

## Sposób określania stopnia uszkodzenia nerek pojawiającego się u chorych z cukrzycą

Przedmiotem wynalazku jest sposób określania stopnia uszkodzenia nerek pojawiającego się u chorych z cukrzycą, na podstawie badania stężenia galektyny-3 w mikropęcherzykach pochodzących z moczu (UEV). Wynalazek powinien znaleźć zastosowanie w terapii, zwłaszcza w diagnostyce klinicznej powikłań cukrzycy.

Galektyna-3 (gal-3) jest białkiem o właściwościach lektyny zwierzęcej, należącym do rodziny białek wiążących anteny cukrowe  $\beta$ -galaktozydy. Cechą charakterystyczną galektyn jest to, że wszystkie posiadają charakterystyczną domenę złożoną z ok. 130 a.a. rozpoznającą cukry – CRD (ang. Carbohydrate Recognition Domaine) [1]. Obecnie zidentyfikowano 15 różnych galektyn, które sklasyfikowano do 3 grup: tandemowej (z 2 powtórzeniami CRD) do których zaliczane są galektyny -4, -6, -8, -9 i -12; prototypową (galektyna-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 i -15) z jedną domeną CRD oraz unikalną grupę chimerową posiadającą jedną domenę CRD oraz długą domenę N-końcową bogatą w prolinę i glicynę, do której zaliczana jest gal-3 [2]. Ponadto odkryto ostatnio nową grupę galektyn zwierzęcych zawierających 4 domeny CRD. Galektyna preferencyjnie wiąże glikany, które zawierają łańcuchy N-acetylogalaktozaminy. Gal-3 zbudowana jest z 2 domen: C-końcowej w obrębie której występuje sekwencja CRD oraz N-końcowej zawierającej miejsce fosforylacji (S6) [3]. Domena N-końcowa jest zbudowana z 110-130 aminokwasów, zawiera szereg homologicznych powtórzeń 9-aminokwasów (P, G, T, E), jest ona silnie konserwatywna, wykazuje znaczącą homologię do heterogennych jądrowych kompleksów rybonukleoproteinowych oraz do łańcucha kolagenu ( $\alpha 1$ ) i jest odpowiedzialna za tworzenie multimerów [4]. U ssaków, N-końcowy fragment 1-12 jest odpowiedzialny za sekrecję gal-3 i [5].

Mikropęcherzyki lub inaczej pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (ang. extracellular vesicles - EVs) to drobne, kuliste struktury błonowe o średnicy 20-1000nm, uwalniane do przestrzeni międzykomórkowej [6]. Termin odnosi się zarówno do mikropęcherzyków pączkujących bezpośrednio z błony komórkowej w trakcie cyklu życiowego komórki – ektosomy (ang. microvesicles) lub podczas programowanej śmierci komórki - pęcherzyki apoptotyczne (ang. apoptotic blebs), jak również do pęcherzyków pochodzenia wewnątrzkomórkowego - egzosomów (ang. exosomes) uwalnianych z ciałek wielopęcherzykowych (ang. multivesicular bodies) [7]. Pomimo odmiennej charakterystyki pod względem rozmiarów (egzosomy: 30-100nm, ektosomy: 100-1000nm, pęcherzyki apoptotyczne: 500-1000nm), EVs wykazują wiele cech wspólnych, jak: dwuwarstwowa błona lipidowa oraz białka i kwasy nukleinowe znajdujące się wewnątrz tych struktur [6, 8, 9]. Zawartość (ang. cargo) transportowana przez EVs, która odzwierciedla status komórki

wydzielającej, jest przekazywana do komórki docelowej - bierze czynny udział w sygnalizacji międzykomórkowej.

Wobec opisanego powyżej stanu techniki nadal istnieje zapotrzebowanie na dostarczenie sposobu pozwalającego na określanie stopnia uszkodzenia nerek pojawiającego się u chorych z cukrzycą.

Nieoczekiwanie sposób taki został uzyskany w niniejszym wynalazku.

Przedmiotem wynalazku jest sposób określania stopnia uszkodzenia nerek pojawiającego się u chorych z cukrzycą, charakteryzujący się tym, że w próbce moczu od pacjenta cierpiącego na cukrzycę określa się stężenie białka gal-3, przy czym:

- wartość stężenia białka gal-3 w moczu poniżej 11,06 ng/mL świadczy o istnieniu u tego pacjenta stopnia uszkodzenia nerek odpowiadającego umiarkowanemu lub ciężkiemu obniżeniu współczynnika przesączania kłębuszkowego eGFR poniżej 44 ml/min/1.73cm<sup>2</sup>,

- wartość stężenia białka gal-3 w moczu powyżej 11,06 ng/mL świadczy o istnieniu u tego pacjenta stopnia uszkodzenia nerek odpowiadającego umiarkowanemu, niewielkiemu lub łagodnemu obniżeniu współczynnika przesączania kłębuszkowego eGFR do wartości powyżej 44 ml/min/1.73cm<sup>2</sup>.

W korzystnej realizacji sposobu według wynalazku dodatkowo określa się stężenie białka gal-3 w mikropęcherzykach obecnych w moczu (UEV) i jego podwyższona wartość w porównaniu z obserwowaną u pacjentów zdrowych potwierdza uszkodzenie nerek. Korzystnie, mikropęcherzyki izoluje się z moczu poprzez filtrowanie metodą HFD, a następnie ultrawierowanie przy prędkości 150 000 x g przez 1.5 h w temp. 4 °C.

Korzystnie, stężenie białka gal-3 określa się ilościową metodą ELISA z wykorzystaniem przeciwciał specyficznych wobec białka gal-3.

Nieoczekiwanie, w pracach które doprowadziły do niniejszego wynalazku ustalono, że istnieje korelacja pomiędzy poziomem zawartości gal-3 w moczu pełnym oraz poziomem mikropęcherzyków zawierających gal-3, a stopniem uszkodzenia komórek nerek, zwłaszcza w wyniku cukrzycy.

Sposób według wynalazku pozwala na uzyskanie, niezależnie od stanu leczenia cukrzycy, wiarygodnego testu diagnostycznego pozwalającego na określanie stopnia uszkodzenia nerek pojawiającego się u chorych z cukrzycą.

Poniżej przedstawiono przykłady wykonania wynalazku.

Przykład 1. Określanie stopnia uszkodzenia nerek pojawiającego się u chorych z cukrzycą  
**Opis grupy badanej.** Do badania zrekrutowano 109 pacjentów z cukrzycą typu 2 oraz 7 osób zdrowych (kontrola). Od wszystkich osób została pobrana próbka pierwszego porannego moczu ze środkowego strumienia. Pacjenci zostali zrekrutowani w Katedrze Nefrologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie oraz w Klinicznym Szpitalu Wojewódzkim Nr 2 w Rzeszowie.

Pacjenci zostali podzieleni na 5 grup ze względu na stopień zaawansowania uszkodzenia nerek w przebiegu przewlekłej choroby nerek spowodowanej cukrzycą. Przewlekła choroba nerek (PChN) to wg definicji KDIGO 2012 utrzymujące się >3 mies. nieprawidłowości budowy lub czynności nerek mające znaczenie dla zdrowia. Zaawansowanie PChN określa się na podstawie wielkości GFR (kategoria G) oraz wielkości albuminurii (kategoria A) [10]. Najczęstsze przyczyny PChN to nefropatia cukrzycowa (ok. 30% w schyłkowym stadium), kłębuszkowe zapalenie nerek, nefropatia nadciśnieniowa, ostre uszkodzenie nerek, cewkowo-śródmiąższowe choroby nerek, wielotorbielowate zwyrodnienie nerek, nefropatia niedokrwienowa [11].

**Kryterium klasyfikacji stopnia uszkodzenia nerek w przebiegu PChN.** Kryterium włączenia pacjenta do danej grupy była szacunkowa wartość współczynnika przesączania kłębuszkowego eGFR (z ang. *estimated Glomerular Filtration Rate*). Współczynnik eGFR został oszacowany na podstawie wartości stężenia kreatyniny w surowicy krwi, wieku, płci oraz rasy pacjenta, a do jego wyliczenia posłużył wzór **CKD EPI** [12, 13], gdzie:

$$eGFR = 141 \cdot \min\left(\frac{Skr}{\kappa \text{ lub } 1}\right)^\alpha \cdot \max\left(\frac{Skr}{\kappa \text{ lub } 1}\right)^{-1.209} \cdot 0,993^{\text{wiek}} \cdot 1,018 [\text{kobieta}] \cdot 1,159 [\text{rasa czarna}]$$

**Skr** – stężenie kreatyniny w surowicy w jednostkach [mg/dL]

**$\kappa$**  - współczynnik, dla kobiet wynosi **0,7**, dla mężczyzn **0,9**, lub opcjonalnie wartość 1

**$\alpha$**  - współczynnik, dla kobiet wynosi **-0,329**, dla mężczyzn **-0.411**

**min** - minimalny  $\frac{Skr}{\kappa \text{ lub } 1}$

**max** – maksymalny  $\frac{Skr}{\kappa \text{ lub } 1}$

**wiek** – wiek w latach

Powyższy wzór jest lepszy od najczęściej stosowanych wariantów rekomendowanych do oceny i klasyfikacji przewlekłej niewydolności nerek, jak wzór MDRD (ang. *Modification of Diet in Renal Disease Study*), ze względu na mniejszy błąd systemowy szczególnie przy wyższych wartościach eGFR, co pozwala na rozpoznanie z większą czułością uszkodzenia nerek we wczesnym stadium, to jest stadium II [11].

Podział pacjentów na grupy ze względu na stopień uszkodzenia nerek:

Ze względu na stopień uszkodzenia nerek wyrażony na podstawie eGFR, pacjentów z cukrzycową PNCh sklasyfikowano na 5 grup [10, 14]:

- 1 powyżej 90 oraz między 60 – 89 ml/min/1.73cm<sup>2</sup>, stadium G1 - prawidłowe lub zwiększone GFR, stadium G2 - uszkodzeniem nerek z łagodnym obniżeniem eGFR, (n=79)
- 2 45 – 59 ml/min/1.73cm<sup>2</sup>, stadium G3a - uszkodzenie nerek z obniżeniem eGFR między niewielkim a umiarkowanym; (n=5)
- 3 30 – 44 ml/min/1.73cm<sup>2</sup>, stadium G3b - uszkodzenie nerek z obniżeniem eGFR między umiarkowanym a ciężkim; (n=3)
- 4 15 – 29 ml/min/1.73cm<sup>2</sup>, stadium G4 - uszkodzenie nerek z ciężkim obniżeniem eGFR (n=11),
- 5 <15 ml/min/1.73cm<sup>2</sup>, stadium G5 – niewydolność nerek krańcowa (n=11)

Za wartość graniczną poniżej której można mówić o niewydolności nerek przyjmuje się umownie 60 ml/min/1.73cm<sup>2</sup> [10,11,14]. Za wartość graniczną rozdzielającą 2 grupy chorych z umiarkowanym uszkodzeniem nerek, na 2 podgrupy z umiarkowanie średnim (stadium G3a, grupa 2) i umiarkowanie ciężkim (stadium G3b, grupa 3) uszkodzeniem nerek, przyjęto wartość **44 ml/min/1.73cm<sup>2</sup>**. Pełny obraz kliniczny PChN w zależności od kategorii GFR zawiera opracowanie „Interna. Choroby. Choroby nerek i dróg moczowych. Przewlekła choroba nerek” [11].

**Kryterium wyznaczania cut-off dla galektyny-3.** Jako graniczną wartość współczynnika eGFR do różnicowania pacjentów z PChN w powikłaniu cukrzycy przyjęto **44 ml/min/1.73cm<sup>2</sup>**. Ponieważ klinicznie grupa G3 jest bardzo heterogenna i stopień zaawansowania choroby może być zróżnicowany, co daje wyraz w etiopatologii choroby (podział na G3a i G3b) i różnym obrazie klinicznym [11,12]. Przyjmując to kryterium, pacjentów do oznaczenia stężenia **gal-3** w moczu podzielono na 2 grupy:

- A. **> 44 ml/min/1.73cm<sup>2</sup>** (grupy: 1, 2; G1,G2, G3a)
- B. **=< 44 ml/min/1.73cm<sup>2</sup>** (grupy: 3,4,5: G3b, G4, G5)

**Etyka.** Badanie posiadało wymaganą zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum (nr KBET/206/B/2013). Zgoda ważna do 31-12-2017 roku. Udział w badaniu był możliwy jedynie po wyrażeniu zgody przez pacjenta potwierdzonej własnoręcznym podpisem, a nabór do badania prowadzony był przez lekarzy specjalistów.

**Izolacja UEV z próbki moczu.** Poranny mocz ze środkowego strumienia o objętości ok. 100 mL pobrano od pacjentów z cukrzycą typu II po ich wcześniejszym włączeniu do badania. Mocz został poddany wstępnemu wirowaniu przy prędkości 2000 x g przez 30 min w temp. pokojowej (wirówka Hermle Z-300K) w celu usunięcia fragmentów komórek, bakterii oraz innych zanieczyszczeń. Po wirowaniu zlano supernatant, który został wykorzystany w

kolejnym kroku izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzących z moczu (UEV). Supernatant został poddany filtrowaniu metodą HFD (z ang. *Hydrostatic Filtration Dialysis*) w celu zagęszczenia populacji EVs. Zagęszczona populacja EVs została poddana ultrawiroowaniu przy prędkości 150 000 x g przez 1.5 h w temp. 4 °C, zaś uzyskany pelet pęcherzyków zawieszono w 60 ul wody demineralizowanej.

**Oznaczenie stężenia galektyny-3 w moczu oraz wyizolowanych pęcherzykach metodą ELISA.** Stężenie gal-3 w próbkach moczu oraz w UEV z wykorzystaniem testu Human LGALS3/ Galectin-3 ELISA Kit (Sigma Aldrich, nr kat. RAB0661), zgodnie z zaleceniami producenta.

W metodzie tej wykorzystano płytkę 96-dołkową opłaszczoną przeciwciałem dla galektyny-3. Na płytkę naniesiono standard białkowy (w różnym stężeniu w celu wykreślenia krzywej kalibracyjnej) oraz próbki wyizolowanych pęcherzyków bądź pełnego moczu. Płytkę inkubowano przez 2.5 godziny, temp. pokojowa, wytrząsanie, a następnie płytka została przepłukana 4 razy za pomocą buforu dołączonego do zestawu (Wash Buffer). W kolejnym kroku dodano przeciwciało biotynylowane i ponownie inkubowano (1 godzina, temp. pokojowa, wytrząsanie). Po inkubacji płytka została przepłukana 4 razy za pomocą Wash Buffer. Następnie nałożono streptawidynę skonjugowaną z peroksydazą chrzanową (HRP). Płytkę inkubowano przez 45 minut w temp. pokojowej z wytrząsaniem. Płytkę po inkubacji została ponownie przepłukana 4 razy. W kolejnym kroku dodany został substrat TMB (3,3',5,5'-tetrametylobenzzydina) dla enzymu HRP, dzięki któremu zachodzi reakcja barwna. Dodanie na koniec roztworu Stop Solution powoduje zahamowanie reakcji. Odczyt absorbancji został przeprowadzony przy długości fali 450 nm.

Stężenia dla poszczególnych próbek zostały wyliczane na podstawie wykreślonej krzywej kalibracyjnej.

**Analiza półilościowa białka gal-3 w UEV z moczu pacjentów metodą Western Blot.** Do oceny ilości białka gal-3 w UEV izolowanych z moczu pacjentów z cukrzycową PChNn i kontroli zastosowano metodą Western Blot. W tym celu z wyizolowanych UEV izolowano białko i oznaczano stężenia za pomocą metody BCA. Następnie wykonano rozdział elektroforetyczny białek w żelu metodą PAGE-SDS i wykonano bloty za pomocą przeciwciał: pierwszorzędowe galectin-3 antibody (kat nr. 60207-1-Ig, CloneNo.: 1C1B2; producent Prointech Germany) i drugorzędowe : HRP-conjugated (Mouse/Rabbit), w zestawie Lumi-LightPLUS Western Blotting Kit (kat. nr 12015218001, Roche).

**Analiza statystyczna.** Dla poszczególnych grup wyliczono medianę gal-3 oraz rozstęp międzykwartyłowy (Q1-Q3). Wartość *p* wyliczono za pomocą testu U-Manna-Whitneya w programie Statistica 13. Do oceny poprawności klasyfikatora jakim jest nowy biomarker galektyna-3 (gal-3), wykonano analizę krzywej ROC (ang. *Receiver Operating Characteristics*) przy użyciu narzędzi w programie Statistica 13 z nakładką do analiz medycznych. Ponadto

do analizy dobroci i trafności wybranego modelu wyznaczono pole pod krzywą ROC metodą AUC (ang. *Area Under Curve*). Wartość wskaźnika AUC przyjmuje wartości z przedziału [0,1], im większa tym lepszy model [15].

#### Wyniki:

**Stężenie białka gal-3 w moczu.** Wyniki oznaczeń i porównanie stężenia **gal-3** w moczu między poszczególnymi grupami pokazane są na Fig. 1. Przedstawiono wyniki uzyskane dla kontroli (0) oraz poszczególnych grup pacjentów z różnym stopniem uszkodzenia nerek (1-5). Kwadrat w środku box-u oznacza wartość średnią, zaś linia pozioma wartość mediany.

W Tabeli 1 podano wartości mediany, pierwszego i trzeciego kwartyła (Q1-Q3) oraz wartość **p** wyliczoną za pomocą testu U-Manna-Whitneya (grupa kontrolna została porównana z każdą z grup pacjentów).

**Tabela. 1.** Wartość mediany dla stężenia **gal-3** w moczu dla poszczególnych grup.

Grupa	0	1	2	3	4	5
<b>Mediana</b>	3,59	18,93	13,25	4,37	3,64	2,89
<b>[ng/mL]</b>	(0,25 – 4,16)	(13,85 – 25,23)	(1,97 – 27,31)	(3,18 – 11,06)	(1,93 – 5,56)	(1,71 – 5,33)
<b>p</b>	-----	<b>0,01</b>	0,37	0,38	0,53	0,76

**Ilość białka gal-3 w UEV izolowanych z moczu metoda HFD.** Ilość **gal-3** w wyizolowanych pęcherzykach z moczu przedstawiono na Fig. 2. Przedstawiono wyniki uzyskane dla grupy kontrolnej (0) oraz poszczególnych grup pacjentów z różnym stopniem uszkodzenia nerek (1-5). Kwadrat w środku box-u oznacza wartość średnią, zaś linia pozioma wartość mediany. W Tabeli 2 podano wartości mediany, pierwszego i trzeciego kwartyła (Q1-Q3) oraz wartość **p** wyliczoną za pomocą testu U-Manna-Whitneya (grupa kontrolna została porównana z każdą z grup pacjentów).

**Tabela. 2.** Wartość mediany dla stężenia **gal-3** w pęcherzykach dla poszczególnych grup.

Grupa	0	1	2	3	4	5
<b>Mediana</b>	4,46	27, 42	15,6	13,94	3,47	1,29
<b>[ng/mL]</b>	(1,79 – 4,78)	(7,49 – 29,13)	(3,97 – 21,34)	(8,89 – 23,98)	(1,09 – 6,38)	(0,56 – 2,64)
<b>p</b>	-----	0,08	0,38	0,08	0,55	0,19

**Identyfikacja gal-3 metodami półilościowymi (elektroforeza w żelu poliakrylamidowym oraz Western Blot).** Na podstawie uzyskanych wartości względnej intensywności prążka dla **gal-3** metodą Western Blot sporządzono Fig.3, na której przedstawiono wartości uzyskane dla poszczególnych grup badanych. Kwadrat w środku box-u oznacza wartość średnią, zaś linia pozioma wartość mediany.

W Tabeli 3 podano wartości mediany, pierwszego i trzeciego kwartyla oraz wartość **p** wyliczoną za pomocą testu U-Manna-Whitneya (grupa kontrolna została porównana z każdą z grup pacjentów).

**Tabela. 3.** Wartość mediany dla stężenia **gal-3** w pęcherzykach dla poszczególnych grup.

Grupa	0	1	2	3	4	5
<b>Mediana</b>	1,15	7,3	7,29	8,32	2,44	5,32
<b>[RBI]</b>	(0,98 – 1,55)	(3,64 – 10,93)	(3,55 – 8,57)	(5,6 – 11,78)	(2,56 – 3,41)	(5,58 – 6,82)
<b>p</b>	-----	<b>0,03</b>	0,05	0,05	0,05	<b>0,02</b>

**Analiza Receiver Operating Curve (ROC).** Dla wyznaczania wartości **cut-off** dla stężeń **gal-3** u pacjentów z cukrzycową PChN wykonano analizę **ROC** (patrz Tabela 4). Na podstawie analizy czułości i specyficzności wyznaczono wartość **cut-off** do różnicowania stopnia uszkodzenia nerek G3a/G3b (eGFR poniżej **44 ml/min/1.73cm<sup>2</sup>**), dla wartości stężeń **gal-3**, we wszystkich grupach pacjentów z cukrzycową PChN. Istotną wartość **p** (stopa błędu) uzyskano dla **gal-3** przy stężeniu **11,06 ng/mL**.

Tabela 4. Wyniki analizy ROC dla stężeń gal-3 w moczu pełnym u pacjentów z cukrzycową PChN.

	cut-off AUC [ng/mL]	Czułość	1-Specyficzność	Dokładność (ACC)	Ryzyko eksponowanych	Ryzyko nieeksponowanych	Stopa fałszywie poz.	Stopa fałszywie neg.	Iloraz wiarygodności	Stopa błędu	Iloraz wiarygodności
<b>Gal-3</b>	<b>11,06</b>	<b>0,960</b>	<b>0,786</b>	<b>0,214</b>	<b>0,826</b>	<b>0,571</b>	<b>0,985</b>	<b>0,214</b>	<b>0,040</b>	<b>4,480</b>	<b>0,05</b>

Wartość cut-off **11,06 ng/mL** różnicuje chorych z cukrzycowym uszkodzeniem nerek z prawidłowym lub zwiększonym eGFR, łagodnym obniżeniem i umiarkowanym obniżeniem eGFR (G1,G2 i G3a) od pacjentów z umiarkowanie ciężkim i ciężkim obniżeniem eGFR

(G3b, G4, i G5) . Wykres przebiegu krzywej **ROC** i wyznaczenia **AUC** z zaznaczoną wartością **cut-off** ilustruje Fig. 4, na której zaprezentowano wykres przebiegu krzywej ROC, do wyznaczenia wartości stężenia gal-3 dla różnicowania pacjentów z cukrzycową PChN. Wyznaczony cut-off wynosi 11,06 ng/mL przy  $p=0,05$ . W Tabeli 4 przedstawiono wartości pola pod krzywa **ROC**, wartość **AUC** z oceną dobroci testu, wartość prawdopodobieństwa **p** wyznaczono na  $p<0,000005$ .

**Tabela 4.** Wartość AUC z oceną dobroci testu

AUC	SE	AUC Dolny 95%	AUC Górny 95%	z	p
<b>0,885</b>	<b>0,031</b>	<b>0,824</b>	<b>0,947</b>	<b>12,256</b>	<b>0,0000</b>

**Wnioski:**

1. Potwierdzono obecność białka **gal-3** w UEV z moczu oraz w pełnym moczu u pacjentów we wczesnym stadium cukrzycowej PCnN.
2. Wykazano że, we wczesnym stadium cukrzycowej PChN (G1, G2, G3a) występuje wzrost stężenia białka **gal-3** w moczu pacjentów z cukrzycowa PCnN, po czym następuje spadek stężenia **gal-3** u pacjentów z umiarkowanie ciężkim i ciężkim obniżeniem eGFR (G3b, G4, i G5)
3. Wykazano, że wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania uszkodzenia nerek wg definicji i skali KDIGO 2012 stężenie białka **gal-3** w moczu pacjentów z cukrzycową PChN spada.
4. Wartość cut-off **11,06 ng/mL** różnicuje chorych z cukrzycowym uszkodzeniem nerek z prawidłowym lub zwiększonym eGFR, łagodnym obniżeniem i umiarkowanym obniżeniem eGFR (G1,G2 i G3a) od pacjentów z umiarkowanie ciężkim i ciężkim obniżeniem eGFR (G3b, G4, i G5).
5. Niskie stężenia **gal-3** w moczu u pacjentów z cukrzycową PChN i wysoka zawartość białka **gal-3** w UEV są **biomarkerami** do opracowania testu diagnostycznego do różnicowania stopnia uszkodzenia nerek w cukrzycowej PChN.

### Literatura

1. S.H. An Barondes, D.N. Cooper, M.A. Gitt, H. Leffler. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem*, 269 (1994), pp. 20807–20810
2. M. Pokrywka, A. Lityńska. Budowa i funkcje biologiczne galektyny-3. Część I. *Post Biol Kom*, 37 (2010), pp. 677-684
3. Saccon F, Gatto M, Ghirardello A, Iaccarino L, Punzi L, Doria A. Role of galectin-3 in autoimmune and non-autoimmune nephropathies. *Autoimmun Rev*. 2016 Sep 23. pii: S1568-9972(16)30218-X.
4. Wang L, Inohara H, Pienta KJ, Raz A: Galectin-3 is a nuclear matrix protein which binds RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 217: 292–303, 1995
5. Menon RP, Hughes RC: Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *Eur J Biochem* 264: 569–576, 1999
6. Théry C, Ostrowski M i Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2009 Aug; 9 (8):581-93.
7. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014; 30:255-89. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.
8. van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev*. 2012 Jul;64(3):676-705. doi: 10.1124/pr.112.005983.
9. van der Pol E, Böing AN, Gool EL, Nieuwland R. Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. *J Thromb Haemost*. 2016 Jan;14(1):48-56. doi: 10.1111/jth.13190.
10. Wiczorek-Surdacka E.: Ogólne zasady postępowania u chorych we wczesnych fazach przewlekłej choroby nerek w świetle aktualnych zaleceń KDIGO. *Med. Prakt.*, 2017; 10: 40–49
11. <https://www.mp.pl/interna/chapter/B16.II.14.2>; autorzy Michał Myśliwiec, Robert Drabczyk, aktualizacja 06-08-2018
12. [https://qxmd.com/calculate/calculator\\_251/egfr-using-ckd-epi](https://qxmd.com/calculate/calculator_251/egfr-using-ckd-epi)
13. Levey et al. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann Intern Med*. 2009;150:604-612.
14. Król E, Rutkowski B. Przewlekła choroba nerek – klasyfikacja, epidemiologia i diagnostyka. *Forum Nefrologiczne*. 2008; 1:1-6.
15. Harańczyk G. Krzywe ROC, czyli ocena jakości klasyfikatora i poszukiwanie optymalnego punktu. Statsoft. Czytelnia odcięcia. [https://media.statsoft.pl/old\\_dnn/downloads/krzywe\\_roc\\_czyli\\_ocena\\_jakosci.pdf](https://media.statsoft.pl/old_dnn/downloads/krzywe_roc_czyli_ocena_jakosci.pdf)