutin olarak belirtilmektedir (87).

Bahsedilen pek çok klinik ve progresif faktörün IgA Nefropati prognozunda rolünün gösterilmesi ve hastalığın sıklığı ve kötü renal sonlanımlar ile olan ilişkisi değerlendirildiğinde prognoz tayini gerek tanı gerek takipte hastalığın yönetiminde büyük önem arz etmektedir. Yakın dönemde Barbour ve arkadaşları Uluslararası IgA Nefropati Risk Tahmin Sistemi skorlamasını geliştirmişlerdir (88). Çevrimiçi olarak tüm klinisyenlerin erişimine açık olan bu uygulamaya güncel kılavuzda da değinilmiştir (25). Yaklaşık 7 yıla kadar olan dönemde GFR değerinde %50 kayıp veya son dönem böbrek kaybını öngören uygulamanın temel kısıtlaması yalnızca tanı anında kullanılabilir olmasıdır (88). Her ne kadar bu problemi üstesinden gelmek amacıyla 1. ve 2. yılda da yüksek performans gösteren bir modifiye risk skorlama sistemi geliştirilmiş olsa da halen bu skorların eksik veya fazla tedaviye neden olabileceği gösterilmiş olup uygulamaların temelde henüz bireyselleştirilmiş tedaviye kılavuzluk etmekten çok hasta ve primer doktora prognoz hakkında fikir vermek amacıyla kullanılması gerektiği belirtilmektedir (89).



Şekil 2.2. IgA nefropati tanısı alana bir vakada glomerüllerde mezengial hücre artışı ve JMS boyamasında global sklerotik glomerül ve çevresine lokalize tübüler atrofi ve interstisyel fibrozis ile karakterize skar odağı (A,B,C) . Bir başka vakada aralarında eozinofil lökositlerin de yer aldığı inflamatuvar hücre reaksiyonu (D)

Glomerüler hastalıkların tedavi felsefesine uygun olarak yaşam tarzı değişiklikleri, tuz kısıtlaması ve hipertansiyon varlığından bağımsız olarak $>0,5$ gr/gün proteinürisi olan hastalarda maksimal doz RAAS blokajı tedavinin temelini oluşturmakta ve maksimum destek tedavisine rağmen 3.ayda >1 gr/gün proteinürisi olan hastalarda steroid tedavisi önerilmekte; GFR <50 ml/dk olan alt grupta yan etkiler açısından özellikle dikkatli olunması gerektiği vurgulanmaktadır (25). Çin popülasyonunda mikofenolat mofetil ve hidroksiklorokin ile ilgili sınırlı kapsamda çalışma olmakta birlikte steroid dirençli veya bağımlı bireylerin klinik çalışmalara katılması önerilmekte ve budesonid, kompleman yolağı inhibitörleri ve diğer hedefe yönelik tedavilerin gelecekte hastalığın yönetimini değiştirebileceğine inanılmaktadır (85, 90-92).

2.2. Amiloidoz

Amiloidoz çeşitli etiyolojilere bağlı olarak nadir olarak görülen bir grup protein katlanma hastalığı grubunu kapsamaktadır. 'Amiloid' terimi ilk olarak 1953 yılında Rudolf Virchow tarafından bu fibriller yapıların iyot ve sülfirik asit tarafından boyandıktan sonra mikroskopik olarak nişasta polimerlerine benzemesinden dolayı kullanılmıştır (93). İlerleyen proteomiks teknikleri ile son yıllarda tanımlanan amiloid öncülü olabilen proteinlerin sayısı artmıştır. Günümüze dek amiloidojenik potansiyele sahip olan 36 protein tanımlanmış olup bu proteinlerin en azından 17'sinin patolojik olduğu belirlenmiştir (94). Bu bağlamda amiloidoz hastalığı da biriken protein tipine veya daha genel olarak birikimin organ tutulum tipine göre sınıflandırılabilir (95). Bu heterojen hastalık grubu altında AA-Amiloidoz, AL-Amiloidoz, Beta2-Mikroglobulin ilişkili Amiloidoz, Transtiretin ilişkili Amiloidoz, ALECT-2 ilişkili Amiloidoz ve Apolipoprotein ilişkili Amiloidoz sık görülen bazı alt grupları oluşturmaktadır.

2.2.1. Epidemiyoloji

Hastalığın nadir prevalansı kapsamlı epidemiyolojik çalışmaların sayısını kısıtlamıştır (96). AL Amiloidoz tipine özgü olarak yapılmış en kapsamlı retrospektif çalışmada 1950-1990 yılları arasında ABD' de Minnesota bölgesindeki bir popülasyonda hastalığın prevalansı 9/milyon kişiyıl olarak hesaplanmıştır (97). Yakın dönemde Avrupa kıtasında yapılan diğer çalışmalar da benzer sonuçlar ortaya koymuş ve amiloidoz sıklığı 5-8/milyon kişiyıl olarak hesaplanmıştır (98, 99). Bu çalışmalarda saptanan bir diğer önemli sonuç AA Amiloidoz olgularının AL Amiloidoz olgularına görece daha düşük bir sıklıkta bulunmuş olmasıdır (100). Bu değişimin altında yatan faktörün AA Amiloidoz hastalığına yol açan pek çok hastalığın günümüzde daha erken tanı alıp daha etkin bir şekilde tedavi edilmesi olduğu düşünülmektedir (95).

AA ve AL alt tipleri arasında son yıllarda değişen diğer epidemiyolojik özellikler tanı yaşı ve altta yatan etiyolojilerin spektrumundaki değişikliklerdir (100). AA Amiloidoz vakalarının medyan görülme yaşı 60-80 yaş aralığından 45-55

yaşlarına gerilemiştir (99). Özellikle gelişmiş ülkelerde etkin enfeksiyon kontrol ve tedavi modaliteleri sayesinde tüberküloz gibi amiloidoz ile sonuçlanabilecek kronik enfeksiyonların prevalansı azalmış ve otoimmün/otoinflamatuvar sendromlar vakaların çoğunda altta yatan etiyojolojiyi oluşturmaya başlamıştır (100).

2.2.2. Organ Tutulumlarına Bağlı Genel Klinik Özellikler

Amiloidoz alt tipinden bağımsız olarak organ tutulumlarının klinik yansımaları bu nadir hastalık grubunda tanıdan şüphelenilmesine katkı sağlayacaktır. Renal amiloidoz ile ilgili klinik belirti ve bulgular Renal Amiloidoz kısmında ayrıntılı olarak anlatılacağından bu başlıkta ele alınmamıştır.

Kardiyovasküler Sistem

Amiloid kalp hastalığı diastolik yetmezlik bulgularının dominant olduğu bir restriktif kardiyomiopati olarak prezante olmaktadır; ancak klinik belirti ve bulgular diğer kalp yetmezliği etiyojilerinden ayırım için yeterli değildir (101). Elektrokardiyogramda (EKG) görülebilen psödo-enfarkt paterni hastalara gereksiz invazif koroner anjiyografik girişimler yapılmasına neden olabilir (102). EKG’ de daha sık görülen bir bulgu hastaların yarısından fazlasında saptanan düşük voltaj paternidir (103). Koroner arterlerde amiloid birikimi nadiren miyokardiyal enfarktüs veya kardiyojenik şok ile sonuçlanabilir (104, 105). Klinik, EKG ve ekokardiyografi (EKO) bulguları ile kardiyak tutulumdan şüphe duyulan vakalarda kardiyak manyetik rezonans görüntüleme (MRG) tanı koydurucu olabilmektedir .

Sinir Sistemi

Amiloidoza sekonder gelişen periferik nöropati tipik olarak alt ekstremitelerden simetrik olarak başlayan sensörimotor bir nöropatidir ve bu özellikleriyle toplumda çok daha sık rastlanan diyabetik nöropati ile karışabilir (101). Yalnızca küçük liflerin tutulduğu amiloid nöropatide elektromiyografi (EMG) bulguları kaçırabilir ve kesin tanı için sinir biyopsisi gerekebilir (106). Ayrıca uzamış distal motor latent periyodu gibi bazı bulgular hastaya yanlışlıkla kronik inflamatuvar demiyelinizan polinöropati tanısı konmasına ve yanlış tedavilere yol açabilir (107).

Amiloidoza sekonder gelişen otonomik nöropati ortostatik hipotansiyon, psödo-obstrüksiyon ve gastroparezi belirti ve bulgularına yol açabilir (101). Otonomik nöropati tutulumu periferel nöropatiden bağımsız olarak saptanabilir (108).

Yumuşak Doku

Makroglossi AL Amiloidoz hastalarında asemptomatik olarak görülebilmekle beraber obstrüktif uyku apnesi, kserostomi, disguzi, disfaji ve iştahsızlığa neden olabilir (109). Amiloidoz hastalığına patognomonik olmamakla birlikte makroglossi amiloidoz hastalığında saptandığında yalnızca AL alt tipiyle beraberliği gösterilmiştir (101). Amiloid eklem tutulumuna bağlı hareketlerde kısıtlılık ve ağrı görülebilir ve fizik muayenesinde omuz yastığı bulgusu (*shoulder pad sign*) periartiküler amiloid birikimine sekonder görülen klasik bir bulgudur (110).

Gastrointestinal Sistem ve Karaciğer Tutulumu

Gastrointestinal sistemde amiloid birikimi asemptomatik olgulardan şişkinlik ve hazımsızlık, gastroparezi, malabsorpsiyon ve gastrointestinal kanamanın görüldüğü olguları içeren geniş bir spektrumda görülebilir (93). Yukarıda bahsedildiği üzere otonomik nöropatide de benzer bulgular görülebileceğinden ayırıcı tanı her zaman mümkün değildir. Karaciğer tutulumu tipik olarak hepatomegali ve alkalen fosfataz yüksekliği ile seyrederken transaminaz ve bilirubin yüksekliği geç dönem bulgularıdır (111). AL Amiloidoz hastalığında karaciğer enzim yüksekliğine eşlik eden poliklonal bir hipergamaglobulinemi olması amiloidoz dışı bir hepatit etiolojisi araştırmayı gerektirir (101).

Hematolojik Tutulum

Özellikle AL Amiloidoz hastalarında görülen kanama diyatezinin en sık nedeni kazanılmış faktör X eksikliği olup aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPPT) ve protrombin zamanı (PT) değerlerinde yüksekliği görüldüğü bu tabloda düşük faktör X düzeyleri karışım testleri sonrasında düzelmektedir (112, 113). Diğer kanama nedenleri arasında karaciğer tutulumu olan olgularda faktör sentezinin azalmasına sekonder görülen koagülopati, amiloid vasküler tutulumu bağlı oluşan anjiyopati, faktör V eksikliği ve kazanılmış von Willebrand Hastalığı sayılabilir (101).

2.2.4. Tanısal Yaklaşım ve Patoloji

Çoğu amiloidoz olgusunda kesin tanı doku biyopsisi ile konulabilmekte olup biyopsi lokalizasyonunun seçimi yanlış negatiflik oranının azaltılması ve tedavinin gecikmemesi adına önem arz etmektedir. Lokalize amiloid tutulumundan şüphelenilen olgularda ancak ilgili organ biyopsisi (böbrek, karaciğer vb) tanı konulmasını sağlayabilirken sistemik amiloidoz hastalarında abdominal yağ, rektum, kemik iliği veya tükürük bezi biyopsileri indirekt olarak amiloid fibrillerinin gösterilmesini sağlayarak tanı koydurabilmektedir (114).

Klinik olarak amiloid tutulumunda şüphelenilen ilgili organ biyopsisi en duyarlı tanı metodu olup biyopsi amiloid sınıflandırması için yeterli dokuyu sağlarken aynı zamanda eşlik edebilecek ek patolojileri gösterebilmektedir (115). Amiloidoz sürecine sekonder olası vasküler kırılabilirlik ve kanama diyatezi nedeniyle biyopsinin güvenliğinden şüphe duyulmasına yol açabilse de yapılan çalışmalarda renal biyopsi komplikasyon oranları kontrol gruplarına benzer oranlarda saptanmıştır (116, 117)

Abdominal subkutan yağ aspirasyonu teknik olarak en kolay uygulanabilir yöntem olsa da alınan yağ dokusu miktarı, amiloid tipi ve patolojik deneyime bağlı olarak çok değişken bir duyarlılık aralığına sahiptir (118). Abdominal yağ doku biyopsisi derin yağ doku bileşenlerinin de elde edilmesini sağlayarak duyarlılığı arttırabilmektedir (115).

Rektal biyopsi abdominal subkutan yağ doku aspirasyonu ile birlikte sistemik amiloidozda indirekt amiloid birikimini göstererek en sık tercih edilen biyopsi modalitelerinden biri olsa da literatürde rektal biyopsinin tanısal kuvvetine ilişkin çelişkili veriler mevcuttur (114). Rektum dokusunda amiloid birikimi en sık muskularis mukoza ve submukozada görülmekte olup yalnızca mukozanın örneklenmesi yanlış negatifliğe neden olabilmektedir (119). Genel olarak duyarlı bir biyopsi yöntemi olmasına rağmen hasta hazırlığı gerektirmesi, nadiren kanama ve perforasyon gibi komplikasyonların eşlik edebilmesi ve özellikle abdominal subkutan yağ biyopsisi negatifliği durumunda duyarlılığın azalması nedeniyle rektal biyopsi amiloid tanısında ilk basamakta önerilmemektedir (119).

Kemik iliği biyopsisi özellikle AL Amiloidoz' dan şüphelenildiğinde tanısal değerlendirmenin rutin bir parçasını oluşturmaktadır. Bazı AA Amiloidoz serilerinde kemik iliğinde saptanan amiloid birikim oranlarının düşük olmaması nedeniyle kemik iliği aspirasyonu/biyopsisi sonucundan amiloid birikiminin gösterilmesi plazma hücre diskrazisi varlığında bile direkt olarak AL Amiloidoz olarak kabul edilmemeli ve kesin tanı kapsamlı klinik değerlendirme ve monoklonalite çalışmaları sonrasında konulmalıdır (114, 120).

2.3. AA Amiloidoz

AA Amiloidoz hastalığı çeşitli kronik inflamatuvar etiyolojilerin zemininde gelişen multisistemik bir amiloidoz alt tipidir. Prekürsör amiloidojenik protein Serum Amiloid A (SAA) proteinin olup SAA normal bireylerde kan çok düşük konsantrasyonda bulunan bir akut faz reaktanıdır (121). Karaciğerden İnterlökin-6 (IL-6) stimülasyonu ile üretilen SAA C-reaktif protein (CRP) ile pek çok açıdan benzerlik taşımakta ve düzeyleri pek çok inflamatuvar hastalıkta paralellik göstermektedir (122, 123).

Spesifik SAA1 gen polimorfizmleri altta yatan etiyolojiden bağımsız olarak SAA proteinin amiloid fibrillere dönüşebilme riskini arttırmaktadır (124). Beyaz ırkta Ailevi Akdeniz Ateşi, Romatoid Artrit ve Juvenil İdiyopatik Artrit tanısı olan bireylerde SAA1.1 alleli ile AA Amiloidoz arasında kuvvetli bir korelasyon saptanmıştır (125, 126). Ancak Japonya' da Romatoid Artrit hastalarında yapılan bir çalışmada homozigot olarak SAA1.3 alleli bulunan bireylerde AA Amiloidoz riski yüksek olarak saptanırken SAA1.1 allelinin koruyucu olduğu gösterilmiştir (127, 128). Bu çelişkili sonuçlar SAA spesifik allelinden ziyade homozigotluk durumunun amiloidoz riski açısından daha önemli olabileceğini düşündürmektedir (129).

Ishii ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada romatoid artrite sekonder AA Amiloidoz gelişen hastalarda serum SAA düzeylerinin amiloidoz komplikasyonu görülmeyen hastalara göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu ve yüksek SAA düzeylerinin CRP düzeylerine göre amiloid birikimi ile daha iyi bir korelasyona sahip olduğu gösterilmiştir (130). Ancak literatürdeki diğer pek çok çalışmada SAA

düzeyi ile amiloid birikimi arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (131, 132). Bu veriler yüksek SAA düzeyinin her ne kadar AA Amiloidoz gelişimi için bir gereklilik olsa da tek başına yeterli olmadığını ve zayıf korelasyon nedeniyle tanısal bir belirteç olarak kullanılamayacağını göstermektedir (121). Ancak amiloidoz gelişen hastalarda SAA düzeylerinin prospektif olarak amiloid birikimi ile korele olduğu ve SAA düzeyinin son dönem böbrek hastalığı ve mortalitenin kuvvetli bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (133, 134). Bu nedenle SAA ölçümünün tedavi takibi ve prognoz tayininde önerilmekte; ancak bireysel konsantrasyonların obezite, sigara, hipertansiyon ve diyabet gibi komorbiditelerden etkilenebileceği göz önünde bulundurulmalıdır (121).

Her türlü kronik inflamatuvar süreç potansiyel olarak sekonder amiloidoz gelişimine neden olabilir; ancak gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerde kronik enfeksiyonlar; gelişmiş ülkelerde ise inflamatuvar artritler en sık AA Amiloidoz etkenleri olarak gösterilmektedir (129) (**Tablo 2**). Romatoid artrit sürecinde diğer çok inflamatuvar durumda görüldüğü gibi uzun süren kontrol edilmemiş inflamasyonun riski arttığı gösterilmiştir (135). Tüberküloz gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerde kronik enfeksiyon etkenleri arasında en sık görülen etiyojilerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır (136, 137). Gelişmiş ülkelerde ise özellikle immünsupresif bireylerde gelişen atipik enfeksiyonlar sekonder amiloidoza yol açabilmekte ve tedavideki gecikmelerin amiloidoz riskini arttırdığı düşünülmektedir (138-140). Herediter periyodik ateş sendromlarında yüksek bir sekonder amiloidoz riski bulunmakta ve yine subklinik inflamasyonun önemli bir risk faktörü olduğu görülmektedir (129). Nedeni bulunamayan AA Amiloidoz vakalarında ise obezite ve ileri yaşın riski arttırabileceği belirtilmiştir (141). Ancak genel olarak uzun süreli kronik inflamasyon ile giden hastalıkların ancak küçük bir yüzdesinde bu komplikasyon görüldüğü için henüz belirlenememiş pek çok genetik ve çevresel faktörün AA Amiloidoz patogenezinde katkıda bulunduğu düşünülmektedir (142).

Tablo 2. Sekonder AA amiloidoz etiyolojileri ve başlıca örnekler (129)

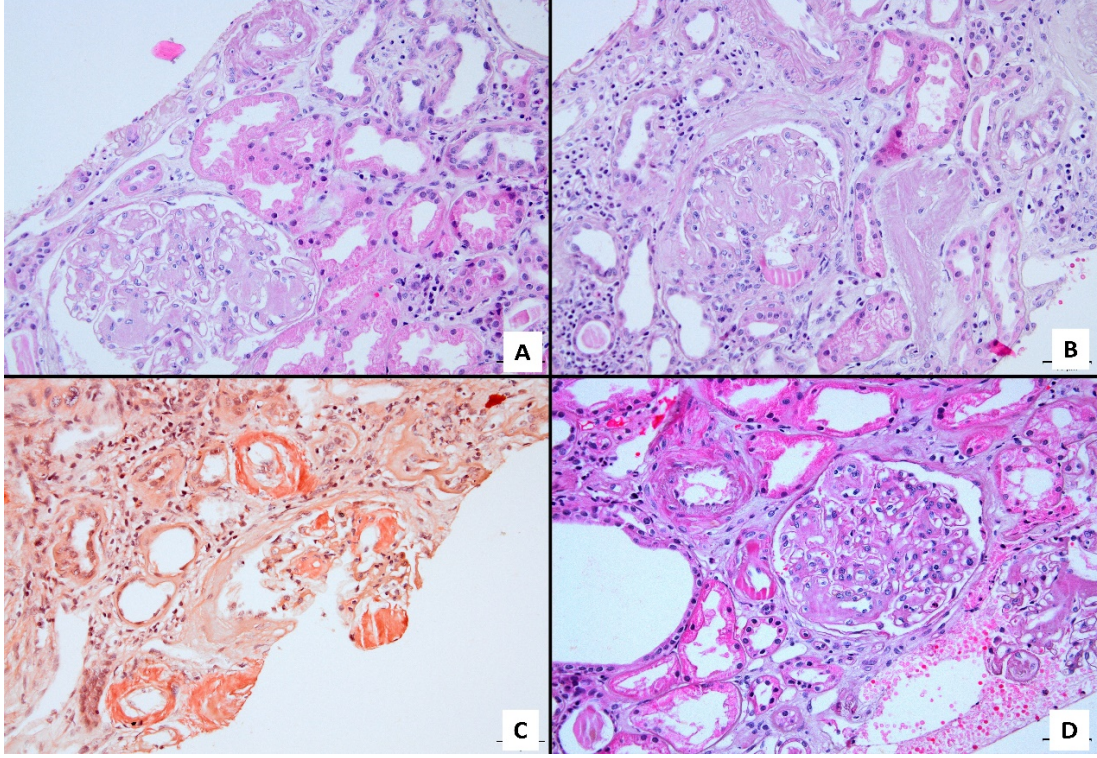
AA Amiloidoz etkenleri	Başlıca örnekler
Kronik Enfeksiyonlar	Tüberküloz Lepra Whipple hastalığı Osteomyelit Kronik piyelonefrit Subakut bakteriyel endokardit Kronik ülserler Kistik fibrozis Kartagener sendromu Bronşiektazi Hidradenitis Suppurativa
İmmün yetmezlik tabloları	<i>Common variable</i> immünyetmezlik Siklik nötropeni Hiperimmünoglobulin M sendromu X-bağlı agammaglobülinemi AIDS
İnflamatuar artritler	Ankilozan spondilit Juvenil idiyopatik artrit Psöriatik artrit Reiter sendromu Romatoid artrit Erişkin başlangıçlı Still hastalığı
Sistemik vaskülitler	ANCA-ilişkili vaskülit Behcet hastalığı Dev hücreli artrit Poliartreitis nodoza PMR (<i>Polymyagia rheumatica</i>) SLE
Otoinflamatuvar hastalıklar	Cryopyrin-ilişkili periyodik ateş sendromu

	Ailevi Akdeniz Ateşi Mevalonat kinaz eksikliği TNFR-ilişkili periyodik ateş sendromu
Neoplaziler	Adenokarsinomlar Bazal hücreli karsinom Karsinoid tumor Castleman hastalığı Gastrointestinal stromal tümör Saçlı hücreli lösemi Hepatik adenom Hodgkin hastalığı Mezotelyoma Renal hücreli karsinom Sarkomlar

Proteinüri hastaların %95' inde ilk klinik prezantasyon olup bu hastaların yaklaşık yarısında nefrotik sendrom kliniği görülmekte ve olguların %10' u son dönem böbrek hastalığı ile prezante olabilmektedir (129). Diğer alt tiplere göre daha az sıklıkla olmakla birlikte kardiyak ve nöropatik tutulum nadir olarak görülmektedir (143). Hastaların yalnızca %10' unda klinik olarak hepatomegali saptanırken sintigrafik görüntülemelerde daha yüksek oranda karaciğerde amiloid birikimi saptanmaktadır (143). İntestinal tutulum olan hastalarda kronik ishal ve karın ağrısı ile görülen malabsorbsiyon tablosu görülebilmektedir (144). Hastalarda nadiren nodüler akciğer tutulumu saptanabilmektedir (145). Çoğu olgu kronik ve indolan olarak seyretse de akut aciller nadiren görülebilmektedir. Amiloid birikimine sekonder acil cerrahi gerektiren karaciğer ve dalak rüptürleri veya intestinal tutulumla bağlı olarak gastrointestinal kanama veya obstrüksiyon bildirilmiştir (146, 147).

Hastalığın kesin tanısı için amiloid birikiminin gösterilmesi gerekmektedir. Altın standart polarize ışık mikroskopunda Kongo kırmızısı boyası ile yeşil çift kırıcılığın gösterilmesidir (129) (**Şekil 2.3**). İmmünohistokimya anti-AA antikorları ile fibril protein tipini kesinleştirebilir; ancak yorumlanması zor veya tanı konulamayan

olgularda kütle spektroskopisi çalışmaları gereklidir (148, 149). Elektron mikroskopunda amiloid fibrilleri 10-15 nm çapında, dallanmayan, değişken uzunluklarda düz filamanlar olarak izlenmektedir (150).



Şekil 2.3. Mezangial alanların amiloid ile uyumlu homojen eozinofilik amorf madde birikimi ile genişleme ve nodülasyon (A,B). Bazı alanlarda ise arterioller kalınlaşmanın daha koyu eozinofilik hyalen birikimi nedeniyle olan ve amiloidin PAS boyamasında pozitif reaksiyon (C). Kongo kırmızısı ile amiloid birikim pozitif boyanma (D).

AA Amiloidoz hastalığının medyan sağkalımı 6-9 yıl olup başlıca kötü prognostik faktörler proteinüri, düşük GFR, son dönem böbrek hastalığı, kardiyak tutulum, karaciğerde amiloid birikiminin gösterilmesi, tanı anında ileri yaş ve altta yatan hastalığın kronik sepsis veya Crohn hastalığı olarak saptanmış olmasıdır (143, 151). Pozitif prognostik faktörler ise literatürde altta yatan etiyolojinin periyodik ateş sendromu olması ve SAP sintigrafisinde amiloid birikiminin gerilemesi ile takipte SAA düzeylerinin düşmesi olarak belirtilmiştir (129, 152).

Hastalığın temel tedavisi altta yatan kronik inflamasyonun baskılanması olup bu durumun kontrol edilemediği dirençli vakalarda amiloid birikimini azaltmak için çeşitli hedefe yönelik tedaviler geliştirilmiştir. Eprodizat heparan sülfata benzeyen kimyasal konfigürasyonu ile SAA proteinlerinin glikozaminoglikanlara bağlanma bölgesi için rekabete girmekte olup ilacın in vivo fare çalışmalarında amiloid birikimini azalttığı gösterilmiştir (153). Ancak AA Amiloidoz hastalarında yapılan faz II/III çok merkezli randomize çalışmada son dönem böbrek hastalığı veya mortalite üzerinde istatistiksel anlamlı etkisi gösterilememiştir (154). Bir diğer hedefe yönelik tedavi olan CPHPC molekülü SAP proteininin amiloid fibrillere bağlanmasının engellemek üzere tasarlanmıştır (155). Öncül bir klinik çalışmada molekülün ciddi bir yan etkiye neden olmadan SAP düzeyini kalıcı ve belirgin bir şekilde baskıladığı gösterilmiştir (156). Hedefe yönelik tedavilerde gelecekteki gelişmeler dirençli AA Amiloidoz hastalarını sağkalımına önemli ölçüde katkı sağlayacaktır.

2.3.1. Renal AA-tip Amiloidoz

Renal tutulum da AA Amiloidoz vakalarının ilgili başlıkta da belirtildiği üzere en sık klinik prezantasyonunu oluşturmaktadır (129). AA Amiloidoz hastalığının en sık organ tutulumunun renal tutulum olduğu göz önünde bulundurulduğunda AA Amiloidoz epidemiyolojisinin renal amiloidoz etiyolojilerini doğrudan etkileyebilmektedir. İngiltere’ de Ulusal Amiloidoz Merkezi’ nde yapılan 374 renal AA Amiloidoz hastasını kapsayan 15 yıllık bir prospektif çalışmada Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) olguların yalnızca %5’ inden sorumlu olarak saptanırken AAA prevalansının ve MEFV mutasyonunun daha prevalan olduğu toplumlarda Ailevi Akdeniz Ateşi renal AA Amiloidoz vakalarının en sık nedenini oluşturmaktadır (143, 157). Ailevi Akdeniz Ateşi hastalarına renal amiloidoz tanı yaşı 40-50 aralığında olurken altta yatan inflamatuvar hastalıkların daha etkili ve erken tedavileri nedeniyle diğer AA Amiloidoz vakalarında renal tutulum 50-70 yaşlarında görülmektedir (129, 158).

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) hastalığında amiloidoz mortaliteyi belirleyen temel komplikasyondur (159). 1970’li yıllardan itibaren kolşisin tedavisi

sekonder AA Amiloidoz insidansındaki belirgin düşüşte en önemli katkısı sağlamıştır (160, 161). 2005 yılında Türk Ailevi Akdeniz Ateşi Çalışma Grubu tarafından 2838 hastada yapılan bir çalışmada amiloidoz sıklığı %12.9 olarak hesaplanmıştır (162). Yüksek mortalite riski nedeniyle AA Amiloidoz gelişimi açısından risk grubundaki hastaların saptanması saptanmasına yönelik pek çok çalışma yapılmıştır. Erkek cinsiyet, ailede amiloidoz gelişimi öyküsü, yaşanan coğrafi bölge, tanının gecikmesi, artrit ve spesifik MEFV gen mutasyonları amiloidoz gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (161, 163). Her ne kadar literatürde bazı çelişkili çalışmalar mevcut olsa da M694V homozigot kalıtımın amiloidoz gelişimi açısından en yüksek riskli genotip olduğu düşünülmektedir (161).

Renal AA Amiloidoz hastalarında proteinüri en sık klinik prezantasyonu oluşturmakta; tanı anında proteinüri subnefrotik düzeyde olabilirken pek çok hastada nefrotik sendrom kliniği görülebilmektedir (159). Albümin değerleri çok düşük olabilmekte ve özellikle kardiyak tutulumun da eklendiği olgularda hipervolemi yönetimi zorlu ve diüretik tedaviye dirençli seyrebilmektedir (164). Çoğu AA Amiloidoz olgusu indolan ve kronik bir seyir gösterirken AAA hastalarının nadir bir alt grubu ateş, inflamatuvar belirteçlerde yükseklik, masif proteinüri ve son dönem böbrek hastalığına hızlı bir gidiş ile karakterize olan ‘amiloid fırtınası’ kliniği ile prezante olabilmektedir (165). Bu tablonun süperimpoze enfeksiyonlar ile tetiklendiği düşünülmektedir.

Işık mikroskopisinde amorf görünümde olan bu fibriller en sık glomerülde birikim göstermektedir (164). Altın standart polarize ışık mikroskopunda Kongo kırmızısı boyası ile yeşil çift kırıcılığın gösterilmesi olup bu boyanma özelliği potasyum permanganat ile müdahale sonrasında kaybolmaktadır; ancak günümüzde hassas immünohistokimyasal yöntemler ile anti-AA antikorlarının kullanımı bu tip konvansiyonel histokimyasal yöntemlerin yerini almıştır (164). Amiloid birikiminin böbrek parankimindeki lokasyonu kliniğe etki edebilmektedir. Nadir bir hasta alt grubunda yalnızca tubulointerstisyumda amiloid birikimi daha düşük düzeyde bir proteinüri ile seyrederken glomerüler birikimin de eşlik etmesi hastalığın nefrotik düzeyde proteinüri ile ve daha hızlı GFR kaybıyla prezante olma riskini arttırmaktadır (164). Tübulointerstisyel nefrit AAA sekonder renal amiloidoza eşlik edebilir ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (166).

Renal AA Amiloidoz tedavisi altta yatan hastalığın etkin tedavisi olup inflamatuvar hastalıklarda anti-inflamatuvar tedaviler ile proteinürinin gerilediği gösterilmiştir (167, 168). Altta yatan inflamasyonu baskılamamanın mümkün olmadığı dirençli klinik tablolarda yukarıda da bahsedilen hedefe yönelik tedavi çalışmaların en önemli klinik sonuçlarından biri renal hasarın geriletilmesi olup henüz klinik pratikte yaygın olarak kullanılabilecek bir ajan olmasa da çalışmalar devam etmektedir.

Kolşisin Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığına sekonder gelişen AA Amiloidoz hastalığında proteinüri seyrini yavaşlatabilir ve geriletebilir (167). Günlük etkin dozun renal fonksiyonları normal aralıkta olan hastalarda minimum 1.5 gram olması gerekmektedir (169). Ayrıca tüm proteinürik hastalarda sıkı kan basıncı kontrolü sağlanmalı ve endike durumlarda lipid düşürücü tedavi verilmeli ve tolere edilebilen maksimum doz kolşisin tedavisine rağmen inflamasyon ve proteinürinin devam ettiği dirençli hastalarda biyolojik tedavileri (anakinra, kanakinumab, rilonasept) gecikmeden tedaviye eklenmelidir (159, 170).

AA Amiloidoza sekonder son dönem böbrek hastalığında renal transplantasyon hastaların tanı yaşı da düşünüldüğünde önemli bir tedavi alternatifidir. Literatürde AA Amiloidoz hastalarında renal transplantasyon ile büyük kohortlarda greft sağkalımının non-amiloid etiyolojilere benzer olduğu bildirilmiştir (171). Ancak daha yüksek oranda görülen post-transplant enfeksiyon ve kardiyovasküler komplikasyonlar nedeniyle hastaların sağkalımının daha düşük olduğu saptanmıştır (172). Nakil sonrası inflamasyonun sıkı kontrolüne devam edilmesi büyük önem arz etmekte olup bu bağlamda kolşisin ve/veya diğer biyolojik ajanların nakil süreci ve sonrasında kullanılan immünsupresif tedaviler ile olası ilaç etkileşimlerine dikkat edilmelidir (159).

2.4. Nefroloji Biliminde Proteomiks ve Metabolomiks

Belirli bir zaman ve biyolojik domainde bulunan tüm protein içeriğine proteom; proteomu inceleyen çalışma alanı ise proteomiks olarak adlandırılmaktadır (173). Somatik mutasyonlar fizyolojik süreçte gerçekleşmeye devam etmekle birlikte

nefrolojik bakış açısından böbrek genomu ile ilgili bir genomik çalışma için vücutta periferik kan başta olmak üzere herhangi uygun bir kaynaktan DNA örneği alınabilir (174). Ancak proteom ve metabolom yüksek derecede dinamik olup farklı organ sistemlerinden alınacak örneklerde ciddi heterojenite mevcuttur (175). Bu nedenle proteom ve metabolom incelenen organ sistemine ve hastalığına daha doğrudan ilişkili bilgiler sağlamakta ve genomik içeriğin belirli bir doku ve zamanda fonksiyonel olarak nasıl eksprese olduğuna dair değerli bilgiler sağlamaktadır.

‘Omiks’ çalışmaları ile son yıllarda yeni biyobelirteçlerin keşfi hızlanmış ve böbrek biyopsi materyali, kan ve idrar örneklerinde yapılan çalışmalar ile GFR ve proteinüri miktarı gibi geleneksel belirteçlere göre belirli sonlanım noktaları ile daha iyi korelasyon gösteren biyobelirteç setleri saptanmıştır (176). Proteomik ve metabolomik analizlerin idrar örnekleri ile çalışabilmesi pek çok avantaj sağlamaktadır. İdrar örnekleri hastaya herhangi bir invazif girişim yapmaksızın kolay elde edilebilmekte ve hali hazırda nefroloji pratiğinde klinisyen tarafından çok sık olarak istenmekte, diğer biyolojik örneklerle kıyasla 24 saatlik örnekler elde edilebildiğinden gerektiğinde yüksek hacimlerde elde edilebilmektedir (176).

Metabolit miktar ve çeşitliliği diğer tüm biyolojik süreçlerden etkilendiği için genomik, transkriptomik ve proteomik analizi destekleyen ve özetleyen bilgiler sunmaktadır (177). Ancak proteomik analiz sonuçlarında karşılaştığımız protein-protein etkileşimler ve ağ analizleri konusundaki henüz başlangıç seviyesindeki bilgilerimize karşın uzun yıllardır süren biyokimyasal çalışmalar nedeniyle metabolomik analizlerin yorumlanmasında kullanılan metabolik yollar üzerine kapsamlı bir literatür bulunmaktadır (177). Yine diğer omiks analizlerine göre metabolomik analizlerin ortaya koyduğu bir diğer katman metabolomik analizlerin diyet, mikrobiyota ve çevresel etmenlerden etkilerinin yansıtabilmesidir (178).

Gen ontolojisi, yolak ve ağ analizleri omiks veri kümelerinin düzenlenmesine yardımcı olan güçlü biyoinformatik yöntemlerdir. Omiks analizlerinin ilerlemesiyle hastalıkların farklı aşamalarında baskın olan yolların saptanması, bu yollar ile ilişkisi biyobelirteçlerin keşfedilmesi ve ilaç etki/yan etkilerinin farklı biyolojik domainlere etkisi büyük veri setlerinin bahsedilen yöntemler aracılığıyla biyoinformatik çözümlenmesi sayesinde gerçekleşmektedir.

Gene Ontolojisi (GO) biyoinformatik alanında omiks çalışmalarının ileri analizleri için kullanılmakta olup proteomik analizler sonucunda saptanan proteinlerin eksprese olduğu genleri yalnızca adlandırmak yerine genin fizyolojik domainine odaklanmaktadır (179). GO terminolojisinde moleküler fonksiyon veya aktiviteler, görevli olunan biyolojik süreçler ve bulunduğu hücresel lokasyonlar ifade edilmektedir. Yolak analizleri ise fonksiyonel düzeyde proteinlerin bilinen yolak veri tabanları taranarak hangi süreçler ile ilgili olduğunun saptanmasını sağlamaktadır (179). *KEGG*, *Reactome*, *Wiki pathways* en sık kullanılan veri tabanları arasındadır. Ancak yolak analizinin yetersiz kaldığı bir nokta protein-protein etkileşimleri ve çok yönlü yolakları bütüncül olarak analiz etmeyi sağlayan yöntem ağ analizleridir. *IntAct*, *BioGRID*, *STRING* en sık kullanılan veri tabanlarına örnek olarak verilebilir.

Proteomik ve metabolomik analizlerin pek çok üstünlüğü bulunmakla birlikte genomik ve transkriptomik analizlere göre zayıf olduğu bir husus nedensellik açısından yorumlamayı zor kılmasıdır (180). Örneğin GFR değeri düşük olan bir hasta grubunda saptanan proteinler hastalığa spesifik bir biyobelirteç olmaktan ziyade filtrasyon bariyerindeki hasar kaynaklı olabilir. Ayrıca yukarıda belirtildiği üzere metabolomik analizlere açıklık, gün içi örnek alınan saat, cinsiyeti diyet ve mikrobiyota gibi pek çok faktörün etki etmesi bir yandan ekstrinsik ve intrinsik faktörleri bütüncül olarak incelemeye olanaklı kılarken bir yandan da küçük bir örnekleme sorununda hastalığa spesifik olmayan metabolitlerin gruplar arasında farklı düzeylerde sonuçlanmasına neden olabilir (178).

Günümüzde en sık kullanılan proteomiks yöntemleri kütle spektroskopisi (Mass spectroscopy, MS) bazlı yöntemlerdir. MS analizinden önce proteinlerin çeşitli ayrıştırma ve fraksiyonlama yöntemleri ile analize uygun hale getirilmesi gerekmektedir (181). İki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi (2D-PAGE) peptidleri sahip oldukları elektrik yükü ve kütlelerine göre ayıran bir yöntem olup uzun süre proteomik analizlerde standart prosedür olarak kullanılmıştır. Ancak gerekli olan iş gücü ve zamanın yüksek olması yeni nesil yüksek verimli proteomik çalışmalar için bu tekniğin kullanımını azaltmıştır (orijinal makale). Proteomik analizler için sıvı kromatografisi, yüksek veya çok yüksek performanslı sıvı kromatografisi (sırasıyla LC, HPLC, UHPLC); metabolomik analizler için de yine sıvı kromatografisine ek olarak gaz kromatografisi (GC) ve nükleer manyetik

rezonans (NMR) bazlık teknikler yüksek verimli proteomik ve metabolomik analizlerde günümüzde sıkça kullanılan tekniklerdir (182, 183).

Sıvı kromatografisi (Liquid chromatography, LC) bir sıvı karışımın bileşenlerinin, sabit ve hareketli iki faz arasında ayrımının sağlandığı bir fiziksel ayırma yöntemidir. LC uygulaması; adsorpsiyon kromatografisi, bölme kromatografisi, iyon değişim kromatografisi, boyut dışlama kromatografisi ve afinite kromatografisi olmak üzere beş kategoriye ayrılabilir (184). Bunlar arasında en yaygın olarak kullanılan varyant, polar olmayan (hidrofobik) bir durağan faz ve bir polar mobil faz kullanan bölme kromatografisi tekniğinin ters faz modudur (184). Pratikte mobil faz, su ve diğer polar çözücülerin (örneğin metanol, izopropanol ve asetonitril) bir karışımı iken sabit faz uzun zincirli alkil gruplarının düzensiz veya küresel şekilli 5 µm çapında gözenekli silika parçacıklarının dış ve iç yüzeylerine bağlanmasıyla hazırlanır (185).

Kütle spektroskopisi molekülleri yük/kütle (m/z) oranlarına göre ayıran ve tanımlayan analitik bir tekniktir. Pek çok farklı alt tipi olmasına rağmen temel fiziksel yöntem olarak elektrik veya manyetik alan ile iyonlaştırılmış molekülleri manipüle ederek m/z oranlarını saptanmaktadır (185). MS analizinin temel bileşenleri iyon kaynağı, kütle analizörü, dedektör, data ve vakumlama sistemleridir. MS cihazlarının temel ayırım noktaları kütle analizörleri ile yapılmakta olup quadrupole, time-of-flight (TOF), ion traps, ve birden çok yöntemin beraber kullanıldığı hibrit sistemler (quadrupole-TOF (QTOF)) bu sistemlere örnek olarak verilebilir.

2.4.1. Glomerüler Hastalıklarda Üriner Proteomiks Uygulamaları

Yüksek verimli tekniklerin gelişmesiyle MN, FSGS ve IgAN hastalıklarında tanısal, prognostik, patofizyolojik ve tedavi cevabına yönelik pek çok idrar proteomiks çalışması yapılmıştır. Pang ve arkadaşları nLC-MS/MS ile primer MN hastalarına özgü 249 protein belirlemişler ve bu proteinler içinden α -1-antitripsin ve afamin western blotting analizi ile gösterilmiştir (186). GO analizinde platelet degranülasyonu, kalsiyum bağlanması ve ekstraselüler eksozomlar sırasıyla en önemli biyolojik süreç, moleküler fonksiyon ve hücrenel komponent olarak bildirilmiştir (186). Rood ve arkadaşlarının MN hastaları ile FSGS ve kontrol grubu

arasında yaptığı karşılaştırmalı üriner ekzozom proteomik analizinde lizozom ve endozom biyogenezinde kritik rol oynayan Lizozomal İntegral Membran Protein tip 2' in MN grubunda daha yüksek olduğu görülmüş ve patolojik olarak immünfloresan boyamasıyla bu durum konfirme edilmiştir (187). İmmüsupresif tedaviye cevap veren ve vermeyen hastaların MALDI-MS ile karşılaştırıldığı bir çalışmada *Sonic Hedgehog* ve α -düz kas Aktin proteinlerinin tedavi cevabını predike edebilecek biyobelirteçler olduğunu belirtilmiştir (188).

Perez ve arkadaşları FSGS ve Minimal Değişiklik Hastalığı arasında tanısal biyobelirteçlerin araştırılması amacıyla MALDI-TOF MS kullanarak karşılaştırmalı bir üriner proteomiks çalışması yapmıştır. Uromodülin FSGS grubunda daha yüksek; α -1-antitripsin ise daha düşük saptanmıştır (189). Kalantari ve arkadaşları erken ve ileri evre FSGS hastalarını nLC-MS kullanarak karşılaştırdığı bir çalışmada haptoglobulin ve ribonükleaz 2 proteinlerinin ileri dönem hastalık ile en çok ilişkisi olan proteinler olduğunu saptamışlardır (190). Aynı grubun steroid tedavisi cevabını karşılaştırdığı bir diğer çalışmada apolipoprotein-A1 ve *matrix-remodelling protein 8* (MXRA8) proteinlerinin steroid duyarlı ve dirençli gruplar arasında düzeyi en yüksek anlamlılıkta değişen proteinler olduğu bildirilmiştir (191). Wang ve arkadaşlarının 2DE-MD/MS aracılığıyla yine FSGS ve Minimal Değişiklik Hastalığı' nı karşılaştırdığı bir başka idrar proteomiks çalışmasında ubiquitin-60S ribozomal protein L40' In FSGS grubunda yüksek olarak saptandığı ve bu durumunun FSGS hastalığında ubiquitin-proteozom sisteminin aktivasyonu ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (192).

Neprasova ve arkadaşlarının tanısal biyobelirteç keşfi amacıyla IgAN hastalarını diğer etiyojilere bağlı kronik böbrek hastalığı ve sağlıklı bireyler ile karşılaştırdığı bir üriner proteomiks çalışmasında IgA-Uromodulin kompleksi, α -1-antitripsin ve Gd-IgA1 IgAN hastalarının diğer gruplardan ayırabilmiştir (193). Graterol ve arkadaşları MALDI-TOF/MS aracılığıyla Oxford klasifikasyonuna göre IgAN hastalarını patolojik özellikleri temel alınarak karşılaştırdığı bir kan ve üriner proteomik analizi yapmışlardır (194). Tübülointerstisyel hasar (T), endokapiller hasar) ve glomerüloskleroz (G) skorları dahil edilen çalışmada Uromodulin, α -1-antitripsin ve bradikinin proteinlerinin patolojik lezyonların ağırlığı ile korele olduğu

bildirilmiştir (194). Rochetti ve arkadaşları IgA Nefropati hastalarının ACE inhibitörü tedavisine yanıtına göre hastaları gruplayarak karşılaştırmalı bir üriner proteomiks analizi yapmışlar ve e kininojen, inter- α -tripsin inhibitörü ağır zinciri 4 ve transtiretin tedaviye cevap veren ve vermeyen hastaları en iyi ayıran proteinler olarak bildirilmiştir (195). Yokota ve arkadaşları 2DE-DIGE aracılığıyla yaptığı IgAN hastalarını kontrol grubu ile karşılaştırdığı bir çalışmada anlamlı fark gösteren 172 protein saptanmış; patofizyolojik rolü net olarak anlaşılammakla birlikte diğer glomerüler hastalıklarda da saptanan α 1-mikroglobulin proteininin en uygun biyobelirteç özelliklerine sahip olduğunu bildirmişlerdir (196).

2.4.2 Glomerüler Hastalıklarda Üriner Metabolomiks Uygulamaları

Taherkhani ve arkadaşlarının MN hastaları ile eşleştirilmiş sağlıklı kontrol grubu arasında yaptığı GC-MS ve NMR spektroskopisi yöntemlerinin kombine olarak kullanarak yaptığı bir çalışmada fumarat, karnozin, dopamin, nikotinamid D-ribonükleotit, piridoksal, deoksiguanozin trifosfat, nikotinamid, deoksiüridin, fenilalanin, triptamin, süksinat, adenzin monofosfat ve L-sitrülin metabolitleri uygun biyobelirteçler olarak saptanmıştır (197). Çalışmanın GO analizinde pirimidin biosentezi, pürin ribonükleozit metabolik yolağı ve aromatik amino asit ailesi ilişkili metabolik yolların aktif olduğu görülmüştür (197). Aynı grubun yine MN hastaları üzerinde karşılaştırma grubunda FSGS ve IgAN hastalarının da bulunduğu bir diğer çalışmada α -hidroksibütirik asit, 3,4-dihidroksimandelik asit, 5 α -kolestanon, 2-hidroksiglutarik asit lakton, nikotinamid, epikoprostanol ve palmitik asit metabolitlerinden oluşan bir modelin MN tanısını istatistiksel açıdan en iyi şekilde predikte ettiğini göstermiştir (198).

Hao ve arkadaşları 25 FSGS, 24 MGN, 14 MCD (*Minimal change disease*), 26 IgAN ve 35 sağlıklı kontrol bireyde 1H-NMR spektroskopisi aracılığıyla üriner metabolomiks analizi yapmışlardır (199). Trimetilamin üriner seviyeleri FSGS grubunda belirgin derecede yüksek saptanırken valin, pirüvat, izolösin, tirozin, hippurat, sitrat, fenilasetilglisin, β -hidroksil izovalerat ve 3-metilhistidin seviyeleri FSGS hastalarında diğer tüm glomerülopatilere göre düşük saptanmıştır (199). Kalantari grubunun yaptığı bir başka çalışmada FSGS hastaları proteinüri düzeylerine göre iki gruba ayrılarak proteinüri ile ilgili metabolit belirteçlerini

incelemiştir (200). NMR kullanarak proteinürisi 3000 µmg/gün' den fazla ve daha az olan iki hasta grubundan elde edilen idrar örneklerini karşılaştırılan çalışmada sitrulin, prolin, dimetilamin, asetoasetat, valin, al faketoizovalerik asit, izobutirat, histidin, D-Palmitilkarnitin ve N-metilnikotinamid dahil olmak üzere 10 metabolit prognostik açıdan proteinüri ile ilişkilendirilmiştir (200). Sui ve arkadaşları NMR spektrometresinin kullanıldığı bir metabolomiks çalışmasında progresyon açısından yüksek ve düşük riskli IgAN hastasını karşılaştırmıştır (201). Sağlıklı kontrollere kıyasla hem düşük hem de yüksek riskli hastalarda daha yüksek serum fenilalanin, laktat, miyo-İnositol, L6 lipitleri, L5 lipitleri ve L3 lipitlerinin yanı sıra daha düşük valin, glikoz, gliserolfosfokolin , fosfokolin, tirozin, lisin, izolösin, glisin, , glutamat, glutamin, alanin, asetat, 1-metilhistidin ve 3-hidroksibutirat seviyeleri saptamışlar ve bu durumu Krebs döngüsünün KBH süresinden etkilenmesi ile ilişkilendirmişlerdir (201).

3.YÖNTEM

3.1. Hastaların Dahil Edilme ve Dışlama Kriterleri

Çalışmaya dahil edilen hastalar uygun kriterler sağlandıktan sonra Ocak 2021-Mayıs 2022 zaman aralığında Hacettepe Üniversitesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Nefroloji Bilim Dalı' na başvuran hastalardan seçilmiştir.

Çalışma edilme kriterleri aşağıdaki gibidir:

- Hastaların 18 yaşından büyük olması
- 24 saatlik idrarda proteinüri seviyesinin >1000 mg/gün ve/veya spot idrarda >1000 mg/g kreatinin olması
- GFR >15 ml/dk/1.73 m² olması
- Daha önce primer glomerülonefrit ve/veya nefrotik sendrom tanısı almamış olması
- Nefroloji bölümü tarafından yapılan tanısal amaçlı böbrek biyopsisi sonucunda Membranöz Nefropati, Fokal Segmental Glomerüloskleroz, IgA Nefropatisi veya AA amiloidoz tanısı almış olması

Çalışmadan dışlanma kriterleri ise aşağıdaki gibidir:

- Gebe hastalar
- Renal transplantasyon hastaları
- Hastanın hemodiyaliz /periton diyalizi tedavisi altında olması veya GFR <15 ml/dk/1.73 m² olması
- İdrar örneği alındığı zaman aralığında akut böbrek hasarı tablosu olması
- Hastanın daha önce son 1 yıl içinde başka bir etiyoloji nedeniyle immünespresif tedavi almamış olması (Çalışmaya dahil edilecek FMF tanısı olan hastaların yalnızca kolşisin tedavisi almış olması ve diğer gruplardaki hastaların RAAS inhibitör tedavi alması kabul edilmiştir.)

Hacettepe Üniversitesi Nefroloji Bilim Dalı' na proteinüri nedeniyle yönlendirilerek primer hekimi tarafından değerlendirildikten sonra renal biyopsi kararı alınan hastalardan işlemde önce yatışı yapıldıktan sonra saat 09.00-10.00 aralığında aç karnına 10 cc orta akım idrar örneği alınmış ve 4°C' de 3200 g 15 dk santrifüj edilip -81°C' de omiks analizlere kadar geçecek süre 6 ayı geçmemek koşuluyla saklanmıştır. Bağımsız olarak raporlanan patoloji sonucunda tanısız olarak çalışmaya dahil edilme kriterleri karşılayan hastalar dahil edilmiştir.

3.2. Hastaların Laboratuvar Verileri

Hastaların laboratuvar verileri biyopsiden önce poliklinikte hastayı değerlendiren ve biyopsi yapılmasına karar veren doktor/doktorlar tarafından istenmiş olup çalışma kapsamında istenmemiştir. Hastaların laboratuvar sonuçlarında incelenen parametreler serum albümin, ürik asit, serum kreatinin, LDL, trigliserit değerleri ve 24 saatlik idrarda protein miktarlarıdır. Albümin gr/dl, LDL ve kreatinin ise mg/dl cinsinden belirtilmiştir. GFR, CKD-EPI 2021 formülüne göre hesaplandıktan sonra mL/dk/1.73m² biriminde hesaplanmıştır. 24 saatlik idrar tetkikleri ise mg/gün cinsinden belirtilmiştir.

3.3. Hastaların Patolojik Verileri

Hastaların böbrek biyopsileri çalışma kapsamında olduğu bilinmeden raporlandıktan sonra Hacettepe Üniversitesi Nefroloji Bilim Dalı'nda iki bağımsız nefropatolog tarafından bağımsız olarak skorlanmıştır. Patolojik spesimenler ışık ve immünfloresans mikroskopisinde incelenmiş, elektron mikroskopisi kullanılmamıştır. Kullanılan histokimyasal boyalar *Jones' methenamine silver*, *masson trikrom*, *Periodic acid methenamine silver*, kristal viyole, *Periodic acid schiff* (PAS) ve kongre kırmızısıdır. Kullanılan immünfloresan boyalar ise IgA, IgG, IgM, C3, C4, C1q, kappa ve lambda antikorlarıdır.

Çalışma kapsamında histopatolojik 6 parametre incelenmiştir. Bunlar glomerüler skleroz (G), tübüler atrofi (TA), interstisyel fibrozis (IF), amiloid tutulumu (A), total inflamasyon (ti) ve hyalin arteriolar kalınlaşmadır (aaH).

Glomerüler skleroz skorunda tüm seçilebilen glomerüller için global ve segmental olarak skleroz saptanan glomerüllerin yüzdesi hesaplanmış ve %10' un altı, %10-25 arası, %25-50 arası ve %50 üzeri olmak üzere 4 grupta sınıflandırılmıştır. Tübüler atrofi ve interstisyel fibrozis skorlarında total kortikal parankimde tübüler atrofi ve interstisyel fibrozis saptanan alan yüzdesi %10 altı, %10-25 arası, %25-50 arası ve %50 üzeri olmak üzere 4 grupta sınıflandırılmıştır. Her üç skor için dört sınıfa sırasıyla 0 (%0-10), 1 (%11-25), 2 (%26-50), 3 (>%50) puan verilmiştir. Ayrıca bu üç parametrelerin toplamı ile total renal kronisite skoru hesaplanmıştır (202). G+IF+TA toplam skoruna göre kronisite skoru minimal kronik değişiklikler (0-1), hafif derece kronik değişiklikler (2-4), orta derece kronik değişiklikler (5-7) ve ağır derecede kronik değişiklikler (≥ 8) olarak sınıflandırılmıştır. Arteriyolar hyalinozis skoru Banff kriterlerine göre yapılmış ve yalnızca bir arteriolde dejenerer düz kaslar yerine hyalin depolanması segmental olarak var ise 1, birden çok arteriolde segmental tutulum var ise 2 ve en az 1 tüm duvarı tutan (*circumferential*) hyalinozis var ise 3 olarak skorlanmıştır (203). Tübüler inflamasyon Banff kriterlerine göre yapılmış ve total kortikal parankimdeki inflamasyon yüzdesi %10'un altı, %10-25 arası, %25-50 arası ve %50 üzeri olmak üzere 4 grupta sınıflandırılmıştır. Dört ayrı sınıfa sırasıyla 0 (%0-10), 1 (%11-25), 2 (%26-50) ve 3 (>%50) puan verilmiştir (203). Amiloid tutulumu etkilenen renal domaine göre glomerüler (AmyG), tübülointerstisyel (AmyT/I) ve vasküler (AmyV) olarak sınıflandırılmıştır. AmyG amiloid birikiminin yol açtığı mezengial etkiye 5 grupta sınıflandırılmış ve bu sınıflara sırasıyla 0, 1, 2, 3 ve 4 puan verilmiştir. AmyT/I renal tübülointerstisyel parankim alanının etkilenim yüzdesi %0, %1-25, %26-50 ve >%50 olacak şekilde 4 grupta sınıflandırılmış ve sırasıyla 0, 1, 2, 3 puan verilmiştir. AmyV skorlaması arteriyolar duvarda amiloidoz birikimini aaH skoruna benzer olarak arteriyollerde amiloid birikimi yoksa 0, bir arteriolde segmental tutulum var ise 1, birden çok arteriolde segmental tutulum var ise 2 ve en az bir arterde çepeçevre tutulum var ise 3 olarak skorlanmıştır.

3.4. Üriner Proteomik Analizi

Pre-analitik hazırlık fazından sonra örneklerin proteomik analizi Koç Üniversitesi Translasyonel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi (KUTTAM) Hücre Biyolojisi ve Proteomiks Laboratuvarı'nda yapılmıştır. İdrar örnekleri 2000g hızında 4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. 0.5 M amonyum bikarbonat (ABC) ile pH düzenlemesi yapıldıktan sonra süpernatantlar 3K santrifüj filtrelerinden filtre edilmiştir (Amicon Ultra-15mL Centrifugal Filters-Ultracel-3K, UFC900308). Ultrafiltrat 8 M üre, 50 mM ABC and 1mM sodyum-orto-vanadat ile inkübe edildikten sonra 100 mM DTT ile 45 dk 56°C'de indirgenmiş ve 20 mM iyodoasetamid ile oda sıcaklığında 30°C'de alkilenmiştir. Örnekler 50 nM ABC ile 8 kat seyreltilerek tripsin ile 1 gece bekletildikten sonra ertesi sabah örneklere %10 formik asit eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Solid faz ekstraksiyonu (SPE) ile tripsin aracılığıyla fragmente olmuş peptidler tuzdan arındırılmıştır (*desalting*). Peptidler C18 nanoakımlı ters-faz (*reverse phase*) HPLC (*Dionex Ultimate 3000,3500 RSLC nano, Thermo Scientific*) ile kombine Orbitrap MS ile analiz edilmiştir (*Q Exactive Orbitrap HF, Thermo Scientific*). MS1 için tarama parametreleri; 70 000 çözünürlük; AGC 3e6; Max IT 60 ms; tarama aralığı 400-1500 m/z ve MS2 için ; 17 500 çözünürlük; AGC:5e4; Max IT:60 ms; Top 15; izolasyon aralığı:2.0 m/z; NCE: 26 olarak ayarlanmıştır.

3.5. Üriner Metabolomik Analizi

Örneklerin metabolomik analizi Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Bilim Dalı'nda yapılmıştır. -20°C'de saklanan idrar örneklerinden 100'er µL alınmıştır, üzerine üreaz (10 mg/5 mL su çözeltisinden 50'şer µL ilave edilerek 37 °C'de 4 saat inkübasyon işlemi yapılmıştır. MeOH:H₂O (9:1, h/h) karışımdan 850 µL ilave edilerek 10000 rpm'de 5 dk santrifüj işlemi yapılmıştır. Proteinlerin çöktürülmesi ile elde edilen berrak kısımdan GC-MS temelli metabolomik çalışmalarda kullanmak için uygun tüplere 400 µL alınarak tüm numuneler vakumlu santrifüjde kuruluğa kadar uçurulmuştur ve metabolomik çalışmalar yapılncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Tüm idrar örnekleri için proteinlerin çöktürülmesi ile elde edilen berrak kısımdan 100'er µL alınarak bir karışım hazırlanmış ve metabolomik çalışmalarda

QC (*quality control*) örneği olarak kullanılmıştır. Bu QC karışım çözeltilisinden 400 µL' lik kısımlar alınarak vakumlu santrifüjde kuruluğa kadar uçurulmuş ve metabolomik çalışmalar yapılincaya kadar -20°C' de saklanmıştır. Kuruluğa kadar uçurulmuş -20°C' de saklanan numuneler metabolomik analizler öncesinde 15 dk vakumlu santrifüjde tutulmuştur. Üzerine 20 µL metoksiamin hidroklorür çözeltilisinden eklenerek 30°C'e ayarlı termal çalkalayıcı içerisinde 90 dk metoksillendirilmiştir. Daha sonra oda sıcaklığına getirilen numuneler üzerine 80 µL N-metil-N-trimetilsilil trifloroasetamit ve trimetil klorosilan (MSTFA + %1 TMCS) eklenerek ayarlı termal çalkalayıcı içerisinde 37°C' de 30 dk bekletilerek türevlendirilmiştir. Türevlendirilen numuneler içinde insert olan viallere aktarılarak GC-MS ile analizleri yapılmıştır. Analiz için *Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra* cihazı ve %5 difenil %95 dimetilpolisiloksan kapiller kolonları kullanılmıştır. Her analiz öncesi cihazda otomatik ayar yapılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Ayrıca cihazda yer alan enjektör yıkama çözeltileri günlük olarak değiştirilmiştir.

3.6. Proteinlerin/Metabolitlerin Belirlenmesi ve Biyoinformatik Analiz

Proteomik ve metabolomik sonuçların biyoinformatik analizi Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoinformatik Bilim Dalı' nda yapılmıştır. Ham spektroskopik veriler *MaxQuant* (versiyon 1.16.14) programı kullanılarak ve sık karşılaşılan kontaminant veriler de değerlendirilerek Uniprot veritabanında (UP000005640) taranmıştır. *Thermo Scientific Q Exactive HF Hibrid Quadrupole-Orbitrap* MS cihazının varsayılan ayarları ve 2 eksik uca izin veren Tripsin/P spesifitesi tarama parametreleri olarak belirlenmiştir. Karboksiamidometil sabit; oksidasyon ve asetilasyon değişken modifikasyonlar olarak belirlenirken minimum peptid uzunluğu 7 aminoasit olarak belirlenmiştir. MaxQuant programı ölçülen iyonların internal kütle kalibrasyonlarını ve peptit validasyonlarını tamamlamıştır. Yanlış keşif oranı (false discovery rate, FDR) %1 olarak kabul edilmiştir. Ölçülen peptit sekansları *razor* ve *unique* olarak seçilmiştir. Normalizasyon sonrası MaxQuant aracılığıyla ölçülen proteinlerin *label free quantification* (LFQ) değerleri hesaplanmıştır.

LFQ değerleri *Perseus* programı (versiyon 1.6.7) aracılığıyla \log_2 tabanına göre normalize edilmiştir (19) . En az 3 örnekte saptanan proteinle analize dahil edilmiştir. Çalışma grupları ve kontrol grubu arasındaki protein miktarlarındaki farklılıkları istatistiksel analizi 2-yönlü ANOVA ve HSD-Tukey testleri ile hesaplanmış ve p değeri Benjamini-Hochberg yöntemi ile düzeltilmiştir. *R* programı (versiyon 4.0.4) kullanarak 2 tabanında logaritmik kat değişiklikleri (\log_2FC) hesaplanmıştır (20) . Ayarlanmış p değeri <0.05 olmak üzere $\log_2FC \geq 3$ ve $\log_2FC \leq -3$ olarak proteinlerin istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.

GC-MS ile yapılan analizlere ait ölçüm sonuçları *Labsolutions* (versiyon 4.20) yazılımı ile elde edilmiştir. Elde edilen ham veriler uygun bir yazılım ile mzXML formatına dnştrlmştir. Daha sonra *MS-DIAL* (versiyon 4.60) yazılımı kullanılarak kompleks kromatogramlar ayrıştırılmış ve alıkonma zamanları düzeltilerek elde edilen veri matrisleri Excel alışma dosyasına aktarılmıştır. Alıkonma indeksli Fiehn kütüphanesi kullanılarak metabolitlere ait pikler tanımlanmıştır. Elde edilen veri matrisleri LOESS (QC temelli yerel olarak tahmin edilen dağılım yumuşatma grafiği), MSTUS (her bir metabolitin alanının tüm metabolitlerin toplam alanına bölünmesiyle yapılan toplam pik normalizasyonu) ve TIC (toplam iyon kromatogramı) gibi normalizasyon teknikleri kullanılarak normalize edilmiştir. Daha sonra veriler tek değişkenli ve çok değişkenli istatistiksel analizler gerçekleştirilmek üzere sırasıyla *Excel* ve *Simca P+* (versiyon 13.0) alışma dosyasına aktararak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir.

Çalışma gruplarında anlamlı farklılık gösteren tüm proteinlerin ve metabolitlerin görsel olarak doğal kümelenme paternlerini göstermek amacıyla Temel Bileşen Analizi (*Principal Component Analysis*, PCA) yapılmıştır. Bu proteinlerin düzeylerindeki farklılıklar klid uzaklıklarını temel alan hiyerarşik kümeleme analizi yapılarak ısı analizi (*Heatmap Analysis*) şeklinde görselleştirilmiştir. Proteinler gen ontolojisi (GO) Analizi ile *PANTHER* klasifikasyon sistemi kapsamında fonksiyonel olarak biyolojik süreç, moleküler aktivite ve hücrenel kompartmanlarına göre sınıflandırılmıştır. Proteinlerin yolak analizleri *Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes (KEGG)* ve fonksiyonel ağ analizleri *Cytoscape/InTact* ve *STRING* veritabanları kullanılarak yapılmıştır. Metabolitlerin yolak analizinde *KEGG* ve *Metaboanalyst* veritabanı kullanılmıştır.

3.7 İstatistiksel Analiz

Yukarıda protein miktarlarının belirlenmesi ve gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırılması *Perseus* ve *R* programları aracılığıyla ayrıntılı olarak belirtilen yöntemler ile yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler ve gruplar arasında anlamlı farklılıklara sahip proteinlerin klinik ve patolojik veriler ile ilişkisi araştırılırken *Statistical Packages for the Social Sciences (SPSS Inc. versiyon 25.0)* yazılımı kullanılarak ilk olarak nümerik verilerin normal dağılıp dağılmadığı Shapiro-Wilk normallik testi ile tespit edilmiş, normal dağılan veriler için ortalama değer ve standart sapma; normal dağılmayan veriler için minimum-maksimum ve medyan değerler verilmiştir. Kategorik değişkenler için ise sayı ve yüzdelerle ifade edilmiştir. Protein/metabolit düzeylerinin patolojik alt gruplara göre kategorize edildikten sonra yapılan karşılaştırma analizlerinde (örneğin yüksek vs düşük total renal kronisite skoru) grup sayısı ve normal dağılım özelliklerine göre ANOVA, Mann Whitney-U ve Kruskal-Wallis testleri kullanılmıştır. Protein/metabolit düzeylerinin kendi aralarında ve diğer sürekli laboratuvar parametreler ile ilişkisi için değişkenlerin normal dağılım analizine bağlı olarak Pearson ve Spearman korelasyon analizleri kullanılmıştır (örneğin UMOD-Ürat, UMOD-İnositol, biyobelirteç-proteinüri/eGFR ilişkileri). Biyoinformatik analiz sonrası yapılmış olan bu istatistiksel testlerde anlamlılık düzeyi Bonferroni düzeltmesi yapılarak $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir; omiks ve gen ontolojisi analizlerinde ise yukarıda belirtildiği üzere FDR %1 olarak belirlenmiştir.

3.8 Çalışmanın Etik İzni ve Mali Desteği

Araştırma için Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Çalışmalar Etik Kurulu'na başvuruda bulunulmuştur. Çalışma, Etik Kurulun 19.01.2021 tarihli toplantısında görüşülerek etik açıdan uygun bulunmuştur (Karar No: GO 2021/0246). Araştırma Helsinki Deklarasyonuna uygun olarak gerçekleştirilmiş olup hastalardan çalışma için onam alındı Çalışma Türk Hipertansiyon ve Böbrek Hastalıkları Derneği tarafından desteklenmiştir.

4.SONUÇLAR

4.1. Klinik ve Demografik Bilgiler

Ocak 2021- Mayıs 2022 yılları arasında çalışmamıza Hacettepe Üniversitesi Nefroloji Bilim Dalı tarafından böbrek biyopsisi kararı alınarak ilk tez tanı alan 8 renal AA Amiloidoz, 8 Membranöz Nefropati, 7 FSGS, 8 IgA Nefropatisi ve 6 sağlıklı kontrol hastası dahil edilmiştir. Hastaların demografik ve klinik verileri Tablo 4.1’ de özetlenmiştir. Kontrol grubunun E/K oranı 1 olup (3/3) yaşlarının medyan değeri 47,5 olarak saptanmıştır.

Tablo 4.1. Hastaların demografik ve klinik parametreler

	AA Amiloidoz (n=8)	MN (n=8)	FSGS (n=7)	IgAN (n=9)
Yaş	57,5 (21-76)	42,5 (24-67)	43 (27-57)	43 (31-66)
Cinsiyet (E/K)	6/2	4/4	2/5	6/3
Hipertansiyon(%)	%62,5 (5/8)	%62,5 (5/8)	%57,2 (4/7)	%55,5 (5/9)
T2DM (%)	%37,5 (3/8)	%12,5 (1/8)	%14,3 (1/7)	% 11,1 (1/9)
ASKVH (%)	%37,5 (3/8)	%12,5 (1/8)	%14,3 (1/7)	% 22,2 (2/9)
Bx öncesi RAAS inhibitör tedavisi	%62,5 (5/8)	%75 (6/8)	%28,6 (2/7)	% 66,6 (6/9)

Hastaların biyopsi sonuçlarına göre laboratuvar verileri Tablo 4.2’ de ifade edilmiştir. Hastalardan elde edilen laboratuvar sonuçları biyopsi sonuçlarına göre incelendiğinde heterojen dağılımda oldukları görülmektedir ve bu nedenle medyan, min-max olarak ifade edilmiştir.

Kruskal-Wallis analizi sonucunda gruplar arasında medyan eGFR değerleri arasındaki fark istatistiksel anlamlılığa ulaşmazken ($p=0,12$); proteomik analizlerin yapıldığı MN ve AA grupları kendi arasında karşılaştırıldığında Mann-Whitney U testinde medyan eGFR değerlerinin AA grubunda daha düşük olma trendinde olduğu

görülmüştür (67,6 vs 112; $p=0.08$). eGFR değerlerine paralel olarak en düşük medyan kreatinin düzeyine MN grubunda (0,67 mg/dl) izlenirken en yüksek medyan kreatinin değeri IgAN grubunda (1,48 mg/dl) saptanmış; Kruskal-Wallis testinde gruplar arasında farklar istatistiksel anlamlılığa ulaşamamış ancak IgAN grubundaki yüksek medyan değerler nedeniyle anlamlılık trendinde olmuştur ($p=0,058$).

İdrar tetkikleri incelendiğinde gruplar arasındaki fark Kruskal-Wallis testinde istatistiksel anlamlılığa ulaşmış ($p=0,002$); en yüksek medyan 24 saatlik idrar protein miktarı düzeyine MN ve AA gruplarında (sırasıyla 9499 ve 9512 mg/gün), en düşük medyan 24 saatlik idrar protein miktarı düzeyine IgAN (1947,63 mg/gün; AA vs IgAN $p=0,01$, MN vs IgAN $p=0,01$) grubunda ulaşılmıştır.

Serum albümin düzeyleri incelendiğinde gruplar arasındaki fark Kruskal-Wallis testinde istatistiksel anlamlılığa ulaşmış ($p=0,007$); en yüksek medyan serum albümin düzeyine MN ve AA gruplarında (sırasıyla 2,86 ve 2,41), en yüksek medyan serum albümin düzeyine IgAN (3,76; AA vs IgAN $p=0,01$, MN vs IgAN $p=0,01$) grubunda ulaşılmıştır.

Tablo 4.2. Hastaların göre laboratuvar parametreleri

	AA Amiloidoz	MN	FSGS	IgAN
Kreatinin (mg/dl)	1,19 (0.58-4.5)	0,67 (0.41-1.51)	1,19 (0,59-1,82)	1,48 (0,69-1,84)
Ürik asit (mg/dl)	6,23 (5.3-7.22)	6,59 (3.77-9.3)	6,3 (4,6-9)	6,26 (4,4-9,3)
Serum albümin (g/dL)	2,41 (1,56-3,48)	2,86 (1,93-3,26)	3,13 (1,74-3,65)	3,76 (3,53-4,62)
Proteinüri (mg/gün)	9512 (1933-30120)	9499 (2749-23977)	3405 (1781-13297)	1947,63 (1003-3225,17)
eGFR ml/dk/1.73m ²	67,46 (15,81-127)	112 (46.78-136)	79 (30.3-117)	54,3 (41,51-121)
LDL (mg/dl)	153,5 (131-217)	196 (154-273)	178 (116-339)	126 (88-316)
Trigliserit (mg/dl)	139 (88-350)	178 (87-596)	160,5 (98-652)	160,5 (39-302)

4.2. Patolojik Özellikler

Hastaların tanılarına göre patolojik skorları Tablo 4.3’ te özetlenmiştir. Patolojik skorların dağılımı homojen olmadığı için medyan, min-max olarak ifade edilmiştir. En yüksek medyan glomerüloskleroz skoru AA grubunda (1,5) , en düşük medyan glomerüloskleroz skoru MN grubunda (0) izlenmiştir. Tübüler atrofi ve interstisyel fibrozis skorları tüm gruplarda birbirleriyle paralellik göstermiş olup en yüksek medyan tübüler atrofi ve interstisyel fibrozis skoru AA grubunda (2 ve 2), en düşük medyan tübüler atrofi ve interstisyel fibrozis skoru MN grubunda (0 ve 0) izlenmiştir. Total kronisite skoru da benzer şekilde medyan en yüksek AA grubunda (5,5) , medyan en düşük MN grubunda (0) hesaplanmıştır.

Tablo 4.3. Hastaların medyan patolojik skorları

	AA Amiloidoz	MN	FSGS	IgAN
Glomerüloskleroz	1,5 (0-3)	0 (0-1)	1 (0-2)	1 (0-3)
Tübüler atrofi	2 (0-3)	0 (0-1)	1 (0-2)	1 (0-3)
İnterstisyel fibrozis	2 (0-3)	0 (0-1)	1 (0-2)	1 (0-3)
Arteriolar hyalinozis	0 (0-3)	0 (0-1)	2 (0-3)	2 (0-3)
Tübüler İnflamasyon	2 (0-3)	0 (0-2)	0 (0-2)	1 (0-3)
Total renal kronisite skoru	5,5 (1-9)	0 (0-2)	3 (1-6)	3 (0-9)

Proteomik analizlerin yapıldığı AA ve MN grupları incelendiğinde Khi-kare testi (χ^2) sonucunda orta ve ileri tübüler atrofi ve interstisyel fibrozis skoru yüzdeleri istatistiksel anlamlı olarak AA grubunda daha yüksek saptanmış ($p=0.02$); paralel olarak glomerüloskleroz skor yüzdeleri AA grubunda istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek görülmüştür ($p=0.005$). Tübüler inflamasyon skoru yüzdelerinin Khi-Kare analizinde AA ve MN grupları arasındaki dağılımda istatistiksel anlamlı fark

saptanmamış ($p=0.17$); total renal kronisite skor yüzdeleri ise anlamlılık trendinde saptanmıştır ($p=0.051$). Çapraz tablolar Tablo 4.4. , 4.5. ve 4.6.' da özetlenmiştir.

Tablo 4.4. Hastaların tübüler atrofi ve interstisyel fibrozis skorları çapraz tablosu (Skorlar hasta gruplarında aynı değerlerde olduğu için tek tabloda özetlenmiştir.)

Tanı	Tübüler atrofi/İnterstisyel fibrozis				Toplam
	yok	Hafif	Orta	Şiddetli	
AA Amiloidoz	%87,5 (7)	%12,5 (1)	%0 (0)	%0 (0)	%100 (8)
MN	%12,5 (1)	%25 (2)	%37,5 (3)	%25 (2)	%100 (8)
Toplam	%50 (8)	%18,8 (3)	%18,8 (3)	%12,5 (2)	%100 (16)

Tablo 4.5. Hastaların glomerüloskleroz skorları çapraz tablosu

Tanı	Glomerüloskleroz				Toplam
	yok	Hafif	Orta	Şiddetli	
AA Amiloidoz	%87,5 (7)	%12,5 (1)	%0 (0)	%0 (0)	%100 (8)
MN	%0 (0)	%50 (4)	%25 (2)	%25 (2)	%100 (8)
Toplam	%43,8 (7)	%31,3 (5)	%12,5 (2)	%12,5 (2)	%100 (16)

Tablo 4.6. Hastaların total renal kronisite skorları çapraz tablosu

Tanı	Total renal kronisite				Toplam
	yok	Hafif	Orta	Şiddetli	
AA Amiloidoz	%87,5 (7)	%12,5 (1)	%0 (0)	%0 (0)	%100 (8)
MN	%25 (2)	%12,5 (1)	%37,5 (3)	%25 (2)	%100 (8)
Toplam	%56,3 (9)	%12,5 (2)	%18,8 (3)	%12,5 (2)	%100 (16)

4.2. Proteomik Analiz

8 MN ve 8 AA tanılı hastanın ve kontrol grubundan 6 birey olmak üzere toplam 22 hasta proteomik analize dahil edilmiştir. İdrar örneklerinin proteomik analizi sonucunda toplam 911 protein belirlenmiştir. Filtreleme işlemi sonrasında 859 protein analize dahil edilmiştir. ANOVA ve HSD-Tukey testleri sonucunda

kontrol grubu ile AA Amiloidoz grubu arasında istatistiksel anlamlı olarak düzeyi farklılık gösteren 51; kontrol grubu ile MN grubu arasında düzeyi istatistiksel anlamlı olarak farklılık gösteren 52 protein bulunmuştur (Tablo 4.4). Kontrol grubuna göre düzeyindeki farklılık istatistiksel anlamlılığa ulaşan tüm proteinlerin düzeyi AA Amiloidoz grubunda kontrol grubuna göre daha düşük olarak saptanmış; bu nedenle log₂fold değerleri – (negatif) işareti ile tabloda belirtilmiştir.

AA Amiloidoz grubu ile Membranöz Nefropati grubu arasında farklılık gösteren 3 protein saptanmıştır. Bu proteinlerden Üromodulin AA Amiloidoz grubunda daha düşük miktarda iken (log₂FC 3,37) ; RNASE1 ve AMBP AA Amiloidoz grubunda daha yüksek miktarda (log₂FC sırasıyla 3,41 ve 3,07) olarak saptanmıştır.

Tablo 4.7. Proteomik analiz sonucunda AA Amiloidoz ile kontrol grubu arasında düzeyi anlamlı farklılık gösteren proteinler (C kontrol grubunu temsil etmektedir.)

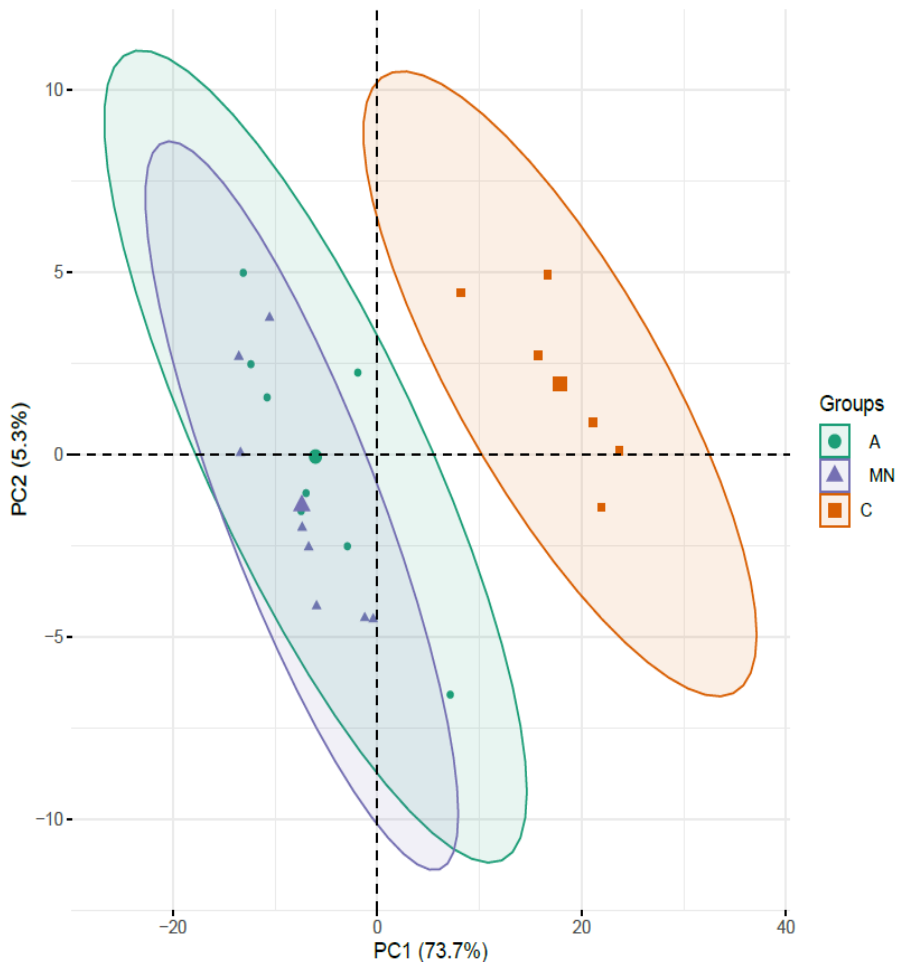
Protein isimleri	Gene isimleri	Log ₂ fold(A/C)
Kaderin-1	CDH1	- 5,90
Kolajen α -1(VI) zinciri	COL6A1	- 6,23
G-protein ilişkili reseptör ailesi C grup 5 üye C	GPRC5C	- 4,68
Arilsülfataz A	ARSA	- 6,38
α -galaktozidaz A	GLA	- 4,29
Lizozomal asit fosfataz	ACP2	- 5,79
İnterlökin-18 bağlayıcı protein	IL18BP	- 5,49
CD44 antijeni	CD44	- 7,25
Düşük afiniteli immünglobulin γ Fc bölgesi reseptörü III-A	FCGR3A	- 4,95
Butirofilin ailesi 2 A1 ve A2 üyeleri	BTN2A1;BTN2A2	- 5,02
ICOS ligandı	ICOSLG	- 6,19
Prominin-1	PROM1	- 4,46
Kübülün	CUBN	- 7,04
Peptidoglikan tanıma proteini 1	PGLYRP1	- 4,99
Epidermal büyüme faktörü	EGF	- 10,00
Pankreatik α -amilaz	AMY2A	- 8,24
Apolipoprotein D	APOD	- 5,26
Plazma serin proteaz inhibitörü	SERPINA5	- 5,90
Kallikrein-1	KLK1	- 7,14

Üromodulin	UMOD	-	8,05
Pepsin A-3;Pepsin A-5;Pepsin A-4	PGA3;PGA5;PGA4	-	6,48
Non-sekretuar ribonükleaz	RNASE2	-	7,63
Aminopeptidaz N	ANPEP	-	4,76
Kaderin-2	CDH2	-	6,39
γ -glutamiltanspeptidaz 1	GGT1	-	4,97
Karboksilik ester hidrolaz	CEL	-	6,13
Deoksiribonükleaz-1	DNASE1	-	8,25
Granülinler (1-7)	GRN	-	5,74
Tirozin-protein kinaz reseptörü UFO (AXL)	AXL	-	6,14
Kolajen α -1(XVIII) zinciri (Endostatin)	COL18A1	-	6,61
Salgılanan Ly-6/uPAR-ilişkili protein 1	SLURP1	-	5,65
Kaderin-13	CDH13	-	5,43
β -defensin 1	DEFB1	-	6,76
Endorepellin (LG3 peptidi)	HSPG2	-	5,03
LDL reseptör ilişkili protein 2 (Megalin)	LRP2	-	6,38
Galektin-3 bağlayıcı protein	LGALS3BP	-	6,28
WAP 4-disülfid kor domain protein 2	WFDC2	-	5,98
Glutamil-peptid siklotransferaz	QPCT	-	5,75
Vazorin	VASN		
CMRF35-benzeri molekül 9	CD300LG	-	6,87
Nöronal büyüme düzenleyicisi 1	NEGR1	-	5,14
Vitellin membran dış tabaka protein 1 homolog	VMO1	-	5,98
Golgi membran proteini 1	GOLM1	-	4,92
Hücre adhezyon molekülü 4	CADM4	-	6,28
Roundabout homolog 4	ROBO4	-	6,80
Brevikan kor protein	BCAN	-	5,72
Hemisentin-1	HMCN1	-	6,46
Endosialin	CD248	-	7,18
G-protein ilişkili reseptör ailesi C grup 5 üye B	GPRC5B	-	5,01
Endotel protein C reseptörü	PROCR	-	7,51

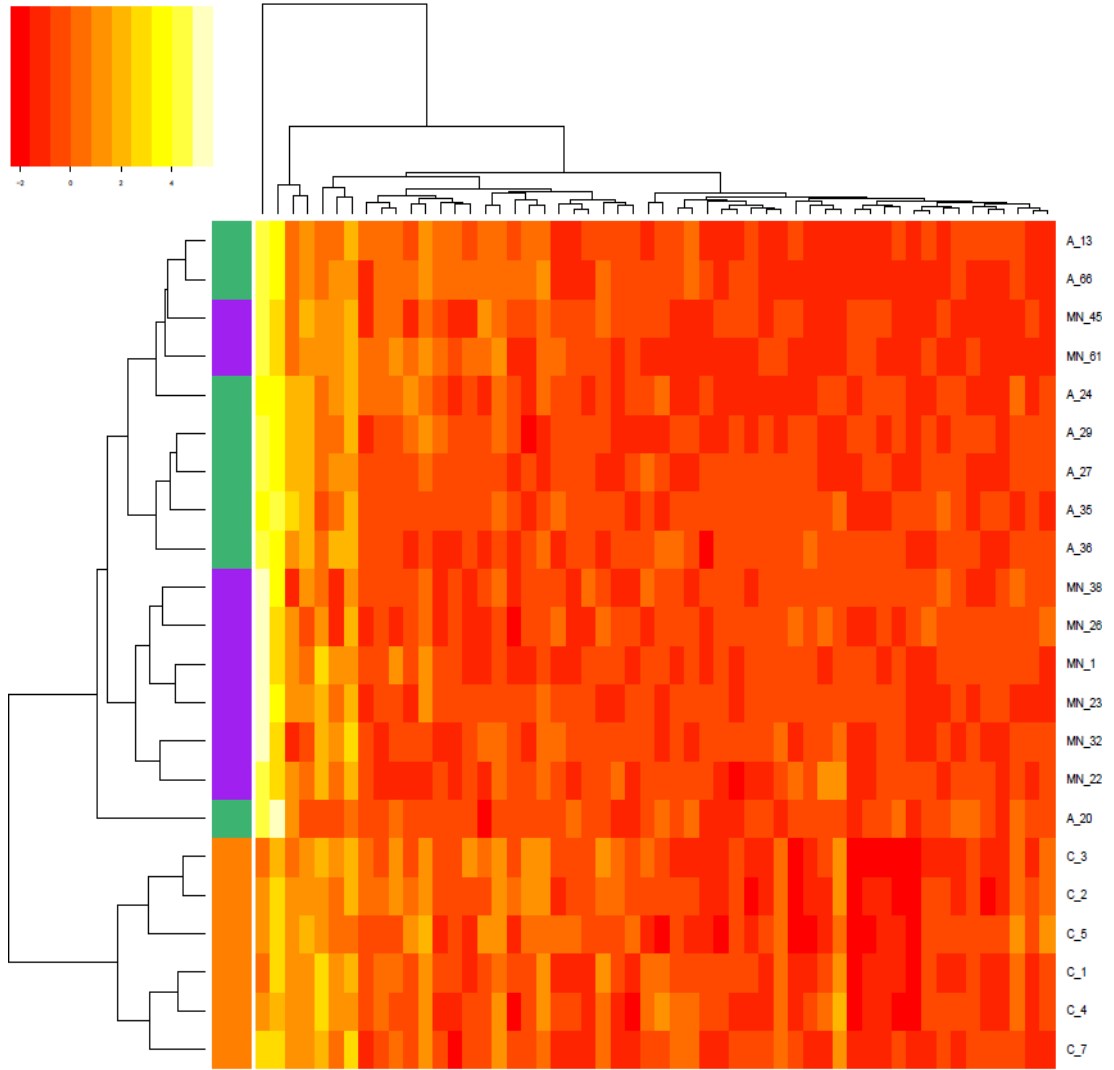
AA grubunu kontrol ve MN grubundan ayıran proteinlerin PCA ve ısı haritası analizleri yapılmıştır (Şekil 4.1. ve Şekil 4.2). PCA Analizinde gerek AA gerek MN gruplarında kontrol grubundan belirgin şekilde ayrımın yapılabildiği görülmüştür. Gen Ontolojisi analizinde istatistiksel anlamlı olarak en yoğun (*fold enrichment* değeri en yüksek) biyolojik süreç sindirim ve homofilik hücre adezyonu , en yoğun moleküler fonksiyon kalsiyum bağlanması ve en yoğun hücresel kompartman

multiveziküler organ lümeni, endozomlar ve dış hücre membranı olarak saptanmıştır (Tablo 4.5).

GO analiz sonuçları bar grafikleri olarak görselleştirilmiş (Şekil 4.3) ve dilim grafiklerinde domainlerin nicel olarak en baskın alt domainleri ontolojik açıdan belirtilmiştir (Şekil 4.4 , 4.5. ve 4.6.). Homofilik hücre adezyon proteinleri kaderin-1, kaderin-2, kaderin-13, ROBO4, hemisentin-1 ve hücre adezyon molekülü-4 olarak saptanırken multiveziküler organ lümeni, endozom ve dış hücre membranında saptanan proteinler pepsin, arilsülfataz, kübilin ve megalin olarak belirlenmiştir.



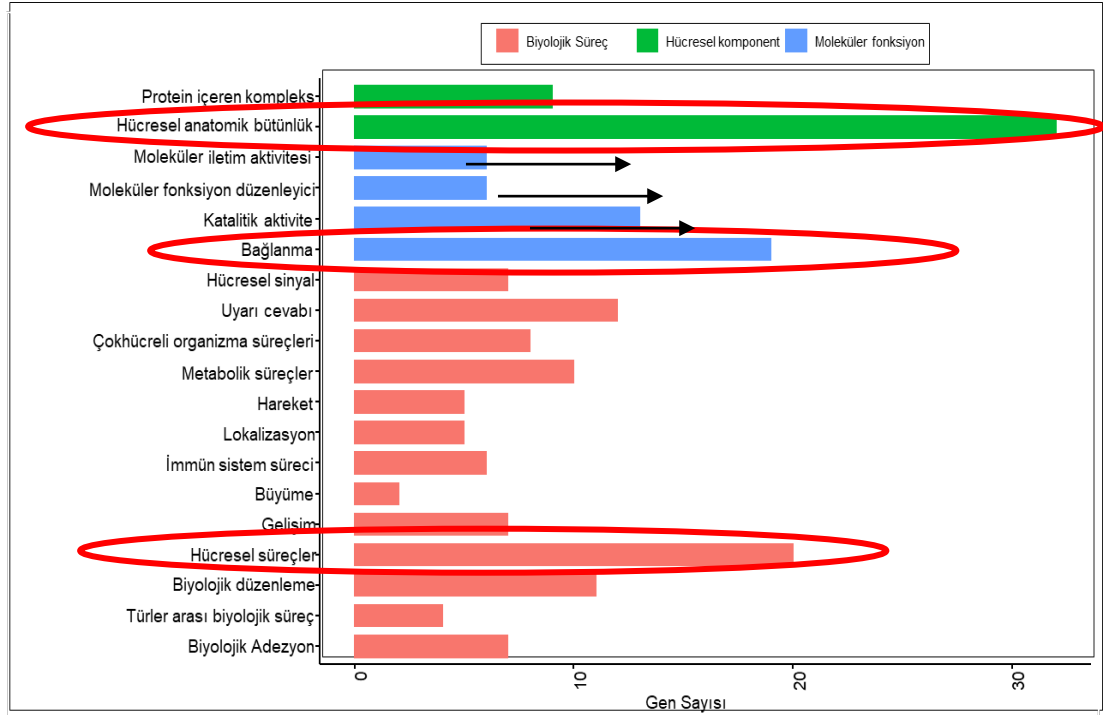
Şekil 4.1. Proteomik sonuçların PCA analizi



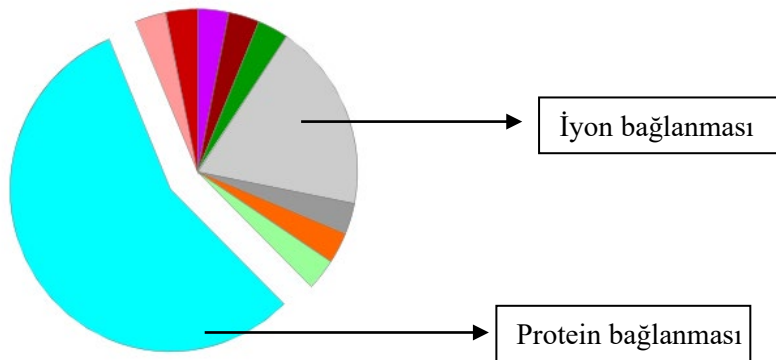
Şekil 4.2. Proteomik sonuçların Isı Haritası Analizi

Tablo 4.8. GO biyolojik süreç analizindeki domainlerin *fold enrichment* analizi

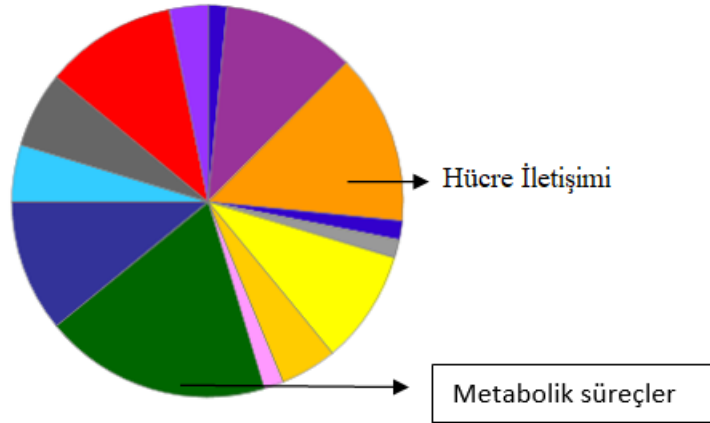
Biyolojik süreç	Toplam gen sayısı	Saptanan gen sayısı	Beklenen gen sayısı	<i>Fold enrichment</i>
Sindirim	108	5	0,3	16,72
Homofilik hücre-hücre adhezyonu	170	7	,47	14,87
Kan damarı morfogenezi	421	9	1,17	7,72
Hücre-hücre adhezyonu	543	10	1,5	6,65



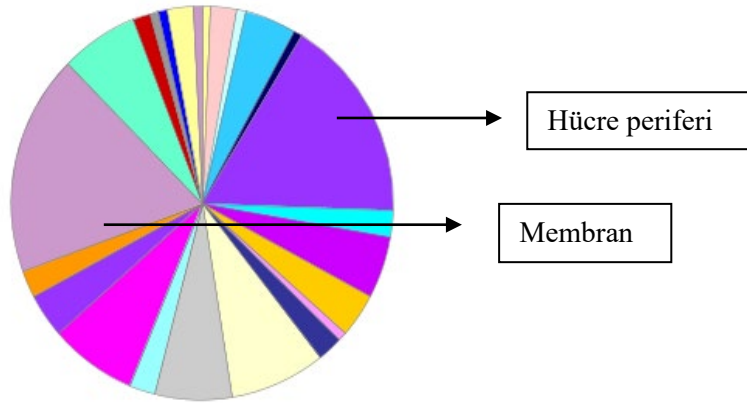
Şekil 4.3. Proteomik sonuçların Gen Ontolojisi Analizi (Yalnızca temel domainler gösterilmiş ve nicel olarak en çok proteinin içeren domainler halka içine alınmıştır.)



Şekil 4.4. GO moleküler fonksiyon **bağlanma** alt domainleri (Fold enrichment değerlerine göre değil nicel olarak grafiklendirilmiştir.)



Şekil 4.5. GO biyolojik süreç domaini **hücreyel süreçler** alt domainleri (*Fold enrichment* değerine göre değil nicel olarak grafiklendirilmiştir.)



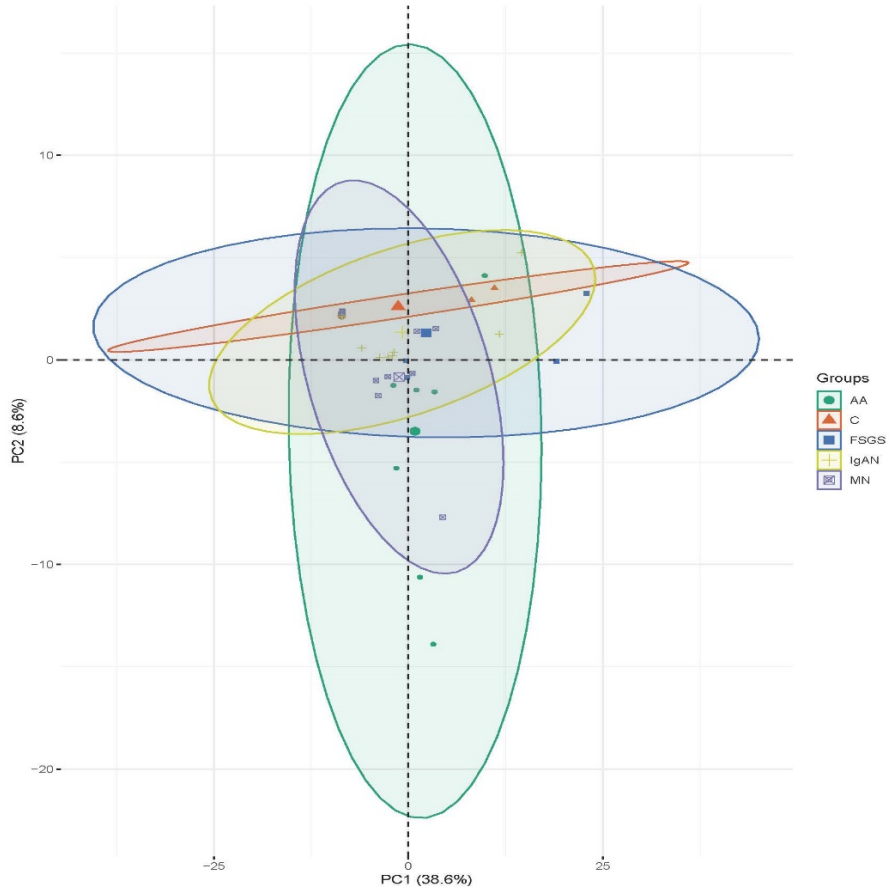
Şekil 4.6. GO hücreyel kompartman domaini **hücreyel anatomik bütünlük** alt domainleri (*Fold enrichment* değerine göre değil nicel olarak grafiklendirilmiştir.)

STRING aracılığıyla yapılan ağ analizinde pankreatik sindirim enzimleri (pankreatik alfa-amilaz, pankreatik ribonükleaz 1, deoksiribonükleaz 1, karboksilik ester lipaz), tübüler membran enzimleri (aminopeptidaz, gama-glutamil transpeptidaz), megalin-kübülin-ligandları ve perlecan-EGF-kaderin-CD44 ağı ön planda görüldü (Şekil 4.7)

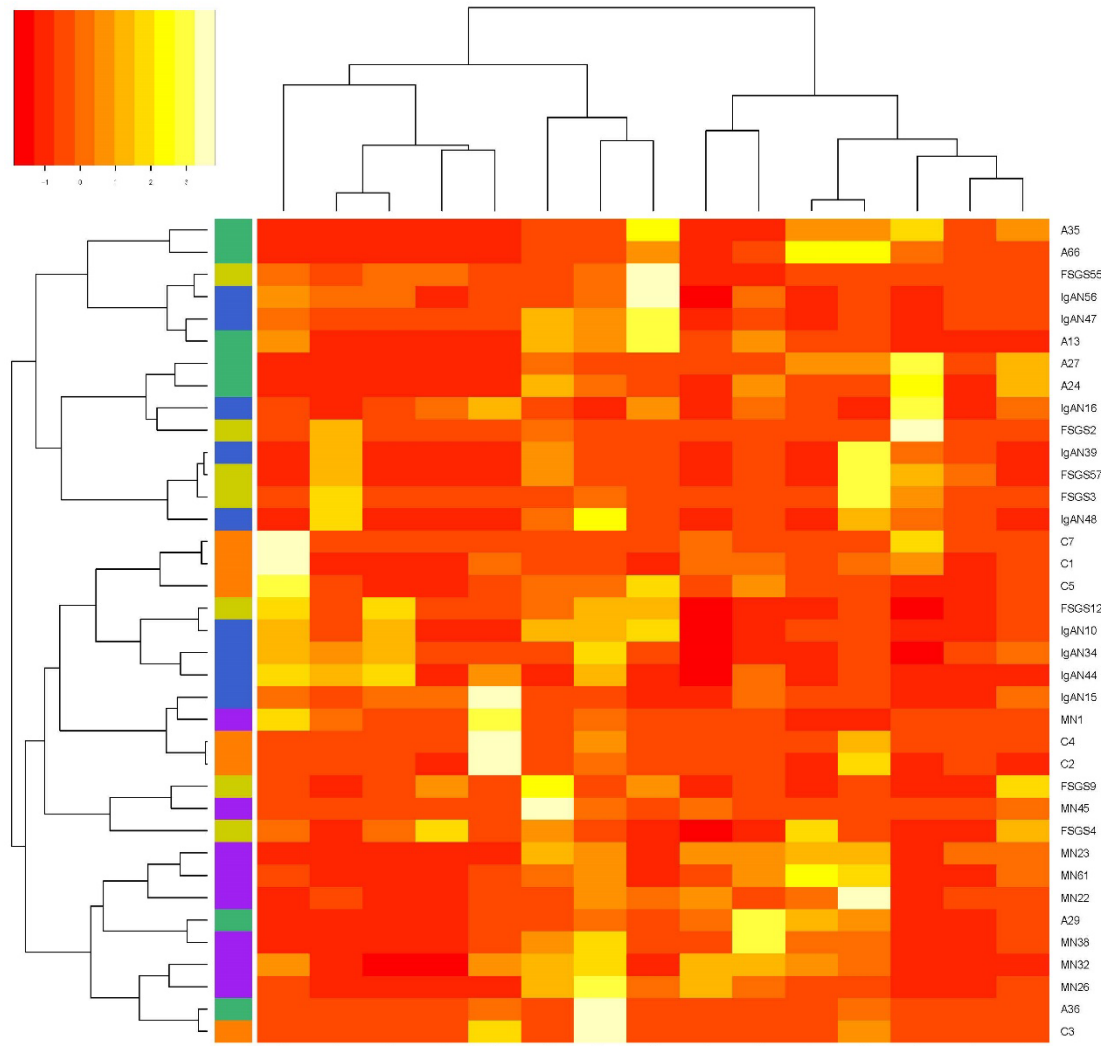
analizden farklı olarak ± 1.5 olarak belirlenmiştir. PCA ve ısı haritası analizleri sırasıyla Şekil 4.8. ve Şekil 4.9. 'da belirtilmiştir.

Tablo 4.9. Metabolomik analiz sonucunda AA Amiloidoz ile diğer gruplar arasında düzeyi anlamlı farklılık gösteren proteinler (\log_2FC değerleri parantez içinde belirtilmiştir.)

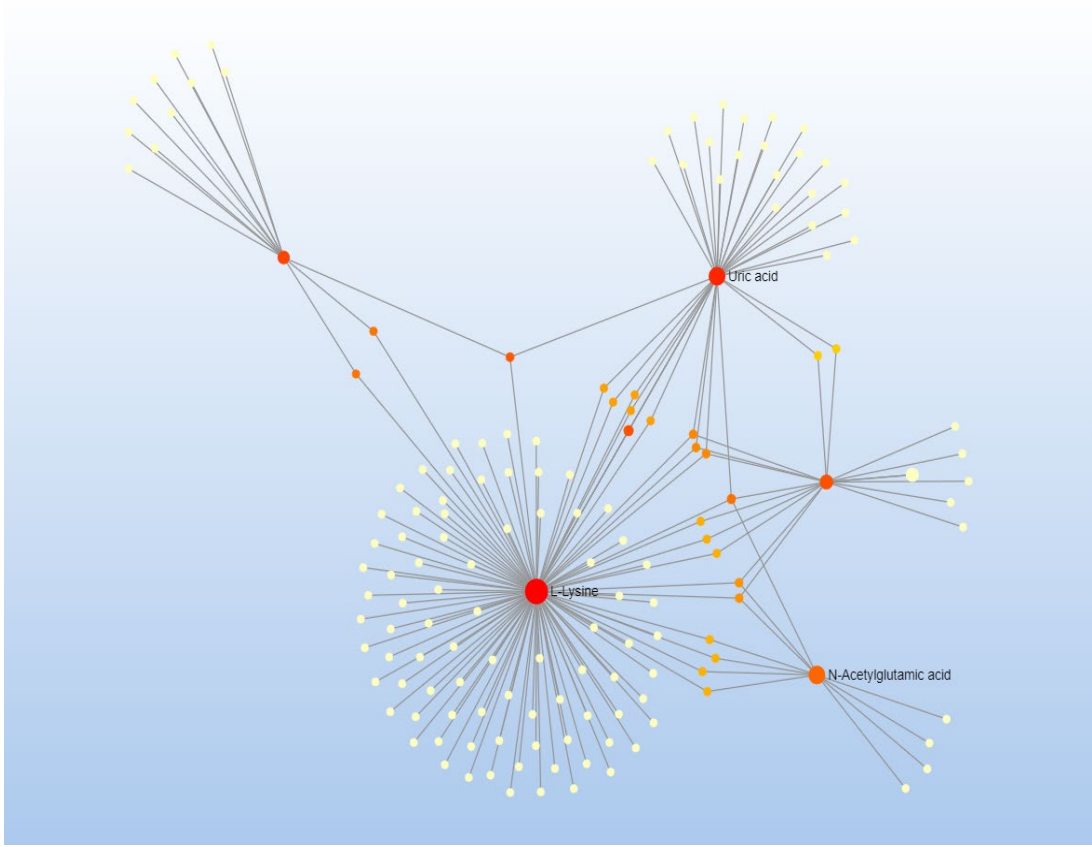
A/C	A/MN	A/FSGS	A/IgAN
D-mannitol (3.06)	Myo-inositol (2.18)	D-mannitol (2.65)	D-mannitol (2.28)
Metilmalonat (-2.96)	Maltoz (2.46)	Metil palmitat (2.59)	Metil palmitat (2.59)
L-lizin (1.85)	Ürik asit (2.65)	Laktoz (1.57)	
Sisteamin (3.46)		Palatinitol (1.8)	Palatinitol (-1.89)
N-asetilglutamat (2.46)		Soforoz (-1.52)	Soforoz (-1.74)
Trimetillizin (-2.65)			



Şekil 4.8. Metabolomik sonuçların Temel Bileşen Analizi



Şekil 4.9. Metabolomik sonuçların ısı haritası analizi



Şekil 4.10. Metabolomik sonuçların yolak analizi (*Metaboanalyst*)

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada yeni tanı renal AA Amiloidoz hastaları ile kontrol grubu bireyler ve diğer glomerüler hastalıklar arasında karşılaştırmalı bir üriner proteomik ve metabolomik analizi yapılmış ve amiloidoz grubunda düzeyi farklılık gösteren protein ve metabolitler saptanmıştır. Hastaların çeşitli patolojik özelliklerini skorlayarak bu moleküller ile olası ilişkilerini araştırılmış ve düzeyi farklılık gösteren bu moleküllerin bazılarının patofizyolojik olarak tübülointerstisyel kronik hasar ile ilişkili olabileceğini gösterilmiştir. Çalışmamız literatürde yeni tanı renal AA Amiloidoz hastaları üzerinde yapılmış ilk üriner omiks analizidir.

AA Amiloidoz ve Membranöz Nefropati hastaları arasındaki proteomik analizde Üromodulin (UMOD) amiloidoz grubunda istatistiksel anlamlı olarak düşük saptanırken pankreatik ribonükleaz (RNase1) ve AMBP (α -1-mikroglobulin/bikunin prekürsör protein) amiloidoz grubunda istatistiksel anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. UMOD nefroloji literatüründeki son yıllarda önemli bir yere sahip olup fizyolojik, patofizyolojik, tanısal ve prognostik açıdan pek çok hastalık süreci ile ilişkilendirilmiştir.

Üromodulin veya tarihsel adıyla Tamm-Horsfall proteini yalnızca renal tübülün kalın çıkan kol ve erken distal tübül hücrelerinde sentezlenmekte olan bir glikoproteindir (204). İdrarda en yüksek miktarda bulunan protein olan UMOD sentez ve regülasyon açısından birbirinden kısmen bağımsız iki farklı formda bulunmaktadır (205). Renal tübül hücrelerinin apikal kutbundan salgılanan ve idrarda baskın olarak saptanan form polimerize form olup glikozilfosfatidilinositol (GPI) çapasıyla hücre membranının eksternal yüzeyine salgılanır (206). Daha sonrasında bir tip 2 transmembran serin proteaz olan hepsin tarafından GPI çapasından ayrılır ve hidrofobik domaini aracılığıyla (ZP N-terminal) polimerize olarak fibriller bir yapı haline dönüşür (207). Bazolateral kutuptan renal interstisyuma salgılanan non-polimerize form ise serum üromodulinin tek kaynağı olup polimerize forma göre çok daha düşük miktarlarda idrarda da saptanmaktadır (205). Salgılandıktan sonra daha farklı bir bölgeden proteolize uğraması nedeniyle polimerizasyonu inhibe edici eksternal hidrofobik yama (EHP) domaininin kesilmemesi nedeniyle bu formun

polimerizasyona uğramadığı düşünülmektedir (208). Yapılan in vitro ve insan çalışmalarında bu iki sentezinin farklı fizyolojik regülasyonlar ile olabileceği gösterilmiştir (209, 210).

Üromodulinin fizyolojik rolünün üretildiği spesifik lokasyon ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Dış medullanın iç şerit bölgesi UMOD proteininin en çok eksprese edildiği yer olup bu bölge aynı zamanda renal mononükleer fagositer hücrelerin en yoğun olarak konumlandığı lokasyondur (205). Üromodulinin bu bölgede immün regülasyona katkı sağladığı düşünülmektedir (211). Fizyolojik olarak Henle çıkan kalın kolu ve erken distal tübül nefronunda serbest su emiliminin olmadığı bölgeler olup UMOD' un sodyum-potasyum-klor (NKCC2) ve sodyum-klor (NCC) kotransport proteinleri üzerindeki uyarıcı etkileri nedeniyle tuz duyarlı hipertansiyon patogenezinde de rol oynadığı düşünülmektedir (212, 213). Renal enfeksiyonlara ve taş oluşumuna karşı koruyucu etkileri de bildirilen proteinin sistemik formunun da distal bölgelerde antioksidan ve anti-inflamatuar rolü olabileceği belirtilmektedir (205).

Üriner UMOD proteininin yalnızca renal tübüler hücrelerden salgılanması nedeniyle sağlıklı nefron miktarının indirekt bir göstergesi olduğu düşünülmektedir. Radyoimmün testlerle yapılan tarihsel çalışmalarda renal hasarlı bireylerde ve otozomal dominant polikistik böbrek hastalarında (ADPKD) üriner UMOD düzeylerinin düşük olduğu bildirilmiştir (214). MS bazlı proteomiks ve ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) tekniği ile Fabry hastalığı, lupus nefriti ve ADPKD kohortlarında düşük üriner UMOD düzeylerinin saptanması ve eş zamanlı olarak üriner UMOD ölçüm tekniklerinin gelişmesi geniş kapsamlı popülasyon çalışmalarında total nefron miktarı ile üriner UMOD konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi araştırmayı mümkün kılmıştır (215).

Geniş bir popülasyon çalışmasında Pruijm ve arkadaşları SKIPOGH (*Swiss Kidney Project on Genes in Hypertension*) ve Lozan Kohortu çalışmasına katılan bireylerde 24 saatlik idrarda UMOD konsantrasyonu ile tübüler fonksiyon belirteçleri (idrara elektrolitleri, idrara kreatinini, 24 saatlik idrara hacmi, idrara osmolalitesi), ultrasonografik böbrek boyutları, yaş ve diyabet ile ilişkisini araştırmıştır (216).

Araştırmacılar üriner UMOD atılımı ile tübüler fonksiyonlar ve böbrek boyutları arasında pozitif; yaş ve diyabet arasında negatif korelasyon saptamış olup üriner üromodulin proteininin genel popülasyonda nefron yükünün indirekt bir göstergesi olabileceğini belirtmişlerdir (216). Pivin ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer araştırmada SKIPOGH çalışmasına katılan sağlıklı bireylerdeki toplam nefron yükü cinsiyet, ürik asit, yaş ve boyu içeren bir model aracılığıyla hesaplanmış ve kayıtlardan ulaşılabildiği ölçüde yine toplam nefron miktarının indirekt bir diğer göstergesi olan doğum ağırlıkları kaydedilmiştir (217). 24 saatlik idrarda UMOD konsantrasyonu ile hesaplanan nefron yükünün istatistiksel anlamlı bir şekilde korelasyon gösterdiğini gösteren araştırmacılar aynı zamanda renal donörleri içeren bir başka kohortta nefrektomi sonrasında üriner UMOD miktarının azaldığını göstermişlerdir (217).

Kronik böbrek hastalığı progresyonu ile üriner UMOD düzeyleri arasında görece küçük çalışmalarda çelişkili sonuçların ardından Garimella ve arkadaşları *Cardiovascular Health Study* çalışmasındaki bireylerin içinden 9 yıllık bir zaman aralığında GFR değerleri %30 veya daha fazla düşen hastalarda üriner UMOD konsantrasyonlarını incelemiştir (218). Vaka-kontrol çalışması olarak tasarlanan analizde düşük üriner UMOD konsantrasyonunun GFR ve proteinüriden bağımsız olarak GFR kaybı ve kardiyovasküler mortalite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (218). Çalışmanın uzun dönem sonuçlarının yapıldığı bir diğer analizde serum UMOD düzeyinde 1 standart birimlik bir artışın son dönem böbrek hastalığı riskini %63 oranında azalttığı gösterilmiştir (219). 2652 kronik böbrek hastasının olduğu bir Çin kohortunda bu korelasyon tekrar ortaya konulmuş ve düşük üriner UMOD düzeylerinin kardiyovasküler risk faktörlerinden bağımsız olarak son dönem böbrek hastalığı riskini arttırdığı bildirilmiştir (220). Scherberich ve arkadaşlarının yaptığı kesitsel bir çalışmada pediatrik yaş grubunu da içerecek şekilde sağlıklı bireylerden alınan serum UMOD örneklerinde stabilite çalışılmış ve normal değer aralıkları oluşturulmuştur (221). Sonrasında renal transplant alıcı hastalar ve IgAN, Membranöz nefropati, anti-GBM antikor pozitif pulmonorenal sendrom ve Lupus nefriti gibi otoimmün hastalık gruplarında anlamlı olarak daha düşük serum UMOD düzeyleri gösterilmiştir. Ayrıca evre 1-5 KBH hastalarında aynı çalışmada serum UMOD düzeyleri ile GFR, sistatin ve kreatinin korelasyonu açısından incelenmiş;

serum UMOD düzeyinin KBH evresine paralel olarak azaldığı ve non-KBH hastalarını KBH hastalarından ayırt etme konusunda serum sistatin düzeylerinden daha iyi performans gösterdiği saptanmıştır (221). Steubl ve arkadaşları Alman Kronik Böbrek Hastalığı kohortunda 5143 hastanın serum UMOD düzeyleri incelemiş ve çoklu değişken analizinde en yüksek çeyrek dilimde serum UMOD konsantrasyonuna sahip bireylerin en düşük çeyrek dilimdeki bireylere göre daha yüksek kardiyovasküler olay, son dönem böbrek hastalığı ve tüm nedenlere bağlı ölüm riskine sahip olduğu göstermişlerdir (222).

Ancak literatürde bazı çelişkili veriler de mevcuttur. Az sayıda çalışmada üriner ve serum UMOD düzeylerinin her patolojik durumda nefron yükü ile paralel olmadığını bildirmiştir (223). Kadınlarda ortalama nefron sayısı erkeklerden az olmasına rağmen üriner UMOD konsantrasyonu daha yüksek bulunmuştur (216). Renal hasarın erken başlangıç döneminde protektif geri bildirim mekanizmaları ile nefron başına düşen UMOD üretimi akut olarak arttığı bildirilmiştir (224). Ayrıca Mendel randomizasyon çalışmaları ile gösterildiği üzere bazı UMOD promotor bölgesi varyantlarının üriner UMOD konsantrasyonlarını arttırarak tuz duyarlı hipertansiyon gelişimine daha yüksek oranda yol açarak aynı zamanda renal hasara neden olabileceği ifade edilmiştir (225). Bu nedenle bazı yazarlar üriner UMOD konsantrasyonu doğrudan toplam sağlıklı nefron yükünün bir göstergesi olarak kabul etmek yerine çok bileşenli bir fonksiyonel tübüler yanıtın komponenti olarak değerlendirilmesi gerektiğini belirtmektedir (205).

Çalışmamızda renal AA Amiloidoz grubunda MN grubuna istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek oranda saptanan tübüler atrofi, interstisyel fibrozis ve total renal kronisite skorları ve daha düşük eGFR değerleri saptanmıştır. Bu nedenle amiloidoz grubundaki düşük üromodulin düzeylerinin hastalığa spesifik bir biyobelirteç olmaktan ziyade tanı anındaki yüksek tübülointerstisyel hasar sürecini yansıttığı düşünülmektedir.

Renal AA Amiloidoz hastalığında baskın olarak amiloid birikimi glomerüllerde saptanmakta ve nefrotik proteinüri en sık klinik prezantasyonu oluşturmaktadır (129). Ancak progresif hastalıkta tübülointerstisyel alanda da

amiloid birikimi ve beraberinde fibrozis gelişmektedir (164). Tanı anında amiloidoz sürecine eşlik eden tübülointerstisyel nefrit de bildirilmiş ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (166). Böbrek biyopsisi öncesinde üriner belirteçlerin renal patolojinin glomerüler veya tübülointerstisyel kaynaklı olduğunu belirlemedeki rolü üzerine yapılan bir çalışmada çoklu değişken analizinde yüksek idrar UMOD düzeyinin nispeten sağlıklı tübüler sisteme işaret ederek glomerüler etioloji ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (226). Japonya’ da 180 hastalık bir IgAN kohortunda yapılan çalışmada düşük serum UMOD düzeylerinin ağır histopatolojik skorlar ile ilişkili olduğu ve GFR>60 ml/dk olan hastalarda bile düşük serum UMOD düzeylerinin GFR kaybı ve tübüler zedelenmenin indirekt bir göstergesi olabileceğini bildirmişlerdir (227). 344 IgAN hastasının bulunduğu bir başka çalışmada düşük üriner UMOD düzeylerinin histopatolojik Oxford sınıflandırmasında daha yüksek tübüler atrofi/interstisyel fibrozis skorları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (228). Melchinger ve arkadaşlarının 364 glomerüler hastalık geniş bir kohortta yaptığı güncel bir çalışmada patolojik olarak tübüler atrofi ve interstisyel fibrozisin çoklu değişken analizde üriner UMOD ile bağımsız olarak ilişkili olduğu gösterilmiştir ve fibrotik böbreği olan fare modellerinde üromodulin boyanmasının immünohistokimyasal olarak daha zayıf olduğunun gösterilmesiyle bu ilişki desteklenmiştir (229). Çalışmamızda AA Amiloidoz hastalığında sağlıklı kontrol grubu ve MN tanısı olan hastalara göre düşük üriner UMOD düzeylerinin amiloid birikiminin yol açtığı tübüler hasarın indirekt bir göstergesi ve bu bağlamda kötü prognostik bir belirteç olabileceği düşünülmektedir. Nadir prevalansı nedeniyle AA Amiloidoz hastalığının yukarıda tartışılan UMOD ile renal prognoz ve tübülointerstisyel fibrozis arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda yeterince temsil edilmediği düşünülmekte ve renal AA Amiloidoz ile üriner UMOD düzeyleri arasındaki ilişkiyi gösteren bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Bu kapsamda çalışmamız üriner üromodulin ile amiloid tübülointerstisyel hasar arasındaki ilişkiyi indirekt olarak proteomik analiz sonucunda bildiren ilk çalışmadır.

Çalışmamızda proteomik analizler sonucunda AA Amiloidoz grubunu kontrol ve Membranöz nefropati grubundan ayıran bir diğer molekülün AMBP proteini olduğu görülmüştür. AMBP proteini aynı isimli AMBP geni (α 1-mikroglobulin-bikunun prekürsör geni) tarafından sentezlenen prekürsör protein olup bir tripeptid ile

birbirine bağlanmış bikunin ve α -1-mikroglobulin (A1M) proteinlerini içermektedir (230). Endoplazmik retikulumda katlanan protein golgi aygıtında N-terminal ucuna kondroitin sülfat bağlanarak post-translasyonel modifikasyona uğramakta ve proteinlerine ayrılmaktadır (231).

AMBP sentezi temel olarak karaciğerde olup α -1-mikroglobulinin fizyolojik rolü ile uyumlu olarak oksidatif stresler ile uyarılmaktadır (231). İçerdiği serbest sistein sülfidril uçları sayesinde önemli bir indirgeme potansiyeli olan proteinin serbest radikallerden pek çok dokuyu koruduğu düşünülmektedir (232). Aynı zamanda hemoliz sonucunda açığa çıkan hem moleküllerine bağlanarak hem ilişkili toksisiteyi engelleyebileceği gösterilmiştir (233). Hızlı bir şekilde intravasküler ve ekstrasvasküler kompartmanlarda dengeye ulaşan proteinin yarı ömrü hayvan çalışmalarında 2-3 dakika olarak bildirilmiştir (234). α 1-mikroglobulin düşük molekül ağırlığı ile glomerülden kolaylıkla filtre olduktan sonra büyük ölçüde proksimal tübülerden reabsorbe olmaktadır. Bu kapsamda tübüler hasar durumunda idrardaki konsantrasyonu artmakta ve literatürde aşağıda belirtilecek pek çok çalışmada tübüler fonksiyon belirteci olarak kullanılmaktadır.

Tarihsel olarak üriner serbest A1M konsantrasyonundaki artışın bozulmuş renal tübüler fonksiyonlar ile ilişkisi gösterilmiştir. Serum kreatinin ve β 2-mikroglobulin ile karşılaştırıldığında GFR kaybının daha erken dönemlerinde serum konsantrasyonunun arttığı ve tübüler hasar durumlarında stabilitesi ve ölçüm kolaylığıyla birlikte β 2-mikroglobulin ve N-asetilgalaktozidaz ile benzer şekilde üriner konsantrasyonunun arttığı gösterilmiştir (235). Cıva ve kadmiyum zehirlenmesi gibi toksik tübüler hasara sekonder durumlarda renal hasarın erken bir biyobelirteci olarak kullanılabilmesi bildirilmiştir (236). Renal transplant vakalarında da graft yetmezliği ve reddi üzerine yapılmış çalışmalar mevcuttur. FAVORIT çalışmasına (*Folic Acid for Vascular Outcome Reduction in Transplantation*) katılan renal transplant hastalarından seçilen bir grupta üriner A1M konsantrasyonunun eGFR ve proteinüri ile birlikte allogreft yetmezliği ile ilişkisi gösterilmiştir (237). 116 renal transplant hastasında yapılan bir üriner proteomik çalışmada A1M ve haptoglobin proteinlerinin akut rejeksiyon hastalarını stabil greft fonksiyonu grubundan istatistiksel olarak en iyi ayıran belirteçler olduğunu

göstermişlerdir (238). Yeni tanı kronik böbrek hastalığı gelişimi, progresyonu ve mortalite üzerinde yapılan uzun dönem prospektif bir çalışmada (*Framingham Heart Study*) 2948 katılımcıda 14 üriner biyobelirtecin yeni tanı renal veya kardiyovasküler hastalık gelişimi ve mortalite ile korelasyonu araştırılmıştır. Herhangi bir biyobelirteç KBH tanısı almada risk artışı ile ilişkili bulunmazken A1M molekülünün tüm nedenlere bağlı mortaliteyi ve KBH varlığında mortaliteyi diğer faktörlerden bağımsız olarak istatistiksel anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir (239).

Üriner A1M proteininin erken dönemde diyabetik böbrek hastalığının biyobelirteci olabileceğine dair pek çok veri bulunmaktadır. Görece küçük örneklerde yapılan çalışmalarda klinik olarak diyabetik nefropati gelişmeden önce üriner A1M düzeylerinin arttığı ve gerek tip1 gerek tip 2 diyabet hastalarında üriner A1M konsantrasyonunun arttığı gösterilmiştir (240-242). 590 hastanın katıldığı Asya popülasyonunda yapılan epidemiyolojik bir çalışmada üriner A1M düzeylerinin diyabetin süresi ve kontrol düzeyleri ile ilişkili olduğu gösterilmiş olup albüminüri ile korele olduğu bildirilmiştir (243). Başka bir çalışmada non-albüminürik diyabetik hastalarda üriner A1M yüksekliği gösterilmiş ve A1M konsantrasyonlarının en iyi predikte eden faktörün açlık glukoz düzeyi olduğu bildirilmiştir (244). Çin’de yapılan bir çalışmada diyabetik hastalarda glomerüler ve tübüler üriner biyobelirteçlerinin eGFR ile ilişkisi araştırılmış ve yalnızca üriner A1M ile β 2M konsantrasyonlarındaki yüksekliğin albuminüriden bağımsız olarak eGFR düşüklüğü ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (245). SDRNT1BIO (*Scottish Diabetes Research Network Type 1 Bioresource*) çalışmasına katılan tip1 diyabeti olan hastalarda 14 idrar ve kan biyobelirteci ile eGFR arasındaki ilişki araştırılmış ve A1M proteininin içeren bir modelin prospektif olarak eGFR düşüşünü tek başına albuminüriden daha iyi predikte ettiği gösterilmiştir (246). Amatruda ve arkadaşlarının 2022 yılında yaptığı bir analizde REGARDS (*Reasons for Geographic and Racial Differences in Stroke*) çalışmasında diyabet tanısı olup GFR<60 ml/dk olan 1092 hastaların medyan 4.3 yılda son dönem böbrek hastalığına progrese olan alt grubunda çeşitli biyobelirteçler çalışılmıştır (247). İdrarda A1M, MCP (*monocyte chemoattractant protein-1*) ve KIM-1 (*kidney injury molecule-1*) konsantrasyonlarındaki artışın GFR ve albuminüriden bağımsız olarak son dönem böbrek hastalığına ulaşma riskini arttırdığı gösterilmiştir (247).

Diyabetik hastalarda yapılan proteomiks çalışmaları da üriner A1M' nin diyabetik böbrek hastalığında bir biyobelirteç olarak kullanılabilmesine işaret etmektedir. Karşılaştırmalı bir üriner eksozom proteomik analizinde diyabetik böbrek hastalığı olan bireylerde üriner serbest ve/veya eksozomal AMBP proteininin sağlıklı kontrollere göre yüksek olduğu görülmüştür (248). Liao ve arkadaşlarının yaptığı karşılaştırmalı bir diğer proteomik analizde sağlıklı kontroller ile proteinürik olan grup ve diyabetik hastaların içinde nefropatisi olan ve olmayan bireyleri istatistiksel olarak en iyi ayıran iki protein haptoglobin ve AMBP olduğu bildirilmiş ve bu proteinler ELISA ölçümleri ile konfirme edilmiştir (249).

Glomerüler hastalıklarda yapılan analizlerde A1M proteininin ayırıcı tanı ve prognozda rol oynayabileceğine dair çalışmalar mevcuttur. Membranöz nefropatide üriner düşük moleküler ağırlıklı proteinleri prognoz ile ilişkili olduğu pek çok çalışmada gösterilmiş ve kişiselleştirilmiş risk bazlı tedavide güncel kılavuzda immünsupresyon kararını etkileyen faktörlerden biri olarak belirtilmiştir (25, 250). A1M, B2M ile birlikte temel üriner düşük molekül ağırlıklı proteinleri oluşturmaktadır. Rood ve arkadaşları primer MN hastalarında, primer FSGS ve sağlıklı kontrol grubu arasında karşılaştırmalı bir üriner eksozom analizi yapmıştır. Lizozomal İntegral Membran Protein Tip 2' nin (LIMP-2) MN eksozomları için yeni bir biyobelirteç olabileceğine işaret eden ve histopatolojik olarak da LIMP-2 ekspresyonu konfirme edilen çalışmada, ek olarak A1M miktarının FSGS ve kontrol grubuna kıyasla MN hastalarının üriner eksozomlarında daha yüksek olduğu bildirilmiştir (187).

Yokota ve arkadaşları LC-MS/MS kullanılarak 17 hastadan alınan idrar örneklerinde IgAN protein belirteçlerini araştırmıştır. Tanımlanmış 172 protein arasında α -1-mikroglobulinin grupları yüksek istatistiksel kuvvet ile ayırabilmesi nedeniyle IgA Nefropati hastalığı için olası bir biyobelirteç olabileceği belirtilmiştir (196). Daha büyük bir örneklem ile yapılan benzer bir çalışmada 30 IgAN tanılı hastanın idrar proteomunu incelenmiş ve sonuçları 30 kişilik kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. IEF-LC-MS/MS kullanılan proteomik analizde A1M proteininin IgAN hastalarında 18 adet istatistiksel anlamlı olarak farklı düzeyde eksprese edilen proteinden biri olduğu saptanmıştır (251). IgAN hastalarında dolaşımdaki immün

kompleks (CIC) bileşimini araştırmak için, Xu ve arkadaşları IgAN hastalarından ve sağlıklı kontrollerden izole edilmiş CIC' ler arasında MS bazlı karşılaştırmalı bir analiz yapmıştır (252). CIC içeriğinde 14 proteinin anlamlı ölçüde farklı seviyelerde olduğunun gösterildiği çalışmada bu proteinlerin arasında olan A1M proteininin yalnızca in vitro mezengial hücre proliferasyonu ve MIC-1 salgılanması ile değil, aynı zamanda eGFR seviyeleri ve tübülointerstisyel lezyonlarla da ilişkilendirilmiştir (252).

Zhao ve arkadaşları Adriamisin ile indüklenen sıçan FSGS modellerinde idrar proteomunu araştırmıştır. 20'si insan ortologlarına sahip 23 proteinde gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklı düzeylerin tanımladığı çalışmada bu 20 protein arasından 7 tanesi seçilmiş ve serum albümini, serotransferin, α -1-antiproteinaz, afamin, seruloplazmin, plazminojen ve AMBP proteinleri idrarda Western blot analizi ile doğrulanmıştır (253). Kalantari grubunun yaptığı bir diğer çalışmada erken (eGFR > 60 ml/dk) ve ileri (eGFR < 60 ml/dk) evredeki iki grup FSGS hastası arasındaki prognostik protein belirteçleri çalışılmıştır. nLC-MS/MS yöntemini kullanarak yapılan idrar proteomik analizinde düzeyi anlamlı olarak değişen 54 protein arasından AMBP, düşük GFR grubunda en yüksek *logfold* değişimine sahip proteinlerden biri olarak bildirilmiştir (190). Cheade ve arkadaşlarının pediatrik popülasyonda MCD ile FSGS ayırıcı tanısı üzerinde üriner düşük molekül ağırlıklı proteinleri araştırdıkları bir çalışmada A1M düzeyleri histopatolojik tanıdan bağımsız olarak her ne kadar iki grup arasında anlamlı fark göstermese de relaps ile ilişkili bulunmuştur (254).

AA Amiloidoz ile MN grupları arasında istatistiksel anlamlı farklılık gösteren son protein olan pankreatik ribonükleaz (RNase1), günümüze dek tanımlanmış toplam 13 enzimden oluşan Ribonükleaz A üst ailesine ait bir endonükleazdır (255). Bu enzim ailesi konak savunması ve bağışıklık hücre düzenlemesi doku onarımı ve anjiyogenez gibi geniş bir spektruma dağılan biyolojik işlevlere sahiptir (256). RNase1, kanonik ribonükleazlar olarak bilinen ailenin 8 salgılanabilir ve enzimatik olarak aktif üyesinden biri olarak tanımlanmaktadır (255). RNase1' in pankreas, testis, over, beyin ve proksimal tübül gibi vücudun birçok dokusunda üretildiği gösterilmiştir (256). Tarihsel çalışmalarda idrardan izole edilmiş birden çok

ribonükleaz enzimi tanımlanmış ve nefrotik sendromlu bireylerin idrar protein analizinde de gösterilmiştir (257, 258).

Günümüze dek RNase1 enziminin böbrek hastalıkları ile ilişkisine dair çok az sayıda veri bulunmaktadır. Tarihsel çalışmalarda serum ribonükleaz düzeylerinin kronik böbrek hastalarında yükseldiği gösterilmiş; diyaliz tedavisi ile etkin düşüş sağlanamaması ve in vitro toksik etkileri nedeniyle enzimin üremik bir toksin olarak değerlendirilebileceği bildirilmiştir (259-261). Bir başka çalışmada lösemi hastalarında serum ribonükleaz seviyeleri ve renal hasar arasında bir korelasyon olduğu belirtilmiştir (262). Choi ve arkadaşlarının primer nefrotik sendromlu bireylerde yaptığı karşılaştırmalı bir üriner proteomiks çalışmasında FSGS, MN ve MCD tanılı hastaların analizinde RNase1 FSGS grubuna spesifik olarak bildirilmiştir (263). Endotel kökenli RNase1 enziminin regülasyonu üzerinde yapılan çalışmalarda akut inflamasyonun ekstraselüler RNA düzeylerini arttırarak dolaylı yoldan RNase1 salgılanmasını tetiklediği gösterilmiştir. Ancak kronik inflamasyonda ekstraselüler RNA birikiminin kemotaktik etkileri ile bölgeye gelen inflamatuvar hücrelerden salgılanan proinflamatuvar sitokinler (TNF- α ve IL-1) RNase1 ekspresyonunu baskıladığı ifade edilmiştir (256). Sepsis ve kritik hastalık gibi akut inflamatuvar bir hastalıkta yapılan bir sistem biyolojisi çalışmasının sonuçları bu mekanizmayı destekler niteliktedir. Tsalik ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptığı bu çalışmada CAPSOD (*Community Acquired Pneumonia and Sepsis Outcome Diagnostic*) çalışmasındaki sepsisi olan hastalar renal fonksiyonlarına göre kategorize edilmiş ve plazma örneklerinin proteomik, transkriptomik ve metabolomik analizi yapılarak renal disfonksiyonunun kritik hastalık durumunda kapsamlı patofizyolojik etkileri araştırılmıştır (264). Omiks analizlerin sistematik integrasyonu sonucunda plazma RNase1 ile pek çok RNA kataboliti ve modifiye nükleozitler arasında korelasyon saptanmıştır. Ayrıca kesitsel olarak RNase1 ile son dönem böbrek hasarında saptanan üremik bazı endotel hasarı ile ilgili çeşitli metabolitlerin (fenilasetilglutamin, P-kresol sülfat ve mannitol) korelasyonunu gösteren araştırmacılar endotel hasarına sekonder artan RNase1 düzeylerinin RNA yıkımına yol açtığı ve ürik asit başta olmak üzere yıkım ürünlerinin yol açtığı oksidatif hasarın patofizyolojiye katkı sağladığını öne sürmüşlerdir (264). Yapılan bir hayvan çalışmasında fare sepsis modeline RNase1 uygulamasının septik kardiyomyopatiyi

ve kardiyak apoptozisi azalttığı gösterilmiştir (265). Kronik inflamasyon açısından genel görüş endotel kaynaklı RNase1 açısından inhibe edici olarak görülse de lipopolisakkarit ve IL-13 gibi proinflamatuvar uyarıların enzim sentezini arttıramadığı gösterilmiştir (266). Ayrıca literatürde üriner RNase1 regülasyonu üzerinde bir çalışma henüz yapılmamış olup farklı dokularda farklı mekanizmalar baskın olabilir. Bu kapsamda AA Amiloidoz grubunda MN grubuna göre ekspresyonu artmış RNase1 enziminin altta yatan ekstraselüler RNA ve inflamatuvar hasar ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda AA Amiloidoz grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık gösteren proteinleri gen ontolojisi analizinde istatistiksel olarak en anlamlı moleküler fonksiyon kalsiyum bağlanması; biyolojik süreç sindirim süreci ve hücrel kompartmanda hücre içi veziküler membranlar ve hücre membranı olarak sonuçlandı. Aril sülfataz, α -galaktozidaz, lizozomal asit fosfataz, pankreatik alfa amilaz, deoksiribonükleaz, non-sekretuar ribonükleaz, aminopeptidaz, gama-glutamil transferaz, pepsin ve karboksil-ester hidrolaz sindirim domainindeki proteinleri oluşturmuştur.

RNase2 non-sekretuar bir ribonükleaz olup literatürde eozinofil kaynaklı nörotoksin (EDN) olarak da bilinmektedir (267). Eozinofilik asidik granüllerde bulunan ve proinflamatuvar uyarılar sonucunda makrofajlardan da salgılanabilen bu proteinin dentritik hücrelerin kemotaksisi, matürasyonu ve Th2 hücrelerini uyarması gibi pek çok immünolojik rolü bulunmaktadır (268, 269). İdrar EDN düzeylerinin astım ve atopik dermatit gibi alerjik hastalıklarda ve over kanserinde bir biyobelirteç olabileceğine dair bulgular mevcuttur (270-272). Ancak glomerüler hastalıklarda RNase2 enzimine spesifik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Giriş kısmında da ifade edilen çalışmada literatürde RNase2 ile ilgili bildirilmiş tek proteomik çalışması Kalantari ve arkadaşlarının erken ve ileri evre FSGS hastalarını nLC-MS kullanarak karşılaştırdığı ve ribonükleaz 2 proteininin ileri dönem hastalık grubunda en yüksek *logfold* değerine sahip olan protein olduğunu bildirdiği çalışmadır (190). Çalışmamızda ise benzer yükseklikteki bir *logfold* değerinde (-7.6) EDN kontrol grubunda amiloidoz grubuna göre yüksek saptanmıştır.

Deoksiribonükleaz (DNase1), pankreatik α -amilaz (AMY2A) ve karboksilik ester lipaz (CEL) çalışmamızda saptadığımız sindirim süreci ile ilişkili enzimlerin diğer örnekleridir. Kronik böbrek hastalığında evre ilerledikçe AMY2A enziminin serum düzeylerinin ve amilaz-kreatinin renal klirensinin arttığı belirtilmiştir (273-275). Hemodiyaliz hastalarında yapılan bir çalışmada düşük serum amilaz düzeyine sahip hastalarda mortalitenin arttığı belirtilmiş ve bu durum malnütrisyon ile ilişkilendirilmiştir (276). Literatürdeki proteomik analizlere bakıldığı zaman diyabetik nefropati hastalarında progresyondaki biyobelirteçlerin inceleyen bir üriner proteomik analizde Lewandowicz ve arkadaşları AMY2A, AMY2B ve DNase1 düzeylerinin diyabetik böbrek hastalığı olan grupta komplikasyon gelişmemiş diyabet grubuna göre daha düşük olduğunu bulmuşlardır (277). Araştırmacılar literatürdeki serum amilaz düzeylerinde ve klirensteki artış verileri nedeniyle bu korelasyonun azalmış filtrasyon ve/veya artmış tübüler reabsorpsiyon gibi renal kökenli bir mekanizmadan çok diyabetik hastalarda özellikle otonomik nöropatiye eşlik eden ekzokrin pankreas yetmezliğine sekonder gelişen mutlak enzim eksikliğine bağlı olabileceğine işaret etmişlerdir (277). Literatürde diyabetik veya non-diyabetik kronik böbrek hastalarında da üremik ekzokrin pankreatopati gelişebildiği bildirilmiş olup ayrıca sistemik AA Amiloidoz hastalığında da pankreasta amiloid tutulumuna bağlı hasarlanma oluşabilmektedir (278, 279). Bu kapsamda çalışmamızda 3 pankreatik enzimin de amiloidoz grubunda kontrol grubuna göre düşük saptanmış olması, amiloidoz grubunda mevcut olası asemptomatik ekzokrin pankreas yetmezliği ile ilişkili olabilir.

Üriner DNase1 enziminin pankreasa ek olarak böbrek tübül hücreleri kökenli olarak da üretilebileceğine dair bilgiler mevcut olup bu bağlamda DNase1 enzimi ayrıca tartışılmayı hak etmektedir. Hayvan lupus nefriti modellerinde DNase1 doku, serum ve idrar düzeylerinin düşük olduğu gösterilmiştir (280). Membranoproliferatif lupus nefriti hastalarında da renal DNase1 ekspresyonunun azaldığı ve enzimatik aktivitedeki düşüklüğün basit bir inhibisyondan ziyade üretimde azalma kaynaklı olduğu gösterilmiştir (281). Pedersen ve arkadaşlarının fare modelleri ve lupus nefriti hastaları üzerinde yaptığı çalışmada renal dokudaki enzim aktivitesindeki düşüklüğün üriner enzimatik aktivite düşüklüğü ile korelasyon gösterdiği ve progresif vakalarda düşük DNase1 enzim düzeyleri olduğunun gösterilmesi üriner

düşük DNase1 enzim aktivitesinin proliferatif lupus nefritinde tanısal ve prognostik bir belirteç olabileceği belirtilmiştir (282). Pek çok farklı etiyolojiye bağlı akut böbrek hasarında gerek insan gerek hayvan modellerinde üriner ve plazma ekstraselüler DNA konsantrasyonlarının arttığını ve hayvan modellerinde ekstraselüler DNA yüksekliğine paralel olarak üriner DNase1 aktivitesinin azaldığını gösteren Kovalcikova ve arkadaşları ekstraselüler DNA miktarındaki artışın renal hastalıklarda DNase1 inhibisyonuna sekonder gelişebileceğini öne sürmüşlerdir (283). Ancak yalnızca çalışmaya katılan glomerüler hastalığa sahip bireylerde bu düşüş gösterilememiştir. Analoji kurulan hayvan modelinde adenin nefropatili (AN) farelerin kullanılması nedeniyle araştırmacılar bu farklılıktan AN patogenezinde glomerülonefritlerin aksine hasarı tübülointerstisyel olarak başlaması kaynaklı olabileceğini belirtmişlerdir (283). Çalışmamızda amiloidoz grubunda kontrol grubuna göre daha düşük düzeyde saptanan DNase1 düzeylerinin tübülointerstisyel hasar ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Amiloidoz ve kontrol grubu arasında N-aminopeptidaz (Alanin Aminopeptidaz, APN) ve gama-glutamil transpeptidaz izoformlarının (GGT1, GGT2, GGT3) düzeylerinin anlamlı farklılık gösterdiği saptanmıştır. Aminopeptidazlar ve gama-glutamil transpeptidazlar renal tübüler hücrelerin fırça kenar membranında bulunan enzimatik proteinlerdir (284). Aminopeptidazlar glomerüler filtrasyon bariyerinden kolayca filtre olamayacak ölçüde büyük (>140 kDa) ve yüksek oranda renal spesifik bu üriner enzimler tübüler tarihsel olarak 1970'lerden bu yana böbrek hastalıklarında üriner biyobelirteçler olarak öne sürülmüşlerdir (285). APN ve izoformlarının ölçümünün nefrolitiaziste tanısal önemi olduğunu gösteren Marchewka ve arkadaşları ayrıca glomerülonefrit tanılı hastalarda kontrollere göre anlamlı derecede daha yüksek APN atılımı ve idrar protein konsantrasyonları ile APN aktivitesi arasında pozitif bir korelasyon gözlemlemiştir (286, 287). APN aktivitesi; IgA nefropatisi ve diyabetik gibi çeşitli hastalıklarda, ayrıca vankomisin veya amfoterisin B tarafından indüklenen nefrotoksisitede bir biyobelirteç olarak da önerilmiştir (288-291). Çalışmamızda ise amiloidoz grubunda renal tübüler membran enzimleri membranöz nefropati grubuna göre daha düşük düzeyde saptanmıştır. Bu durumun uzun süren kronik tübüler hasar sonucu azalan sağlıklı hücre yükü ile körele olabileceği düşünülmektedir.

Megalin (*Low-density lipoprotein receptor-related protein 2*, LRP2) ve kübilin (CUB) proteinleri proteomik analizlerde AA Amiloidoz grubunda istatistiksel anlamlı olarak düşük görülen, özellikle proksimal tübül fizyolojisinde temel rol oynayan iki proteindir. Membranla ilişkili bir endositik reseptör olan megalin ve bununla ilgili proteinlerden en önemlilerden biri olan kübilin, reseptör aracılı endositozdan sorumludur (292). LDL reseptör ailesinden yüksek moleküler ağırlıklı (yaklaşık 600 kDa) bir glikoprotein olan megalin çeşitli dokular tarafından ifade edilmekte; ancak en yüksek oranda böbrekte proksimal tübüler hücre membranında eksprese edilmektedir (293). Bir transmembran protein olan megalin 4600 aminoasitlik 3 farklı domainin tekrarlarında oluşan ve çok çeşitli bir spektrumda ligandlara bağlanmayı mümkün kılan ekstraselüler bölge, tek domain içeren bir transmembran bölge ve kısa bir intrasitoplazmik bölgeden oluşmaktadır (294). İntrasitoplazmik bölgeye bağlanan ve fosforilasyonu sağlayan çeşitli adaptif proteinler (OCRL1, ARH, Rab11, Dab2, GSK-3 β) megalinin endositik döngüsü düzenlemekte ve hücre içi yarı ömrünü uzatmaktadır (294).

Steroller, lipoproteinler, vitamin bağlayıcı proteinler ve hormonlar gibi birçok ligand, reabsorpsiyon için megalin proteinine ihtiyaç duymaktadır (295). Bunların çoğu, vitamin D bağlayıcı protein (DBP), vitamin A/retinol bağlayıcı protein (RBP), β 2-mikroglobulin ve α -1-mikroglobulin dahil olmak üzere tübüler geri emilim fonksiyonunun belirteçleridir (294). Ayrıca Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin (NGAL) gibi akut ve kronik böbrek hastalığının iyi çalışılmış üriner bazı biyobelirteçler megalin proteininin ligandları arasında tanımlanmıştır (296). Megalin ayrıca aminoglikozitler, polimiksin B ve kolistin gibi nefrotoksik ilaçların yeniden emilimine katkı sağlamaktadır (297).

Pek çok molekül fonksiyonel ve spatiyel olarak megalin ile ilişkilidir. Bunlardan en belirgin olanı kübilindir. İlk olarak intrinsik faktör-vitamin B12 reseptörü olarak tanımlanan proteini kodlayan gendeki mutasyon proteinürinin eşlik ettiği Imerslund-Gräsbeck sendromuna yol açmaktadır (297). Bu proteininin altında yatan etiolojinin genetik bir FSGS olabileceği küçük bir vaka serisinde bildirilmiştir (298). Kübilin proteini glomerüler filtratta bulunan transferin, albümin, DBP ve diğer ligandları tanıyan bir endositik reseptör görevi görmekte; ancak intraselüler domaine

sahip olmaması nedeniyle, kübilinin etkili bir şekilde çalışması için megalin ile bağlanması gerektiği düşünülmektedir (292).

Lipopolisakkarite sekonder endotoksemi, iskemi-reperfüzyon hasarı, Shiga toksine sekonder nefropati, hipertansiyon, aristoloşik asit nefropatisi ve mineralokortikoid bağımlı tübüler interstisyel fibrozis modellerinde renal dokuda megalin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (299-303). Ayrıca diyabetik hayvan modellerinde ve diyabetik böbrek hastalarında dokuda megalin ekspresyonunun azaldığı gösteren çalışmalar mevcuttur. Diyabetik sıçan modellerinde artan proteinüriye paralel olarak proksimal tübüllerde megalin, kübülün ve ClC-5 (*Chlorine channel-5*) proteinlerinin ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiştir (304). Diğer bir diyabetik hayvan çalışmasında megalin ile aynı makromoleküler endositik kompleks içinde bulunması nedeniyle NHE3 (*Sodium-hydrogen exchanger 3*) kanalının diyabetik nefropatide megalin proteini artan albüminüri ile mücadele ederken membranda ekspresyonunun arttığı ve sodyum tutulumuna katkıda bulunduğu bildirilmiş ve bu bağlamda diyabet patofizyolojisinde proteinüri-megalin ekspresyon kaybı- tuz tutulumu ilişkisine dikkat çekilmiştir (305).

Glomerüler hastalıklarda da proksimal tübül hücrelerinde megalin ekspresyonunun azaldığına yönelik kanıtlar mevcuttur. Fatah ve arkadaşları minimal değişiklik hastalığı, membranöz nefropati veya fokal segmental glomerüloskleroz hastalıklarına sekonder nefrotik sendrom kliniği ile başvuran hastaların proksimal tübüler epitel hücrelerinde ve fare modelinde megalin ekspresyonunun proteinüri arttıkça önemli ölçüde azaldığını göstermiştir (306). Renal megalin ekspresyon kaybının proteinüri miktarı ile doğrudan ilişkisini araştırmak için aynı ekip aşırı-protein ile beslenen proteinürik fare modeli ile çalışmış ve idrar protein/kreatinin oranındaki üç katlık bir artışın, tübüler megalin ve kübülün ekspresyonunu azaltmak ve bu moleküllerin üriner atılımını artırmak için yeterli olduğunu göstermiştir (306). Vinge ve arkadaşları Alport sendromu modeli olan XLAS köpeklerinde yaptıkları çalışmada artan proteinürinin megalin ve kübülün proteinlerinin geri emilim kapasitesini aşmasından sonra idrarda bu proteinlerin ligandı olan düşük moleküler ağırlıklı proteinleri atılımının arttırdığı; hücresel düzeyde de reseptör ilişkili endositik aktivitenin azaldığı göstermiştir (307).

Üriner megalin veya kübülün proteinlerinin atılımı ve/veya konsantrasyonunun biyobelirteç olarak değeri konusunda daha az sayıda çalışma mevcuttur. Seki ve arkadaşları IgAN tanısı hastalarda yüksek üriner megalin düzeylerinin son dönem böbrek hastalığı riskini arttırdığını bildirmiştir (308). Mikroalbüminürik tip1 diyabeti olan hastalarda yapılan küçük ölçekli bir karşılaştırmalı üriner proteomiks çalışmasında megalin ve kübülün atılımının arttığı gösterilmiş ve bu durumun diyabetik böbrek hastalığında artan matriks metalloproteinaz aktivitesi sonucu bu moleküllerin membranda proteolize uğrayarak idrara dökülmesi nedeniyle olabileceğini belirtmişlerdir (309).

Tip 2 diyabet tanılı 68 hastalık küçük bir kohortta yapılan çalışmada tam uzunluktaki üriner megalin düzeyleri ELISA ile ölçülmüş; üriner megalin konsantrasyonlarının proteinüri ile pozitif ve eGFR düzeyleri ile negatif korelasyon gösterdiği gösterilmiştir (310). eGFR>60 ml/dk olan hastaları da dahil eden ve eGFR ile proteinürinin birbirinden bağımsız olarak üriner megalin düzeyi ile olan ilişkisini kesitsel olarak inceleyen Kurita ve arkadaşları DDCRT 21 (*Diabetes Distress and Care Registry at Tenri*) çalışması katılımcılarını içeren 1576 hastalık geniş bir kohortta bu korelasyonları doğrulamışlardır (311). DCCRT 22 kohortunda Nishiwaki ve arkadaşları yaklaşık 2 yıllık medyan takip süresinde de üriner megalin düzeylerinin mikroalbüminüri progresyonunu arttırdığını göstermişlerdir (312). Proteinürik preeklamsi hastalarında yapılan bir çalışmada üriner kübülün düzeylerinin proteinüri düzeyi ile paralel olarak arttığını ve kübülün kaybının D vitamini bağlayıcı globin miktarını azaltarak vitamin D eksikliğine katkı sağladığını belirtmişlerdir (313). Literatür değerlendirildiğinde çalışmamızda patolojik olarak yüksek düzeyde tübüler atrofi ve interstisyel fibrozis saptanan amiloidoz hastalarında saptanan megalin ve kübülün düzeylerinin uzun dönemde düşük düzey ekspresyon ve üriner kayıp sonucu olduğu düşünülmektedir.

Perlekan multisistemik olarak bağ dokunun en önemli bileşenlerinden birini oluşturan bir proteoglikandır (314). Endotel bazal membranında yüksek miktarlarda bulunan protein glomerüler bazal membranının da önemli bir bileşenini oluşturmaktadır (314). Perlekan endotel hücrelerinde VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) yolağının regülasyonu yoluyla anjiyogenezde kritik bir rol

oyunmaktadır (315). Ayrıca endotel duvarında tutunmuş olan perlekanın kayma gerilmesi (*shear stress*) açısından bir sensör görevi gördüğü ve endotel hücre membranı polarizasyonu yoluyla da endotel hücre büyüme ve gelişimini etkilediği bildirilmiştir (316).

Pek çok hayvan modelinde ve diyabetik böbrek hastalarında hiperglisemiye sekonder glomerüler bazal membranda perlekan sentezinin azalması ve kalınlığın artmasıyla bazal membranının kalitesinin azaldığı ve geçirgenliğinin arttığı gösterilmiştir (317). IgAN hastalarında yapılan bir çalışmada perlekan proteininin glomerüllerde artmış ve tübülointerstisyel kompartmanda azalmış ekspresyonu saptanmış ve yüksek perlekan ekspresyonu olan hastalarda böbrek fonksiyonunda daha yavaş bozulma görülmüştür (318). Yazarlar bu nedenle IgAN hastalarında perlekanın olası bir pozitif prognostik belirteç olduğu sonucuna varmışlardır. Gebe hastalarda yapılan karşılaştırmalı bir proteomik analizde preeklamsi tanısı olan gebelerde üriner perlekan düzeylerinin daha düşük olduğu gösterilmiştir (319).

Endorepellin perlekan kor proteininin 5.domain C-terminal bölgesinin BMP-1 (*bone morphogenetic protein-1*) enzimi tarafından kesilmesiyle oluşan 85 kDa ağırlığında bir proteindir (320). Aynı enzim veya katepsin L aracılığıyla ileri bir proteoliz sonucu olarak da LG3 fragmenti oluşmaktadır (321). LG3, hem α -2- β -1 integrin hem de VEGF yolları ile etkileşimi sonucunda sahiptir stres liflerinin ve fokal adezyonların bozulmasını tetikleyerek anti-anjiyojenik aktiviteye sahip olur (322, 323). Anti-anjiyojenik etkilerine ek olarak fibroblastlarda, vasküler düz kas hücrelerinde ve mezenkimal kök hücrelerde anti-apoptotik etkiye sahip olan LG3 fragmenti, fibroblastlardaki kolajen I üretimini artırarak ve miyofibroblast farklılaşmasını destekleyerek fibrozise yol açmaktadır (324, 325).

Endorepellin ve LG3 proteomik çalışmalarda idrar ve serumda tespit edilmiş, ancak glomerüler hastalıklarda kapsamlı bir şekilde değerlendirilmemiştir (325). Yapılan proteomik çalışmalarda son dönem böbrek yetmezliği 35 olan hastaların idrarında LG3 fragmanı saptanmış ve renal transplant hastalarında yapılan iki analizde, akut ve kronik allogreft reddinde sırasıyla idrar ve kanda LG3 fragmenti miktarının arttığı gösterilmiştir (326). Surin ve arkadaşlarının yaptığı karşılaştırmalı

üriner proteomik analizde, üriner LG3 fragmenti miktarının IgAN hastalarında kontrol grubundaki tüm glomerüler hastalıklarda ve sağlıklı deneklere kıyasla daha düşük olduğu bildirilmiştir (325, 327). Yazarlar bu düşüşün böbrek fonksiyonunu korumak amaçlı LG3'ün anti-anjiyojenik etkisine karşı adaptif bir yanıt olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Çalışmamızda amiloidoz grubunu kontrol grubundan ayıran literatürde renal sonlanımların önemli bir biyobelirteci olarak ele alınmış bir diğer protein Endotelial büyüme faktörüdür (EGF). EGF, üç intramoleküler disülfid bağına sahip 53 amino asitten oluşan, kompakt ve ısıya dayanıklı bir büyüme faktörüdür (328). EGF, böbrek tübüllerinde (özellikle Henle halkası ve distal kıvrımlı tübüller), idrarda ve minimum konsantrasyonlarda plazmada bulunmaktadır (328). Trombositler insanlarda plazmada EGF'nin başlıca kaynağıdır (329). EGF, reseptörünün (EGFR) çözünür hücre dışı alanına bağlanarak dimerizasyonu tetikler ve reseptörün intrinsik protein-tirozin kinaz aktivitesini aktive ederek, hücre içi sinyal kaskadı sonucu hücresel proliferasyon ve farklılaşma desteklenmiş olur (330). Böbrek dokusunda EGF, hücre metabolizma ve glomerüler hemodinamiğin düzenlenmesi, hücre büyümesinin modülasyonu ve hasar sonrası rejenerasyon gibi çeşitli biyolojik işlevlere sahiptir (331). Aşağıda tartışılacak pek çok deneysel ve klinik çalışmanın oraya koyduğu kanıtlar, idrar EGF (uEGF) seviyelerinin fonksiyonel tübüler kütle ve rejenerasyon potansiyelinin bir göstergesi olduğunu düşündürmektedir.

uEGF düzeylerinin diyabetik böbrek hastalığı ile ilişkisine dair literatürde pek çok kanıt bulunmaktadır. Başlangıçta normoalbuminürik olan Edinburgh Tip 2 Diyabet Çalışması'ndan 642 katılımcı, uEGF düzeylerinin böbrek fonksiyonlarındaki progresif düşüşünün bir biyobelirteci olarak kullanılıp kullanılmayacağını araştırmak amacıyla incelenmiştir (332). Çalışmanın başlangıcında, eGFR ile uEGF/Cr (kreatinin) arasında zayıf bir pozitif korelasyon varken; takip süresi boyunca, en düşük uEGF konsantrasyonuna sahip olan tertildeki hastaların, eGFR <60 mL/dk geliştirme riski önemli ölçüde daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu korelasyon proteinüri için geçerli olmadığı ve bazal değişkenler için yapılan düzeltmeler sonrasında da istatistiksel olarak anlamlılığın devam ettiği gösterilmiştir. Bu nedenle araştırmacılar, diğer risk faktörlerinden bağımsız olarak,

düşük bir uEGF/Cr oranının KBH başlangıcı ile bağlantılı olduğunu bildirmişlerdir (332).

Çin popülasyonunda yapılan iki çalışmada (C-STRIDE ve INDEED), uEGF düzeylerinin erken ve ileri diyabetik böbrek hastalığı (DBH) riski arasındaki ilişki incelenmiştir. INDEED (*Incident, Development, and Prognosis of DKD*) çalışmasında kesitsel olarak, uEGF/Cr ve uEGF/monosit kemotaktik peptid-1 (MCP-1) oranları ile erken evre DH gelişimi ile negatif bir korelasyona sahip olduğu bulunmuştur (333). C-STRIDE (*Cohort Research of Chronic Kidney Disease*) kohortundaki gözlemsel çalışmada, uEGF/Cr, uMCP-1/Cr ve uEGF/MCP-1 oranlarının, ilgili ortak değişkenlerden bağımsız olarak komposit sonlanım noktası ile ilişkili olduğu ve uEGF/MCP-1 oranının diğer oranlara göre renal bileşik sonucun daha iyi bir belirteci olduğu bildirilmiştir (333).

Primer glomerülonefrit hastalarında yapılan bir çalışmada Worawichawong ve arkadaşları kesitsel olarak tübüler atrofi ve tübülointerstisyel fibrozis ile uEGF, uMCP-1 ve uEGF/MCP-1 oranları arasındaki ilişki araştırılmıştır (334). Bu oranlarının tümü, tek değişkenli analizde patolojik skorlar ile bağlantılıken çok değişkenli analizde, yalnızca uEGF/MCP-1 oranı bağımsız olarak tübüler atrofi/interstisyel fibrozis ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (334). Primer IgAN tanılı 58 bireyde IL-6 (İnterlökin -6), EGF, MCP-1 ve TGF- β 1 (*Transforming growth factor- β 1*) 'in idrar seviyeleri ile klinik, biyokimyasal ve histolojik parametreler arasındaki ilişkiler değerlendirilmiştir (335). uEGF' nin interstisyel fibrozis ile negatif korelasyonu olduğu görülen çalışmada Oxford sınıflamasına göre T1 ve T2 puanları olan bireyler, T0 puanları olan hastalara göre önemli ölçüde daha düşük uEGF seviyeleri sergilemiştir. MCP-1, IL-6 ve EGF üriner konsantrasyonlarının, çoklu lojistik regresyon analizinde fibrozisin bağımsız prediktörleri olduğu ortaya bildirilmiştir (335). 132 IgAN tanısı olan hastanın gözlemsel analizinde, en düşük çeyrekte uEGF/MCP-1 oranlarına sahip hastaların 48 ve 84 aylık takiplerinde böbrek sağkalım oranlarının anlamlı ölçüde düşük olduğu ve çok değişkenli bir Cox regresyon analizinde, uEGF/MCP-1 oranının bağımsız olarak renal sonlanım noktaları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (336). Kapsamlı bir üriner proteomiks çalışmasında aktif lupus nefriti hastalarının, aktif böbrek dışı SLE tanılı hastalardan,

aktif olmayan SLE hastalarından ve böbrek donörlerinden önemli ölçüde daha düşük uEGF düzeylerine sahip olduğu ve patolojik kronisite indekslerinin tümünün uEGF ile negatif bir korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (337).

Literatürdeki diyabet, lupus nefriti, transplant hastaları ve çeşitli glomerülonefritlere sekonder akut/kronik böbrek hastalıklarındaki üriner EGF düzeyleri incelendiğinde klinik olarak düşük eGFR ve patolojik olarak tübülointerstisyel fibrozis ile olan ilişkisi pek çok kesitsel ve gözlemsel çalışmada gösterilmiş olup çalışmamızda amiloidoz grubundaki düşük üriner EGF düzeylerinin de yüksek tübülointerstisyel fibrozis ve kronik hasar ile ilişkili olduğu bu hasta popülasyonunda ilk kez gösterilmiştir.

Kaderin gen ailesi epitel hücre-hücre bağlantılarının temelini oluşturan zona adherens gibi pek çok adezyon proteini kompleksinin ana parçasını oluşturan kaderin genlerini kodlamaktadır. Çalışmamızda E-kaderin (CDH1), N-kaderin (CDH2) ve T-kaderin (CDH13) proteinleri AA Amiloidoz grubunda istatistiksel anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Kaderin proteinleri yukarıda ayrıntılı olarak bahsedilen EGF ve reseptörü EGFR ile yakın ilişki içindedir. Sullivan ve arkadaşları istirahat halinde epitel hücre membranında heterotrimer olarak gözlenen EGFR ve E-Kaderin dimerlerinin mekanik kuvvetler sonucu bozularak EGFR reseptörlerinin açığa çıktığını ve EGF varlığında hücre içi sinyal yolağın aktive olduğu göstermiştir (338). Bu bağlamda kayma gerilmesi ve mekanik kuvvetlerin hücre büyümesi ile olan ilişkisi açıklanabilmektedir.

E-Kaderin proteininin böbrekte üriner kayma gerilim kuvvetleri ile de patofizyolojik açıdan yakın bir ilişkisi mevcuttur. Nefronda idrar akışına sekonder gelişen kayma gerilmesi kuvvetlerindeki artışın kronik böbrek hastalığının progresyonuna neden olan faktörlerden biri olabileceğine dair literatürde pek çok kanıt bulunmaktadır. Pek çok KBH etiyojisinde, hiperfiltrasyon, obstrüksiyon ve/veya viskozitedeki değişiklikler nedeniyle üriner kayma gerilmesi kuvvetlerinin değiştiği tahmin edilmektedir (339, 340). Renal tübüler hücreler üzerinde yapılan in vitro deneyler, kayma artan gerilmesinin plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1) inhibisyonu ve RAAS aktivasyonu gibi KBH gelişiminde rol oynayan bir dizi

molekölü hedef aldığını göstermiştir (341, 342). Bir diğer çalışmada, proksimal tübüler hücreler üzerindeki kayma gerilmesi kuvvetlerindeki değişikliklerin, KIM1 ve NGAL gibi tübüler hasar belirteçlerini indüklediğini gösterilmiştir (343). Ayrıca kayma gerilmesi kuvvetleri sonucu hasar gören hücrelerin monositlerin endotel hücrelerine adhezyonunu ve inflamatuvar makrofajlara farklılaşmasını tetikleyerek steril bir inflamasyonun oluştuğu bildirilmiştir (343). Maggiorani ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada hem in vivo hem in vitro ortamda üriner kayma gerilim kuvvetlerinin tübüler epitel karakteristiklerinin değiştirdiği ve E-kaderin ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (344).

Literatürde üriner ve/veya serum kaderin düzeyleri ile renal ayırıcı tanı ve prognoz açısından farklı sonuçlar mevcuttur. Pediatrik popülasyonda kronik böbrek hastalarında yapılan bir çalışmada üriner E-kaderin düzeylerinin kronik böbrek kohortunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu ve GFR ile negatif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (345). Andersen ve arkadaşlarının pediatrik nefrotik sendromlu hastalarda yaptıkları karşılaştırmalı bir üriner proteomiks çalışmasında üriner E-kaderin düzeyleri hastalığın aktif olduğu nefrotik sendrom grubunda remisyon grubuna göre daha düşük saptanmıştır (346). Diyabetik hastalarda yapılan bir proteomik çalışmada ise serum E-kaderin düzeylerinin diyabetik grupta kontrol grubuna göre daha düşük olduğu gösterilmiştir (347).

Jiang ve arkadaşlarının diyabetik nefropatili hastalarda yaptığı bir diğer karşılaştırmalı üriner proteomik çalışmasında üriner E-kaderin düzeylerinin diyabetik nefropati grubunda makroalbuminürik bireylerde daha yüksek olacak şekilde arttığı; üriner E-kaderin ekspresyonunun ise azaldığı bildirilmiştir (348). Koziolok ve arkadaşlarının yine diyabetik böbrek hastalığına sahip bireylerde yaptığı bir çalışmada proteomik analize diyabetik grupta proteinüri de pozitif korelasyon gösterecek şekilde yüksek miktarda bulunan E-kaderin proteininin uzun dönem analizinde de kötü prognostik faktör olduğu gösterilmiştir (349).

N-Kaderin (CDH 2) ile ilgili yapılan sınırlı sayıdaki çalışma incelendiğinde serum N-kaderin düzeylerinin diyabetik böbrek hastalığında yüksek saptandığı gösterilmiş ve yazarlar N-kaderin ve E-kaderin proteinlerinin farklı lokasyonlarda

(proksimal vs distal tübül) eksprese olması ile ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir (350). Adriamisin ile indüklenmiş fare FSGS modelinde pre-sklerotik ve sklerotik aşamalar dinamik olarak incelendiğinde N-kaderin düzeylerinin kademeli olarak azaldığı gösterilmiştir (351).

Metabolomik analizler sonucunda amiloidoz grubunda diğer hasta ve kontrol gruplarına göre istatistiksel anlamlı olarak farklı düzeyde olan metabolitler incelendiğinde şeker alkollerini (poliol) olan myo-inositol ve mannitol düzeylerinin amiloidoz grubunda yüksek olduğu saptanmıştır. Tek hücreli organizmalarda memelilere kadar çeşitli polioller organik ozmolitler olarak hücre ve dokuların hiperozmolariteye karşı mücadelesinde temel rolü oynamaktadır (352). Böbrek dokusunda üretilen myo-inositolün geri emilimi sodyum-myo-inositol taşıyıcı proteinleri (Smit ve Smit2) sağlıklı medüller hücrelerde interstisyel ozmolariteye paralel olarak artmakta ve tübüler hücreleri hiperozmolar hasardan betain ile birlikte korumaktadır (353). Metabolitin serum konsantrasyonu son dönem böbrek hastalarında üremik birikim ile artmaktadır (354).

Gill ve arkadaşlarının geniş bir KBH kohortunda yaptığı üriner metabolomik analiz fare renal transkriptomik analizlerde myo-inositol üriner düzeyleri ile kronik böbrek hastalığı arasındaki patofizyolojik bağlantıya dikkat çekmiştir (353). Çeşitli etiyojilere bağlı kronik böbrek hastalığında kronik tübüler hasara sekonder Smit taşıyıcı proteinlerini kodlayan Slc5a gen ekspresyonunun azalmasının myo-inositol geri emilimi azalttığı düşünülmektedir. Bu durumda özellikle medüller renal tübüler hücreler hiperozmolar hasara karşı savunmasız hale gelmekte ve geri emilim azaldığı için dolaylı olarak üriner myo-inositol düzeyleri artmaktadır (353). Deneysel diyabetik fare modellerinde bu hipoteze uygun olarak renal dokuda myo-inositol düzeyi azalmaktadır (355). Dutta ve arkadaşlarının yaptığı bir fare çalışmasında myo-inositol yıkımına yol açana MIOX (myo-inositol oksijenaz) enziminin ekspresyon artışının renal dokuda myo-inositol konsantrasyonunu azalttığı ve sisplatin ilişkili nefrotoksisiteyi arttırdığı gösterilmiştir (356). 2012 yılında kronik böbrek hastalarında yapılan NMR bazlı bir metabolomik çalışmada myo-inositol düzeylerinin arttığı görülmüştür (357). FSGS ve MCD hastaları arasında karşılaştırmalı bir üriner metabolomik analizde FSGS grubunda üriner myo-inositol

düzeyleri yüksek olarak bulunmuş ve bu durum yüksek tübülointerstisyel hasar ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (358). ADPKD hastalarında üriner myo-inositol/sitrat oranının renal progresyon ile ilişkili olduğu saptanmıştır (359). Renoprotektif etkileri iyi bilinen losartan ve dapaglifozin tedavileri sonrasında fare modelleri ve diyabetik bireylerde üriner myo-inositol konsantrasyonlarının arttığı gösterilmiştir (360, 361).

Metabolomik analizlerde amiloidoz grubunda iki disakkarit (laktoz ve maltoz) yüksek saptanmıştır. Üriner disakkarit düzeyleri diyet ve gastrointestinal enzimatik aktivite düzeyini değerlendirmek için kullanılabilir (362). Renal hastalıklar ile ilişkisi konusunda ise çok sınırlı yayın bulunmaktadır. Periton diyalizi hastalarında yapılan bir metabolomik analizde Choi ve arkadaşları serum maltoz düzeylerini hemodiyaliz hastalarına göre periton diyalizi grubunda daha yüksek olarak saptamış ve bu yüksekliğin yalnızca ikodekstrin kullanan hastalarda olduğunu belirtmişlerdir (363). Giriş kısmında da bahsedilen yüksek ve düşük proteinüriye sahip membranöz nefropati hastalarının karşılaştırıldığı bir üriner metabolomik analizde Gao ve arkadaşlarının düşük proteinüri grubunda daha yüksek saptadığı metabolitlerden biri laktoz olmuştur (364).

Özellikle triptofan metabolizması, glisin/alanin ve dallı zincirli aminoasitlerin üriner düzeyleri üzerine metabolomik çalışmalar olmakla birlikte lizin metabolizmasına üzerine çok sınırlı sayıda veri mevcuttur . Sui ve arkadaşlarının sağlıklı bireyler, düşük ve yüksek riskli IgAN hastalarında yaptığı NMR bazlı bir serum metabolomik analizde diğer pek çok aminoasit ile birlikte lizin düzeylerinin hem düşük hem yüksek riskli IgAN hasta grubunda azaldığı görülmüş ve yazarlar bu durumu kronik böbrek hastalığına sekonder Krebs döngüsü bozukluğuna sekonder ara metabolitlerdeki azalma ile ilişkilendirmişlerdir (201). Ayrıca aynı çalışmada hasta grubunda serum myo-inositol düzeylerinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızda ise amiloidoz grubunda kontrol grubuna göre lizin düzeyleri daha düşük olarak saptanmıştır.

Her ne kadar çalışmamızda AA grubunda MN grubuna göre yüksek üriner ürik asit düzeyleri GFR değerlerine bağlı olarak yüksek serum düzeyleri ile

açıklanabilecek olsa da üriner metabolomiks çalışmalarında pürin metabolizması ile biyobelirteçlerin saptanması bu yolağın KBH sürecinde bozulduğuna işaret etmektedir . Alman KBH Kohortu' nda yapılan bir diğer çalışmada renal progresyon ile ilişkisi gösterilen üriner UMOD düzeyleri ile üriner urat düzeylerinin körele olduğu bildirilmiştir (365). Bir toplum çalışmasında üriner kadmiyum düzeyleri ile üriner ürik asit düzeyleri arasında korelasyon olduğu bildirilmiştir (366).

Bu çalışma literatüre ilk kez renal AA Amiloidoz hastalarını içeren karşılaştırmalı bir üriner omiks analizi niteliğini taşımaktadır. Hastaların gerek AA gerek karşılaştırma gruplarında yeni tanı olması ve bu nedenle RAAS inhibitörü veya kolşisin dışında herhangi bir tedavi almamış olması analizin gücünü arttırmaktadır. Hem proteomik hem metabolomik analizin beraber yapılması bulunan sonuçların bütüncül analizine katkıda bulunmuştur. Valide skorlama sistemleri ile patolojik olarak böbrek biyopsilerin skorlanması GFR ve proteinüriye ek olarak daha güçlü bir şekilde verilerin kronik tübülointerstisyel hasar ile ilişkilendirilmesini kolaylaştırmıştır.

Çalışmamızın pek çok kısıtlılığı bulunmaktadır. Hastalığın nadir doğası gereği örneklem grubu çok küçük olup kapsamlı çıkarımları mümkün kılmamaktadır. Ayrıca nicelik olarak regresyon analizine tam anlamıyla imkan vermemektedir. İkinci temel kısıtlılık henüz saptanan protein ve metabolitlerin doku veya idrarda konfirmasyonunun bağımsız bir kohortta yapılmamış olmasıdır. Ayrıca çalışmamız kesitsel nitelikte olup verilerin uzun dönem prognozu açısından yorumlanması uygun değildir. Son olarak metabolomik analiz yapılan tüm bireylere proteomik analiz yapılamamış olup bu durum metabolit-protein korelasyon analizlerinde istatistiksel anlamlılığa ulaşmakta engel teşkil etmiştir.

6.SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Bu pilot çalışmada literatürde ilk kez renal AA Amiloidoz hastalarında karşılaştırmalı bir üriner proteomik ve metabolomik analiz yapılmış ve biyoinformatik sonuçların klinik, laboratuvar ve patolojik veriler ile ilişkisi çalışılmıştır.

2. Çalışmamızda gerek proteomik gerek metabolomik analizlerde AA Amiloidoz grubunu kontrol grubu ve diğer glomerüler hastalık gruplarından ayıran protein ve metabolitler saptanmıştır.

3. Hastaların tübüler atrofi, interstisyel fibrozis, glomerüloskleroz gibi patolojik özelliklerini skorlamamız sayesinde saptanan bu moleküllerin standart klinik ve laboratuvar verilerine ek olarak patolojik veriler ile olan korelasyonlarını çalışmamız ve yorumlamamız mümkün olmuştur. Ayrıca proteomik ve metabolomik analizleri beraber uygulamamız patofizyolojik ilişkilerin daha kapsamlı değerlendirilmesini sağlamıştır.

4. Hastalığın nadir prevalansı gereği yen tanı olgu sayısı kısıtlı kalmış; bu nedenle homojenite sağlanamamış ve bazı korelasyonlar istatistiksel anlamlılığa ulaşamamıştır. Ayrıca henüz bağımsız bir amiloidoz kohortunda saptadığımız moleküller valide edilmediği için biyoinformatik sonuçların genelleştirilmesi bu noktada mümkün olmamıştır.

5. İleride daha büyük bağımsız AA amiloidoz kohortlarında idrar ve/veya dokuda bu biyobelirteçlerin valide edilmesi gerek patofizyolojik gerek prognostik açıdan yeni veriler sağlayacak; birden çok biyobelirtecin beraber değerlendirilmesiyle tanısal ve/veya prognostik paneller oluşturulabilecek ve gelecekte olası non-invazif amiloidoz tanısı konusunda önemli bir adım olacaktır

7. KAYNAKÇA

1. Dong R, Xu Y. Glomerular cell cross talk in diabetic kidney diseases. *J Diabetes*. 2022;14(8):514-23.
2. Schlöndorff D, Banas B. The mesangial cell revisited: no cell is an island. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(6):1179-87.
3. Couser WG. Primary Membranous Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017;12(6):983-97.
4. Ronco P, Beck L, Debiec H, Fervenza FC, Hou FF, Jha V, et al. Membranous nephropathy. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7(1):69.
5. Rychlík I, Jancová E, Tesar V, Kolsky A, Lácha J, Stejskal J, et al. The Czech registry of renal biopsies. Occurrence of renal diseases in the years 1994-2000. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19(12):3040-9.
6. Moroni G, Ponticelli C. Secondary Membranous Nephropathy. A Narrative Review. *Front Med (Lausanne)*. 2020;7:611317.
7. Sinico RA, Mezzina N, Trezzi B, Ghiggeri GM, Radice A. Immunology of membranous nephropathy: from animal models to humans. *Clin Exp Immunol*. 2016;183(2):157-65.
8. Ancian P, Lambeau G, Mattéi MG, Lazdunski M. The human 180-kDa receptor for secretory phospholipases A2. Molecular cloning, identification of a secreted soluble form, expression, and chromosomal localization. *J Biol Chem*. 1995;270(15):8963-70.
9. Nieto-Gañán I, Iturrieta-Zuazo I, Rita C, Carrasco-Sayalero Á. Revisiting immunological and clinical aspects of membranous nephropathy. *Clin Immunol*. 2022;237:108976.
10. Fresquet M, Jowitt TA, Gummadova J, Collins R, O'Cualain R, McKenzie EA, et al. Identification of a major epitope recognized by PLA2R autoantibodies in primary membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(2):302-13.
11. Hayashi N, Okada K, Matsui Y, Fujimoto K, Adachi H, Yamaya H, et al. Glomerular mannose-binding lectin deposition in intrinsic antigen-related membranous nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2018;33(5):832-40.
12. Seitz-Polski B, Dolla G, Payré C, Girard CA, Polidori J, Zorzi K, et al. Epitope Spreading of Autoantibody Response to PLA2R Associates with Poor Prognosis in Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(5):1517-33.
13. Seitz-Polski B, Debiec H, Rousseau A, Dahan K, Zaghrini C, Payré C, et al. Phospholipase A2 Receptor 1 Epitope Spreading at Baseline Predicts Reduced Likelihood of Remission of Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(2):401-8.
14. Huang CC, Lehman A, Albawardi A, Satoskar A, Brodsky S, Nadasdy G, et al. IgG subclass staining in renal biopsies with membranous glomerulonephritis indicates subclass switch during disease progression. *Mod Pathol*. 2013;26(6):799-805.

15. Beck LH, Jr., Salant DJ. Membranous nephropathy: recent travels and new roads ahead. *Kidney Int.* 2010;77(9):765-70.
16. Guerry MJ, Vanhille P, Ronco P, Debiec H. Serum anti-PLA2R antibodies may be present before clinical manifestations of membranous nephropathy. *Kidney Int.* 2016;89(6):1399.
17. Ronco P, Debiec H. Membranous nephropathy: current understanding of various causes in light of new target antigens. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2021;30(3):287-93.
18. Hoxha E, Beck LH, Jr., Wiech T, Tomas NM, Probst C, Mindorf S, et al. An Indirect Immunofluorescence Method Facilitates Detection of Thrombospondin Type 1 Domain-Containing 7A-Specific Antibodies in Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(2):520-31.
19. Caza TN, Hassen SI, Dvanajscak Z, Kuperman M, Edmondson R, Herzog C, et al. NELL1 is a target antigen in malignancy-associated membranous nephropathy. *Kidney Int.* 2021;99(4):967-76.
20. Bobart SA, Tehranian S, Sethi S, Alexander MP, Nasr SH, Moura Marta C, et al. A Target Antigen-Based Approach to the Classification of Membranous Nephropathy. *Mayo Clin Proc.* 2021;96(3):577-91.
21. Ponticelli C, Glassock RJ. Glomerular diseases: membranous nephropathy--a modern view. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014;9(3):609-16.
22. Agrawal S, Zaritsky JJ, Fornoni A, Smoyer WE. Dyslipidaemia in nephrotic syndrome: mechanisms and treatment. *Nat Rev Nephrol.* 2018;14(1):57-70.
23. Kerlin BA, Ayoob R, Smoyer WE. Epidemiology and pathophysiology of nephrotic syndrome-associated thromboembolic disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2012;7(3):513-20.
24. Zou H, Li Y, Xu G. Management of anticoagulation and antiplatelet therapy in patients with primary membranous nephropathy. *BMC Nephrol.* 2019;20(1):442.
25. Rovin BH, Adler SG, Barratt J, Bridoux F, Burdge KA, Chan TM, et al. KDIGO 2021 clinical practice guideline for the management of glomerular diseases. *Kidney international.* 2021;100(4):S1-S276.
26. Fogo AB, Lusco MA, Najafian B, Alpers CE. *AJKD Atlas of Renal Pathology: Membranous Nephropathy.* *Am J Kidney Dis.* 2015;66(3):e15-7.
27. Markowitz GS. Membranous glomerulopathy: emphasis on secondary forms and disease variants. *Adv Anat Pathol.* 2001;8(3):119-25.
28. van de Logt AE, Hofstra JM, Wetzels JF. Serum anti-PLA2R antibodies can be initially absent in idiopathic membranous nephropathy: seroconversion after prolonged follow-up. *Kidney Int.* 2015;87(6):1263-4.
29. Scolari F, Alberici F, Mescia F, Delbarba E, Trujillo H, Praga M, et al. Therapies for Membranous Nephropathy: A Tale From the Old and New Millennia. *Front Immunol.* 2022;13:789713.
30. Rosenberg AZ, Kopp JB. Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2017;12(3):502-17.

31. Sim JJ, Batech M, Hever A, Harrison TN, Avelar T, Kanter MH, et al. Distribution of Biopsy-Proven Presumed Primary Glomerulonephropathies in 2000-2011 Among a Racially and Ethnically Diverse US Population. *Am J Kidney Dis*. 2016;68(4):533-44.
32. Wada T, Nangaku M. A circulating permeability factor in focal segmental glomerulosclerosis: the hunt continues. *Clin Kidney J*. 2015;8(6):708-15.
33. Sethi S, Glassock RJ, Fervenza FC. Focal segmental glomerulosclerosis: towards a better understanding for the practicing nephrologist. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30(3):375-84.
34. Sun K, Xie Q, Hao CM. Mechanisms of Scarring in Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Kidney Dis (Basel)*. 2021;7(5):350-8.
35. De Vriese AS, Sethi S, Nath KA, Glassock RJ, Fervenza FC. Differentiating Primary, Genetic, and Secondary FSGS in Adults: A Clinicopathologic Approach. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(3):759-74.
36. Chandra P, Kopp JB. Viruses and collapsing glomerulopathy: a brief critical review. *Clin Kidney J*. 2013;6(1):1-5.
37. Sakarcan A, Thomas DB, O'Reilly KP, Richards RW. Lithium-induced nephrotic syndrome in a young pediatric patient. *Pediatr Nephrol*. 2002;17(4):290-2.
38. Mohamed N, Goldstein J, Schiff J, John R. Collapsing glomerulopathy following anthracycline therapy. *Am J Kidney Dis*. 2013;61(5):778-81.
39. Lee VW, Harris DC. Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology (Carlton)*. 2011;16(1):30-8.
40. Genovese G, Friedman DJ, Ross MD, Lecordier L, Uzureau P, Freedman BI, et al. Association of trypanolytic ApoL1 variants with kidney disease in African Americans. *Science*. 2010;329(5993):841-5.
41. Smith EE, Malik HS. The apolipoprotein L family of programmed cell death and immunity genes rapidly evolved in primates at discrete sites of host-pathogen interactions. *Genome research*. 2009;19(5):850-8.
42. Kopp JB, Nelson GW, Sampath K, Johnson RC, Genovese G, An P, et al. APOL1 genetic variants in focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2011;22(11):2129-37.
43. Kasembeli AN, Duarte R, Ramsay M, Mosiane P, Dickens C, Dix-Peek T, et al. APOL1 risk variants are strongly associated with HIV-associated nephropathy in black South Africans. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2015;26(11):2882-90.
44. Freedman BI, Langefeld CD, Andringa KK, Croker JA, Williams AH, Garner NE, et al. End-stage renal disease in African Americans with lupus nephritis is associated with APOL1. *Arthritis & Rheumatology*. 2014;66(2):390-6.
45. Larsen CP, Beggs ML, Saeed M, Walker PD. Apolipoprotein L1 risk variants associate with systemic lupus erythematosus-associated collapsing glomerulopathy. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2013;24(5):722-5.

46. Löwik M, Groenen P, Levchenko E, Monnens L, Van Den Heuvel L. Molecular genetic analysis of podocyte genes in focal segmental glomerulosclerosis—a review. *European journal of pediatrics*. 2009;168(11):1291-304.
47. Hinkes BG, Mucha B, Vlangos CN, Gbadegesin R, Liu J, Hasselbacher K, et al. Nephrotic syndrome in the first year of life: two thirds of cases are caused by mutations in 4 genes (NPHS1, NPHS2, WT1, and LAMB2). *Pediatrics*. 2007;119(4):e907-e19.
48. Santín S, Bullich G, Tazón-Vega B, García-Maset R, Giménez I, Silva I, et al. Clinical utility of genetic testing in children and adults with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2011;6(5):1139-48.
49. Thomas D, Franceschini N, Hogan S, Ten Holder S, Jennette C, Falk R, et al. Clinical and pathologic characteristics of focal segmental glomerulosclerosis pathologic variants. *Kidney international*. 2006;69(5):920-6.
50. Praga M, Morales E, Herrero JC, Campos AP, Domínguez-Gil B, Alegre R, et al. Absence of hypoalbuminemia despite massive proteinuria in focal segmental glomerulosclerosis secondary to hyperfiltration. *American journal of kidney diseases*. 1999;33(1):52-8.
51. Praga M, Borstein B, Andres A, Arenas J, Oliet A, Montoyo C, et al. Nephrotic proteinuria without hypoalbuminemia: clinical characteristics and response to angiotensin-converting enzyme inhibition. *American journal of kidney diseases*. 1991;17(3):330-8.
52. Kambham N, Markowitz GS, Valeri AM, Lin J, D'Agati VD. Obesity-related glomerulopathy: an emerging epidemic. *Kidney international*. 2001;59(4):1498-509.
53. Trautmann A, Bodria M, Ozaltin F, Gheisari A, Melk A, Azocar M, et al. Spectrum of steroid-resistant and congenital nephrotic syndrome in children: the PodoNet registry cohort. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2015;10(4):592-600.
54. D'Agati VD, Alster JM, Jennette JC, Thomas DB, Pullman J, Savino DA, et al. Association of histologic variants in FSGS clinical trial with presenting features and outcomes. *Clinical journal of the American Society of Nephrology*. 2013;8(3):399-406.
55. Sethi S, Zand L, Nasr SH, Glasscock RJ, Fervenza FC. Focal and segmental glomerulosclerosis: clinical and kidney biopsy correlations. *Clinical kidney journal*. 2014;7(6):531-7.
56. Deegens JK, Steenbergen EJ, Wetzels JF. Review on diagnosis and treatment of focal segmental glomerulosclerosis. *Neth J Med*. 2008;66(1):3-12.
57. Turkmen A, Sumnu A, Cebeci E, Yazici H, Eren N, Seyahi N, et al. Epidemiological features of primary glomerular disease in Turkey: a multicenter study by the Turkish Society of Nephrology Glomerular Diseases Working Group. *BMC nephrology*. 2020;21(1):1-11.

58. Rodrigues JC, Haas M, Reich HN. IgA Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017;12(4):677-86.
59. McGrogan A, Franssen CF, de Vries CS. The incidence of primary glomerulonephritis worldwide: a systematic review of the literature. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2011;26(2):414-30.
60. Varis J, Rantala I, Pasternack A, Oksa H, Jääntti M, Paunu E, et al. Immunoglobulin and complement deposition in glomeruli of 756 subjects who had committed suicide or met with a violent death. *Journal of clinical pathology*. 1993;46(7):607-10.
61. Suzuki K, Honda K, Tanabe K, Toma H, Nihei H, Yamaguchi Y. Incidence of latent mesangial IgA deposition in renal allograft donors in Japan. *Kidney international*. 2003;63(6):2286-94.
62. Kiryluk K, Li Y, Sanna-Cherchi S, Rohanizadegan M, Suzuki H, Eitner F, et al. Geographic differences in genetic susceptibility to IgA nephropathy: GWAS replication study and geospatial risk analysis. *PLoS genetics*. 2012;8(6):e1002765.
63. Moldoveanu Z, Wyatt R, Lee J, Tomana M, Julian B, Mestecky J, et al. Patients with IgA nephropathy have increased serum galactose-deficient IgA1 levels. *Kidney international*. 2007;71(11):1148-54.
64. Suzuki H, Allegri L, Suzuki Y, Hall S, Moldoveanu Z, Wyatt RJ, et al. Galactose-deficient IgA1 as a candidate urinary polypeptide marker of IgA nephropathy? *Disease Markers*. 2016;2016.
65. Schiemann B, Gommerman JL, Vora K, Cachero TG, Shulga-Morskaya S, Dobles M, et al. An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science*. 2001;293(5537):2111-4.
66. Zhai Y-L, Zhu L, Shi S-F, Liu L-J, Lv J-C, Zhang H. Increased APRIL expression induces IgA1 aberrant glycosylation in IgA nephropathy. *Medicine*. 2016;95(11).
67. McCarthy DD, Kujawa J, Wilson C, Papandile A, Poreci U, Porfilio EA, et al. Mice overexpressing BAFF develop a commensal flora-dependent, IgA-associated nephropathy. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(10):3991-4002.
68. Yanagawa H, Suzuki H, Suzuki Y, Kiryluk K, Gharavi AG, Matsuoka K, et al. A panel of serum biomarkers differentiates IgA nephropathy from other renal diseases. *PloS one*. 2014;9(5):e98081.
69. Berthoux F, Suzuki H, Thibaudin L, Yanagawa H, Maillard N, Mariat C, et al. Autoantibodies targeting galactose-deficient IgA1 associate with progression of IgA nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2012;23(9):1579-87.
70. Novak J, Julian BA, Tomana M, Mestecky J. IgA glycosylation and IgA immune complexes in the pathogenesis of IgA nephropathy. *Semin Nephrol*. 2008;28(1):78-87.

71. Tortajada A, Gutierrez E, Pickering MC, Terente MP, Medjeral-Thomas N. The role of complement in IgA nephropathy. *Molecular immunology*. 2019;114:123-32.
72. Lai KN, Leung JC, Chan LY, Saleem MA, Mathieson PW, Tam KY, et al. Podocyte injury induced by mesangial-derived cytokines in IgA nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2009;24(1):62-72.
73. Trimarchi H, Coppo R. Podocytopathy in the mesangial proliferative immunoglobulin A nephropathy: new insights into the mechanisms of damage and progression. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2019;34(8):1280-5.
74. Gutiérrez E, Zamora I, Ballarín JA, Arce Y, Jiménez S, Quereda C, et al. Long-term outcomes of IgA nephropathy presenting with minimal or no proteinuria. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2012;23(10):1753-60.
75. Szeto C-C, Lai FM-M, To K-F, Wong TY-H, Chow K-M, Choi PC-L, et al. The natural history of immunoglobulin a nephropathy among patients with hematuria and minimal proteinuria. *The American journal of medicine*. 2001;110(6):434-7.
76. D'Amico G, editor *Natural history of idiopathic IgA nephropathy and factors predictive of disease outcome*. Seminars in nephrology; 2004: Elsevier.
77. D'Amico G. Natural history of idiopathic IgA nephropathy: role of clinical and histological prognostic factors. *Am J Kidney Dis*. 2000;36(2):227-37.
78. Ibels LS, Györy AZ. IgA nephropathy: analysis of the natural history, important factors in the progression of renal disease, and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 1994;73(2):79-102.
79. Le W, Liang S, Chen H, Wang S, Zhang W, Wang X, et al. Long-term outcome of IgA nephropathy patients with recurrent macroscopic hematuria. *Am J Nephrol*. 2014;40(1):43-50.
80. Lai KN, Lai FM, Chan KW, Ho CP, Leung AC, Vallance-Owen J. An overlapping syndrome of IgA nephropathy and lipid nephrosis. *Am J Clin Pathol*. 1986;86(6):716-23.
81. Herlitz LC, Bomback AS, Stokes MB, Radhakrishnan J, D'Agati VD, Markowitz GS. IgA nephropathy with minimal change disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9(6):1033-9.
82. Li XW, Liang SS, Le WB, Cheng SQ, Zeng CH, Wang JQ, et al. Long-term outcome of IgA nephropathy with minimal change disease: a comparison between patients with and without minimal change disease. *J Nephrol*. 2016;29(4):567-73.
83. Nüsken E, Weber LT. IgA vasculitis nephritis. *Curr Opin Pediatr*. 2022;34(2):209-16.
84. Audemard-Verger A, Terrier B, Dechartres A, Chanal J, Amoura Z, Le Gouellec N, et al. Characteristics and Management of IgA Vasculitis (Henoch-Schönlein) in Adults: Data From 260 Patients Included in a French Multicenter Retrospective Survey. *Arthritis Rheumatol*. 2017;69(9):1862-70.
85. Pattapornpisut P, Avila-Casado C, Reich HN. IgA Nephropathy: Core Curriculum 2021. *American Journal of Kidney Diseases*. 2021;78(3):429-41.

86. Roberts IS, Cook HT, Troyanov S, Alpers CE, Amore A, Barratt J, et al. The Oxford classification of IgA nephropathy: pathology definitions, correlations, and reproducibility. *Kidney Int.* 2009;76(5):546-56.
87. Cattran DC, Coppo R, Cook HT, Feehally J, Roberts IS, Troyanov S, et al. The Oxford classification of IgA nephropathy: rationale, clinicopathological correlations, and classification. *Kidney Int.* 2009;76(5):534-45.
88. Barbour SJ, Coppo R, Zhang H, Liu ZH, Suzuki Y, Matsuzaki K, et al. Evaluating a New International Risk-Prediction Tool in IgA Nephropathy. *JAMA Intern Med.* 2019;179(7):942-52.
89. Floege J, Wied S, Rauen T. Assessing prognosis in IgA nephropathy. *Kidney International.* 2022;102(1):22-4.
90. Hou JH, Le WB, Chen N, Wang WM, Liu ZS, Liu D, et al. Mycophenolate Mofetil Combined With Prednisone Versus Full-Dose Prednisone in IgA Nephropathy With Active Proliferative Lesions: A Randomized Controlled Trial. *Am J Kidney Dis.* 2017;69(6):788-95.
91. Liu LJ, Yang YZ, Shi SF, Bao YF, Yang C, Zhu SN, et al. Effects of Hydroxychloroquine on Proteinuria in IgA Nephropathy: A Randomized Controlled Trial. *Am J Kidney Dis.* 2019;74(1):15-22.
92. Fellström BC, Barratt J, Cook H, Coppo R, Feehally J, de Fijter JW, et al. Targeted-release budesonide versus placebo in patients with IgA nephropathy (NEFIGAN): a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet.* 2017;389(10084):2117-27.
93. Dahiya DS, Kichloo A, Singh J, Albosta M, Wani F. Gastrointestinal amyloidosis: A focused review. *World J Gastrointest Endosc.* 2021;13(1):1-12.
94. Muchtar E, Dispenzieri A, Magen H, Grogan M, Mauermann M, McPhail ED, et al. Systemic amyloidosis from A (AA) to T (ATTR): a review. *J Intern Med.* 2021;289(3):268-92.
95. Real de Asúa D, Costa R, Galván JM, Filigheddu MT, Trujillo D, Cadiñanos J. Systemic AA amyloidosis: epidemiology, diagnosis, and management. *Clin Epidemiol.* 2014;6:369-77.
96. Simms RW, Prout MN, Cohen AS. The epidemiology of AL and AA amyloidosis. *Baillieres Clin Rheumatol.* 1994;8(3):627-34.
97. Kyle RA, Linos A, Beard CM, Linke RP, Gertz MA, O'Fallon WM, et al. Incidence and natural history of primary systemic amyloidosis in Olmsted County, Minnesota, 1950 through 1989. *Blood.* 1992;79(7):1817-22.
98. Hemminki K, Li X, Försti A, Sundquist J, Sundquist K. Incidence and survival in non-hereditary amyloidosis in Sweden. *BMC Public Health.* 2012;12:974.
99. Pinney JH, Smith CJ, Taube JB, Lachmann HJ, Venner CP, Gibbs SD, et al. Systemic amyloidosis in England: an epidemiological study. *Br J Haematol.* 2013;161(4):525-32.

100. Real de Asúa D, Costa R, Contreras MM, Gutiérrez Á, Filigghedu MT, Armas M. Clinical characteristics of the patients with systemic amyloidosis in 2000-2010. *Rev Clin Esp (Barc)*. 2013;213(4):186-93.
101. Vaxman I, Gertz M. When to Suspect a Diagnosis of Amyloidosis. *Acta Haematologica*. 2020;143(4):304-11.
102. Murtagh B, Hammill SC, Gertz MA, Kyle RA, Tajik AJ, Grogan M. Electrocardiographic findings in primary systemic amyloidosis and biopsy-proven cardiac involvement. *Am J Cardiol*. 2005;95(4):535-7.
103. Dubrey SW, Cha K, Anderson J, Chamarthi B, Reisinger J, Skinner M, et al. The clinical features of immunoglobulin light-chain (AL) amyloidosis with heart involvement. *Qjm*. 1998;91(2):141-57.
104. Gościński P, Larysz B, Józwa R. Triple-trouble cardiomyopathy: myocardial infarction, diastolic heart failure, and conduction defects due to amyloidosis associated with multiple myeloma. *Kardiol Pol*. 2013;71(5):543.
105. Afzal A, Brener SJ, Narula N, Worku B, Gulkarov I. Cardiac Amyloidosis Presenting With Cardiogenic Shock. *Am J Ther*. 2016;23(4):e1060-3.
106. Wang AK, Fealey RD, Gehrking TL, Low PA. Patterns of neuropathy and autonomic failure in patients with amyloidosis. *Mayo Clin Proc*. 2008;83(11):1226-30.
107. Lozeron P, Mariani LL, Dodet P, Beaudonnet G, Théaudin M, Adam C, et al. Transthyretin amyloid polyneuropathies mimicking a demyelinating polyneuropathy. *Neurology*. 2018;91(2):e143-e52.
108. Sugiyama A, Asahina M, Takeda Y, Shiojiri T, Sano K, Ikeda S, et al. Isolated autonomic failure without evident somatic polyneuropathy in AL amyloidosis. *Amyloid*. 2014;21(3):218-20.
109. Tsourdi E, Därr R, Wiczorek K, Röcken C, Eehalt F, Conrad K, et al. Macroglossia as the only presenting feature of amyloidosis due to MGUS. *Eur J Haematol*. 2014;92(1):88-9.
110. Al Saleh AS, Sidiqi MH, Gertz MA. Joint Pain and Proteinuria. *Jama*. 2019;322(15):1512-3.
111. Gertz MA, Kyle RA. Hepatic amyloidosis (primary [AL], immunoglobulin light chain): the natural history in 80 patients. *Am J Med*. 1988;85(1):73-80.
112. Arahata M, Takamatsu H, Morishita E, Kadohira Y, Yamada S, Ichinose A, et al. Coagulation and fibrinolytic features in AL amyloidosis with abnormal bleeding and usefulness of tranexamic acid. *Int J Hematol*. 2020;111(4):550-8.
113. Dejhansathit S, Suvannasankha A. Acquired Factor X Deficiency in Patients With Primary Light Chain Amyloidosis. *J Investig Med High Impact Case Rep*. 2019;7:2324709619832332.
114. Wisniowski B, Wechalekar A. Confirming the Diagnosis of Amyloidosis. *Acta Haematologica*. 2020;143(4):312-21.
115. Mollée P, Renaut P, Gottlieb D, Goodman H. How to diagnose amyloidosis. *Intern Med J*. 2014;44(1):7-17.

116. Altindal M, Yildirim T, Turkmen E, Unal M, Boga I, Yilmaz R, et al. Safety of Percutaneous Ultrasound-Guided Kidney Biopsy in Patients with AA Amyloidosis. *Nephron*. 2015;131(1):17-22.
117. Soares SM, Fervenza FC, Lager DJ, Gertz MA, Cosio FG, Leung N. Bleeding complications after transcutaneous kidney biopsy in patients with systemic amyloidosis: single-center experience in 101 patients. *Am J Kidney Dis*. 2008;52(6):1079-83.
118. van G, II, Hazenberg BP, Bijzet J, van Rijswijk MH. Diagnostic accuracy of subcutaneous abdominal fat tissue aspiration for detecting systemic amyloidosis and its utility in clinical practice. *Arthritis Rheum*. 2006;54(6):2015-21.
119. Kyle RA, Spencer RJ, Dahlin DC. Value of rectal biopsy in the diagnosis of primary systemic amyloidosis. *Am J Med Sci*. 1966;251(5):501-6.
120. Sungur C, Sungur A, Akpolat T, Arik N. Diagnostic value of bone marrow biopsy in patients with AA-type renal amyloidosis secondary to ankylosing spondylitis. *Nephrol Dial Transplant*. 1996;11(12):2520-1.
121. Sorić Hosman I, Kos I, Lamot L. Serum Amyloid A in Inflammatory Rheumatic Diseases: A Compendious Review of a Renowned Biomarker. *Frontiers in Immunology*. 2021;11.
122. Goldberger G, Bing DH, Sipe JD, Rits M, Colten HR. Transcriptional regulation of genes encoding the acute-phase proteins CRP, SAA, and C3. *J Immunol*. 1987;138(11):3967-71.
123. Takata S, Wada H, Tamura M, Koide T, Higaki M, Mikura SI, et al. Kinetics of c-reactive protein (CRP) and serum amyloid A protein (SAA) in patients with community-acquired pneumonia (CAP), as presented with biologic half-life times. *Biomarkers*. 2011;16(6):530-5.
124. van der Hilst JCH, Yamada T, Op den Camp HJM, van der Meer JWM, Drenth JPH, Simon A. Increased susceptibility of serum amyloid A 1.1 to degradation by MMP-1: potential explanation for higher risk of type AA amyloidosis. *Rheumatology*. 2008;47(11):1651-4.
125. Booth DR, Booth SE, Gillmore JD, Hawkins PN, Pepys MB. SAA1 alleles as risk factors in reactive systemic AA amyloidosis. *Amyloid*. 1998;5(4):262-5.
126. Gershoni-Baruch R, Brik R, Zacks N, Shinawi M, Lidar M, Livneh A. The contribution of genotypes at the MEFV and SAA1 loci to amyloidosis and disease severity in patients with familial mediterranean fever. *Arthritis and Rheumatism*. 2003;48(4):1149-55.
127. Moriguchi M, Terai C, Koseki Y, Uesato M, Nakajima A, Inada S, et al. Influence of genotypes at SAA1 and SAA2 loci on the development and the length of latent period of secondary AA-amyloidosis in patients with rheumatoid arthritis. *Human Genetics*. 1999;105(4):360-6.
128. Yamada T, Okuda Y, Takasugi K, Itoh K, Igari J. Relative serum amyloid A (SAA) values: The influence of SAA1 genotypes and corticosteroid treatment in

- Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2001;60(2):124-7.
129. Papa R, Lachmann HJ. Secondary, AA, Amyloidosis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 2018;44(4):585-603.
130. Ishii W, Matsuda M, Nakamura A, Nakamura N, Suzuki A, Ikeda S. Abdominal fat aspiration biopsy and genotyping of serum amyloid A contribute to early diagnosis of reactive AA amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis. *Intern Med*. 2003;42(9):800-5.
131. Migita K, Eguchi K, Tsukada T, Kawabe Y, Takashima H, Mine M, et al. Increased circulating serum amyloid A protein derivatives in rheumatoid arthritis patients with secondary amyloidosis. *Lab Invest*. 1996;75(3):371-5.
132. Gorlier C, Sellam J, Laurans L, Simon T, Giurgea I, Bastard JP, et al. In familial Mediterranean fever, soluble TREM-1 plasma level is higher in case of amyloidosis. *Innate Immun*. 2019;25(8):487-90.
133. Gillmore JD, Lovat LB, Persey MR, Pepys MB, Hawkins PN. Amyloid load and clinical outcome in AA amyloidosis in relation to circulating concentration of serum amyloid A protein. *Lancet*. 2001;358(9275):24-9.
134. Perry ME, Stirling A, Hunter JA. Effect of etanercept on serum amyloid A protein (SAA) levels in patients with AA amyloidosis complicating inflammatory arthritis. *Clin Rheumatol*. 2008;27(7):923-5.
135. Koivuniemi R, Paimela L, Suomalainen R, Törnroth T, Leirisalo-Repo M. Amyloidosis is frequently undetected in patients with rheumatoid arthritis. *Amyloid*. 2008;15(4):262-8.
136. Ahmed S, Nasir H, Moatasim A, Khalil F. Renal Amyloidosis: A Clinicopathological Study From a Tertiary Care Hospital in Pakistan. *Cureus*. 2022;14(1):e21122.
137. Kalle A, Gudipati A, Raju SB, Kalidindi K, Guditi S, Taduri G, et al. Revisiting renal amyloidosis with clinicopathological characteristics, grading, and scoring: A single-institutional experience. *J Lab Physicians*. 2018;10(02):226-31.
138. Esenboga S, Çagdas Ayvaz D, Saglam Ayhan A, Peynircioglu B, Sanal O, Tezcan I. CVID associated with systemic amyloidosis. *Case Rep Immunol*. 2015;2015.
139. Darougar S, Farokhi FR, Tajik S, Baghaie N, Amirmoini M, Bashardoust B, et al. Amyloidosis as a renal complication of chronic granulomatous disease. *Iranian Journal of Kidney Diseases*. 2016;10(4):228-32.
140. Gupta K, Rawat A, Agrawal P, Jindal A, Nada R, Saikia B, et al. Infectious and non-infectious complications in primary immunodeficiency disorders: an autopsy study from North India. *J Clin Pathol*. 2018;71(5):425-35.
141. Blank N, Hegenbart U, Dietrich S, Brune M, Beimler J, Röcken C, et al. Obesity is a significant susceptibility factor for idiopathic AA amyloidosis. *Amyloid*. 2018;25(1):37-45.

142. Obici L, Raimondi S, Lavatelli F, Bellotti V, Merlini G. Susceptibility to AA amyloidosis in rheumatic diseases: A critical overview. *Arthritis Care & Research*. 2009;61(10):1435-40.
143. Lachmann HJ, Goodman HJB, Gilbertson JA, Gallimore JR, Sabin CA, Gillmore JD, et al. Natural history and outcome in systemic AA amyloidosis. *New England Journal of Medicine*. 2007;356(23):2361-71.
144. Sattianayagam PT, Hawkins PN, Gillmore JD. Systemic amyloidosis and the gastrointestinal tract. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2009;6(10):608-17.
145. Calatayud J, Candelas G, Gómez A, Morado C, Tranco FH. Nodular pulmonary amyloidosis in a patient with rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology*. 2007;26(10):1797-8.
146. Renzulli P, Schoepfer A, Mueller E, Candinas D. Atraumatic splenic rupture in amyloidosis. *Amyloid*. 2009;16(1):47-53.
147. Ebert EC, Nagar M. Gastrointestinal Manifestations of Amyloidosis. *Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG*. 2008;103(3):776-87.
148. Sethi S, Vrana JA, Theis JD, Leung N, Sethi A, Nasr SH, et al. Laser microdissection and mass spectrometry-based proteomics aids the diagnosis and typing of renal amyloidosis. *Kidney International*. 2012;82(2):226-34.
149. Larsen BT, Mereuta OM, Dasari S, Fayyaz AU, Theis JD, Vrana JA, et al. Correlation of histomorphological pattern of cardiac amyloid deposition with amyloid type: a histological and proteomic analysis of 108 cases. *Histopathology*. 2016;68(5):648-56.
150. Close W, Neumann M, Schmidt A, Hora M, Annamalai K, Schmidt M, et al. Physical basis of amyloid fibril polymorphism. *Nature Communications*. 2018;9(1).
151. Bergesio F, Ciciani AM, Manganaro M, Palladini G, Santostefano M, Brugnano R, et al. Renal involvement in systemic amyloidosis. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2008;23(3):941-51.
152. Gillmore JD, Lovat LB, Persey MR, Pepys MB, Hawkins PN. Amyloid load and clinical outcome in AA amyloidosis in relation to circulating concentration of serum amyloid A protein. *The Lancet*. 2001;358(9275):24-9.
153. Rumjon A, Coats T, Javaid MM. Review of eprodisate for the treatment of renal disease in AA amyloidosis. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease*. 2012;5:37-43.
154. Dember LM, Hawkins PN, Hazenberg BPC, Gorevic PD, Merlini G, Butrimiene I, et al. Eprodisate for the treatment of renal disease in AA amyloidosis. *New England Journal of Medicine*. 2007;356(23):2349-60.
155. Pepys MB, Herbert J, Hutchinson WL, Tennent GA, Lachmann HJ, Gallimore JR, et al. Targeted pharmacological depletion of serum amyloid P component for treatment of human amyloidosis. *Nature*. 2002;417(6886):254-9.
156. Gillmore JD, Tennent GA, Hutchinson WL, Gallimore JR, Lachmann HJ, Goodman HJB, et al. Sustained pharmacological depletion of serum amyloid P

component in patients with systemic amyloidosis. *British Journal of Haematology*. 2010;148(5):760-7.

157. Siligato R, Gembillo G, Calabrese V, Conti G, Santoro D. Amyloidosis and Glomerular Diseases in Familial Mediterranean Fever. *Medicina*. 2021;57(10):1049.

158. Erdogmus S, Kendi Celebi Z, Akturk S, Kumru G, Duman N, Ates K, et al. Profile of renal AA amyloidosis in older and younger individuals: a single-centre experience. *Amyloid*. 2018;25(2):115-9.

159. Tufan A, Lachmann HJ. Familial Mediterranean fever, from pathogenesis to treatment: a contemporary review. *Turk J Med Sci*. 2020;50(Si-2):1591-610.

160. Sohar E, Gafni J, Pras M, Heller H. Familial Mediterranean fever: A survey of 470 cases and review of the literature. *The American Journal of Medicine*. 1967;43(2):227-53.

161. Kasifoglu T, Bilge SY, Sari I, Solmaz D, Senel S, Emmungil H, et al. Amyloidosis and its related factors in Turkish patients with familial Mediterranean fever: a multicentre study. *Rheumatology (Oxford)*. 2014;53(4):741-5.

162. Familial Mediterranean fever (FMF) in Turkey: results of a nationwide multicenter study. *Medicine (Baltimore)*. 2005;84(1):1-11.

163. Touitou I, Sarkisian T, Medlej-Hashim M, Tunca M, Livneh A, Cattan D, et al. Country as the primary risk factor for renal amyloidosis in familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum*. 2007;56(5):1706-12.

164. Dember LM. Amyloidosis-Associated Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2006;17(12):3458-71.

165. Kukuy OL, Beckerman P, Dinour D, Ben-Zvi I, Livneh A. Amyloid storm: acute kidney injury and massive proteinuria, rapidly progressing to end-stage kidney disease in AA amyloidosis of familial Mediterranean fever. *Rheumatology*. 2020;60(7):3235-42.

166. Yildirim T, Gok-Oguz E, Koc NS, Uzerk-Kibar M, Uner M, Saglam EA, et al. Dismal Prognosis of Acute Allergic Tubulointerstitial Nephritis in Patients with AA Amyloidosis. *Nephron*. 2022;146(2):172-8.

167. Ozen S. Renal amyloidosis in familial Mediterranean fever. *Kidney Int*. 2004;65(3):1118-27.

168. Smith GR, Tymms KE, Falk M. Etanercept treatment of renal amyloidosis complicating rheumatoid arthritis. *Intern Med J*. 2004;34(9-10):570-2.

169. Livneh A, Zemer D, Langevitz P, Laor A, Sohar E, Pras M. Colchicine treatment of AA amyloidosis of familial Mediterranean fever. An analysis of factors affecting outcome. *Arthritis Rheum*. 1994;37(12):1804-11.

170. Tanatar A, Karadağ Ş G, Sönmez HE, Çakan M, Aktay Ayaz N. Short-term follow-up results of children with familial Mediterranean fever after cessation of colchicine: is it possible to quit? *Rheumatology (Oxford)*. 2019;58(10):1818-21.

171. Altindal M, Turkmen E, Yildirim T, Yilmaz R, Aki FT, Arici M, et al. Kidney transplantation for end-stage renal disease secondary to familial Mediterranean fever. *Clin Transplant*. 2016;30(7):787-90.

172. Sarihan I, Caliskan Y, Mirioglu S, Ozluk Y, Senates B, Seyahi N, et al. Amyloid A Amyloidosis After Renal Transplantation: An Important Cause of Mortality. *Transplantation*. 2020;104(8):1703-11.
173. Cañadas-Garre M, Anderson K, McGoldrick J, Maxwell AP, McKnight AJ. Proteomic and metabolomic approaches in the search for biomarkers in chronic kidney disease. *Journal of Proteomics*. 2019;193:93-122.
174. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. 2016;107(1):1-8.
175. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science (New York, NY)*. 2015;347(6220):1260419.
176. Provenzano M, Serra R, Garofalo C, Michael A, Crugliano G, Battaglia Y, et al. OMICS in Chronic Kidney Disease: Focus on Prognosis and Prediction. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(1):336.
177. Kalim S, Rhee EP. An overview of renal metabolomics. *Kidney International*. 2017;91(1):61-9.
178. Newgard CB. Metabolomics and Metabolic Diseases: Where Do We Stand? *Cell Metab*. 2017;25(1):43-56.
179. Heinzl A, Mühlberger I, Stelzer G, Lancet D, Oberbauer R, Martin M, et al. Molecular disease presentation in diabetic nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2015;30(suppl_4):iv17-iv25.
180. Dubin RF, Rhee EP. Proteomics and Metabolomics in Kidney Disease, including Insights into Etiology, Treatment, and Prevention. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2020;15(3):404-11.
181. Peng L, Cantor DI, Huang C, Wang K, Baker MS, Nice EC. Tissue and plasma proteomics for early stage cancer detection. *Molecular omics*. 2018;14(6):405-23.
182. Cupp-Sutton KA, Wu S. High-throughput quantitative top-down proteomics. *Molecular omics*. 2020;16(2):91-9.
183. Corbett JR, Robinson DE, Patrie SM. Robustness and ruggedness of isoelectric focusing and superficially porous liquid chromatography with Fourier transform mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2020;32(1):346-54.
184. Pitt JJ. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin Biochem Rev*. 2009;30(1):19-34.
185. Hyphenated Separation Techniques. *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry 2007*. p. 151-94.
186. Yang Y, Wei J, Huang X, Wu M, Lv Z, Tong P, et al. iTRAQ-based proteomics of chronic renal failure rats after FuShengong decoction treatment reveals haptoglobin and alpha-1-antitrypsin as potential biomarkers. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2017;2017.

187. Rood IM, Merchant ML, Wilkey DW, Zhang T, Zabrouskov V, van der Vlag J, et al. Increased expression of lysosome membrane protein 2 in glomeruli of patients with idiopathic membranous nephropathy. *Proteomics*. 2015;15(21):3722-30.
188. Smith A, L'Imperio V, Denti V, Mazza M, Ivanova M, Stella M, et al. High spatial resolution MALDI-MS imaging in the study of membranous nephropathy. *PROTEOMICS–Clinical Applications*. 2019;13(1):1800016.
189. Perez V, Ibernón M, Lopez D, Pastor MC, Navarro M, Navarro-Muñoz M, et al. Urinary peptide profiling to differentiate between minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis. *PLoS One*. 2014;9(1):e87731.
190. Kalantari S, Nafar M, Samavat S, Rezaei-Tavirani M, Rutishauser D, Zubarev R. Urinary prognostic biomarkers in patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrourol Mon*. 2014;6(2):e16806.
191. Kalantari S, Nafar M, Rutishauser D, Samavat S, Rezaei-Tavirani M, Yang H, et al. Predictive urinary biomarkers for steroid-resistant and steroid-sensitive focal segmental glomerulosclerosis using high resolution mass spectrometry and multivariate statistical analysis. *BMC Nephrology*. 2014;15(1):141.
192. Wang Y, Zheng C, Wang X, Zuo K, Liu Z. Proteomic profile-based screening of potential protein biomarkers in the urine of patients with nephrotic syndrome. *Mol Med Rep*. 2017;16(5):6276-84.
193. Neprasova M, Maixnerova D, Novak J, Reily C, Julian BA, Boron J, et al. Toward Noninvasive Diagnosis of IgA Nephropathy: A Pilot Urinary Metabolomic and Proteomic Study. *Dis Markers*. 2016;2016:3650909.
194. Graterol F, Navarro-Muñoz M, Ibernón M, López D, Troya MI, Pérez V, et al. Poor histological lesions in IgA nephropathy may be reflected in blood and urine peptide profiling. *BMC Nephrol*. 2013;14:82.
195. Rocchetti MT, Centra M, Papale M, Bortone G, Palermo C, Centonze D, et al. Urine protein profile of IgA nephropathy patients may predict the response to ACE-inhibitor therapy. *Proteomics*. 2008;8(1):206-16.
196. Yokota H, Hiramoto M, Okada H, Kanno Y, Yuri M, Morita S, et al. Absence of increased alpha1-microglobulin in IgA nephropathy proteinuria. *Mol Cell Proteomics*. 2007;6(4):738-44.
197. Taherkhani A, Kalantari S, Arefi Oskouie A, Nafar M, Taghizadeh M, Tabar K. Network analysis of membranous glomerulonephritis based on metabolomics data. *Mol Med Rep*. 2018;18(5):4197-212.
198. Taherkhani A, Nafar M, Arefi-Oskouie A, Broumandnia N, Parvin M, Mahmoudieh L, et al. Metabolomic Analysis of Membranous Glomerulonephritis: Identification of a Diagnostic Panel and Pathogenic Pathways. *Arch Med Res*. 2019;50(4):159-69.
199. Hao X, Liu X, Wang W, Ren H, Xie J, Shen P, et al. Distinct metabolic profile of primary focal segmental glomerulosclerosis revealed by NMR-based metabolomics. *PLoS One*. 2013;8(11):e78531.

200. Kalantari S, Nafar M, Samavat S, Parvin M, Nobakht MGBF, Barzi F. (1) H NMR-based metabolomics exploring urinary biomarkers correlated with proteinuria in focal segmental glomerulosclerosis: a pilot study. *Magn Reson Chem*. 2016;54(10):821-6.
201. Sui W, Li L, Che W, Zuo G, Chen J, Li W, et al. A proton nuclear magnetic resonance-based metabonomics study of metabolic profiling in immunoglobulin a nephropathy. *Clinics*. 2012;67(4):363-73.
202. Sethi S, D'Agati VD, Nast CC, Fogo AB, De Vriese AS, Markowitz GS, et al. A proposal for standardized grading of chronic changes in native kidney biopsy specimens. *Kidney Int*. 2017;91(4):787-9.
203. Roufosse C, Simmonds N, Clahsen-van Groningen M, Haas M, Henriksen KJ, Horsfield C, et al. A 2018 Reference Guide to the Banff Classification of Renal Allograft Pathology. *Transplantation*. 2018;102(11):1795-814.
204. Melchinger H, Calderon-Gutierrez F, Obeid W, Xu L, Shaw MM, Luciano RL, et al. Urine Uromodulin as a Biomarker of Kidney Tubulointerstitial Fibrosis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2022;17(9):1284-92.
205. LaFavers KA, Micanovic R, Sabo AR, Maghak LA, El-Achkar TM. Evolving Concepts in Uromodulin Biology, Physiology, and Its Role in Disease: a Tale of Two Forms. *Hypertension*. 2022;101161hypertensionaha12218567.
206. Brunati M, Perucca S, Han L, Cattaneo A, Consolato F, Andolfo A, et al. The serine protease hepsin mediates urinary secretion and polymerisation of Zona Pellucida domain protein uromodulin. *Elife*. 2015;4:e08887.
207. Stanisich JJ, Zyla DS, Afanasyev P, Xu J, Kipp A, Olinger E, et al. The cryo-EM structure of the human uromodulin filament core reveals a unique assembly mechanism. *Elife*. 2020;9.
208. Micanovic R, LaFavers KA, Patidar KR, Ghabril MS, Doud EH, Mosley AL, et al. The kidney releases a nonpolymerizing form of uromodulin in the urine and circulation that retains the external hydrophobic patch domain. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2022;322(4):F403-f18.
209. Nanamatsu A, Mori T, Ando F, Furusho T, Mandai S, Susa K, et al. Vasopressin Induces Urinary Uromodulin Secretion By Activating PKA (Protein Kinase A). *Hypertension*. 2021;77(6):1953-63.
210. Steubl D, Buzkova P, Ix JH, Devarajan P, Bennett MR, Chaves PHM, et al. Association of serum and urinary uromodulin and their correlates in older adults-The Cardiovascular Health Study. *Nephrology (Carlton)*. 2020;25(7):522-6.
211. El-Achkar TM, Dagher PC. Tubular cross talk in acute kidney injury: a story of sense and sensibility. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015;308(12):F1317-23.
212. Graham LA, Padmanabhan S, Fraser NJ, Kumar S, Bates JM, Raffi HS, et al. Validation of uromodulin as a candidate gene for human essential hypertension. *Hypertension*. 2014;63(3):551-8.
213. Tokonami N, Takata T, Beyeler J, Ehrbar I, Yoshifuji A, Christensen EI, et al. Uromodulin is expressed in the distal convoluted tubule, where it is critical for

- regulation of the sodium chloride cotransporter NCC. *Kidney Int.* 2018;94(4):701-15.
214. Lynn KL, Marshall RD. Excretion of Tamm-Horsfall glycoprotein in renal disease. *Clin Nephrol.* 1984;22(5):253-7.
215. Devuyst O, Olinger E, Rampoldi L. Uromodulin: from physiology to rare and complex kidney disorders. *Nat Rev Nephrol.* 2017;13(9):525-44.
216. Pruijm M, Ponte B, Ackermann D, Paccaud F, Guessous I, Ehret G, et al. Associations of Urinary Uromodulin with Clinical Characteristics and Markers of Tubular Function in the General Population. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016;11(1):70-80.
217. Pivin E, Ponte B, de Seigneux S, Ackermann D, Guessous I, Ehret G, et al. Uromodulin and Nephron Mass. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2018;13(10):1556-7.
218. Garimella PS, Biggs ML, Katz R, Ix JH, Bennett MR, Devarajan P, et al. Urinary uromodulin, kidney function, and cardiovascular disease in elderly adults. *Kidney Int.* 2015;88(5):1126-34.
219. Steubl D, Buzkova P, Garimella PS, Ix JH, Devarajan P, Bennett MR, et al. Association of Serum Uromodulin With ESKD and Kidney Function Decline in the Elderly: The Cardiovascular Health Study. *Am J Kidney Dis.* 2019;74(4):501-9.
220. Lv L, Wang J, Gao B, Wu L, Wang F, Cui Z, et al. Serum uromodulin and progression of kidney disease in patients with chronic kidney disease. *J Transl Med.* 2018;16(1):316.
221. Scherberich JE, Gruber R, Nockher WA, Christensen EI, Schmitt H, Herbst V, et al. Serum uromodulin-a marker of kidney function and renal parenchymal integrity. *Nephrol Dial Transplant.* 2018;33(2):284-95.
222. Steubl D, Schneider MP, Meiselbach H, Nadal J, Schmid MC, Saritas T, et al. Association of Serum Uromodulin with Death, Cardiovascular Events, and Kidney Failure in CKD. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2020;15(5):616-24.
223. Thornley C, Dawnay A, Cattell W. Human Tamm-Horsfall glycoprotein: urinary and plasma levels in normal subjects and patients with renal disease determined by a fully validated radioimmunoassay. *Clinical science (London, England: 1979).* 1985;68(5):529-35.
224. Prajczek S, Heidenreich U, Pfaller W, Kotanko P, Lhotta K, Jennings P. Evidence for a role of uromodulin in chronic kidney disease progression. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(6):1896-903.
225. Ponte B, Sadler MC, Olinger E, Vollenweider P, Bochud M, Padmanabhan S, et al. Mendelian randomization to assess causality between uromodulin, blood pressure and chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2021;100(6):1282-91.
226. Tran AC, Melchinger H, Weinstein J, Shaw M, Kent C, Perazella MA, et al. Urine testing to differentiate glomerular from tubulointerstitial diseases on kidney biopsy. *Pract Lab Med.* 2022;30:e00271.

227. Tachibana S, Iyoda M, Suzuki T, Kanazawa N, Honda H. Serum Uromodulin Levels Reflect Severity of Clinicopathological Findings in Early Stage IgA Nephropathy. *Am J Nephrol*. 2022;53(7):575-85.
228. Zhou J, Chen Y, Liu Y, Shi S, Wang S, Li X, et al. Urinary uromodulin excretion predicts progression of chronic kidney disease resulting from IgA nephropathy. *PLoS One*. 2013;8(8):e71023.
229. Melchinger H, Calderon-Gutierrez F, Obeid W, Xu L, Shaw MM, Luciano RL, et al. Urine Uromodulin as a Biomarker of Kidney Tubulointerstitial Fibrosis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2022.
230. Lindqvist A, Bratt T, Altieri M, Kastern W, Åkerström B. Rat α 1-microglobulin: co-expression in liver with the light chain of inter- α -trypsin inhibitor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*. 1992;1130(1):63-7.
231. Bergwik J, Kristiansson A, Allhorn M, Gram M, Åkerström B. Structure, Functions, and Physiological Roles of the Lipocalin α 1-Microglobulin (A1M). *Frontiers in Physiology*. 2021;12.
232. Akerstrom B, Maghzal GJ, Winterbourn CC, Kettle AJ. The lipocalin α 1-microglobulin has radical scavenging activity. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(43):31493-503.
233. Allhorn M, Åkerström B, Lundqvist K, Schmidtchen A. Heme-scavenging role of α 1-microglobulin in chronic ulcers. *Journal of investigative dermatology*. 2003;121(3):640-6.
234. Larsson J, Wingårdh K, Berggård T, Davies JR, Lögdberg L, Strand S-E, et al. Distribution of iodine 125-labeled α 1-microglobulin in rats after intravenous injection. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 2001;137(3):165-75.
235. Penders J, Delanghe JR. Alpha 1-microglobulin: clinical laboratory aspects and applications. *Clinica Chimica Acta*. 2004;346(2):107-18.
236. Jung K, Pergande M, Graubaum H, Fels L, Endl U, Stolte H. Urinary proteins and enzymes as early indicators of renal dysfunction in chronic exposure to cadmium. *Clinical chemistry*. 1993;39(5):757-65.
237. Ix JH, Katz R, Bansal N, Foster M, Weiner DE, Tracy R, et al. Urine Fibrosis Markers and Risk of Allograft Failure in Kidney Transplant Recipients: A Case-Cohort Ancillary Study of the FAVORIT Trial. *Am J Kidney Dis*. 2017;69(3):410-9.
238. Stubendorff B, Finke S, Walter M, Kniemeyer O, von Eggeling F, Gruschwitz T, et al. Urine protein profiling identified alpha-1-microglobulin and haptoglobin as biomarkers for early diagnosis of acute allograft rejection following kidney transplantation. *World J Urol*. 2014;32(6):1619-24.
239. O'Seaghdha CM, Hwang SJ, Larson MG, Meigs JB, Vasan RS, Fox CS. Analysis of a urinary biomarker panel for incident kidney disease and clinical outcomes. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(11):1880-8.
240. Pfliederer S, Zimmerhackl LB, Kinne R, Manz F, Schuler G, Brandis M. Renal proximal and distal tubular function is attenuated in diabetes mellitus type 1 as

determined by the renal excretion of alpha 1-microglobulin and Tamm-Horsfall protein. *Clin Investig.* 1993;71(12):972-7.

241. Brocco E, Fioretto P, Mauer M, Saller A, Carraro A, Frigato F, et al. Renal structure and function in non-insulin dependent diabetic patients with microalbuminuria. *Kidney Int Suppl.* 1997;63:S40-4.

242. Marczewski K, Krawczyk W, Rózyc P, Raszewski G, Grzywna R, Klimek K. Day/night ratio of microproteinuria and blood pressure rhythm in type II diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 1996;33(3):169-72.

243. Hong C-Y, Hughes K, Chia K-S, Ng V, Ling S-L. Urinary α 1-Microglobulin as a Marker of Nephropathy in Type 2 Diabetic Asian Subjects in Singapore. *Diabetes Care.* 2003;26(2):338-42.

244. Robles-Osorio ML, Sabath E. Tubular dysfunction and non-albuminuric renal disease in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Rev Invest Clin.* 2014;66(3):234-9.

245. Jiang X, Zhang Q, Wang HB, Cui XF, Liu R. Associations of urinary, glomerular, and tubular markers with the development of diabetic kidney disease in type 2 diabetes patients. *J Clin Lab Anal.* 2018;32(1).

246. Colombo M, McGurnaghan SJ, Blackbourn LAK, Dalton RN, Dunger D, Bell S, et al. Comparison of serum and urinary biomarker panels with albumin/creatinine ratio in the prediction of renal function decline in type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2020;63(4):788-98.

247. Amatruda JG, Katz R, Sarnak MJ, Gutierrez OM, Greenberg JH, Cushman M, et al. Biomarkers of Kidney Tubule Disease and Risk of End-Stage Kidney Disease in Persons With Diabetes and CKD. *Kidney Int Rep.* 2022;7(7):1514-23.

248. Zubiri I, Posada-Ayala M, Sanz-Maroto A, Calvo E, Martin-Lorenzo M, Gonzalez-Calero L, et al. Diabetic nephropathy induces changes in the proteome of human urinary exosomes as revealed by label-free comparative analysis. *Journal of proteomics.* 2014;96:92-102.

249. Liao W-L, Chang C-T, Chen C-C, Lee W-J, Lin S-Y, Liao H-Y, et al. Urinary Proteomics for the Early Diagnosis of Diabetic Nephropathy in Taiwanese Patients. *Journal of Clinical Medicine.* 2018;7(12):483.

250. du Buf-Vereijken PW, Wetzels JF. Treatment-related changes in urinary excretion of high and low molecular weight proteins in patients with idiopathic membranous nephropathy and renal insufficiency. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21(2):389-96.

251. Mucha K, Bakun M, Jaźwiec R, Dadlez M, Florczak M, Bajor M, et al. Complement components, proteolysis-related, and cell communication-related proteins detected in urine proteomics are associated with IgA nephropathy. *Pol Arch Med Wewn.* 2014;124(7-8):380-6.

252. Xu B, Zhu L, Wang Q, Zhao Y, Jia M, Shi S, et al. Mass spectrometry-based screening identifies circulating immunoglobulinA- α 1-microglobulin complex as potential biomarker in immunoglobulin A nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2021;36(5):782-92.

253. Zhao M, Li M, Li X, Shao C, Yin J, Gao Y. Dynamic changes of urinary proteins in a focal segmental glomerulosclerosis rat model. *Proteome Sci.* 2014;12:42.
254. Chehade H, Parvex P, Poncet A, Werner D, Mosig D, Cachat F, et al. Urinary low-molecular-weight protein excretion in pediatric idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2013;28(12):2299-306.
255. Koczera P, Martin L, Marx G, Schuerholz T. The ribonuclease a superfamily in humans: canonical RNases as the buttress of innate immunity. *International journal of molecular sciences.* 2016;17(8):1278.
256. Bedenbender K, Schmeck BT. Endothelial Ribonuclease 1 in Cardiovascular and Systemic Inflammation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 2020;8.
257. Yamanaka M, Akagi K, Murai K, Hirao N, Fujimi S, Omae T. Purification and properties of urinary alkaline ribonucleases from patients with nephrotic syndrome. *Clinica Chimica Acta.* 1977;78(2):191-201.
258. Sugiyama RH, Blank A, Dekker CA. Multiple ribonucleases of human urine. *Biochemistry.* 1981;20(8):2268-74.
259. Rabin EZ, Algom D, Freedman MH, Geunther L, Dardick I, Tattire B. Ribonuclease activity in renal failure. Evidence for toxicity. *Nephron.* 1981;27(4-5):254-9.
260. Rabin EZ, Jindal SL, Posen GA, Tattire B, Algom D, Roncari DA, et al. Ribonuclease activity in renal failure: evidence for toxicity. *Proc Eur Dial Transplant Assoc.* 1977;14:528-34.
261. Naskalski J, Anyszek T, Surdacka E, Hoyer B, Sulowicz W. Acid ribonuclease and alkaline ribonuclease isoenzymes in plasma of patients with decreased glomerular filtration rate. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42(3):279-82.
262. Humphrey RL, Karpetsky TP, Neuwelt EA, Levy CC. Levels of serum ribonuclease as an indicator of renal insufficiency in patients with leukemia. *Cancer Res.* 1977;37(7 Pt 1):2015-22.
263. Choi YW, Kim YG, Song MY, Moon JY, Jeong KH, Lee TW, et al. Potential urine proteomics biomarkers for primary nephrotic syndrome. *Clin Proteomics.* 2017;14:18.
264. Tsalik EL, Willig LK, Rice BJ, van Velkinburgh JC, Mohny RP, McDunn JE, et al. Renal systems biology of patients with systemic inflammatory response syndrome. *Kidney Int.* 2015;88(4):804-14.
265. Zechendorf E, O'Riordan CE, Stiehler L, Wischmeyer N, Chiazza F, Collotta D, et al. Ribonuclease 1 attenuates septic cardiomyopathy and cardiac apoptosis in a murine model of polymicrobial sepsis. *JCI Insight.* 2020;5(8).
266. Bedenbender K, Scheller N, Fischer S, Leiting S, Preissner KT, Schmeck BT, et al. Inflammation-mediated deacetylation of the ribonuclease 1 promoter via histone deacetylase 2 in endothelial cells. *The FASEB Journal.* 2019;33(8):9017-29.
267. Rosenberg HF. RNase A ribonucleases and host defense: an evolving story. *J Leukoc Biol.* 2008;83(5):1079-87.

268. Yang D, Rosenberg HF, Chen Q, Dyer KD, Kurosaka K, Oppenheim JJ. Eosinophil-derived neurotoxin (EDN), an antimicrobial protein with chemotactic activities for dendritic cells. *Blood*. 2003;102(9):3396-403.
269. Yang D, Chen Q, Rosenberg HF, Rybak SM, Newton DL, Wang ZY, et al. Human ribonuclease A superfamily members, eosinophil-derived neurotoxin and pancreatic ribonuclease, induce dendritic cell maturation and activation. *J Immunol*. 2004;173(10):6134-42.
270. Makiya MA, Khoury P, Kuang FL, Mata AD, Mahmood S, Bowman A, et al. Urine eosinophil-derived neurotoxin: A potential marker of activity in select eosinophilic disorders. *Allergy*. 2022.
271. Goto T, Morioka J, Inamura H, Yano M, Kodaira K, Igarashi Y, et al. Urinary eosinophil-derived neurotoxin concentrations in patients with atopic dermatitis: a useful clinical marker for disease activity. *Allergol Int*. 2007;56(4):433-8.
272. Ye B, Skates S, Mok SC, Horick NK, Rosenberg HF, Vitonis A, et al. Proteomic-based discovery and characterization of glycosylated eosinophil-derived neurotoxin and COOH-terminal osteopontin fragments for ovarian cancer in urine. *Clin Cancer Res*. 2006;12(2):432-41.
273. Jiang CF, Ng KW, Tan SW, Wu CS, Chen HC, Liang CT, et al. Serum level of amylase and lipase in various stages of chronic renal insufficiency. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)*. 2002;65(2):49-54.
274. Lee SY, Lee KT, Kang TW, Moon W, Lee SS, Hwang JY, et al. [Pancreatic enzyme elevations in Korean chronic renal failure patients]. *Korean J Gastroenterol*. 2005;45(2):125-9.
275. Maeda M, Otsuki M, Okano K, Yamasaki T, Baba S. Clinical evaluation of amylase-creatinine clearance ratio and amylase isoenzyme clearance in chronic renal failure. *Gastroenterol Jpn*. 1981;16(3):242-8.
276. Ozkok A, Elcioglu OC, Cukadar T, Bakan A, Sasak G, Atilgan KG, et al. Low serum pancreatic enzyme levels predict mortality and are associated with malnutrition-inflammation-atherosclerosis syndrome in patients with chronic kidney disease. *Int Urol Nephrol*. 2013;45(2):477-84.
277. Lewandowicz A, Bakun M, Kohutnicki R, Fabijańska A, Kistowski M, Imiela J, et al. Changes in urine proteome accompanying diabetic nephropathy progression. *Pol Arch Med Wewn*. 2015;125(1-2):27-38.
278. Griesche-Philippi J, Otto J, Schwörer H, Maisonneuve P, Lankisch PG. Exocrine pancreatic function in patients with end-stage renal disease. *Clin Nephrol*. 2010;74(6):457-64.
279. Owyang C, Miller LJ, DiMagno EP, Mitchell JC, 3rd, Go VL. Pancreatic exocrine function in severe human chronic renal failure. *Gut*. 1982;23(5):357-61.
280. Macanovic M, Lachmann PJ. Measurement of deoxyribonuclease I (DNase) in the serum and urine of systemic lupus erythematosus (SLE)-prone NZB/NZW mice by a new radial enzyme diffusion assay. *Clin Exp Immunol*. 1997;108(2):220-6.

281. Zykova SN, Tveita AA, Rekvig OP. Renal Dnase1 enzyme activity and protein expression is selectively shut down in murine and human membranoproliferative lupus nephritis. *PLoS One*. 2010;5(8).
282. Pedersen HL, Horvei KD, Thiyagarajan D, Norby GE, Seredkina N, Moroni G, et al. Lupus nephritis: low urinary DNase I levels reflect loss of renal DNase I and may be utilized as a biomarker of disease progression. *J Pathol Clin Res*. 2018;4(3):193-203.
283. Gaál Kovalčíková A, Janovičová L, Hodosy J, Bábíčková J, Vavrincová-Yaghi D, Vavrinec P, et al. Extracellular DNA concentrations in various aetiologies of acute kidney injury. *Sci Rep*. 2022;12(1):16812.
284. Vargas F, Wangesteen R, Rodríguez-Gómez I, García-Estañ J. Aminopeptidases in Cardiovascular and Renal Function. Role as Predictive Renal Injury Biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(16):5615.
285. Peters J, Mampel E, Schneider I, Burchardt U, Fukala E, Ahrens I, et al. Alanine aminopeptidase in urine in renal diseases. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. 1972;37:213-24.
286. Marchewka Z, Długosz A, Kuźniar J. Diagnostic application of AAP isoenzyme separation. *International Urology and Nephrology*. 1999;31(3):409-16.
287. Marchewka Z, Kuźniar J, Długosz A. Enzymuria and β 2-Mikroglobulinuria in the assessment of the influence of proteinuria on the progression of glomerulopathies. *International urology and nephrology*. 2001;33(4):673-6.
288. Naghibi B, Ghafghazi T, Hajhashemi V, Talebi A. Vancomycin-induced nephrotoxicity in rats: is enzyme elevation a consistent finding in tubular injury? *Journal of nephrology*. 2007;20(4):482-8.
289. Inselmann G, Balaschke M, Heidemann HT. Enzymuria following amphotericin B application in the rat. *Mycoses*. 2003;46(5-6):169-73.
290. Moon PG, Lee JE, You S, Kim TK, Cho JH, Kim IS, et al. Proteomic analysis of urinary exosomes from patients of early IgA nephropathy and thin basement membrane nephropathy. *Proteomics*. 2011;11(12):2459-75.
291. Lazarevic G, Antic S, Vlahovic P, Djordjevic V, Zvezdanovic L, Stefanovic V. Effects of aerobic exercise on microalbuminuria and enzymuria in type 2 diabetic patients. *Renal failure*. 2007;29(2):199-205.
292. De S, Kuwahara S, Saito A. The endocytic receptor megalin and its associated proteins in proximal tubule epithelial cells. *Membranes*. 2014;4(3):333-55.
293. Saito A, Pietromonaco S, Loo AK-C, Farquhar MG. Complete cloning and sequencing of rat gp330/" megalin," a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994;91(21):9725-9.
294. Elsakka EGE, Mokhtar MM, Hegazy M, Ismail A, Doghish AS. Megalin, a multi-ligand endocytic receptor, and its participation in renal function and diseases: A review. *Life Sciences*. 2022;308:120923.

295. Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2001;280(4):F562-F73.
296. Hvidberg V, Jacobsen C, Strong RK, Cowland JB, Moestrup SK, Borregaard N. The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Letters*. 2005;579(3):773-7.
297. Hori Y, Aoki N, Kuwahara S, Hosojima M, Kaseda R, Goto S, et al. Megalin blockade with cilastatin suppresses drug-induced nephrotoxicity. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2017;28(6):1783-91.
298. Yang J, Xu Y, Deng L, Zhou L, Qiu L, Zhang Y, et al. CUBN gene mutations may cause focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) in children. *BMC Nephrol*. 2022;23(1):15.
299. Schreiber A, Theilig F, Schweda F, Höcherl K. Acute endotoxemia in mice induces downregulation of megalin and cubilin in the kidney. *Kidney international*. 2012;82(1):53-9.
300. Ochoa F, Oltra G, Gerhardt E, Hermes R, Cohen L, Damiano AE, et al. Microalbuminuria and early renal response to lethal dose Shiga toxin type 2 in rats. *International journal of nephrology and renovascular disease*. 2012;5:29.
301. Arruda-Junior DF, Virgulino SG, Girardi AC. Reduced tubular proteinuria in hypertensive rats treated with losartan is associated with higher renal cortical megalin expression. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*. 2014;18(2):105-12.
302. Whaley-Connell AT, Habibi J, Nistala R, DeMarco VG, Pulakat L, Hayden MR, et al. Mineralocorticoid receptor-dependent proximal tubule injury is mediated by a redox-sensitive mTOR/S6K1 pathway. *American journal of nephrology*. 2012;35(1):90-100.
303. Lebeau C, Debelle FD, Arlt VM, Pozdzik A, De Prez EG, Phillips DH, et al. Early proximal tubule injury in experimental aristolochic acid nephropathy: functional and histological studies. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2005;20(11):2321-32.
304. Figueira MF, Castiglione RC, de Lemos Barbosa CM, Ornellas FM, da Silva Feltran G, Morales MM, et al. Diabetic rats present higher urinary loss of proteins and lower renal expression of megalin, cubilin, CIC-5, and CFTR. *Physiol Rep*. 2017;5(13).
305. Hryciw DH, Lee EM, Pollock CA, Poronnik P. Molecular changes in proximal tubule function in diabetes mellitus. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2004;31(5-6):372-9.
306. Fatah H, Benfaed N, Chana RS, Chunara MH, Barratt J, Baines RJ, et al. Reduced proximal tubular expression of protein endocytic receptors in proteinuria is associated with urinary receptor shedding. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2018;33(6):934-43.

307. Vinge L, Lees GE, Nielsen R, Kashtan CE, Bahr A, Christensen EI. The effect of progressive glomerular disease on megalin-mediated endocytosis in the kidney. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(8):2458-67.
308. Seki T, Asanuma K, Asao R, Nonaka K, Sasaki Y, Trejo JAO, et al. Significance of urinary full-length megalin in patients with IgA nephropathy. *PLoS One*. 2014;9(12):e114400.
309. Thrailkill KM, Nimmo T, Bunn RC, Cockrell GE, Moreau CS, Mackintosh S, et al. Microalbuminuria in type 1 diabetes is associated with enhanced excretion of the endocytic multiligand receptors megalin and cubilin. *Diabetes care*. 2009;32(7):1266-8.
310. Ogasawara S, Hosojima M, Kaseda R, Kabasawa H, Yamamoto-Kabasawa K, Kurosawa H, et al. Significance of urinary full-length and ectodomain forms of megalin in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2012;35(5):1112-8.
311. Kurita N, Kinoshita M, Fujimura M, Kurosawa K, Sakuramachi Y, Takano K, et al. Association of urinary C-megalin with albuminuria and renal function in diabetes: a cross-sectional study (Diabetes Distress and Care Registry at Tenri [DDCRT 21]). *J Nephrol*. 2022;35(1):201-10.
312. Nishiwaki H, Niihata K, Kinoshita M, Fujimura M, Kurosawa K, Sakuramachi Y, et al. Urinary C-megalin as a novel biomarker of progression to microalbuminuria: A cohort study based on the diabetes Distress and Care Registry at Tenri (DDCRT 22). *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2022;186:109810.
313. Albejante MC, Kunz TCM, Ferreira MFC, Júnior JHZR, de Almeida RJ, Bacigalupo LdS, et al. Proteinuria is Associated with Urinary Loss of Cubilin and Vitamin D-Binding Protein in Patients with Preeclampsia. *Scientific Reports*. 2020;10(1):3956.
314. Hayes AJ, Farrugia BL, Biose IJ, Bix GJ, Melrose J. Perlecan, A Multi-Functional, Cell-Instructive, Matrix-Stabilizing Proteoglycan With Roles in Tissue Development Has Relevance to Connective Tissue Repair and Regeneration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2022;10.
315. Aviezer D, Hecht D, Safran M, Eisinger M, David G, Yayon A. Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis, and angiogenesis. *Cell*. 1994;79(6):1005-13.
316. Siegel G, Malmsten M, Ermilov E. Anionic biopolyelectrolytes of the syndecan/perlecan superfamily: Physicochemical properties and medical significance. *Advances in colloid and interface science*. 2014;205:275-318.
317. Conde-Knape K. Heparan sulfate proteoglycans in experimental models of diabetes: a role for perlecan in diabetes complications. *Diabetes Metab Res Rev*. 2001;17(6):412-21.
318. Ebefors K, Granqvist A, Ingelsten M, Mölne J, Haraldsson B, Nyström J. Role of glomerular proteoglycans in IgA nephropathy. *PLoS One*. 2011;6(4):e18575.
319. Guo HX, Zhu YB, Wu CP, Zhong M, Hu SW. Potential urine biomarkers for gestational hypertension and preeclampsia. *Mol Med Rep*. 2019;19(4):2463-70.

320. Mongiat M, Sweeney SM, San Antonio JD, Fu J, Iozzo RV. Endorepellin, a novel inhibitor of angiogenesis derived from the C terminus of perlecan. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(6):4238-49.
321. Cailhier J-F, Sirois I, Laplante P, Lepage S, Raymond M-A, Brassard N, et al. Caspase-3 activation triggers extracellular cathepsin L release and endorepellin proteolysis. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(40):27220-9.
322. Woodall BP, Nystrom A, Iozzo RA, Eble JA, Niland S, Krieg T, et al. Integrin $\alpha 2\beta 1$ is the required receptor for endorepellin angiostatic activity. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(4):2335-43.
323. Goyal A, Pal N, Concannon M, Paul M, Doran M, Poluzzi C, et al. Endorepellin, the angiostatic module of perlecan, interacts with both the $\alpha 2\beta 1$ integrin and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2): a dual receptor antagonism. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(29):25947-62.
324. Laplante P, Raymond M-A, Labelle A, Abe J-I, Iozzo RV, Hébert M-J. Perlecan proteolysis induces an $\alpha 2\beta 1$ integrin-and Src family kinase-dependent anti-apoptotic pathway in fibroblasts in the absence of focal adhesion kinase activation. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(41):30383-92.
325. Surin B, Sachon E, Rougier J-P, Steverlynck C, Garreau C, Lelongt B, et al. LG3 fragment of endorepellin is a possible biomarker of severity in IgA nephropathy. *PROTEOMICS*. 2013;13(1):142-52.
326. Oda O, Shinzato T, Ohbayashi K, Takai I, Kunimatsu M, Maeda K, et al. Purification and characterization of perlecan fragment in urine of end-stage renal failure patients. *Clinica chimica acta*. 1996;255(2):119-32.
327. O'riordan E, Orlova T, Podust V, Chander P, Yanagi S, Nakazato M, et al. Characterization of urinary peptide biomarkers of acute rejection in renal allografts. *American journal of transplantation*. 2007;7(4):930-40.
328. Cortvrindt C, Speeckaert R, Delanghe JR, Speeckaert MM. Urinary Epidermal Growth Factor: A Promising “Next Generation” Biomarker in Kidney Disease. *American Journal of Nephrology*. 2022;53(5):372-87.
329. Oka Y, Orth DN. Human plasma epidermal growth factor/beta-urogastrone is associated with blood platelets. *J Clin Invest*. 1983;72(1):249-59.
330. Herbst R, Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 59: 21-26. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2004;59:21-6.
331. Chiarelli F, Gaspari S, Marcovecchio ML. Role of growth factors in diabetic kidney disease. *Horm Metab Res*. 2009;41(8):585-93.
332. Betz BB, Jenks SJ, Cronshaw AD, Lamont DJ, Cairns C, Manning JR, et al. Urinary peptidomics in a rodent model of diabetic nephropathy highlights epidermal growth factor as a biomarker for renal deterioration in patients with type 2 diabetes. *Kidney international*. 2016;89(5):1125-35.
333. Wu L, Li X-Q, Chang D-Y, Zhang H, Li J-J, Wu S-L, et al. Associations of urinary epidermal growth factor and monocyte chemotactic protein-1 with kidney

involvement in patients with diabetic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2020;35(2):291-7.

334. Worawichawong S, Worawichawong S, Radinahamed P, Muntham D, Sathirapongsasuti N, Nongnuch A, et al. Urine Epidermal Growth Factor, Monocyte Chemoattractant Protein-1 or Their Ratio as Biomarkers for Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy in Primary Glomerulonephritis. *Kidney Blood Press Res*. 2016;41(6):997-1007.

335. Segarra-Medrano A, Carnicer-Caceres C, Valtierra-Carmeno N, Agraz-Pamplona I, Ramos-Terrades N, Jatem Escalante E, et al. Value of urinary levels of interleukin-6, epidermal growth factor, monocyte chemoattractant protein type 1 and transforming growth factor β 1 in predicting the extent of fibrosis lesions in kidney biopsies of patients with IgA nephropathy. *Nefrología (English Edition)*. 2017;37(5):531-8.

336. Torres D, Rossini M, Manno C, Mattace-Raso F, D'Altri C, Ranieri E, et al. The ratio of epidermal growth factor to monocyte chemotactic peptide-1 in the urine predicts renal prognosis in IgA nephropathy. *Kidney international*. 2008;73(3):327-33.

337. Mejia-Vilet JM, Shapiro JP, Zhang XL, Cruz C, Zimmerman G, Méndez-Pérez RA, et al. Association Between Urinary Epidermal Growth Factor and Renal Prognosis in Lupus Nephritis. *Arthritis Rheumatol*. 2021;73(2):244-54.

338. Sullivan B, Light T, Vu V, Kapustka A, Hristova K, Leckband D. Mechanical disruption of E-cadherin complexes with epidermal growth factor receptor actuates growth factor-dependent signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022;119(4).

339. Rohatgi R, Flores D. Intratubular hydrodynamic forces influence tubulointerstitial fibrosis in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2010;19(1):65-71.

340. Grabias BM, Konstantopoulos K. The physical basis of renal fibrosis: effects of altered hydrodynamic forces on kidney homeostasis. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2014;306(5):F473-F85.

341. Eddy AA. Plasminogen activator inhibitor-1 and the kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2002;283(2):F209-F20.

342. Kolb RJ, Woost PG, Hopfer U. Membrane trafficking of angiotensin receptor type-1 and mechanochemical signal transduction in proximal tubule cells. *Hypertension*. 2004;44(3):352-9.

343. Miravète M, Dissard R, Klein J, Gonzalez J, Caubet C, Pecher C, et al. Renal tubular fluid shear stress facilitates monocyte activation toward inflammatory macrophages. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2012;302(11):F1409-F17.

344. Maggiorani D, Dissard R, Belloy M, Saulnier-Blache J-S, Casemayou A, Ducasse L, et al. Shear Stress-Induced Alteration of Epithelial Organization in Human Renal Tubular Cells. *PLOS ONE*. 2015;10(7):e0131416.

345. Musiał K, Bargenda A, Zwolińska D. Urine survivin, E-cadherin and matrix metalloproteinases as novel biomarkers in children with chronic kidney disease. *Biomarkers*. 2015;20(3):177-82.
346. Andersen RF, Palmfeldt J, Jespersen B, Gregersen N, Rittig S. Plasma and urine proteomic profiles in childhood idiopathic nephrotic syndrome. *Proteomics Clin Appl*. 2012;6(7-8):382-93.
347. El-Dawla NMQ, Sallam AM, El-Hefnawy MH, El-Mesallamy HO. E-cadherin and periostin in early detection and progression of diabetic nephropathy: epithelial-to-mesenchymal transition. *Clin Exp Nephrol*. 2019;23(8):1050-7.
348. Jiang H, Guan G, Zhang R, Liu G, Cheng J, Hou X, et al. Identification of urinary soluble E-cadherin as a novel biomarker for diabetic nephropathy. *Diabetes Metab Res Rev*. 2009;25(3):232-41.
349. Koziolok M, Mueller GA, Dihazi GH, Jung K, Altubar C, Wallbach M, et al. Urine E-cadherin: A Marker for Early Detection of Kidney Injury in Diabetic Patients. *J Clin Med*. 2020;9(3).
350. Ali H, Abu-Farha M, Hammad MM, Devarajan S, Bahbahani Y, Al-Khairi I, et al. Potential Role of N-Cadherin in Diagnosis and Prognosis of Diabetic Nephropathy. *Frontiers in Endocrinology*. 2022;13.
351. Shui HA, Ka SM, Lin JC, Lee JH, Jin JS, Lin YF, et al. Fibronectin in blood invokes the development of focal segmental glomerulosclerosis in mouse model. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(7):1794-802.
352. Burg MB, Ferraris JD. Intracellular Organic Osmolytes: Function and Regulation*. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(12):7309-13.
353. Gil RB, Ortiz A, Sanchez-Niño MD, Markoska K, Schepers E, Vanholder R, et al. Increased urinary osmolyte excretion indicates chronic kidney disease severity and progression rate. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2018;33(12):2156-64.
354. Niewczas MA, Sirich TL, Mathew AV, Skupien J, Mohney RP, Warram JH, et al. Uremic solutes and risk of end-stage renal disease in type 2 diabetes: metabolomic study. *Kidney International*. 2014;85(5):1214-24.
355. Zhao L, Gao H, Lian F, Liu X, Zhao Y, Lin D. ¹H-NMR-based metabonomic analysis of metabolic profiling in diabetic nephropathy rats induced by streptozotocin. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2011;300(4):F947-F56.
356. Dutta RK, Kondeti VK, Sharma I, Chandel NS, Quaggin SE, Kanwar YS. Beneficial effects of myo-inositol oxygenase deficiency in cisplatin-induced AKI. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2017;28(5):1421-36.
357. Qi S, Ouyang X, Wang L, Peng W, Wen J, Dai Y. A Pilot Metabolic Profiling Study in Serum of Patients with Chronic Kidney Disease Based on ¹H-NMR-Spectroscopy. *Clinical and Translational Science*. 2012;5(5):379-85.
358. An JN, Hyeon JS, Jung Y, Choi YW, Kim JH, Yang SH, et al. Urinary myo-inositol is associated with the clinical outcome in focal segmental glomerulosclerosis. *Scientific Reports*. 2019;9(1):14707.

359. Dekker SEI, Verhoeven A, Frey D, Soonawala D, Peters DJM, Mayboroda OA, et al. Change in Urinary Myoinositol/Citrate Ratio Associates with Progressive Loss of Renal Function in ADPKD Patients. *American Journal of Nephrology*. 2022;53(6):470-80.
360. Hyeon JS, Jung Y, Lee G, Ha H, Hwang G-S. Urinary Metabolomic Profiling in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice after Treatment with Losartan. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(23):8969.
361. Bletsas E, Filippas-Dekouan S, Kostara C, Dafopoulos P, Dimou A, Pappa E, et al. Effect of Dapagliflozin on Urine Metabolome in Patients with Type 2 Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2021;106(5):1269-83.
362. Bjarnason I, Batt R, Catt S, Macpherson A, Maxton D, Menzies IS. Evaluation of differential disaccharide excretion in urine for non-invasive investigation of altered intestinal disaccharidase activity caused by alpha-glucosidase inhibition, primary hypolactasia, and coeliac disease. *Gut*. 1996;39(3):374-81.
363. Choi J-Y, Yoon YJ, Choi H-J, Park S-H, Kim C-D, Kim I-S, et al. Dialysis modality-dependent changes in serum metabolites: accumulation of inosine and hypoxanthine in patients on haemodialysis. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2010;26(4):1304-13.
364. Gao X, Chen W, Li R, Wang M, Chen C, Zeng R, et al. Systematic variations associated with renal disease uncovered by parallel metabolomics of urine and serum. *BMC Systems Biology*. 2012;6(1):S14.
365. Bächle H, Sekula P, Schlosser P, Steinbrenner I, Cheng Y, Kotsis F, et al. Uromodulin and its association with urinary metabolites: the German Chronic Kidney Disease Study. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2022.
366. Zeng T, Liang Y, Chen J, Cao G, Yang Z, Zhao X, et al. Urinary metabolic characterization with nephrotoxicity for residents under cadmium exposure. *Environment International*. 2021;154:106646.