

杨氏模量值与BMP-7在糖尿病肾病不同分期诊断中的意义

张 靛¹, 宋 璨², 马蕾媛¹, 邵长杰¹, 于 宁^{1*}

¹青岛大学附属医院, 腹部超声科, 山东 青岛

²青岛大学附属医院, 运动医学科, 山东 青岛

Email: zl18363997941@163.com, *18661808272@163.com

收稿日期: 2021年5月17日; 录用日期: 2021年6月3日; 发布日期: 2021年6月24日

摘 要

目的: 探讨剪切波弹性成像技术所测的杨氏模量值与肾组织中BMP-7在不同分期糖尿病肾病的诊断意义。方法: 选自2018年9月至2020年10月我院糖尿病肾病患者91例, 根据尿微量白蛋白排泄率分为3组: 正常白蛋白尿组38人; 早期糖尿病肾病组29人; 临床糖尿病肾病组24人。对照组取自正常志愿者34例。采集所有受检者肾组织的收缩期峰值流速(peak systolic velocity, PSV)、舒张末期流速(end diastolic velocity, EDV)、血管阻力指数(resistance index, RI)、血管搏动指数(pulsatility index, PI)、杨氏模量值(Young's modulus, E), 将所有糖尿病肾病受检者活检所取得的肾组织制成切片, 并计算出BMP-7的含量。分析BMP-7与E值的关系。结果: 1) 与对照组相比, 糖尿病肾病组的E值差异具有统计学意义。随着糖尿病肾病的病情发展E值逐渐增高, 而BMP-7逐渐降低; 2) E与BMP-7的相关系数为-0.655; 3) 根据ROC结果提示, E值在对照组与A组比较时, $P > 0.05$, 而E与BMP-7在A/B、B/C组别时($P < 0.05$)的截断值分别为4.9、5.8和172.3、114.1。结论: BMP-7与E成明显负相关, 且在早期糖尿病肾病和临床糖尿病肾病中, BMP-7与E有很好的诊断效益。

关键词

糖尿病肾病, 肾形态发生蛋白7, 剪切波弹性成像技术, 杨氏模量值

Significance of Young's Modulus and BMP-7 in the Diagnosis of Different Stages of Diabetic Nephropathy

Liang Zhang¹, Li Song², Leiyuan Ma¹, Changjie Shao¹, Ning Yu^{1*}

¹Department of Abdominal Ultrasound, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

*通讯作者。

文章引用: 张靛, 宋璨, 马蕾媛, 邵长杰, 于宁. 杨氏模量值与BMP-7在糖尿病肾病不同分期诊断中的意义[J]. 临床医学进展, 2021, 11(6): 2781-2787. DOI: 10.12677/acm.2021.116403

²Department of Sports Medicine, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong
Email: zl18363997941@163.com, *18661808272@163.com

Received: May 17th, 2021; accepted: Jun. 3rd, 2021; published: Jun. 24th, 2021

Abstract

Objective: To explore the diagnostic significance of Young's modulus measured by shear wave elastography and BMP-7 in renal tissue in different stages of diabetic nephropathy. **Methods:** 91 patients with diabetic nephropathy were selected in our hospital from September 2018 to October 2020. According to urinary microalbumin excretion rate, they were divided into 3 groups: 38 patients in the normal albuminuria group, 29 patients in the early diabetic nephropathy group, clinical diabetic nephropathy group of 24 patients. The control group was recruited from 34 normal volunteers. Peak Systolic Velocity (PSV), End Diastolic Velocity (EDV), Resistance Index (RI), Pulsatility Index (PI), Young's modulus (E) were collected from all renal tissues of the subjects. The renal tissue from the biopsy of the subject was made into sections and the content of BMP-7 was calculated. The relationship between BMP-7 and E value was analyzed. **Results:** 1) Compared with the control group, the difference of BMP-7 and E value in diabetic nephropathy group was statistically significant. With the development of diabetic nephropathy, E value increased gradually, while BMP-7 decreased gradually; 2) The correlation coefficient between E and BMP-7 is -0.655 ; 3) According to the ROC results, when E was compared between the control group and the A group, $P > 0.05$, while in the A/B and B/C groups ($P < 0.05$), the cut-off values of E and BMP-7 were respectively 4.9, 5.8 and 172.3, 114.1. **Conclusion:** BMP-7 is negatively correlated with E, and BMP-7 and E have a good diagnostic benefit in early diabetic nephropathy and clinical diabetic nephropathy.

Keywords

Diabetic Nephropathy, Bone Morphogenetic Protein 7, Shear Wave Elastography, Young's Modulus Value

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

随着人们生活质量及生活水平的提高, 糖尿病的发病率也逐年提高, 糖尿病也引起越来越多人的注意, 当进展到晚期, 影响了大部分糖尿病患者的肾脏功能, 即肾组织的微血管发生了一系列的改变, 由糖尿病作为基础病并引起肾组织微血管改变的疾病即为糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN) [1] [2]。同其它慢性肾脏病, DN 会通过肾小球硬化及肾间质纤维化过程最终进展为肾衰竭, 影响着糖尿病患者们的预后。研究发现, 骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)也参与肾脏的发生与发展过程[3]。BMP-7 与转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)对肾脏表现为拮抗作用, TGF- β 为促纤维化因子[4], 而 BMP-7 通过抑制纤维化的进程, 对肾脏起着保护作用。剪切波弹性成像技术(shear wave elastography, SWE)通过对剪切波波速的测定, 进一步直观地得出所测组织杨氏模量值(Young's modulus, E), 杨氏模量值即为所测组织的硬度值[5] [6]。故本文采用 SWE 技术对糖尿病肾病患者的肾组织进行测量, 用 E 反应肾组织的硬度, 并将该处肾组织的 BMP-7 的表达量进行计算, 探讨 E 与糖尿病肾病患者表

达的 BMP-7 的关系, 并研究 E 与 BMP-7 对于不同分期的糖尿病肾病的诊断意义。

2. 一般资料

2.1. 研究对象

研究对象取自 2018 年 9 月至 2020 年 10 月因糖尿病肾病入住我院的患者 91 人, 其中男性 59 人, 女性 32 人, 平均年龄 56.7 ± 12.4 岁, 纳入标准: 所有研究对象均符合 1999 年由世界卫生组织认定的糖尿病肾病诊断标准; 均自愿做泌尿系统的肾脏检查, 并且行肾脏穿刺, 病理结果已归; 临床检验结果完善。排除标准: 有其他影响肾脏功能的疾病。

由于本研究需对糖尿病肾病以及对照组肾组织的 BMP-7 的含量进行探究, 故需要对实验组以及对照组进行肾穿刺, 获得病理结果后进行下一步研究。肾穿刺为有创操作, 对照组若选择正常人则不符合医学伦理学的要求, 故本研究中的对照组选自同期未患有肾脏疾病的正常志愿者 34 例, 对受检者均行超声检查, 但并未行肾穿刺操作, 故对照组的 BMP-7 的结果缺失。本研究经过医院伦理委员会审核通过, 所有受试者均获得知情同意。

根据 24 h 尿白蛋白定量将研究对象分为 A 组: 正常白蛋白尿组, 尿微量白蛋白排泄率 $< 20 \mu\text{g}/\text{min}$ 患者 38 人, 平均年龄 52.9 ± 10.3 岁; B 组: 早期糖尿病肾病组, $20 \mu\text{g}/\text{min} \leq$ 尿微量白蛋白排泄率 $\leq 200 \mu\text{g}/\text{min}$ 患者 29 人, 平均年龄 58.7 ± 13.9 岁; C 组: 临床糖尿病肾病组: 尿微量白蛋白排泄率 $> 200 \mu\text{g}/\text{min}$ 患者 24 人, 平均年龄 57.9 ± 11.4 岁。

2.2. 研究方法

2.2.1. 临床资料

将所有纳入研究的对象的年龄、糖尿病病程、BMI 以及尿微量白蛋白排泄率进行记录。

2.2.2. 超声检查方法

本研究使用的法国声科影像(SuperSonic Imagine)的超声诊断系统, 对研究对象的肾组织进行普通 B 超检查和 E 成像。探头选用凸阵 SC6-1, 设定频率为 3~5 MHz, 嘱被检查者右侧卧位于检查床, 充分暴露左腰部, 涂抹耦合剂后, 即可配合患者的呼吸进行肾脏组织的扫查, 需测量检查者的肾脏叶间动脉的收缩期峰值流速(peak systolic velocity, PSV)、舒张末期流速(end diastolic velocity, EDV)、血管阻力指数(resistance index, RI)、血管搏动指数(pulsatility index, PI)。待探头发出的声束与肾脏长轴垂直时, 打开“SWE”模式, 嘱被检查者屏气, 选取肾脏中下极为感兴趣区, 待图像稳定后, 即可测量出该区域的肾组织的杨氏模量值即 Emean, 重复三次测量后取平均值(如图 1 所示)。

2.2.3. 肾脏穿刺活检

选用 3 代穿刺枪, 型号为 18G 的穿刺针, 根据实际情况设定穿刺射程。常规超声检查后, 确定肾脏穿刺部位同超声检查的感兴趣区一致, 消毒铺巾, 在利多卡因局部麻醉下, 进针, 将取得的肾组织用石蜡固定。

2.2.4. 免疫组化因子 BMP-7 的获取方法

对切片进行 HE 及 Massion 染色, 在显微镜下观察肾组织的病理改变情况, 如肾小球硬化、肾间质纤维化等。脱水、包埋后制成 $4 \mu\text{m}$ 的石蜡切片, 采用 envision 免疫组化二步法对切片染色, 选取含有完整肾小球、肾小管的组织切片在 $\times 400$ 倍的显微镜下进行观察, 棕黄色区域即为 BMP-7 因子沉积, 采用 image pro plus 6.0 (IPP) 进行阳性面积的计算, 用平均密度值(Mean Density)表示 BMP-7 的含量。其中, 制成的切片要避免气泡与褶皱, IPP 计算出的结果需测量三次后取平均值。

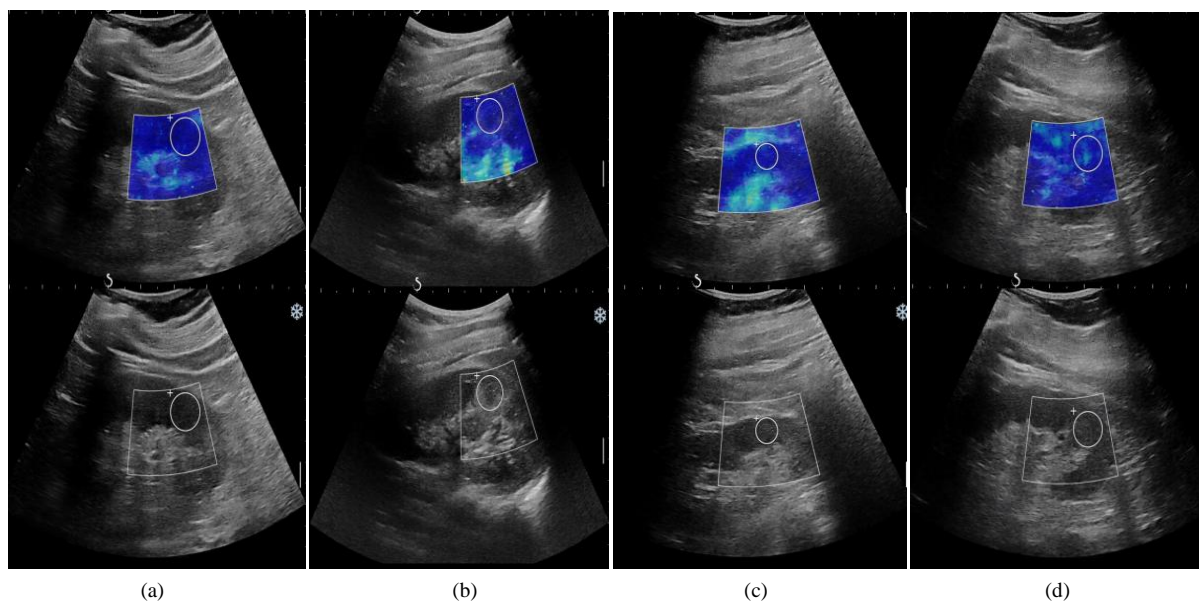


Figure 1. (a) Image of E measured in the control group; (b) Image of E measured in group A; (c) Image of E measured in group B; (d) Image when E is measured in group C

图 1. (a) 在对照组中测量 E 的图像; (b) 在 A 组中测量 E 的图像; (c) 在 B 组中测量 E 的图像; (d) 在 C 组中测量 E 的图像

2.3. 统计学方法

采用 SPSS v26 将符合正态分布的参数进行组间差异性统计学分析, 结果用中位数(上下四分位数)表示。各参数之间的相关性用 Spearman 进行分析, 用 Medcalc 绘制 E、BMP-7 的 ROC 曲线, 以上均认为 $P < 0.05$ 差异具有统计学意义。

3. 结果

3.1. 临床资料统计结果

将四组对象的年龄、病程、BMI、BMP-7、E_{mean}、UAER、PSV、EDV、RI、PI 数据进行统计, 具体数据见表 1。

Table 1. Baseline data of client

表 1. 受检者的基线资料

指标	对照组	A 组	B 组	C 组	t 值	P
例数	34	38	29	24		
年龄(岁)	51.00 (41.75, 56.25)	52.00 (46.75, 60.50)	57.00 (51.00, 73.00) [#]	56.50 (51.00, 67.50)	1.041	0.430
病程(年)	-	6 (4, 8)	6 (4, 7.5)	7 (5, 9) [§]	1.213	0.284
BMI	24.30 (22.70, 25.65)	24.00 (22.78, 24.73)	23.80 (22.65, 25.50)	23.75 (22.53, 24.68)	0.471	0.995
BMP-7	-	224.75 (191.80, 311.15)	151.40 (132.25, 168.20) [#]	101.50 (88.88, 111.45) [§]	2.567	0.001
E _{mean} (kpa)	4.05 (3.775, 4.400)	4.20 (3.80, 4.63)	5.40 (4.55, 5.80) [#]	6.55 (5.45, 7.00) [§]	4.233	0.000
UAER ($\mu\text{g}/\text{min}$)	9.00 (8.60, 9.45)	13.00 (12.25, 14.35)	184.5 (178.7, 192.6) [#]	242.6 (219.8, 345.9) [§]	47.736	0.000
PSV (cm/s)	25.265 (24.005, 27.558)	27.025 (23.402, 28.063)	21.06 (19.33, 22.97) [#]	21.61 (20.44, 22.40)	1.809	0.088
EDV (cm/s)	12.52 (12.02, 13.36)	10.39 (9.6, 11.04) [*]	9.01 (8.41, 9.33) [#]	8.99 (8.52, 9.22)	2.574	0.008

Continued

RI	0.69 (0.65, 0.72)	0.70 (0.65, 0.75)	0.72 (0.70, 0.77) [#]	0.79 (0.76, 0.82) ^{\$}	3.738	0.000
PI	1.225 (1.188, 1.273)	1.535 (1.401, 1.613) [*]	1.68 (1.66, 1.71) [#]	1.67 (1.64, 1.69)	5.558	0.000

题注: *代表 A 组与对照组比较差异具有统计学意义; #代表 A 组与 B 组比较差异具有统计学意义; \$代表 B 组与 C 组比较差异具有统计学意义。

3.2. 相关性统计结果

E 与 BMP-7 的相关系数为-0.655, 此时 $P < 0.05$ (双尾), 表示 E 与 BMP-7 为负相关, 且相关性强(如图 2 所示)。

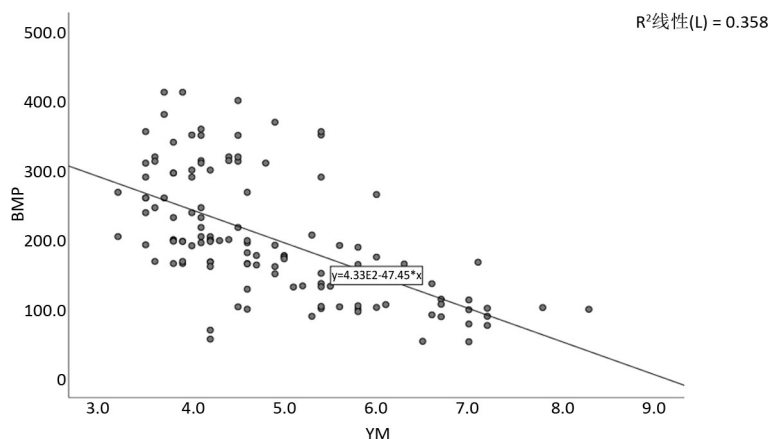


Figure 2. Curve: the correlation graph of E and BMP-7

图 2. E 与 BMP-7 的相关性探究图像

3.3. 受试者工作曲线结果

绘制对照组与 A 组的 E 值 ROC 曲线(如图 3 所示), 以及 A 组与 B 组、B 组与 C 组的 E、BMP-7 的 ROC 曲线如图所示, 并将结果记录, 结果提示, E 值对照组与 A 组 ROC 曲线结果 $P > 0.05$, 如表 2 所示。

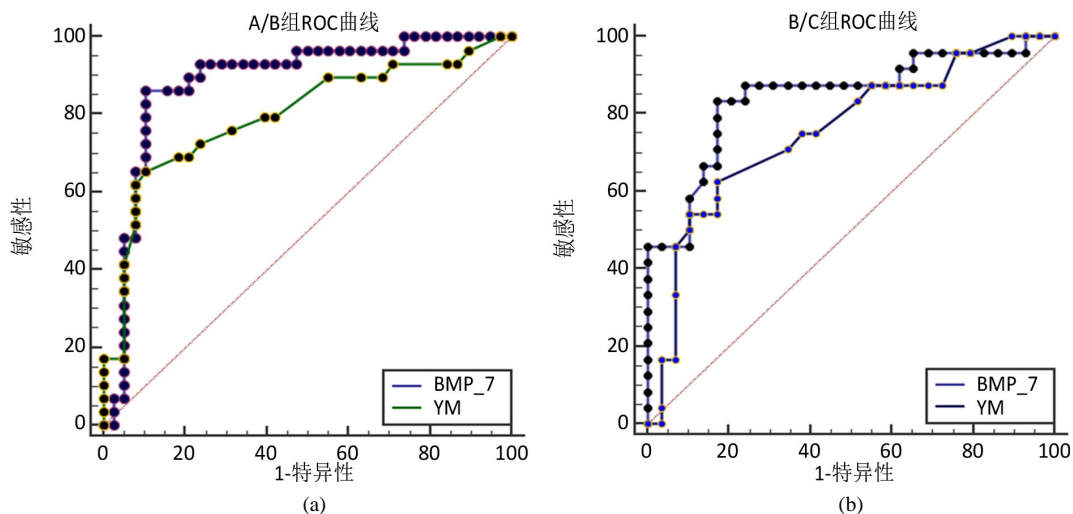


Figure 3. (a) ROC curve of E and BMP-7 in normal albuminuria group and early diabetic nephropathy group; (b) ROC curves of E and BMP-7 in the early diabetic nephropathy group and the clinical diabetic nephropathy group

图 3. (a) 在正常白蛋白尿组与早期糖尿病肾病组中 E 与 BMP-7 的 ROC 曲线; (b) 在早期糖尿病肾病组与临床糖尿病肾病组中 E 与 BMP-7 的 ROC 曲线

Table 2. Diagnostic efficacy of E and BMP-7 in diabetic nephropathy
表 2. E 与 BMP-7 对于糖尿病肾病的诊断效能

参数		AUC	标准误	P 值	敏感度	阈值	特异度	+LR	-LR	约登指数
E	对照/A 组	0.60	0.07	0.1355	55.26	4.1	67.65	1.71	0.66	0.23
	A 组/B 组	0.80	0.06	<0.0001*	65.52	4.9	89.47	6.22	0.39	0.55
	B 组/C 组	0.76	0.07	0.0002*	62.50	5.8	82.76	1.59	0.28	0.45
BMP-7	A 组/B 组	0.88	0.05	<0.0001*	86.21	172.3	89.47	8.19	0.15	0.76
	B 组/C 组	0.85	0.06	<0.0001*	83.33	114.1	82.76	4.83	0.20	0.66

*差异具有统计学意义, $P < 0.05$ 。

4. 讨论

肾功能持续下降是糖尿病导致肾病发生发展的主要原因, 这一过程伴有进行性肾间质损伤和肾纤维化等病理改变[7] [8]。研究表明, 骨形态发生蛋白-7 (BMP-7)可有效预防肾纤维化, 是可用于辅助评估糖尿病肾病肾纤维化的有效标志物[9] [10]。新兴的 SWE 技术应用于越来越多疾病的研究中[11] [12], 本研究旨在探究 E 是否能作为评估糖尿病肾病疾病进展程度的指标, 并对 E 与 BMP-7 的相关性进一步探讨。

根据免疫组化结果可知 BMP-7 主要沉积在近端小管和足细胞中。统计结果显示实验组中的 BMP-7 的表达含量随着病变严重而减少。出现此结果的原因可能与 BMP-7 拮抗转化生长因子的促纤维化过程密切相关。BMP-7 通过增强基质转化而具有抗纤维化作用, 以及逆转糖尿病引起的肾肥大, 使肾小球滤过率、尿白蛋白排泄和肾小球组织学恢复正常, 从而改善肾功能[13] [14] [15]。故具有保护机制的 BMP-7 随着病情进展呈减低趋势。

研究结果提示正常白蛋白尿组患者的 E 与对照组的 E 差异无统计学意义($P > 0.05$), 可能因肾脏组织的病理改变并未达到临床可检测出的标准。与 Betz [16]、Samir [17]的统计结果一致, E 随着肾组组病变的发展而增加, 且 E 与 BMP-7 的相关性具有统计学意义($P < 0.05$), 呈负相关。原因可能为随着肾组织的进一步损伤, 促纤维化因子逐渐增加, 作为拮抗纤维化因子的 BMP-7 逐渐减少, 导致肾组织纤维化程度也逐渐增加, 肾组织的弹性降低, 反之硬度升高, 由于 E 的检出与被测组织的硬度相关, 故此时 E 逐渐增加[18]。

ROC 的结果表明, 在预测 E 对照组与正常白蛋白尿组的截断值时不具有统计学意义, 可能因为正常白蛋白尿组肾组织并未明显受损, 对于 E 的变化检出并不是很敏感。但是在早期白蛋白尿、临床白蛋白尿的预测中, E、BMP-7 的截断值分别为 4.9 kPa、5.8 kPa 和 172.3、114.1, 这对临床检验具有提示性作用。通过 ROC 曲线结果可知, 在预测早期白蛋白尿、临床白蛋白尿中, E、BMP-7 的曲线下面积(AUC)分别为 0.80、0.76 和 0.88、0.85, 说明在糖尿病肾病的进程中, BMP-7 较 E 值有更高的预测效益。产生这种结果的原因可能是 BMP-7 的减少可导致肾组织病变, 而肾组织病变是导致 E 值的改变的原因, 故 BMP-7 在诊断早期白蛋白尿、临床白蛋白尿具有更确切的意义, E 值的诊断效能虽然不如 BMP-7, 但可以在临床中以一种非侵入性的手段对疾病进行预测。

肾活检是诊断肾组织病变[19]的金标准。然而, 操作过程繁琐, 不仅需要麻醉并且会引起一些并发症。且肾活检最常见的并发症是出血。因此, 在临床实践中, 尤其是在糖尿病肾病的终末期等高危患者中, 这种方法并不适用。故本研究对于 SWE 的应用进行了探究, 发现 SWE 技术可用于评估肾实质硬度, 且与糖尿病肾病患者的肾功能损害程度相关。本研究的局限性较多, 需更多学者的研究, 对 SWE 技术的优势进一步证实。

参考文献

- [1] Tuttle, K.R., Bakris, G.L., Bilous, R.W., Chiang, J.L., de Boer, I.H., Goldstein-Fuchs, J., *et al.* (2014) Diabetic Kidney Disease: A Report from an ADA Consensus Conference. *Diabetes Care*, **37**, 2864-2883. <https://doi.org/10.2337/dc14-1296>
- [2] Zhang, L., Long, J., Jiang, W., Shi, Y., He, X., Zhou, Z., *et al.* (2016) Trends in Chronic Kidney Disease in China. *The New England Journal of Medicine*, **375**, 905-906. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1602469>
- [3] Ooxterhuis, N.R., Bongartz, L.G., Verhaar, M.C., Cheng, C., Xu, Y.J., van Koppen, A., *et al.* (2017) Targeting Multiple Pathways Reduces Renal and Cardiac Fibrosis in Rats with Subtotal Nephrectomy Followed by Coronary Ligation. *Acta Physiologica*, **220**, 382-393. <https://doi.org/10.1111/apha.12829>
- [4] Wang, B., Komers, R., Carew, R., Winbanks, C.E., Xu, B., Herman-Edelstein, M., *et al.* (2012) Suppression of MicroRNA-29 Expression by TGF- β 1 Promotes Collagen Expression and Renal Fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, **23**, 252-265. <https://doi.org/10.1681/ASN.2011010055>
- [5] Greening, J. and Dilley, A. (2017) Posture-Induced Changes in Peripheral Nerve Stiffness Measured by Ultrasound Shear Wave Elastography. *Muscle & Nerve*, **55**, 213-222. <https://doi.org/10.1002/mus.25245>
- [6] Mansour, N., Hofauer, B. and Knopf, A. (2017) Ultrasound Elastography in Diffuse and Focal Parotid Gland Lesions. *ORL: Journal for Otorhinolaryngology and Its Related Specialties*, **79**, 54-64. <https://doi.org/10.1159/000455727>
- [7] Kang, H.M., Ahn, S.H., Choi, P., Ko, Y.-A., Han, S.H., Chinga, F., *et al.* (2015) Defective Fatty Acid Oxidation in Renal Tubular Epithelial Cells Has a Key Role in Kidney Fibrosis Development. *Nature Medicine*, **21**, 37-46. <https://doi.org/10.1038/nm.3762>
- [8] Sun, H.J. (2019) Current Opinion for Hypertension in Renal Fibrosis. In: Liu, B.C., Lan, H.Y. and Lv, L.L., Eds., *Renal Fibrosis: Mechanisms and Therapies*, Vol. 1165, Springer, Singapore, 37-47. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8871-2_3
- [9] Ikeda, Y., Jung, Y.O., Kim, H., Oda, T., López-Guisa, J., Maruvada, R., *et al.* (2004) Exogenous Bone Morphogenetic Protein-7 Fails to Attenuate Renal Fibrosis in Rats with Overload Proteinuria. *Nephron Experimental Nephrology*, **97**, e123-e135. <https://doi.org/10.1159/000079177>
- [10] Ohigashi, M., Imai, N., Toba, H., Kobara, M. and Nakata, T. (2016) Pitavastatin Exhibits Protective Effects on Podocytes Accompanied by BMP-7 Up-Regulation and Rho Suppression. *Pharmacology*, **97**, 265-276. <https://doi.org/10.1159/000444397>
- [11] Sigrist, R.M.S., Joy, L., El Kaffas, A., Chammas, M.C. and Willmann, J.K. (2017) Ultrasound Elastography: Review of Techniques and Clinical Applications. *Theranostics*, **7**, 1303-1329. <https://doi.org/10.7150/thno.18650>
- [12] Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J.E., Charlton, M., Cusi, K., Rinella, M., *et al.* (2018) The Diagnosis and Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*, **67**, 328-357. <https://doi.org/10.1002/hep.29367>
- [13] Li, G., Li, Y., Liu, S., Shi, Y., Chi, Y., Liu, G., *et al.* (2013) Gremlin Aggravates Hyperglycemia-Induced Podocyte Injury by a TGF- β /Smad Dependent Signaling Pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*, **114**, 2101-2113. <https://doi.org/10.1002/jcb.24559>
- [14] Leeuwis, J.W., Nguyen, T.Q., Dendooven, A., Kok, R.J. and Goldschmeding, R. (2010) Targeting Podocyte-Associated Diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **62**, 1325-1336. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.08.012>
- [15] Qiao, X., Li, R.S., Li, H., Zhu, G.-Z., Huang, X.-G., Shao, S., *et al.* (2013) Intermedin Protects against Renal Ischemia-Perfusion Injury by Inhibition of Oxidative Stress. *American Journal of Physiology*, **304**, 112-119. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00054.2012>
- [16] Betz, B.B., Jenks, S.J., Cronshaw, A.D., Lamont, D.J., Cairns, C., Manning, J.R., *et al.* (2016) 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*, **89**, 1125-1135. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.01.015>
- [17] Samir, A.E., Allegretti, A.S., Zhu, Q., Dhyani, M., Anvari, A., Sullivan, D.A., *et al.* (2015) Shear Wave Elastography in Chronic Kidney Disease: A Pilot Experience in Native Kidneys. *BMC Nephrology*, **16**, Article No. 119. <https://doi.org/10.1186/s12882-015-0120-7>
- [18] Narmada, F., Shalini, W., Roshan, N., Rodrigo, C., Karunanayake, L., de Silva, H.J., *et al.* (2016) Protein Carbonyl as a Biomarker of Oxidative Stress in Severe Leptospirosis, and Its Usefulness in Differentiating Leptospirosis from Dengue Infections. *PLoS ONE*, **11**, e0156085. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156085>
- [19] Fiorentino, M., Bolignano, D., Tesar, V., Pisano, A., Van Biesen, W., D'Arrigo, G., *et al.* (2016) Renal Biopsy in 2015: From Epidemiology to Evidence-Based Indications. *American Journal of Nephrology*, **43**, 1-19. <https://doi.org/10.1159/000444026>