

Originalni naučni rad

Specifičnost i senzitivnost biomarkera balkanske endemske nefropatije

Marijana Kovačević^{1,2}, Dragana Pavlović^{1,2}, Zlatko Maksimović^{1,3},
Slobodan Marić³, Siniša Ristić¹, Ljubica Đukanović⁴

¹Medicinski fakultet Foča, Univerzitet u Istočnom Sarajevu, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina

²Univerzitetska bolnica Foča, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina

³Dom zdravlja Bijeljina, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina

⁴Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

Kratak sadržaj

Uvod. Posljednjih godina posvećuje se posebna pažnja definisanju kriterijuma za dijagnozu balkanske endemske nefropatije (BEN). Cilj rada je ispitivanje senzitivnosti, specifičnosti i graničnih vrijednosti biomarkera koji se koriste za dijagnozu BEN.

Metode. Ispitivanje je obuhvatilo 103 odrasle osobe podijeljene u dvije grupe: 1. grupa od 60 bolesnika sa BEN (35 muškaraca, starosti od 48 do 82 godine) i 2. grupa od 43 zdrave osobe (23 muškarca, starosti od 23 do 78 godina). Svim ispitanicima je pored detaljne anamneze urađen objektivni pregled, laboratorijske analize seruma i urina, i pregled bubrega ultrazvukom. Pored rutinskih laboratorijskih analiza urađeno je i mjerenje koncentracije albumina, alfa1-mikroglobulina i KIM-1 u urinu.

Rezultati. Bolesnici sa BEN bili su značajno stariji, imali značajno viši sistolni i srednji krvni pritisak, nižu koncentraciju hemoglobina, manju jačinu glomerulske filtracije (JGF) i tubulsku reapsorpciju fosfata od zdravih osoba. Izlučivanje alfa1-mikroglobulina (2,56 mg/mmol kreatinina vs. 0,09 mg/mmol kreatinina; $p=0,004$), albumina (6,5 mg/mmol kreatinina vs. 1,87 mg/mmol kreatinina; $p=0,018$) i proteina (26,7 mg/mmol kreatinina vs. 11,5 mg/mmol kreatinina; $p<0,0001$) urinom bilo je značajno veće kod bolesnika sa BEN nego kod zdravih osoba. Nije utvrđena statistički značajna razlika u ekskreciji KIM-1 između dvije grupe. Dužina bubrega je bila značajno manja kod bolesnika sa BEN nego kod zdravih osoba (97,8 mm vs. 105,8 mm). Alfa1-mikroglobulin u urinu ima najveću specifičnost (100%) i senzitivnost (81,1%) (granična vrijednost: 1,08 mg/mmol kreatinina) za razlikovanje BEN od zdravih. Logistička regresiona analiza je izdvojila proteinuriju i JGF kao značajne prediktore za dijagnozu BEN.

Zaključak. Alfa1-mikroglobulin u urinu ima pri graničnoj vrijednosti od 1,08 mg/mmol kreatinina visoku senzitivnost i specifičnost za razlikovanje BEN od zdravih osoba, pa se može smatrati optimalnim testom za dijagnozu BEN.

Ključne riječi: balkanska endemska nefropatija, biomarkeri, specifičnost, senzitivnost

Adresa autora:
Asist. dr Marijana Kovačević
Univerzitetska bolnica Foča
Studentska 5, 73 300 Foča
maksimmilica@yahoo.com

Uvod

Balkanska endemska nefropatija (BEN) je porodično, hronično, tubulointersticijsko oboljenje stanovnika ograničenih regiona Balkana. Iako je prvi put opisana prije više od pola vijeka [1], o ovoj bolesti još uvijek postoji nekoliko neriješenih pitanja. Jedno od njih su i dijagnostički kriterijumi, koji do skora nisu bili ni precizno definisani ni opšte prihvaćeni. Zbog toga su u različitim studijama korišćeni različiti kriterijumi, što je otežavalo poređenje rezultata istraživanja [2-4]. Panel istraživača je 2007. godine sistematizovao nova istraživanja, posebno nova dostignuća u dijagnostici bubrežnih bolesti i prikazao kriterijume za racionalnu dijagnozu BEN i skrining BEN u endemskim naseljima i porodicama oboljelih od BEN [5]. Iako su u tom radu opisane karakteristike pojedinih kriterijuma koji se koriste za dijagnozu BEN, preporuke i algoritmi za dijagnozu bolesti nisu precizno definisani. Nedavno su objavljene preporuke za dijagnozu, klasifikaciju i liječenje BEN koje su nastale kao rezultat rada grupe istaknutih istraživača ove bolesti [6]. U njima su precizno definisane preporuke i kriterijumi za skrining i dijagnozu bolesti sa precizno navedenim graničnim vrijednostima (cut-off values) pojedinih biomarkera. Međutim, ove granične vrijednosti su definisane na osnovu relativno malog broja istraživanja posvećenih ispitivanju pouzdanosti pojedinih biomarkera za dijagnozu BEN [7,8]. Pored toga, ovaj vodič navodi kao jednu od preporuka za postavljanje dijagnoze BEN isključivanje drugih bolesti bubrega, što ukazuje da sadašnji biomarkeri nisu dovoljni za dijagnozu BEN. Zbog toga je neophodno da se i dalje provjerava senzitivnost i specifičnost pojedinih biomarkera za BEN i da se traga za novim, pouzdanijim biomarkerima bolesti.

Cilj rada je bio da se utvrdi senzitivnost, specifičnost i granična vrijednost pojedinih biomarkera za dijagnozu BEN i ispita njihova prediktivna vrijednost u razlikovanju bolesnika sa BEN od zdravih osoba.

Metode rada

Ispitivanje je obuhvatilo 103 odrasle osobe izdvojene tokom sistematskih pregleda stano-

vnika sela opterećenih BEN u opštini Bijeljina, a metodologija ovih pregleda detaljno je opisana ranije [9]. Ispitanici su podijeljeni u dvije grupe: 1. grupa bolesnika sa BEN koju je činilo 60 bolesnika, starih od 48 do 82 godine, od kojih 35 muškaraca; 2. grupa zdravih osoba koja se sastojala od 43 osobe, 23 muškarca, starosti od 23 do 78 godina, a svi sa negativnom ličnom anamnezom o BEN, drugim bolestima bubrega i hipertenziji, koji nisu koristili nikakve lijekove, a objektivnim pregledom, laboratorijskim analizama i ultrazvučnim pregledom bubrega nije otkriven nijedan patološki nalaz.

Svim ispitanicima je pored detaljne anamneze urađen objektivni pregled, laboratorijske analize seruma i urina, i pregled bubrega ultrazvukom. Krvna slika je određena na hematološkom automatskom brojaču krvnih elemenata, tipa Sysmex. Koncentracije glukoze u serumu i koncentracije kreatinina, natrijuma i fosfata u urinu određivane su standardnim biohemijskim metodama na biohemijskom analizatoru firme Abbott (Alcyon). Koncentracija kreatinina u serumu mjerena je na Beckman kreatinin Analyzer II (Brea, CA, USA) modifikiranom Jaffe metodom. Jačina glomerulske filtracija (JGF) izračunata je prema MDRD formuli: $JGF, mL/min/1,73 m^2 = 186,3 \times sCr (mg/dL)^{-1,154} \times starost^{-0,203} \times 0,742$ za žene, gdje je sCr koncentracija kreatinina u serumu [10]. Koncentracija proteina u urinu određivana je biuretskom metodom i prikazana kao mg proteina/mmol kreatinina (normalne vrijednosti <20 mg/mmol kreatinina). Albumini u urinu određivani su fotometrijskom metodom sa bromokrezol zelenim na analizatoru Olympus AU 400 (Olympus Co. Ltd., Tokyo, Japan) (normalne vrijednosti <2,5 mg/mmol kreatinina za muškarce ili <3,5 mg/mmol kreatinina za žene). Alfa-1 mikroglobulin u urinu je mjereno pomoću imunonefelometrijskog testa (BN II nephelometer, Dade Behring) (normalna vrijednost <1,5 mg/mmol kreatinina). KIM-1 (kidney injury molecule-1) u urinu određen je ELISA metodom (Aviscera Bioscience).

Ultrazvučni pregled bubrega je uradio jedan ljekar (SM) s iskustvom u ultrazvučnoj dijagnostici sa sektorskom sondom 3,5 MHz. Kranio-kaudalni dijametar svakog bubrega mjereno je na presjeku koji je vizuelno procjenjen da ima najveću dužinu, a dužina bubrega je izražena u milimetrima. Srednja dužina bubre-

ga bila je aritmetička sredina dužine desnog i lijevog bubrega. Bubrezi manji od 100 mm smatrani su smanjenim.

Dijagnoza BEN postavljena je pomoću sljedećih kriterijuma: (1) zemljoradnici iz naselja sa BEN, (2) pozitivna porodična anamneza o BEN, (3) proteinurija, (4) povećano izlučivanje alfa1-mikroglobulina, (5) anemija, (6) smanjena JGF, (7) simetrično smanjeni bubrezi [5,6]. Dijagnoza BEN je postavljena ako je pored dva prva kriterijuma postojalo povećano izlučivanje alfa1- mikroglobulina ili proteina urinom i bar još jedan od ostalih kriterijuma, a isključene druge bolesti bubrega.

Anemija je definisana kao koncentracija hemoglobina <130 g/L za muškarce i žene u postmenopauzi, kao i koncentracija hemoglobina <120 g/L za žene prije menopauze, kako je predloženo od strane Svjetske zdravstvene organizacije [11].

Arterijska hipertenzija je dijagnostikovana kada je sistolni krvni pritisak bio ≥ 140 mmHg i/ili dijastolni ≥ 90 mmHg, ili ako je bolesnik liječen antihipertenzivima koje je prethodno odredio ljekar.

Kontinuirana obilježja sa normalnom raspodjelom prikazana su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, a ona sa asimetričnom raspodjelom kao medijana i opseg. Kategorička obilježja prikazana su frekvencijama i procentima. Ispitivanje značajnosti razlika u aritmetičkim sredinama, odnosno medijanama, između grupa vršeno je pomoću Studentovog t-testa, odnosno Mann-Whitney U test, a poređenje frekvencije pomoću χ^2 -kvadrat testa. Dijagnostička vrijednost pojedinih biomarkera ispitana je konstruisanjem ROC krive i određivanjem granične vrijednosti (cut-off point), senzitivnosti i specifičnosti, kao i

površine ispod ROC krive.

Starost bolesnika, srednji arterijski krvni pritisak, koncentracija hemoglobina, glikemija, koncentracija proteina, albumina i alfa-1 mikroglobulina u urinu, JGF, FENa, TRP i srednja dužina bubrega su kombinovani kao nezavisna obilježja u univarijantnoj logističkoj regresionoj analizi. Pripadnost grupi je bilo zavisno obilježje. Sva obilježja za koje je univarijantnom analizom pokazano da su značajni prediktori ($p < 0,1$) kombinovana su potom u multivarijantnoj logističkoj regresionoj analizi. Vrijednost $p < 0,05$ smatrala se statistički značajnom.

Za izračunavanja korišćeni su statistički paket programa SPSS Version 21.0 (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.) i MedCalc for Windows, version 12.5 (MedCalc Software, Ostend, Belgium).

Rezultati

Osnovni podaci o bolesnicima prikazani su u tabeli 1. Prosječna starost, sistolni i srednji krvni pritisak bolesnika sa BEN bili su značajno veći nego kod zdravih osoba kontrolne grupe. Pozitivnu porodičnu anamnezu za BEN imali su svi bolesnici, a samo 32,6% zdravih ispitanika.

Laboratorijske analize su pokazale da bolesnici sa BEN imaju značajno manju JGF i tubulsku reapsorpciju fosfata, a značajno veću ekskreciju proteina, albumina i alfa1-mikroglobulina urinom. Takođe, koncentracija hemoglobina je bila značajno manja kod bolesnika sa BEN nego kod zdravih. Dužina i desnog i lijevog bubrega bolesnika sa BEN je bila za oko 10 mm manja od dužine bubrega

Tabela 1. Osnovne karakteristike ispitanika

	Bolesnici sa BEN	Zdravi	p
Pol, muški/ženski	35/25	23/20	0,590
Starost, godine	64,6 \pm 9,6	50,9 \pm 12,1	<0,0001
Pozitivna porodična anamneza o BEN	60 (100%)	14 (32,6%)	0,0001
Sistolni krvni pritisak, mmHg	146 \pm 14,8	131 \pm 10,1	<0,0001
Dijastolni krvni pritisak, mmHg	88 \pm 9,9	85 \pm 9,3	0,118
MAP, mmHg	107,4 \pm 11,6	100,9 \pm 9,9	0,0032
BMI, kg/m ²	26,7 \pm 4,1	26,4 \pm 3,9	0,734

BEN - balkanska endemska nefropatija, MAP - srednji arterijski pritisak, BMI - indeks tjelesne mase

Tabela 2. Rezultati laboratorijske analize seruma i urina i dužina bubrega bolesnika sa endemskom nefropatijom i zdravih osoba

	Bolesnici sa BEN	Zdravi	p
Hemoglobin, g/L	121,2 ± 16,43	135,85 ± 17,98	<0,016
Glukoza, mmol/L	6,2 ± 2,2	6,0 ± 2,3	0,999
Kreatinin, μmol/L	134,62 (46 - 713)	66,4 (40-103)	<0,0001
JGF, mL/min/1,73m ²	60,98±25,89	105,77±24,48	<0,0001
U-proteini, g/mmol kreatinin	26,67 (1,14-375)	11,49 (2,0-47,9)	<0,0001
U-albumini, mg/mmol kreatinin	6,50 (0,00-570,33)	1,87 (0,01-27,03)	0,018
U-alfa1-MG, mg/mmol kreatinin	2,56 (0,12-70,63)	0,09 (0,01-1.08)	0,004
FENa, %	2,28±2,96	1,032±0,69	0,064
TRP, %	88,1 (54,3 - 99,1)	91,6 (85,2 - 96,9)	0,004
KIM-1, pg/mmol kreatinina	49,4 (1,22 - 485,5)	36,7 (14,6 - 149,2)	0,119
Dužina desnog bubrega, mm	97,75±13,00	105,82±8,40	0,007
Dužina lijevog bubrega, mm	103,60±11,12	114,70±9,22	<0,0001

Vrijednosti su prikazane kao aritmetička sredina ± standardna devijacija, odnosno medijana i opseg u zavisnosti od vrste promjenljive. BEN - balkanska endemska nefropatija, U-alfa1-MG - urinarni alfa1-mikroglobulin, FENa - frakciona ekskrecija natrijuma, TRP - tubulska reapsorpcija fosfata, KIM-1 - kidney injury molecule-1

zdravih osoba.

U tabeli 3 prikazana je specifičnost i senzitivnost pojedinih biomarkera pri navedenoj graničnoj vrijednosti, kao i površina ispod ROC krive u razlikovanju bolesnika sa BEN od zdravih osoba.

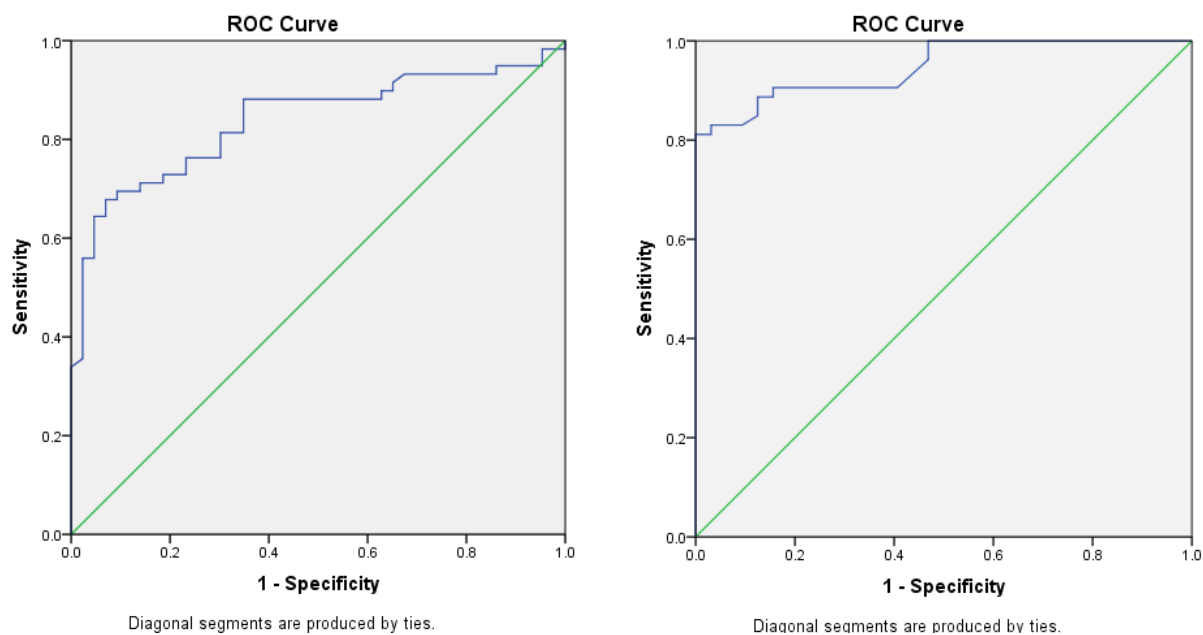
U ovu analizu uvršteni su oni biomarkeri za koje su u prethodnim analizama dokazane statistički značajne razlike između grupa: arterijski pritisak, urinarni protein, albumin i alfa1-mikroglobulin, JGF, tubulska reapsorpcija fosfata, hemoglobin i dužina bubrega (uvršte-

na je srednja dužina bubrega izračunata kao aritmetička sredina dužina dva bubrega), kao i frakciona ekskrecija natrijuma, iako nije dostigla statističku značajnost. Vidi se da najveću senzitivnost i specifičnost za razlikovanje BEN od zdravih ima alfa1-mikroglobulin koji pri graničnoj vrijednosti od 1,08 ima specifičnost 100%, a senzitivnost 81,1%. Površina ispod krive (0,95) ukazuje da će bolesnici sa BEN imati 95% veće šanse od zdravih da imaju povišene vrijednosti alfa1-mikroglobulina u urinu. Kao što se i očekivalo, JGF ima visoku

Tabela 3. Specifičnost i senzitivnost biomarkera u razlikovanju balkanske endemske nefropatije od zdravih osoba

	Granična vrijednost	Specifičnost, %	Senzitivnost, %	Površina ispod krive (AUC)	SE	P
MAP, mmHg	93,33	46,9	92,6	0,68	0,06	0,005
U protein, mg/mmol kreatinin	19,56	93,0	67,8	0,84	0,04	<0,0001
U albumin, mg/mmol kreatinin	16,8	95,5	31,5	0,62	0,08	0,056
U alfa1MG, mg/mmol kreatinina	1,08	100	81,1	0,95	0,02	<0,0001
JGF, mL/min/1,73m ²	75,57	95,1	80,0	0,09	0,03	<0,0001
FENa, %	1,47	85,7	62,1	0,68	0,08	0,030
TRP, %	84,94	100	47,2	0,28	0,06	0,001
Hemoglobin, g/L	137	88,2	54,5	0,28	0,06	0,003
Srednja dužina bubrega, mm	104	85	67,31	0,24	0,05	<0,0001

MAP - srednji arterijski pritisak, U alfa1 MG - urinarni alfa1-mikroglobulin, JGF - jačina glomerulske filtracije, FENa - frakciona ekskrecija natrijuma, TRP - tubulska reapsorpcija fosfata



Grafikon 1. ROC krive za alfa1-mikroglobulin (lijevo) i protein (desno) u urinu u razlikovanju bolesnika sa endemskom nefropatijom i zdravih osoba

specifičnost i senzitivnost za razlikovanje bolesnih od zdravih. Visoku specifičnost i nešto nižu senzitivnost ima i proteinurija i frakciona ekskrecija natrijuma, dok mikroalbuminurija i TRP imaju visoku specifičnost, ali malu senzitivnost.

Koristeći univarijantnu/multivarijantnu logističku regresionu analizu ispitano je koji od biomarkera značajno razlikuju BEN od zdravih osoba. Univarijantnom regresionom analizom izdvojene su sljedeće varijable kao prediktori za dijagnozu BEN: srednji arterijski pritisak, hemoglobin, urinarni proteini i alfa1-mikroglobulin, JGF, TRP i prosječna dužina bubrega. Sve ove varijable, osim alfa1-mikroglobulinurije, uvrštene su zatim u multivarijantnu regresionu analizu. Alfa1-mikroglobulin u urinu ima visok

interval povjerenja što je posljedica njegove kolinearnosti sa grupom bolesnika sa BEN, a to je pokazala i specifičnost ovog biomarkera koja je bila 100% i time dokazala njegovu visoku pouzdanost. Pored toga, alfa1-mikroglobulin je kolinearan sa proteinima u urinu i JGF, pa zbog svega toga nije uvršten u multivarijantnu regresionu analizu.

Multivarijantna regresiona analiza izdvojila je proteinuriju i JGF kao jedine nezavisne promjenljive koje značajno razlikuju bolesnike sa BEN i zdrave osobe. Na osnovu svih ovih analiza može se zaključiti da su pored alfa1-mikroglobulinurije, više vrijednosti proteinurije i niže vrijednosti JGF pouzdani biomarkeri za dijagnozu endemske nefropatije.

Tabela 5. Varijable izdvojene univarijantnom logističkom regresionom analizom kao značajni prediktori za razlikovanje bolesnika sa endemskom nefropatijom i zdravih osoba

Promjenljive	b	p	OR	95% CI
Starost, godine	0,12	<0,0001	1,13	1,07-1,18
MAP, mmHg	0,05	0,017	1,05	1,00-1,09
Hemoglobin,g/l	-0,04	0,05	0,96	0,92-0,98
U-proteini, mg/ mmol kreatinina	0,10	<0,0001	1,10	1,04-1,16
U-alfa1-mikroglobulin, mg/ mmol kreatinina	3,32	0,001	27,92	4,18-186,67
JGF, ml/min/1,73m ²	-0,07	<0,0001	0,92	0,90-0,96
TRP, %	-0,16	0,002	0,84	0,76-0,94
Srednja dužina bubrega, mm	-0,9	<0,0001	0,90	0,86-0,95

MAP – srednji arterijski pritisak, JGF – jačina glomerulske filtracije, TRP – tubulska reapsorpcija fosfata

Diskusija

Glavni cilj istraživanja provedenih u ovom radu bio je da se ispita senzitivnost i specifičnost različitih biomarkera za dijagnozu BEN. Studija je provedena analizom rezultata sistematskih pregleda stanovnika sela sa BEN opštine Bijeljina, a obuhvatila je 60 bolesnika sa BEN i 43 zdrave osobe. Poređenje demografskih, kliničkih, laboratorijskih i ultrazvučnih karakteristika ispitanika ove dvije grupe je pokazalo da su bolesnici sa BEN značajno stariji, imaju značajno viši sistolni krvni pritisak, nižu koncentraciju hemoglobina i manju JGF i tubulsku reapsorpciju fosfata od zdravih osoba. Analize urina su pokazale da bolesnici sa BEN imaju veću alfa1-mikroglobulinuriju, albuminuriju i proteinuriju od zdravih osoba. Nije utvrđena statistički značajna razlika u ekskreciji KIM-1 između grupe sa BEN i grupe zdravih osoba. Bolesnici sa BEN imaju statistički značajno manju dužinu lijevog i desnog bubrega u odnosu na zdrave osobe. Ispitivanje specifičnosti i senzitivnosti obilježja za koja je dokazana statistički značajna razlika između grupa je pokazalo da najveću senzitivnost i specifičnost za razlikovanje BEN od zdravih ima alfa1-mikroglobulin u urinu koji pri graničnoj vrijednosti od 1,08 ima specifičnost 100%, a senzitivnost 81,1%. Logistička regresiona analiza je izdvojila proteinuriju i JGF kao značajne prediktore BEN.

Svi bolesnici sa BEN imali su pozitivnu porodičnu anamnezu za BEN, a samo 26,3% od njih dalo je podatak ličnom anamnezom da boluju od bolesti bubrega. To ukazuje da mnoge osobe iz endemskih porodica imaju neotkrivenu BEN, što nameće potrebu da se provjeri pouzdanost biomarkera koji će omogućiti dijagnozu BEN. Zbog toga je provjera specifičnosti pojedinih biomarkera za dijagnozu BEN odabrana za predmet našeg istraživanja, kao i nekoliko istraživanja urađenih tokom protekle decenije [7,8,12-14].

Niskomolekularna proteinurija se smatra karakteristikom BEN [4-6], a u ovom radu je ona provjeravana mjerenjem ekskrecije alfa1-mikroglobulina urinom. Alfa1-mikroglobulin se u brojnim istraživanjima pokazao kao pouzdan marker oštećenja proksimalnih tubula teškim metalima, ali i tubulskih oštećenja u hipertenziji i dijabetesu [15-18]. Čvorišćec [19] navodi da je kod 90% oboljelih od BEN i kod

41,6% sumnjivih slučajeva povećano izlučivanje alfa1-mikroglobulina nasuprot ispitanicima iz kontrolnih grupa kod kojih je povećano izlučivanje alfa1-mikroglobulina urinom dokazano kod 7,1-8,9%. Naše ispitivanje je pokazalo da je ekskrecija alfa1-mikroglobulina urinom statistički značajno veća kod bolesnika sa BEN u odnosu na zdrave osobe i da je to najpouzdaniji biomarker za razlikovanje bolesnika sa BEN od zdravih osoba. Površina ispod krive od 0,95 pokazuje da bolesnici sa BEN imaju 95% veće šanse od zdravih da imaju povišene vrijednosti alfa1-mikroglobulina u urinu. Đukanović i sar. [7] su pokazali da se između nekoliko biomarkera tubulske disfunkcije (FENa, TRP, glikozurija, alkalna fosfataza u urinu i specifična težina urina) samo alfa1-mikroglobulin pokazao kao značajan nezavisni prediktor BEN. Iako Stefanović i sar. [13] ukazuju da beta-2 mikroglobulin ima veću senzitivnost i specifičnost od alfa1-mikroglobulina u razlikovanju bolesnika sa BEN od zdravih, oba ova biomarkera su se u tom radu pokazala kao značajni prediktori BEN. Međutim, postoje razlike u graničnoj vrijednosti alfa1-mikroglobulina po kojoj se najtačnije razlikuje BEN od zdravih. U našem radu to je vrijednost od 1,08 mg/mmol kreatinina, Stefanović i sar. [13] navode sličnu vrijednost od 1,12 mg/mmol kreatinina, Đukanović i sar. [7] 1,37 mg/mmol kreatinina, ali Dika [8] navodi vrijednost od 23,5 mg/g kreatinina (2,66 mg/mmol kreatinina) koja se preporučuje i u nedavnoj preporuci za dijagnozu BEN [6]. Iako se svi ovi autori slažu da je alfa1-mikroglobulin specifičan i senzitivan biomarker za dijagnozu BEN, granična vrijednost za razlikovanje bolesnika sa BEN od zdravih zahtijeva dodatne provjere.

Albuminurija je u grupi sa BEN bila statistički značajno veća od albuminurije zdravih ispitanika. Postoji više radova koji su pokazali da je, pored povećanog izlučivanja proteina niske molekulske težine karakterističnog za bolesnike sa BEN, albuminurija, takođe, čest nalaz kod ovih bolesnika [12,20,21]. To je vodilo diskusiji o lokalizaciji lezije u BEN. Naime, nisko molekularna proteinurija je znak tubulskog oštećenja, a povećano izlučivanje albumina (MW 68 kDa) ukazuje na povećanu propustljivost glomerulske membrane. Da bi doprinijeli poznavanju porijekla proteinurije kod bolesnika sa BEN, Đukanović i saradnici [12] su nedavno ispitali ekskreciju alfa1-mikroglob-

ulina, albumina i IgG kod bolesnika sa BEN, glomerulonefritisom i zdravih osoba. Pokazali su da postoji negativna korelacija između JGF i ekskrecije ovih proteina, i da se njihov odnos u urinu mijenja sa progresijom bolesti. Iako je niskomolekularna proteinurija najčešći nalaz kod bolesnika sa BEN, albuminurija je često otkrivena kod bolesnika sa JGF ispod 60 ml/min/1,73m², ali i kod bolesnika sa normalnom funkcijom bubrega. IgG je, takođe, otkriven u urinu bolesnika sa BEN i to sve češće kako je bolest napredovala. To ukazuje da se sa progresijom BEN javlja i oštećenje glomerulskog filtra, ali ostaje nejasno zašto se i kod nekih bolesnika sa normalnom funkcijom bubrega nalaze proteini veće molekulske težine. Naši rezultati, takođe, pokazuju da je albuminurija otkrivena kod 60% bolesnika sa BEN, a među njima su tri četvrtine imale JGF iznad 60 ml/min/1,73m². Pojava albuminurije kod bolesnika sa BEN, tubulointersticijskim oboljenjem, ne mora da bude posljedica povećane propustljivosti glomerulskog filtra nego može biti posljedica smanjene reapsorpcije one male količine albumina koji se normalno filtriraju u glomerulu, a ne mogu ih reapsorbovati oštećeni tubuli. Ipak, porijeklo albumina, a posebno IgG u urinu bolesnika sa BEN i normalnom funkcijom bubrega zahtijeva dodatna ispitivanja.

Posljednjih decenija postala je očigledna potreba za novim biomarkerima oštećenja proksimalnih tubula, jer je pokazano da promjene u tubulointersticijumu značajno doprinose progresiji hronične bubrežne slabosti i vode ka terminalnoj fazi bolesti [22,23]. Jedan od ovih biomarkera je i molekul oštećenja bubrega (engl. kidney injury molecule-1 –KIM-1), novi, specifični biomarker za dijagnozu ranih tubulskih oštećenja koji se određuje u tkivu bubrega, ali i u urinu bolesnika. Ovaj transmembranski tubulski protein sa nepoznatom funkcijom se ne detektuje u zdravim bubrežima, ali je obilježje skoro svih toksičnih i ishemičnih bolesti bubrega. Nedavna istraživanja su ukazala na njegovu eventualnu patofiziološku ulogu u modularanju tubulskog oštećenja i reparacije [24]. Međutim, u našem istraživanju većina vrijednosti KIM-1 bila je ispod 150 pg/mmol kreatinina i samo je poneka vrijednost u grupi bolesnika sa BEN, ali ne i u grupi zdravih osoba, bila iznad ove vrijednosti. Nije utvrđena statistički značajna razlika u ekskreciji KIM-1 između grupe bolesnika sa BEN i grupe

zdravih osoba, pa KIM-1 ne bi mogao da bude biomarker za rano otkrivanje BEN. Međutim, analiza distribucija vrijednosti KIM-1 u ispitivanim grupama je pokazala da je oko polovine bolesnika sa BEN imalo KIM-1 iznad vrijednosti medijane za KIM-1 kod zdravih osoba [25]. Kako je ovo ispitivanje obuhvatilo mali broj uzoraka urina, bilo bi neophodno da se ova istraživanja dopune. U literaturi nema podataka o ekskreciji KIM-1 urinom kod bolesnika sa BEN, pa naše rezultate ne možemo da uporedimo sa rezultatima drugih.

Smanjeni bubrezi kod bolesnika sa BEN opisani su već u u prvim radovima o ovoj bolesti, a Danilović [3] je smanjene bubrege svrstao među dijagnostičke kriterijume. Međutim, smatralo se da se smanjenje bubrega javlja tek u odmaklim stadijumima bolesti [26,27]. Ležaić i saradnici [28] su utvrdili da je veličina bubrega već kod bolesnika sa BEN u prvom stadijumu bolesti značajno manja nego kod zdravih osoba podudarnih po polu i uzrastu. Dimitrov i saradnici [2] su opisali manju dužinu bubrega i širinu korteksa čak i u potomaka bolesnika sa BEN i time ukazali da proces smanjenja počinje rano, u predkliničkom stadijumu bolesti. U našem radu dužina bubrega se pokazala kao marker visoke specifičnosti (85%) i relativno visoke senzitivnosti (67,3%), a ovi procenti su nešto viši od onih koje navode drugi autori [7]. Pored toga, univarijantnom analizom je dužina bubrega izdvojena kao značajan prediktor BEN.

Kao što smo i očekivali, JGF je imala visoku specifičnost i senzitivnost za razlikovanje bolesnika sa BEN i zdravih. Visoku specifičnost (93%) i nešto nižu senzitivnost (67,8%) imala je i proteinurija pri graničnoj vrijednosti od 19,56 mg/mmol kreatinina, a površina ispod krive ukazuje da će bolesnici sa BEN imati 83,8% veće šanse od zdravih da imaju povišene vrijednosti proteina u urinu. To pokazuje da u terenskim ispitivanjima u kojima nema mogućnosti da se određuje alfa1-mikroglobulinurija, može se sa nešto manjom pouzdanošću koristiti proteinurija. Za ostale biomarkere, čije se srednje vrijednosti značajno razlikuju između bolesnika sa BEN i zdravih, ROC analiza nije dokazala da mogu biti pouzdani u razlikovanju ove dvije grupe ispitanika. Ove rezultate je potvrdila i logistička regresiona analiza. Multivarijantna logistička regresiona analiza izdvojila je proteinuriju i JGF kao nezavisne promjenljive

koje značajno razlikuju bolesnike sa BEN i zdrave osobe, ali u ovu analizu nije uvršten alfa1-mikroglobulin zbog njegove kolinearnosti sa grupom bolesnika sa BEN, što je pokazala i specifičnost ovog biomarkera od 100%, kao i zbog kolinearnosti sa proteinima u urinu i JGF. No, na osnovu visoke specifičnosti alfa1-mikroglobulina i rezultata multivarijantne logističke regresione analize može se zaključiti da su alfa1-mikroglobulinurija, proteinurija i JGF pouzdani biomarkeri za razlikovanje bolesnika sa BEN i zdravih osoba. Proteinurija i JGF mogu se odrediti u svim ustanovama primarne zdravstvene zaštite, što omogućava njihovu primjenu u ranom otkrivanju BEN. Međutim, alfa1-mikroglobulin u urinu ne određuju ustanove primarne zdravstvene zaštite, ali ni mnoge ustanove sekundarne zdravstvene zaštite. Bilo bi neophodno da se u ustanovama sekundarne zdravstvene zaštite, koje se nalaze u žarištima BEN, omogući određivanje alfa1-mikroglobulina u urinu, što bi doprinijelo ranom otkrivanju BEN i tačnoj diferencijalnoj dijagnozi između BEN i drugih bolesti bubrega, a posebno dvije veoma česte hronične bolesti bubrega, dijabetesne nefropatije i nefroangioskleroze.

Literatura

1. Danilović V, Djurišić M, Mokranjac M, Stojimirović B, Živojinović J, Stojaković P. Néphrites chroniques provoquées par l'intoxication au plomb par voie digestive (farine). *Presse méd* 1957;65(90):2039-40.
2. WHO. The „Endemic Nephropathy“ of South-Eastern Europe. *Bull World Health Organ* 1965;32:441-8.
3. Danilović V. Endemic nephropathy in Yugoslavia. In: Strahinjić S, Stefanović V, editors. *Endemic (Balkan) Nephropathy, Proceedings of the 4th Symposium on Endemic (Balkan) Nephropathy, Niš 1979*. Niš: Inst Nephro Haemod; 1981. p. 1-5.
4. Stefanović V. Diagnostic criteria for Balkan endemic nephropathy. In: Strahinjić S, Stefanović V, editors. *Current Research in Endemic (Balkan) Nephropathy*. Niš: University Press; 1983. p. 351-63.
5. Stefanović V, Jelaković B, Cukuranović R, et al. Diagnostic criteria for Balkan endemic nephropathy: proposal by an international panel. *Ren Fail* 2007;29:867-80.
6. Jelaković B, Nikolić J, Radovanović Z, et al. Consensus statement on screening, diagnosis, classification and treatment of endemic (Balkan) nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2013;29(11):2020-7.
7. Djukanović L, Marinković J, Marić I, et al. Contribution to the definition of diagnostic criteria for Balkan endemic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*

Zaključak

Bolesnici sa BEN su bili stariji i imali su veći sistolni krvni pritisak od zdravih osoba. Ekskrecija proteina, albumina i alfa1-mikroglobulina urinom i frakciona ekskrecija natrijuma su povećane, a JGF, tubulska reapsorpcija fosfata i dužina bubrega smanjeni kod bolesnika sa BEN. Ekskrecija KIM-1 urinom nije se statistički značajno razlikovala između grupe bolesnika sa BEN i zdravih osoba.

Najveću senzitivnost i specifičnost za razlikovanje BEN od zdravih ima alfa1-mikroglobulin u urinu, dok proteinurija ima visoku specifičnost, ali manju senzitivnost. Primjenom ROC analize i univarijantne/multivarijantne logističke regresione analize je utvrđeno da su više vrijednosti alfa1-mikroglobulina i proteina u urinu i niže vrijednosti JGF pouzdani biomarkeri za razlikovanje BEN od zdravih osoba.

Napomena. Istraživanja prikazana u ovom radu finansirana su sredstvima naučnoistraživačkog projekta broj 19/6-020/961-216/10 Ministarstva za nauku i tehnologiju Republike Srpske.

Autori izjavljuju da nemaju sukob interesa.
The authors declare no conflicts of interest.

- 2008;23:3932-8.
8. Dika Ž. Evaluacija dijagnostičkih kriterija za endemsku nefropatiju. Doktorski disertacija. Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2012.
9. Ristić S, Marić V, Lukić Lj, Maksimović Z, Marić S, Kovačević M, Trifunović D, Pavlović D, Mijatović S, Đukanović Lj. Da li su opravdani sistematski pregledi stanovnika u žarištima endemske nefropatije? *Biomedicinska istraživanja* 2011;2(1):27-32.
10. Levey AS, Greene T, Kusek JW, Beck GL. A simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine. *J Am Soc Nephrol* 2000;11(suppl):A0828.
11. European best practice guidelines for the management of anaemia in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14(Suppl 5):1-50.
12. Djukanović L, Djordjević V, Ležaić V, Cukuranović R, Marić I, Bukvić D, Marinković J, Cukuranović J, Rajić M, Stefanović V. Urinary protein patterns in patients with Balkan endemic nephropathy. *Int Urol Nephrol* 2013;45(6):1661-9.
13. Stefanović V, Djukanović Lj, Cukuranović R, Bukvić D, Ležaić V, Marić I, Simić Ogrizović S, Jovanović I, Vlahović P, Pešić I, Djordjević V. Beta2-Mikroglobulin and Alpha1-Mikroglobulin as Markers of Balkan Endemic Nephropathy, a Worldwide Disease. *Ren*

- Fail 2011;33(2):176–83.
14. Dika Z, Antoine MH, Husson C, De Prez EG, Kos J, Mišić M, Fuček M, Cvorišćec D, Bourgeade MF, Nortier JL, Jelaković B. Evaluation of diagnostic criteria for endemic nephropathy. *Prilozi* 2014;35(1):47–50.
 15. Chia KS, Tan AL, Chia SE, Ong CN, Jeyaratnam J. Renal tubular function of cadmium exposed workers. *Ann Acad Med Singapore* 1992;216:756–9.
 16. Endo G, Konishi Y, Kiyota A, Horiguchi S: Urinary α 1-microglobulin in lead workers. *Bull Environ Contam Toxicol* 1993;50:744–9.
 17. 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;26:338–42.
 18. Vyssoulis GP, Tousoulis D, Antaniades C, Dimitrakopoulos S, Zervoudaki A, Stefanadis C. Alpha-1 microglobulin as new inflammatory marker in newly diagnosed hypertensive patients. *Am J Hypertens* 2007;20:1016–21.
 19. Čvorišćec D. Early diagnosis of endemic nephropathy. *Clin Chim Acta* 2000;297:85–91.
 20. Stefanovic V, Mitic-Zlatkovic M, Cukuranovic R, Miljkovic P, Pavlovic NM, Vlahovic P. B2- microglobulin in patients with Balkan nephropathy and in healthy members of their families. *Kidney Int* 1991;40(Suppl. 34):S97–S101.
 21. Stefanovic V, Cukuranovic R, Mitic-Zlatkovic M, Hall PW. Increased urinary albumin excretion in children from families with Balkan nephropathy. *Pediatr Nephrol* 2002;17:913–6.
 22. Bohle A, Mackensen-Haen S, von Gise H. Significance of tubulointerstitial changes in the renal cortex for the excretory function and concentration ability of the kidney: a morphometric contribution. *Am J Nephrol* 1987;7(6):421–33.
 23. D'Amico G, Ferrario F, Rastaldi MP. Tubulointerstitial damage in glomerular diseases: its role in the progression of renal damage. *Am J Kidney Dis* 1995;26(1):124–32.
 24. Simic Ogrizovic S. The importance of KIM-1 determination in tissue and urine of patients with different kidney diseases. *J Med Biochem* 2010;29 (4):304–9.
 25. Kovačević M. Procjena dijagnostičke vrijednosti biomarkera endemske nefropatije. Magistarska teza. Medicinski fakultet Foča, Univerzitet u Istočnom Sarajevu, 2012.
 26. Danilović V, Gorkić D, Velimirović D, Naumović T. Radioisotopic examination of endemic nephropathy. Proc of the Second International Symposium on Endemic Nephropathy, Sofia 1972. Sofia: Bulg Academ Science;1972. p. 31–3.
 27. Radonić M, Radošević Z. Clinical features of Balkan endemic nephropathy. *Food Chem Toxicol* 1992;30:189–92.
 28. Ležaić V, Marić I, Jovanović D, et al. Comparison of Kidney Size between Patients with Balkan Endemic Nephropathy and Other Kidney Disease. *Kidney Blood Press Res* 2008;31:307–12.
 29. Dimitrov P, Tsolova S, Georgieva R, et al. Clinical markers in adult offspring of families with and without Balkan endemic nephropathy. *Kidney Int* 2006;69:723–9.

Specificity and sensitivity of Balkan endemic nephropathy biomarkers

Marijana Kovačević^{1,2}, Dragana Pavlović^{1,2}, Zlatko Maksimović^{1,3}, Slobodan Marić³, Siniša Ristić¹, Ljubica Djukanović⁴

¹Faculty of Medicine Foča, University of East Sarajevo, The Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina

²University Hospital, Foča, The Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina

³Bijeljina Health Center, Bijeljina, The Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina

⁴Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Introduction. In recent years special attention has been paid to the definition of criteria for diagnosis of Balkan endemic nephropathy (BEN). The aim of this study was to examine the specificity, sensitivity and cut-off values of biomarkers used to diagnose BEN.

Methods. The study involved 105 adults allocated to two groups: (1) 60 patients with BEN (35 males, aged 48 to 82 years) and (2) 43 healthy persons (23 males, aged 23 to 78 years). All participants gave their medical history and were subjected to an objective examination, kidney ultrasound, and blood and urine samples were taken for laboratory analysis.

Results. BEN patients were significantly older, had significantly higher systolic and mean blood pressure, but lower hemoglobin levels, glomerular filtration rate (GFR) and tubular phosphate reabsorption in comparison to the healthy individuals. Urinary excretion of alpha1-microglobulin (2.56 mg/mmol creatinine vs. 0.09 mg/mmol creatinine; $p = 0.004$), albumin (6.5 mg/mmol creatinine vs. 1.87 mg/mmol creatinine; $p = 0.018$) and protein (26.7 mg/mmol creatinine vs. 11.5 mg/mmol creatinine; $p < 0.0001$) were significantly higher in BEN patients than in healthy individuals. No significant difference was found

for urinary excretion of KIM-1 between the two groups. Kidney length was significantly shorter in BEN patients than in healthy persons (97.8 mm vs.105.8 mm). Urinary alpha1-microglobulin had the highest specificity (100%) and sensitivity (81.1%) (cut-off value 1.08 mg/mmol creatinine) for differentiation between BEN patients and healthy persons. Logistic regression analysis selected proteinuria and low GFR as significant predictors of BEN.

Conclusion. Urinary alpha1-microglobulin at the cut-off value of 1.08 mg/mmol creatinine has high specificity and sensitivity and can be considered as the optimal test for differentiation between BEN patients and healthy persons.

Keywords: Balkan endemic nephropathy, biomarkers, specificity, sensitivity

Primljen – Received: 11/01/2016

Prihvaćen – Accepted: 03/03/2016