



UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
STUDIJE KLINIČKE MEDICINE

**ISPITIVANJE ODNOSA ENDOTELINA-1 I FUNKCIONOG
STATUSA BUBREGA KOD BOLESNIKA SA TIPOM 2 ŠEĆERNE
BOLESTI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Prof. dr Zoran Stošić

Kandidat: Mr sci med. dr Radmila Žeravica

Novi Sad, 2015 godine

UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl.,mag.,dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Radmila Žeravica
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Zoran Stošić
Naslov rada: NR	Ispitivanje odnosa endotelina-1 i funkcionog statusa bubrega kod bolesnika sa tipom 2 šećerne bolesti
Jezik publikacije: JP	Srpski jezik (latinica)
Jezik izvoda: JI	Srpski / Engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2015. godina
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad
Fizički opis rada: FO	10 poglavlja, 165 strana, 13 slika, 30 grafikona, 17 tabela i 420 nevedenih referenci
Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Patofiziologija bubrežnih bolesti
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Šećerna bolest tip 2; Dijabetesna nefropatija; Endotelin-1; Jačina glomerulske filtracije; Bubrežna insuficijencija
UDK	616.61:616.379-008.64]-092

Čuva se: ČU	Biblioteka Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Srbija
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>Endotelin-1 je najpotentniji vazokontstriktorni peptid koji značajno doprinosi funkcionalnim i strukturnim bubrežnim promenama i poslednjih godina se izdvojio kao značajan faktor u razvoju i progresiji dijabetesne nefropatije. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti nivo plazmatskog endotelina-1 kod bolesnika sa tipom 2 šećerne bolesti u odnosu na zdravu populaciju kao i ispitati odnos plazmatskog endotelina-1 i funkcionog statusa bubrega kod bolesnika sa šećernom bolesti tip 2 i dijabetesnom nefropatijom. U istraživanje je uključeno sto dvadeset ispitanika sa tipom 2 dijabetesa i sekundarno inzulin zavisni, koji su podeljeni u dve grupe u odnosu na izmerenu jačinu glomerulske filtracije: Grupa I (n=60) ispitanici sa jačinom glomerulske filtracije većom od 60 ml/min/1.73m² i grupa II (n=60) ispitanici sa jačinom glomerulske filtracije manjom od 60 ml/min/1.73m². Kod svih ispitanika izmerena je plazmatska vrednost endotelina-1 i izvršena procena funkcionog statusa bubrega merenjem jačine glomerulske filtracije, efektivnog bubrežnog protoka plazme i ostalih parametara bubrežne funkcije: serumske koncentracije cistatina C, uree, kreatinina, mokraćne kiseline kao i određivanje 24h albuminurije i proteinurije. Dobijeni rezultati upoređivani su sa rezultatima kontrolne grupe ispitanika (n= 30). Postoji statistički značajna razlika u medijanama vrednosti endotelina-1 između ispitivanih grupa (p<0.001). Značajno niže vrednosti plazmatske koncentracije endotelina-1 su imali ispitanici kontrolne grupe (0.80 ±0.3) u odnosu na ispitanike sa šećernom bolesti i JGF >60 ml/min (1.4±0.4) kao i u odnosu na dijabetesne bolesnike sa JGF <60 ml/min (2.5 ±0.8). Značajno više vrednosti endotelina-1 su imali bolesnici sa šećernom bolesti i većim stepenom redukcije jačine glomerulske filtracije u odnosu na bolesnike sa manjim stepenom redukcije jačine glomerulske filtracije (p<0.001). U grupi bolesnika sa tipom 2 šećerne bolesti postoji statistički značajna inverzna korelacija između plazmatskog nivoa endotelina-1 i izmerene vrednosti jačine glomerulske filtracije i efektivnog bubrežnog protoka plazme (r= - 0,75; p=0,000; r= - 0,74; p=0,000) odnosno bolesnici sa šećernom bolesti kod kojih postoje povišene vrednosti plazmatskog endotelina-1 imaju veći stepen redukcije jačine glomerulske filtracije i efektivnog bubrežnog protoka plazme. Kod bolesnika sa tipom 2 dijabetes melitusa i različitim stepenom bubrežne hipofunkcije endotelin-1 u značajnoj meri utiče na vrednosti jačine glomerulske filtracije i efektivnog bubrežnog protoka plazme ali i druge funkcijske parametre bubrega i samim tim može imati važnu ulogu u nastanku i razvoju dijabetesne nefropatije.</p>

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	17.7.2013. godine
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	predsednik: član: član: član: član:

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF MEDICINE
KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Radmila Žeravica
Mentor: MN	Zoran Stošić MD,PhD
Title: TI	Investigation of the relationship between endothelin - 1 and the functional status of the kidneys in patients with type 2 diabetes
Language of text: LT	Serbian/Latin
Language of abstract: LA	Serbian / English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2015.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Physical description: PD	chapters 10, pages 165, pictures 13, graphs 30, tables 17 and 420 references
Scientific field	Medicine
Scientific discipline	Pathophysiology of kidney disease
Subject, Key words SKW	Diabetes Mellitus, Type 2; Diabetic Nephropathies; Endothelin-1; Glomerular Filtration Rate; Renal
UC	

Holding data: HD	Library of Medical Faculty Novi Sad, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Serbia
Note: N	
Abstract: AB	<p>Endothelin-1, potent vasoconstrictor peptide may contribute to the functional and structural renal changes and in recent years emerged as a significant factor in the development and progression of diabetic nephropathy. The aim of this study was to determine the level of plasma endothelin-1 levels in patients with type 2 diabetes and compared to healthy population as well as to examine the relationship of plasma endothelin-1 and the functional status of the kidneys in patients with type 2 diabetes . The study included one hundred and twenty patients with type 2 diabetes and insulin-dependent secondary, which are divided into two groups with respect to the measured GFR: Group I (n = 60) subjects with by glomerular filtration rate greater than 60 ml / min / 1.73 m² and group II (n = 60) subjects with by glomerular filtration rate of less than 60 ml / min / 1.73m² . Plasma levels of endothelin-1, glomerular filtration rate and effective renal plasma flow were determined using appropriate methods in all subjects. Other renal function parameters such as serum concentrations of cystatin C, urea, creatinine, uric acid, 24h albuminuria and proteinuria were measured additionally. The results were compared with control groups of subjects (n = 30). There was a statistically significant difference in median values of endothelin-1 between the groups (p <0.001). Significantly lower plasma concentrations of endothelin-1 had control subjects (0.80 ± 0.3) compared to subjects with diabetes and GFR > 60 ml / min (1.4 ± 0.4) and in relation to diabetic patients with GFR <60 ml / min (2.5 ± 0.8). Significantly higher values of endothelin-1 had patients with diabetes and a higher degree of reduction of glomerular filtration rate compared with patients with a lower degree of reduction of glomerular filtration rate (p <0.001). In the group of patients with type 2 diabetes, there was a statistically significant inverse correlation between plasma levels enbdotelina-1 and the measured values of glomerular filtration rate and effective renal plasma flow (r = - 0.75; p = 0.000; r = - 0.74; p = 0.000) and patients with diabetes who have the higher values of plasma endothelin-1 have a higher degree of reduction of glomerular filtration rate and effective renal plasma flow. In patients with type 2 diabetes mellitus and various degrees of renal hypofunction endothelin-1 significantly affects the value of the glomerular filtration rate and effective renal plasma flow or other parameters of renal function and thus can play an important role in the development of diabetic nephropathy.</p>

Accepted on Scientific Board on: AS	17.7.2013.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	president: member: member: member: member:

SADRŽAJ:

UVOD	11
1. DIJABETES MELITUS I BUBREŽNA FUNKCIJA	13
1.1. Faktori rizika za nastanak dijabetesne nefropatije	16
1.1.1. Hiperglikemija	16
1.1.2. Hipertenzija	17
1.1.3. Dislipidemija	18
1.1.4. Hiperproteinska ishrana	18
1.1.5. Pušenje	19
1.1.6. Starost	19
1.1.7. Genetski faktori -porodično opterećenje i etnička pripadnost	19
1.2. Uloga hemodinamskih faktora u razvoju dijabetesne nefropatije	20
1.3. Uloga hiperglikemije u razvoju dijabetesne nefropatije	22
1.4. Uloga vazoktivnih faktora u rzvoju dijabetesne nefropatije	26
1.4.1. Renin-angiotenzin-aldosteron sistem	26
1.4.2. Endotelin	27
1.4.3. Azot monoksid sistem	28
1.4.4. Prostaglandini	30
1.5. Uloga faktora rasta u razvoju dijabetesne nefropatije	31
1.5.1. Transformišući faktor rasta - β 1	31
1.5.2. Vezivno-tkivni faktor rasta	32
1.5.3. Faktor rasta trombocitnog porekla	32
1.5.4. Hepatocitni faktor rasta i koštani morfogenički protein-7	33

1.5.5. Inzulinu sličan faktor rasta	33
1.5.6. Vaskularni endotelni faktor rasta	34
1.5.7. Prorenin	34
1.6. Hipoksija, oksidativni stres i inflamacija u dijabetesnoj nefropatiji	35
1.6.1. Hipoksija	35
1.6.2. Oksidativni stres	35
1.6.3. Inflamacija	36
1.7. Strukturne promene u dijabetesnoj nefropatiji	38
1.7.1. Podociti i dijabetesna nefropatija	39
1.7.2. Tubulointersticijalna fibroza u dijabetesnoj nefropatiji, endotelna i epitelna mezenhimalna transformacija	41
1.8. Značaj genetskih faktora u razvoju dijabetesne nefropatije	44
2. FAZE RAZVOJA DIJABETESNE NEFROPATIJE	49
3. FUNKCIJSKO ISPITIVANJE BUBREGA U DIJABETESU	51
3.1. Merenje albuminurije/proteinurije	52
3.2. Merenje/izračunavanje jačine glomerulske filtracije	54
3.3. Određivanje ukupnog efektivnog bubrežnog protoka plazme	58
4. PREVENCIJA DIJABETESNE NEFROPATIJE	59
5. ENDOTELINSKI SISTEM	63
5.1. Endotelinski sistem bubrega	65
5.1.1. Dejstvo endotelina-1 na bubrežnu hemodinamiku	66
5.1.2. Dejstvo endotelina-1 na glomerule i tubulski sistem	68
5.2. Uloga endotelina-1 u razvoju dijabetesne nefropatije	70

6. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I RADNA HIPOTEZA	72
7. MATERIJAL I METODE	73
7.1. Ispitanici	73
7.2. Metode istraživanja	74
7.2.1. Opšti podaci	74
7.2.2. Procena funkcionog statusa bubrega	75
7.2.2.1. Određivanje jačine glomerulske filtracije	75
7.2.2.2. Određivanje ukupnog efektivnog bubrežnog protoka plazme	75
7.2.2.3. Određivanje frakcije filtracije	76
7.2.2.4. Određivanje serumske koncentracije kreatinina	76
7.2.2.5. Serumska koncentracija uree	77
7.2.2.6. Serumska koncentracija mokraćne kiseline	78
7.2.2.7. Serumska koncentracija cistatina C	78
7.2.2.8. Određivanje urinarne ekskrecije albumina –albuminurija	78
7.2.2.9. Određivanje proteinurije	79
7.2.3. Određivanje endotelina-1 u krvi	79
7.2.4. Procena stanja glikoregulacije	79
7.2.4.1. Glikemija	79
7.2.4.2. HbA1c	80
7.2.5. Procena lipoproteinskog statusa	80
7.2.6. Procena stanja uhranjenosti	81
7.2.7. Određivanje inflamatornih markera, elektrolitskog statusa, ukupnih proteina i jetrenih enzima	82

7.2.7.1. Serumska koncentracija C-reaktivnog proteina	82
7.2.7.2. Plazmatska koncentracija fibrinogena	82
7.2.7.3. Serumska koncentracija ukupnih proteina	82
7.2.7.4. Serumska koncentracija GGT	83
7.2.7.5. Elektrolitski status	83
7.3. STATISTIČKE METODE	84
8. REZULTATI	85
8.1. Opšte karakteristike ispitivanih grupa	86
8.1.1. Starosna i polna struktura	86
8.1.2. Dužina trajanja šećerne bolesti i inzulinske terapije	89
8.1.3. Parametri glikemijske kontrole	90
8.1.4. Stanje uhranjenost	92
8.1.5. Hipertenzija	93
8.1.6. Parametri lipoproteinskog statusa	95
8.1.7. Parametri inflamacije, elektrolitskog statusa, ukupnih proteina i jetrenih	96
8.2. REZULTATI ISPITIVANJA FUNKCIONOG STATUSA BUBREGA	98
8.3. ENDOTELIN-1	106
8.4. REZULTATI KORELACIJE ENDOTELINA-1 SA FUNKCIONIM STATUSOM BUBREGA	109
9. DISKUSIJA	115
10. ZAKLJUČCI	125
LITERATURA	127

UVOD

Danas u svetu od šećerne bolesti boluje približno 366 miliona ljudi, od kojih je 90% sa tipom 2 ove bolesti. Svetska zdravstvena organizacija i Međunarodna federacija za dijabetes procenjuju da će se broj obolelih od šećerne bolesti do 2030. godine povećati na 552 miliona, sa najvećom stopom u razvijenim zemljama, pri čemu se najveći porast broja obolelih očekuje i u zemljama u razvoju, gde spada i naša zemlja (1). Dijabetes tip 2 je najčešći tip dijabetesa, i u Srbiji je u 2011. godini dijagnostikovano 15.404 novoobolelih osoba svih uzrasta. Jedna od njenih najtežih hroničnih komplikacija je svakako dijabetesna nefropatija (2, 3).

Dijabetesna nefropatija (DN) je mikrovaskularna komplikacija insulin zavisnog i insulin nezavisnog dijabetesa, koju odlikuje prisustvo perzistentne proteinurije uz istovremenu retinopatiju i hipertenziju, ali bez infekcije mokraćnih puteva, drugih oboljenja bubrega ili srčane insuficijencije (1). DN, posebno u tipu 2 dijabetes melitusa, postala je devedesetih godina prošlog veka veoma ozbiljan zdravstveni, ali i ekonomski problem razvijenih zemalja. Dramatičan porast broja bolesnika sa dijabetesnom nefropatijom u terminalnoj insuficijenciji bubrega postavio je ovu bolest na prvo mesto među uzrocima terminalne insuficijencije bubrega u Zapadnoj Evropi i SAD (2, 3, 4). U našoj zemlji se porast broja stanovnika sa dijabetesom na dijalizi beleži u prvoj deceniji ovog veka (5). DN se karakteriše, takođe, i višestruko povećanim rizikom za razvoj kardiovaskularnog mortaliteta (6). Oko 2/3 pacijenata sa manifestnom DN umire od kardiovaskularnih bolesti i pre nego što bubrežna bolest progredira do terminalnog stadijuma bubrežne insuficijencije, a mortalitet ovih pacijenata je 5–8 puta veći nego u opštoj populaciji (7, 8, 9).

Patogeneza DN vrlo je složena, a posledica je međudelovanja brojnih hemodinamskih i metaboličkih faktora. Danas su poznati hemodinamski faktori koji doprinose razvoju DN kao što su sistemska i intraglomerularna hipertenzija, kao i aktivacija vazoaktivnih sistema uključujući renin-angiotenzinski sistem (RAS) i endotelinski sistem (ES) (11). Sa druge strane, povećana koncentracija glukoze dovodi do povećanja oksidativnog stresa, kao i aktiviranja alternativnih metaboličkih puteva sa stvaranjem poliola (14) i završnih produkata glikozilacije (AGE) (15). Sve ove promene dovode do posledične povećane bubrežne

permeabilnosti za proteine, kao i do akumulacije ekstraćelijskog matriksa, što dovodi do proteinurije, glomeruloskleroze i tubulointersticijske fibroze (16, 17, 18).

Među faktorima koji igraju značajnu ulogu u razvoju i progresiji DN, izdvojio se poslednjih godina i endotelin-1 (ET-1). Blokatori receptora endotelina se danas spominju kao potencijalna terapijska opcija, čije je delovanje zasnovano na fiziološkom i patofiziološkom efektu endotelina (19). Pre otprilike dvadeset godina prvi put je detaljno opisan ES sa svojim ligandima i receptorima, te njihova uloga u regulacijskim fiziološkim procesima (20). U međuvremenu su objavljene studije u kojima se opisuje uticaj ES u patofiziologiji arterijske hipertenzije i hronične bubrežne bolesti kao što je dijabetesna nefropatija. Tokom istraživanja prepoznati su patofiziološki procesi u kojima učestvuje ES, a sastoje se od mehanizama vazokonstrikcije, povećanja permeabilnosti krvnih sudova, te inflamatornih i oksidativnih efekata endotelina (21). Postavljanjem hipotetskog modela smanjivanja nepovoljnih efekata ES preko blokade njihovih receptora, došlo je do istraživanja antagonista endotelinskih receptora (ER) (22). Međutim, dosadašnja klinička ispitivanja kod pacijenata sa hipertenzijom i dijabetesnom nefropatijom, dala su različite rezultate, koji su zavisili od stadijuma bolesti i upotrebljenog leka. Takođe je značajan proces interakcije endotelinskog sistema sa drugim vazoaktivnim sistemima, kao što je RAS i azot-oksidi (NO) sistem, što je i danas predmet intenzivnih istraživanja (23, 24, 25). Otuda je od velikog naučnog i kliničkog značaja ispitivanje odnosa endotelinskog sistema i hemodinamski zavisnih funkcijskih parametara bubrega kod bolesnika sa DN, jer definitivna saznanja o mogućim patogenetskim mehanizmima koji su uključeni u progresiju DN još uvek u potpunosti nisu rasvetljena. Stoga targetiranje ET-1 kao značajnog faktora u razvoju i progresiji DN može unaprediti terapijske opcije u prevenciji progresije DN, redukovati morbiditet i mortalitet, i shodno tome redukovati troškove lečenja.

1. DIJABETES MELITUS I BUBREŽNA FUNKCIJA

Dijabetes (diabetes mellitus, šećerna bolest), predstavlja heterogenu grupu metaboličkih bolesti koju karakteriše hiperglikemija kao posledica defekta u sekreciji insulina, insulinskoj aktivnosti ili u obe ove funkcije. Dijabetes melitus je jedno od najčešćih hroničnih nezaraznih oboljenja i predstavlja veliki javno-zdravstveni problem (26). U osnovi patogeneze tipa 2 dijabetesa melitusa, koji se najviše javlja kod gojaznih osoba jeste nasledno uslovljena rezistencija na insulin. Do rezistencije mogu da dovedu poremećaji u sekreciji insulina (sinteza, procesovanje i oslobađanje), građi insulina (abnormalno „očitavanje“ glukoze iz krvi, abnormalnosti molekule insulina), faktori iz cirkulacije (antitela na insulin), poremećaji u građi receptora za insulin (promene u broju i afinitetu), postreceptorski defekti i abnormalnosti nosača za glukozu (glukoznih transportera). Ipak, najčešći uzrok su multipli receptorski i postreceptorski defekti koji svi zajedno uslovljavaju smanjeni efekat insulina na metabolizam ćelije. Mehanizam delovanja insulina na ciljne ćelije dešava se tako što se insulin vezuje za specifične visokoafinitetne receptore u ćelijskim membranama većine tkiva uključujući hepatocite, mišiće i masno tkivo. Insulinski receptor se sastoji od dve α i dve β -subjedinice raspoređene u tetramer pomoću disulfidnih veza. Insulin se vezuje za ekstracelularnu α -subjedinicu, a to vezivanje putem autofosforilacije aktivira intracelularnu β -subjedinicu koja je ustvari tirozin kinaza. Aktivacija tirozin kinaze dovodi do fosforilacije peptida sa druge strane membrane nazvanog insulin-receptor supstrat (IRS), koji zatim aktivira veći broj intraćelijskih proteina. Od ovih, najvažnija je aktivacija kretanja insulinsenzitivnih transportera glukoze (GLUT-4) iz intraćelijskog pula na ćelijsku membranu. Ovi transporteri glukoze tada na površini ćelija povećavaju insulin-zavisno preuzimanje molekula glukoze i prenose ih u unutrašnjost ćelija mišićnog i masnog tkiva. Insulin takođe unutar ćelije povećava količine mnogih enzima potrebnih za razgradnju glukoze (26, 27). Obavljena su opsežna genetska ispitivanja da bi se utvrdilo koja genetska mutacija dovodi do takve izmene gena koja prouzrokuje rezistenciju na insulin. Definisani su gen INSR na 19. paru hromozoma (19.p13.3-13.2) koji koduje sintezu polipeptidskih lanaca insulinskog receptora, opisane su i veoma retke monogenne bolesti izazvane tačkastom mutacijom toga gena ali one se veoma razlikuju od dijabetesa tipa 2. S druge strane u različitim bolesnicima koji boluju od dijabetesa tipa 2. sa insulinskom rezistencijom nađene su tačno definisane prateće mutacije na velikom broju gena. Zbog toga se i dalje smatra da se u dijabetesu tipa 2. poligeniski nasleđuje oslabljeno funkcionisanje receptora za insulin i/ili oslabljeno

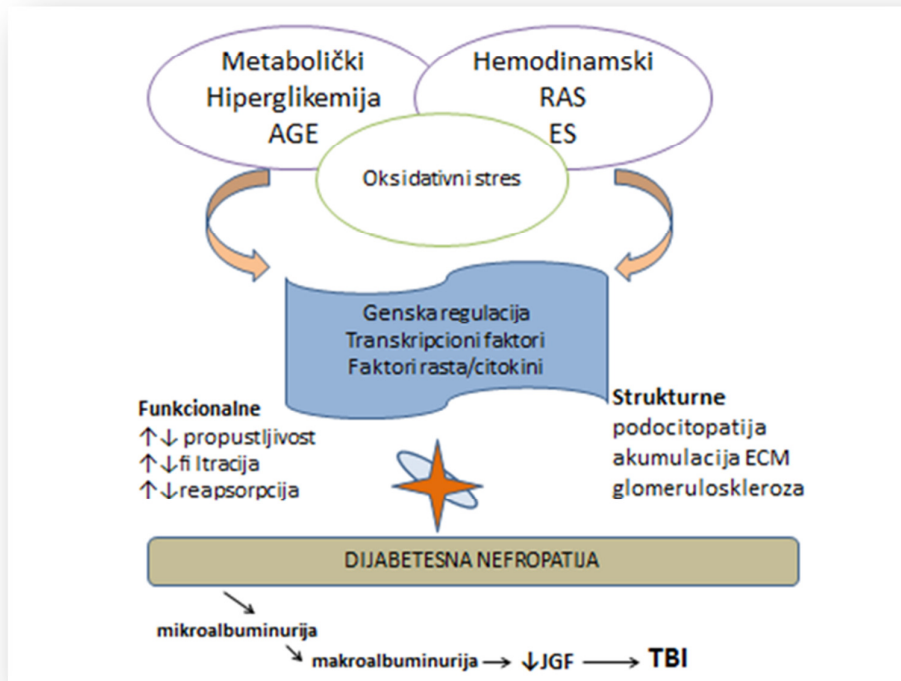
intraćelijsko prenošenje signala sa receptora na efektore. Postoje mnogobrojna istraživanja kojima je pokušano utvrđivanje tačnog molekuskog mehanizma insulinske rezistencije pre svega u gojaznih osoba i u metaboličkom sindromu, ali ona nisu dovela do jedinstvenih nalaza. Dokazano je da do rezistencije može dovesti sam insulin negativnom regulacijom svojih receptora, slobodne masne kiseline, inhibitori proteaza, amilin, izmenjeni fosfolipidi ćelijske membrane, različiti bioaktivni peptidi kao što su faktor nekroze tumora TNF α (posebno u metaboličkom sindromu), interleukin 6, adiponektin, a u poslednje vreme i duodenalni gastrointestinalni hormoni, što samo ukazuje da ne postoji jedinstven molekularni mehanizam insulinske rezistencije i da ovo pitanje nije do danas rešeno. U svakom slučaju rezistencija na insulin je osnovni poremećaj u dijabetesu tipa 2 i kao što je ranije opisano nasleđuje se poligenski, a za njeno ispoljavanje neophodno je i delovanje faktora životne sredine fizička neaktivnost, visokokalorična ishrana i hronični stres (27, 28).

Jedna od najtežih hroničnih mikrovaskularnih komplikacija šećerne bolesti jeste svakako DN, koja je danas vodeći uzrok terminalnog stadijuma bubrežne insuficijencije. Dijabetična nefropatija, koju još nazivamo Kimmelstiel-Wilsonov sindrom, nodularna dijabetična glomeruloskleroza ili interkapilarni glomerulonefritis, klinički je sindrom koji obuhvata pojavu albuminurije (> 300 mg/dan ili > 200 mcg/min) potvrđene u najmanje dva merenja u razmaku od 3 do 6 meseci, trajno i nepovratno smanjenje jačine glomerularne filtracije (JGF) i arterijsku hipertenziju. Sindrom su otkrili britanski lekar Clifford Wilson (1906–1997) i američki lekar Paul Kimmelstiel (1900–1970), a prvi je put objavljen u literaturi 1936. godine (29, 30).

Rezultat patofizioloških poremećaja u šećernoj bolesti jesu i promene funkcijskog statusa bubrega. Promene bubrežne funkcije u dijabetes melitusu odlikuju se dužim periodom klinički „neme“ faze u toku koje dolazi do glavnih promena i to funkcionalnih i strukturnih. *Funkcionalne promene* se dešavaju u nefronu na nivou glomerula, uključujući glomerulsku hiperfiltraciju i hiperperfuziju, pre pojave bilo kakvih klinički merljivih znakova nefropatije, zatim postepeno zadebljanje glomerularne bazalne membrane, glomerularna hipertrofija i ekspanzija mezangijalnog matriksa zauzimaju mesto (31, 32, 33). Promene u *bubrežnoj strukturi* koje su uzrokovane dijabetesom su specifične, daju karakterističan nalaz koji se ne nalazi u drugim bubrežnim bolestima, pri čemu ozbiljnost lezije u DN zavisi od trajanja dijabetesa, stepena glikemijske kontrole i genetskih faktora. Promene bubrežne strukture koje se viđaju u DN su mezangijalna ekspanzija, zadebljanje bazalne membrane, glomerulo i aterosklerotske promene, promene endotelne i tubulskih ćelija, abnormalnost podocita i

intersticijalna inflamacija (34). Međutim, prekomerno taloženje proteina ekstracelularnog matriksa (ECM) u mezangijumu i bazalnoj membrani glomerula, kao i u bubrežnom tubulointersticijumu, najranije su morfološke promene i tipična obeležja DN (34, 35). Ekspanzija mezangijalne regije se, zbog povećanog taloženja u ECM i hipertrofije mezangijalnih ćelija, čini i glavnim uzrokom smanjenja glomerulske filtracije u DN (35, 36). Intenzitet ovih promena, koje dovode do redukcije površina za filtriranje i suženja lumena, je u visoko značajnoj inverznoj korelaciji sa JGF u oba tipa dijabetesa (35, 37, 38, 39). Danas je poznato da brojni mehanizmi, odnosno faktori, doprinose razvoju i ishodu DN, kao što je interakcija između hiperglikemijom indukovanih metaboličkih i hemodinamskih promena i genetske predispozicije (slika 1).

Slika 1. Patogenetski mehanizmi koji dovode do razvoja dijabetesne nefropatije

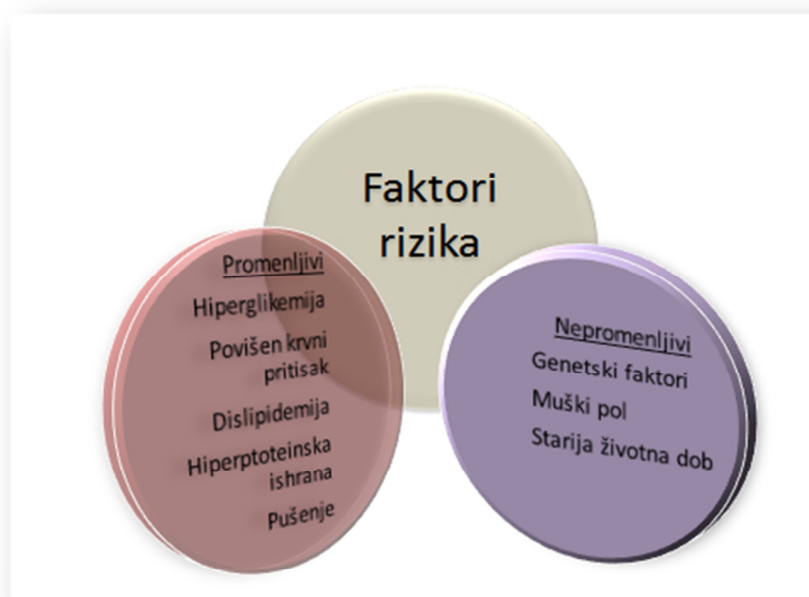


1.1. Faktori rizika za nastanak dijabetesne nefropatije

Svi faktori rizika za dijabetesnu nefropatiju mogu se podeliti na nepromenljive i promenljive faktore (videti sliku 2), odnosno na one na koje ne možemo uticati, kao što su pol, starost i genetski faktori, i na one na koje možemo uticati, među kojima su najvažniji hiperglikemija i hipertenzija.

Naime, dva glavna patogenetska faktora koji učestvuju u nastanku dijabetesne nefropatije su hiperglikemija i povećan glomerulski intrakapilarni pritisak. Dijabetesna nefropatija se neće razviti ako nema hiperglikemije, bez obzira na genetsku predispoziciju i sve ostale prisutne faktore rizika (1, 40).

Slika 2. Faktori rizika za nastanak dijabetesne nefropatije



1.1.1. Hiperglikemija

Hiperglikemija je glavni patogenetski faktor u nastanku dijabetesne nefropatije u oba tipa dijabetesa. Veoma značajan problem kod bolesnika sa dijabetesom melitusom (DM) tip 2 je asimptomatska, ali ne istovremeno i benigna hiperglikemija. Mnoge studije ukazuju da je

kvalitet regulisanosti DM širom sveta veoma loš i da se broj pacijenata koji imaju slabo regulisanu šećernu bolest kreće u proseku oko 65% (41). Neregulisana glikemija ima negativan uticaj na tok nefropatije u svim fazama DM tipa 2 (42). Kod novootkrivenih bolesnika sa DM tip 2, sniženje serumske koncentracije glukoze je praćeno sa smanjenjem stepena albuminurije (43), dok je loše regulisana glikemija nezavisni faktor rizika za razvoj mikro i makroalbuminurije, odnosno DN kod bolesnika sa DM tip 2, što su i pokazale pojedine prospektivne studije (44, 45). Kod bolesnika sa DM tip 2, stroga kontrola glikemije redukuje progresiju normoalbuminurije u mikroalbuminuriju (46). Nedavna ADVERSE studija pokazala je da stroga kontrola glikemije kod bolesnika sa DM, i to sa postizanjem nivoa hemoglobina A_{1c} (HbA_{1c}) ispod 6,5%, značajno doprinosi smanjenju rizika za razvoj nefropatije (47). Naime, intenzivna primena insulina doprinosi adekvatnijoj regulaciji glikemije i samim tim smanjuje rizik za razvoj i progresiju DN (48). Više studija kod bolesnika sa dijabetesom tip 1 i tip 2, pokazale su da je nastanak komplikacija u direktnoj vezi sa stepenom glikoregulacije. Smanjenjem HbA_{1c} za 1% smanjuje se rizik od mikrovaskularnih komplikacija za 30% (49, 50).

1.1.2. Hipertenzija

Arterijska hipertenzija je takođe jedan od glavnih faktora rizika za razvoj DN i najpoznatiji faktor rizika progresije DN. Stroga kontrola arterijskog krvnog pritiska kod bolesnika sa DM tip 2 smanjuje verovatnoću za razvoj i progresiju DN (51). Osim toga, na animalnim modelima je pokazano da hipertenzija arterijalis (HTA) dovodi do progresije renalnih oštećenja, pre svega doprinoseći oštećenju podocita. Upravo oštećenje i gubitak podocita značajno doprinose progresiji DN kod osoba sa DM tip 2 (52). Kliničke studije ukazuju da redukcija sistolnog krvnog pritiska za 9–11 mmHg i dijastolnog za 2–9 mmHg smanjuje kardiovaskularni morbiditet za 34–69%, odnosno mikrovaskularne komplikacije DM (retinopatiju i nefropatiju) za 24–46% i to unutar 2–5 godina (53, 54). Kod novootkrivenih slučajeva DM tip 2, arterijska hipertenzija obično je već prisutna, a često može i prethoditi. Podaci ukazuju da prevalenca HTA kod novootkrivenih bolesnika iznosi oko 50%, a sa razvojem mikroalbuminurije raste i dostiže vrednosti od oko 80%, odnosno pri razvoju makroalbuminurije i do 90% (55). Upravo visoka učestalost HTA kod bolesnika sa DM tip 2 posledica je povezanosti insulinske neosetljivosti i hiperinsulinemije sa hipertenzijom (56).

1.1.3. Dislipidemija

Pokazano je da je hiperholesterolemija faktor rizika za razvoj DN kod tipa 2 dijabetesa (57), kao i povezanost povišenog nivoa triglicerida, ukupnog i LDL holesterola sa razvojem mikro i makroalbuminurije u tipu 1 dijabetesa. Takođe, povišen nivo LDL-H predstavlja faktor rizika za razvoj i progresiju DN, dok, sa druge strane, značaj većih vrednosti HDL-H u kontekstu DN još uvek nije dovoljno proučen (58). Dislipidemija može doprineti pogoršanju DN uzrokujući oštećenje endotelnih ćelija, promene u koagulacijsko-fibrinoliznom sistemu, kao i ubrzani razvoj prevremene ateroskleroze (59). Lipidni poremećaji imaju značajnu ulogu u glomerulskom oštećenju, a naročito ukoliko je prisutna mikroalbuminurija. Utvrđeno je da lipidi uzrokuju oštećenje glomerula i tubulointercijuma mehanizmima koji su slični kao kod ateroskleroze. Naime, mezangijalne ćelije poseduju receptore za nativni, ali i za oxLDL (kao i ćelije glatke muskulature endotela), pri čemu pokazuju veći afinitet za oxLDL. Ovo ukazuje na prisustvo scavenger receptora na mezangijalnim ćelijama (60). Akumulacija modifikovanog holesterola u ovim ćelijama dovodi do stvaranja glomerulskih penastih ćelija. Eksperimentalne i kliničke studije ukazuju na štetan efekat hiperholesterolemije (HH) na bubrežno tkivo, kao i na ulogu HH u inicijaciji i progresiji DN (61). U studiji Gall-a i sar. nivo ukupnog holesterola je bio značajan faktor u razvoju povećane urinarne ekskrecije albumina (62). HH naročito može imati značajnu ulogu u hemodinamskim poremećajima, prouzrokujući endotelnu disfunkciju u preglomerulskoj renalnoj cirkulaciji. Oštećenje vazomotornog odgovora aferentne arteriole može izazvati prenos sistemskog pritiska na glomerulsku cirkulaciju, dovodeći do povećanja intraglomerulskog pritiska (63) i posledičnog oštećenja krvnih sudova.

1.1.4. Hiperproteinska ishrana

Unos belančevina utiče na bubrežnu hemodinamiku, kako kod zdravih osoba, tako i kod dijabetičara. Obično dolazi do povećanja protoka plazme i jačine glomerulske filtracije. Efekat se pripisuje glukagonu i prostaglandinima. Ako se troše proteini biljnog porekla, ne dolazi do promena u bubrežnoj hemodinamici (64).

1.1.5. Pušenje

Osim što doprinosi povećanom riziku za koronarnu bolest srca kod bolesnika sa DM tip 2 (65), postoje podaci da pušenje, nezavisno od godina, pola, trajanja dijabetesa, nivoa HbA1c, doprinosi progresiji bubrežnih oštećenja u DN kod DM tip 2 (66).

1.1.6. Starost

Kod bolesnika s dijabetesom tipa 2, starija životna dob i dužina trajanja šećerne bolesti, rizici su za nastanak DN, albuminuriju i insuficijenciju bubrega. Obrnuto, kod Pima Indijanaca s dijabetesom tipa 2, progresija hronične bolesti bubrega je bitno brža kada šećerna bolest nastane u dobi pre 20. godine života u odnosu na stariju životnu dob (64, 67).

1.1.7. Genetski faktori – porodično opterećenje i etnička pripadnost

Verovatnoća da će se razviti DN bitno je veća kod blizanaca sa šećernom bolesti, kao i kod bolesnika čiji su roditelji imali DN. U populaciji Pima Indijanaca koji su u dve uzastopne generacije imali šećernu bolest tipa 2, mogućnost da razviju proteinuriju je 14%, ako ni jedan od roditelja nije imao tu komplikaciju, 23%, ako je jedan od roditelja imao proteinuriju, i 46%, ako su oba roditelja imala proteinuriju (68, 69). Kod bolesnika s dijabetesom tipa 2, DD polimorfizam može biti udružen s povećanim rizikom od razvoja DN, težom proteinurijom, bržim nastankom hronične bubrežne slabosti. Istraživanja veze genetičke varijacije ACE-gena i DN, kod bolesnika s dijabetesom tipa 1, nisu za sada dala jasan odgovor. Muškarci, ali ne i žene, s dijabetesom tipa 1 i AA haplotipom AT2, imaju nižu JGF od onih s GT haplotipom. U kontrolisanom istraživanju utvrđeno je da bolesnici s dijabetesom tipa 1, koji su homozigoti za Z-2 alel, znatno češće razviju DN (70).

Neka istraživanja ukazuju na mogućnost da hereditet za arterijsku hipertenziju može da predstavlja jedan od faktora rizika za razvoj dijabetesne nefropatije. Prevalenca proteinurije je bila slična među potomcima, kod kojih nijedan roditelj nije imao hipertenziju (8.9%), ili je hipertenzivan bio samo jedan od njih (9.4%). Ona je bila značajno veća kod potomaka, čija su oba roditelja imala hipertenziju (18.8%). Kod njih je, naime, rizik za pojavu proteinurije bio dva puta veći (71).

Kod belaca je, u odnosu na druge rase, zapažena značajno niža prevalenca i incidenca dijabetesne nefropatije (72), kao i dijabetesa tipa 2. Još uvek nije sasvim jasno da li je to uzrokovano genetskim ili socio-ekonomskim faktorima. Ipak, i posle korekcija izvršenih zbog efekata koje ishrana karakteristična za ove etničke grupe može da ima na glikoregulaciju i kontrolu krvnog pritiska, održava se povećan rizik za nastanak dijabetesne nefropatije i razvoj terminalne bubrežne insuficijencije kod Pima Indijanaca i Amerikanaca afričkog porekla. Histopatološke studije su pokazale značajno veće dimenzije glomerula kod Pima Indijanaca, a epidemiološka istraživanja su, u ovoj etničkoj grupi, dokazala bržu progresiju ka mikroalbuminuriji i makroproteinuriji (73).

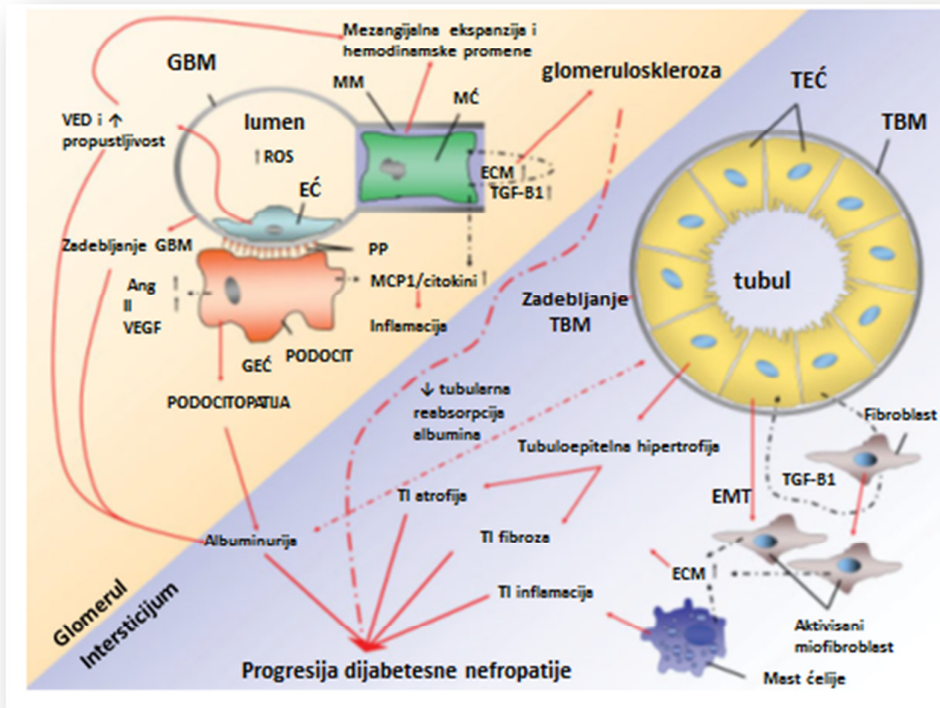
1.2. Uloga hemodinamskih faktora u razvoju dijabetesne nefropatije

Najranija promena u funkciji bubrega kod dijabetesne nefropatije, kao što je prethodno rečeno, jeste glomerulska hiperfiltracija i hipertenzija, za šta su odgovorni hemodinamski i humoralni faktori (32). Povećanje glomerulskog kapilarnog pritiska uzrokuje povećan transkapilarni gradijent, kao i glomerulski protok plazme. Ove promene dovode do smanjenja rezistencije u eferentnoj i aferentnoj arterioli, pri čemu je smanjenje rezistencije izraženije na nivou aferentne arteriole. Ovo dovodi do povećanja glomerulskog kapilarnog pritiska, odnosno gubitka autoregulacije (kod zdravih bubrega povećana glomerulska perfuzija rezultuje preglomerulskom vazokonstrikcijom u cilju održanja konstante JGF) (13, 33, 34).

Postoje brojni faktori koji mogu doprineti hiperperfuziji i hiperfiltraciji, a među njima su Ang II, NO, atrijalni natriuretski peptid, prostanoidi, insulinu sličan faktor rasta (IGF), vaskulni endotelni faktor rasta (VEGF) i citokini. Povišen intraglomerulski pritisak dovodi zatim do prekomerne ekspresije ćelija mezangijalnog matriksa, oštećenja podocita, zbog toga što je kapilarna glomerularna bazalna membrana u kontinuitetu i sa podocitima i sa mezangijalnim ćelijama (MĆ) (34, 74) (slika 3). Ove promene kapilarnog pritiska uzrokuju mehanički „stres“ ili istezanje glomerulskih ćelija, što stimuliše autokrinu ili parakrinu produkciju citokina i faktora rasta. Na primer, u in vitro uslovima, izloženost glomerularnih ćelija (MĆ, podociti i glomerularne endotelne ćelije) istezanju ili mehaničkom „stresu“,

dovodi do aktivacije određenih transdukcionih signalnih sistema, do povećanog rasta, sinteze citokina i povećane produkcije proteina ECM-a (32, 34, 74, 75).

Slika 3. Uključenost različitih tipova bubrežnih ćelija u patogenezu dijabetesne nefropatije



Legenda: GBM-glomerularna bazalna membrana, TEĆ-tubulske epitelne ćelije, TBM-tubulska bazalna membrana, ECM-ekstracelulni matriks, GEĆ-glomerulske epitelne ćelije, EMT-epitelno-mezenhimalna tranzicija, VED-vaskularno endotelna disfunkcija, EĆ-epitelne ćelije, PP-prstasti produžeci, VEGF-vaskularni endotelni faktor rasta, MČ-mezangijalne ćelije, MM-mezangijalni matriks. (Slika preuzeta iz *Trends Endocrinol Metab* 2010; 21:50–6).

MČ koje su lokalizovane u intrakapilarnom prostoru, imaju slične karakteristike kao i vaskularne glatke mišićne ćelije; poseduju veliki broj aktinskih filamenata koji se kontrahuju i proliferišu u odgovoru na brojne vazoaktivne supstance i faktore rasta / citokine. Nakon inicijalne povrede, aktivirane MČ mogu menjati fenotip ekspresijom fibroblastu sličnog miozina. Poremećena funkcija i gubitak aktinskih vlakana u mezangijalnom prostoru nađena je kod tzv. dijabetesnog glomerula sa narušenom kontraktilnošću u odgovoru na vazokonstriktorne agente (76, 77). MČ igraju važnu ulogu u regulaciji glomerulske hemodinamike i glavne glomerulske ćelije su uključene u depoziciji ECM-a u mezangijumu.

Iako oba, istežanje i visok nivo glukoze, indukuju ekspresiju gena i sekreciju proteina ECM-a u MĆ in vitro, pri čemu istežanje stimuliše sintezu kolagena nezavisno od koncentracije glukoze, pokazalo se da je akumulacija kolagena u medijumu prisutna samo u uslovima hiperglikemije. Nadalje, u odgovoru na hiperglikemiju i istežanje, MĆ podležu proliferaciji praćenoj ćelijskom hipertrofijom u kratkom periodu, da bi nakon dužeg izlaganja visokom nivou glukoze MĆ ostale u G1 fazi ćelijskog ciklusa, koja je posredovana P27 Kip1, inhibitora ciklin-zavisne kinaze. Treba napomenuti da Ang II igra ključnu ulogu u ovom procesu rasta (74, 75).

1.3. Uloga hiperglikemije u razvoju dijabetesne nefropatije

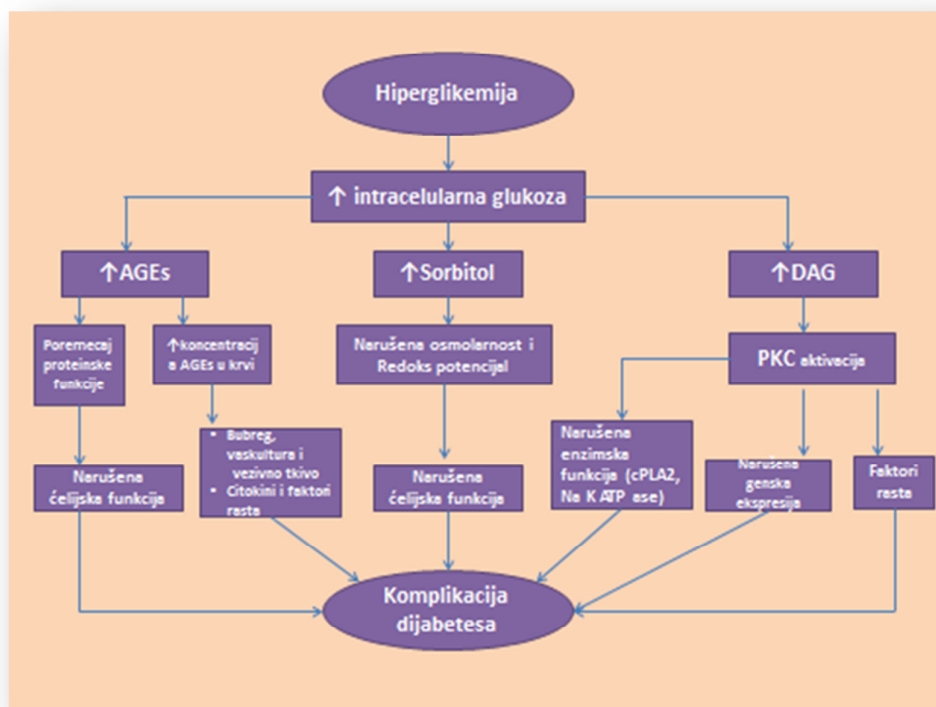
Hiperglikemija je glavni patogenetski faktor u nastanku dijabetesne nefropatije. Hiperglikemija, ali i glomerulska hipertenzija, uzrokuju povećan transport glukoze u ćeliju i ta povećana koncentracija glukoze u ćelijama vodi brojnim poremećajima. Glukoza, naime, nema direktan toksični efekat na ćelije glomerula, nego njena povećana koncentracija menja produkciju različitih proteina i vodi nizu metaboličkih poremećaja koji uzrokuju leziju svih struktura glomerula (78). Osnovna karakteristika ćelija koje su oštećene hiperglikemijom je njihova nesposobnost da smanje transport glukoze kada je ekstracelularna glukoza povišena. Dakle, povišena intracelularna koncentracija glukoze, pre nego njena ekstracelularna akumulacija, deluje kao prvi korak u kaskadi biohemijskih i morfoloških događaja koji vode DN. Ovako nagomilana glukoza izaziva oštećenje tkiva mehanizmima koji mogu biti grupisani u dve kategorije: ponavljane akutne promene u ćelijskom metabolizmu koje su reverzibilne kada se uspostavi normoglikemija, i kumulativne promene u dugoživećim molekulima koji perzistuju uprkos uspostavljanju normoglikemije. Ova kategorija podleže uticaju genetskih faktora i odnosi se na ćelijsku prijemćivost ili rezistenciju na dugotrajnu hiperglikemiju (79).

Poslednjih godina aktuelno je nekoliko hipoteza o mehanizmima u kojima visok sadržaj glukoze u medijumu čini početni korak, oštećuje ćelijski metabolizam i vodi bubrežnoj leziji kod šećerne bolesti (videti sliku 4), a to su (80):

- sorbitolski mehanizam i pojaćana aktivnost aldozoreduktaze;
- povećana sinteza diacilglicerola i prateća aktivacija protein kinaze C (PKC);

- poremećaj aktivnosti metaloproteinaza mezigijumskog matriksa;
- ubrzana neenzimska glikozilacija tkivnih i cirkulišućih proteina i
- poremećaji sinteze i/ili aktivnosti citokina i faktora rasta.

Slika 4. Metabolički poremećaji koji se javljaju u uslovima hiperglikemije



U određenim stanjima sorbitolski mehanizam može biti aktiviran osmotskim stresom, ali i preteranom koncentracijom glukoze u ćeliji. Izlaganje ćelija čiji je metabolizam nezavisan od insulina, kao što su MĆ i endotel glomerula, visokom ekstracelularnom sadržaju glukoze, dovodi do preteranog ulaska glukoze u ćeliju. Time je stimulirana aktivnost aldozoreduktaze, a time i nagomilavanje intracelularnog sorbitola (81). Ovaj polialkohol ne prelazi plazmatske membrane, a njime izazvana intracelularna hiperosmolarnost može direktno voditi destrukciji ćelije. Renalne tubulske ćelije u dijabetesnom bubrežnom tkivu se kupaju u hipertoničnoj intersticijskoj tečnosti, pa ovaj osmotski stres kompenzuju hiperprodukcijom sorbitola iz glukoze. Tako u ćeliji nastaje citosolski redoks disbalans usled porasta intracelularnog indeksa NADH/NAD⁺, koji kasnije može sinergijski delovati i sa drugim potencijalno toksičnim efektima uključenim u mehanizam hiperglikemije (82).

Druga mogućnost vezana je za *aktivaciju protein kinaze C (PKC)* preko koje hiperglikemija stimuliše produkciju ECM, najvećim delom preko *de novo sinteze diacilglicerola (DAG)*. Visoka koncentracija glukoze stimuliše produkciju kolagena tipa IV u kulturi mezangijumskih ćelija, verovatno preko aktivacije PKC (83). Aktivnost PKC povećana je u glomerulima, retini, aorti i srcu dijabetesnih životinja. Aktivisanje DAG i PKC vodi: pojačanoj produkciji vazodilatatornih prostaglandina, što doprinosi početnoj hiperfiltraciji tipičnoj za rani dijabetes, povećanoj sintezi fibronektina i kolagena tipa IV, povećanoj aktivnosti informacijske RNK za komponente ECM, što je praćeno zadebljanjem GMB i ekspanzijom mezangijumskog matriksa. Smatra se da ova dva mehanizma, zajedno sa drugim biohemijskim abnormalnostima koje proističu iz hiperglikemije, sinergijski deluju u aktivaciji mitogeno aktiviranih proteinskih (MAP) kinaza. Ove MAP kinaze menjaju celularni fenotip i imaju kapacitet da pokreću sve ćelijske događaje neophodne za razvoj dijabetesne nefropatije, retinopatije i neuropatije. MAP kinaze vode povećanoj produkciji ECM. Značajno je istaći da inhibitor PKC sprečava aktivaciju MAP kinaza, a inhibitori aldozoreduktaze u kulturi mezangijumskih ćelija inhibišu aktivaciju i PKC i ključnog citokina u nastanku DN – transformišućeg faktora rasta beta (TGF β) (83, 84).

Još jedan od mogućih mehanizama putem kojeg hiperglikemija vodi glomerulskoj leziji je *izmenjena aktivnost metaloproteinaza glomerulskog matriksa (MMP)*. Kao što je ranije navedeno, tipična alteracija vezana za dijabetesni glomerul je uvećanje mezangijumskog matriksa. On je posledica jednog dinamičnog procesa koji u sebi sadrži ubranu sintezu i/ili smanjenje degradacije ECM (85). Hipoteza o abnormalnoj degradaciji zasniva se na eksperimentnim studijama koje potvrđuju ključnu ulogu metaloproteinaza u procesima razgradnje mezangijuma. Ekspresija ovih enzima može da bude smanjena kod dugotrajne hiperglikemije. MMP-2 je glavni MMP kojeg proizvode mezangijumske ćelije, a uključen je u degradaciju kolagena tipa IV. Povišena aktivnost TGF β takođe smanjuje aktivnost ovih metaloproteinaza.

Već 24 časa posle izlaganja kulture glomerulskih ćelija medijumu sa visokim sadržajem glukoze nastupa ushodna regulacija gena za informacijske RNK brojnih citokina, faktora rasta i proteina ECM. U dijabetesnom miljeu, ovi faktori deluju kao modulatori ćelijske proliferacije. Od svih faktora rasta najviše pažnje je posvećeno transformišućem faktoru rasta – TGF β ; za njega se smatra da ima centralnu ulogu u produkciji ECM i pratećoj glomerulskoj fibrozi. Hiperglikemija dovodi do povećane ekspresije VEGF i to u podocitima, što značajno povećava vaskularnu propustljivost i nagomilavanje matriksa u DN (86, 87).

Završni produkti glikozilacije (AGE). Hronična hiperglikemija vodi procesu neenzimatske glikozilacije proteina glomerulske bazalne membrane i proteina mezangijskog matriksa i stvaranju najpre reverzibilnih, a kasnije ireverzibilnih krajnjih produkata glikozilacija (engl. advanced glycosylation end products - AGE). Završni produkti glikozilacije su heterogena grupa jedinjenja koja nastaju kao rezultat „Mailardove reakcije“ u kojoj redukujući šećeri neenzimatski reaguju sa proteinima, lipidima i nukleinskim kiselinama. AGE se formiraju posredstvom reverzibilnih Šifovih baza i stabilnijih Amadorijevih produkata (88). Ovi rani produkti glikozilacije se nakupljaju predominantno u proteinima zida krvnih sudova (kolagen i kristalini) (Brownlee M2001), a serijom daljih reakcija transformišu se u ireverzibilne komplekse tj. AGE, koji pokazuju veliku rezistenciju na proteolitičku razgradnju (89). Jedan od načina na koji AGE ispoljavaju svoje biološke efekte je posredstvom receptora, od kojih su najvažniji tzv. receptori završnih produkata glikozilacije (RAGE). RAGE se nalaze na brojnim ćelijama uključujući ćelije monocitno-makrofagnog sistema, vaskularne endotelne i glatkomišićne ćelije, bubrežne mezangijalne ćelije i podocyte (90). Upravo AGE vezivanjem za RAGE aktiviraju brojne patološke puteve koji su uključeni u razvoj dijabetesne nefropatije. Tako npr., AGE direktno stimulišu produkciju ECM, redukuju ekspresiju i aktivaciju MMP i ostvaruju značajnu interakciju sa RAS. Takođe, AGE dovode do ekspresije i aktivacije brojnih transkripcionih faktora uključenih u razvoj DN, kao što je nuklearni faktor- κ B (NF- κ B) i protein kinaze C (PKC). Ovaj efekat može biti direktan delovanjem preko RAGE ili indirektan preko akumulacije ROS. Između ostalog, AGE stimulišu i oslobađanje proinflamatornih citokina i ekspresiju faktora rasta, kao što je TGF- β 1, i faktor rasta vezivnog tkiva (CTGF), preko interakcije sa specifičnim receptorima, npr. na monocitno/makrofagnim i endotelnim ćelijama. Ekspresija RAGE u DN je povećana, naročito u podocitima. AGE i povećana ekspresija RAGE mogu implicirati „brisanje“ podocita preko ushodne regulacije za monocitni hemotaksijski protein 1 (engl. monocyte chemoattractant protein -1, MCP-1) i apoptoze podocita. Aktivacija RAGE u podocitima povećava i ekspresiju/aktivaciju VEGF koji dovodi i do povećane vaskularne propustljivosti i do proteinurije. Aktivacijom RAGE u endotelnim ćelijama dolazi do nakupljanja ROS koji promovišu vaskularnu endotelnu disfunkciju (VED). U MĆ, aktivacijom RAGE dolazi do inhibicije ćelijske proliferacije i promocije hipertrofije MĆ, kao i povećane mezangijalne sinteze ECM, kao što je fibronektin, kolagen tipa I i IV, te mezangijalne sekrecije MCP-1 koja ima značajnu ulogu u inflamatornim procesima. Pored podocita, endotelnih ćelija i mezangija, prisustvo RAGE je otkriveno i na površini tubularnih

ćelija u bubrežima, čija aktivacija dovodi do povećane ekspresije TGF- β 1, koji je odgovoran za aktivaciju miofibroblasta preko EMT (80, 92).

1.4. Uloga vazokativnih faktora u razvoju dijabetesne nefropatije

Brojni faktori su uključeni u patogenezu DN kao što su faktori rasta, citokini i hemokini. Takođe su se izdvojili i različiti vazoaktivni faktori koji doprinose razvoju i progresiji dijabetesne mikrovaskularne komplikacije. Ovi vazoaktivni faktori uključuju vazokonstriktore, kao što su angiotenzin II (Ang II) i ET-1, kao i vazodilatatore, kao što su NO i prostaglandini. Pored dobro poznatog sistemskog i lokalnog hemodinamskog efekta, renin angiotenzin sistem i endotelinski sistem mogu imati i nehemodinamske efekte preko parakrinog i autokrinog načina delovanja. Oni stimulišu proliferaciju bubrežnih ćelija, kao i ekspresiju faktora rasta ili citokina, koji direktno ili indirektno doprinose bubrežnim promenama koji se viđaju u dijabetesu (92).

1.4.1. Renin-angiotenzin-aldosteron sistem

Renin-angiotenzin-aldosteron sistem (RAAS) ima ključnu ulogu u parakrinnoj regulaciji bubrežne funkcije (93). Takođe, RAAS igra jednu od ključnih uloga u patogenezi komplikacija dijabetes melitusa. Studije koje su ispitivale ulogu RAAS u progresiji bubrežnih bolesti ukazale su na to da je inhibicija ovog sistema kritičan momenat u tretmanu DN (95). Glavni efektorski molekul ovog sistema je Ang II, koji u bubrežima vodi poreklo iz cirkulacije, ili se intrarenalno stvara iz angiotenzina I.

Dva glavna tipa angiotenzinskih receptora su AT1 i AT2 receptori. AT1 receptori se nalaze u glatkoj muskulaturi aferentne i eferentne arteriole, u mezangijskim ćelijama glomerula, podocitima, makuli densi, kao na luminalnoj površini bubrežnih tubulskih ćelija (96, 97). Njihova aktivacija dovodi do vazokonstrikcije eferentne arteriole i redukcije bubrežnog protoka plazme. Takođe, aktivacijom AT1 receptora u mezangijskim ćelijama dolazi do aktivacije TGF- β , kao i aktivacije PAI-1, usled čega je smanjena degradacija ECM (98). AT2 receptori se u bubrežima nalaze u aferentnoj arterioli, glomerulskim endotelnim i mezangijskim ćelijama, kao i u ćelijama proksimalnih tubula i bubrežnog intersticijuma (96).

Aktivacijom AT2 receptora postižu se suprotni efekti od onih koji nastaju aktivacijom AT1 receptora tj. renalna vazodilatacija i antiproliferativni efekti (99, 100).

Ang II u dijabetesnom bubregu, stimulisan od strane hiperglikemije, metaboličkih i hemodinamskih procesa, posreduje glomerulskoj hiperfiltraciji preko povećanog nakupljanja glukoze u ćeliji, povećanog oksidativnog stresa, važnog za formiranje završnih produkata glikozilacije (75). Naime, lokalni porast Ang II u podocitima u uslovima hiperglikemije vodi ka supresiji ekspresije nefrina u podocitima, time povećava ultrafiltraciju proteina, koji nadalje doprinosi oštećenju podocita. Osim toga, Ang II u tubularnim ćelijama takođe indukovano od strane hiperglikemije, povećava tubularnu reapsorpciju proteina doprinoseći tako tubularnoj inflamaciji i fibrozi (74). Nehemodinamski efekti Ang II podrazumevaju povećanje ekspresije faktora rasta (TGF- β , CTGF, VEGF), kolagena i fibronektina, kao i stimulaciju proliferacije mezangijskih ćelija i posledičnu povećanu sintezu ECM (101). Pored toga, u DM ukupna količina NO, kojeg stvaraju endotelne ćelije, je smanjena. Ovo je posledica Ang II-stimulisane produkcije superoksidnih anjona, koji stupaju u reakcije sa NO i dovode do smanjenja njegove biološki aktivne količine (102).

RAAS se osim navedenih, odavno poznatih karika ovog sistema, sastoji i od nekih drugih manje istraživanih molekula. Tako, dejstvo angiotenzin konvertujućeg enzima-2 (ACE-2) ne dovodi do konverzije ANG I u ANG II, a takođe ne podleže inhibiciji pod dejstvom ACE inhibitora. ACE-2 dovodi do konverzije ANG I u ANG (1-9), kao i konverzije ANG II u ANG (1-7), te na taj način (posredstvom povećane konverzije ANG I putevima koji zaobilaze konverziju ANG I u ANG II) dovodi do smanjene produkcije ANG II. ACE-2 se nalazi u renalnim endotelnim ćelijama, ali i u srčanim ćelijama i testisima (103). Stvoreni ANG 1-7 ima antagonističke efekte u odnosu na ANG II, tj. dovodi do stimulacije NO i vazodilatatornih prostaglandina, a osim toga podstiče aktivnost bradikinina i ima antiproliferativno dejstvo na vaskularne glatkomišićne ćelije (104).

1.4.2. Endotelin-1

ET-1 je potentni vazokontstriktorni peptid, nastao produkcijom od strane vaskularnog endotelijuma od *big* ET-1 i njegovim cepanjem pod dejstvom endotelnog konvertujućeg enzima. ET-1 se proizvodi kao rezultat aktivacije ETA receptora i ETB receptora (105). ETA receptori su pretežno lokalizovani na vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama i posreduju

vazokonstrukciji velikih i malih krvnih sudova, dok su ETB receptori smešteni na endotelnim ćelijama i posreduju vazodilataciji preko produkcije NO i prostaciklina (106, 107). ET-1 je uključen u patogenezu kardiovaskularnih bolesti kao što je hipertenzija i srčana insuficijenca, kao i u patogenezu DN (108). DM indukuje prekomernu ekspresiju ET-1 u glomerularnim i tubularnim epitelnim ćelijama koji vodi ka progresiji DN. Pokazano je da dijabetesom indukovani povišen nivo bubrežnog ET-1 dovodi do glomerularne hiperperfuzije i oštećenja tubulointercijuma kod pacova (109). Takođe je zabeleženo da dijabetesom indukovani povišen nivo ET-1 kod pacova ubrzava progresiju DN. Dokazano je da ET-1 aktivise različite signalne sisteme koji indukuju kontrakciju, hipertrofiju, proliferaciju i akumulaciju ECM u MĆ (110). Značajna uloga ET-1 u patogenezi DN je potvrđena i činjenicom da je povišen nivo ET-1 u dijabetesu u korelaciji sa ekspanzijom MĆ i depozicijom kolagena u glomerulima dijabetičnog miša (111). Tretiranjem blokatorima receptora ET poboljšava se bubrežna funkcija pacova sa DN, preko supresije NADPH oksidaze, što ukazuje da ET-1 u patogenezi DN doprinosi preko ushodne regulacije NADPH oksidaze posredovane povećanom produkcijom ROS u bubrežnim ćelijama. Dosadašnji podaci ukazuju da većina patoloških efekata ET-1 jeste posredovana preko aktivacije ETA receptora. Na podocitima pod uticajem ET-1 dolazi do narušavanja aktinskog citoskeleta, tzv. „brisanja“ prstastih produžetaka podocita, gubitka proteina kao što je nefrin, koji ima značajnu ulogu u održavanju međudelejske sponje. Ovo doprinosi razvoju proteinurije koji predstavlja značajan marker progresije bubrežnog oštećenja. ET-1 takođe aktivise mezangijalne ćelije da oslobađaju proinflamatorne i profibrotičke citokine, stimulišu ćelijsku proliferaciju i povećava produkciju proteina ECM, što vodi glomerulosklerozi (slika 4). ET-1 je takođe hemotaksni činilac za leukocite uključujući i makrofage, koji infiltriraju glomerule i intersticijum i doprinose bubrežnoj inflamaciji (112, 113). O ulozi ovog sistema u razvoju DN biće objašnjeno u kasnijem delu izlaganja.

1.4.3. Azot monoksid sistem

NO sistem se smatra važnim regulatorom lokalne cirkulacije. Pored drugih, sintetišu ga i endotelne ćelije. Sintetiše se uz pomoć enzima NO-sintetaze (NOS) oksidacijom L-arginina. Postoji više oblika NOS: konstitutivna (izoforma I u neuronima i izoforma III u endotelnim ćelijama) i inducibilna (izoforma II u monocitno-makrofagnim ćelijama i glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova). Do smanjene koncentracije NO može dovesti: smanjena

aktivnost NOS ili ubrzana razgradnja NO. Do inhibicije aktivnosti NOS dovode neke aminokiseline, kao što je dimetil-arginin (ADMA), čije su koncentracije povećane u hiperholesterolemiji i hroničnoj bubrežnoj insuficijenciji, kao i analozi arginina. Za povećanu razgradnju NO u najvećoj meri je odgovoran superoksidni anjon (114, 115). Takođe, NO ima značajnu ulogu u regulaciji tonusa krvnih sudova, jer posreduje u vazodilatatornom učinku brojnih faktora, ograničava vazokonstriktorne efekte, te smanjuje agregaciju trombocita (115).

Kod bolesnika sa hroničnom insuficijencijom bubrega povećana je koncentracija analoga L arginina koji kompetitivnim mehanizmom inhibiraju NOS, smanjuju nivo L arginina u plazmi i mogu indukovati hipertenziju. Vaskularna regulacija u produkciji NO kao adaptivnog odgovora na povećan krvni pritisak može biti od pomoći u prevenciji od krajnjeg oštećenja organa. Hiperglikemija remeti dostupnost i iskoristljivost NO u organizmu, povećava i koncentraciju slobodnih radikala (ROS) koji inaktivišu NO, čime je onemogućeno njegovo delovanje. U bubrezima NO je uključen u regulaciju bubrežnog protoka plazme, JGF, ekskrecije soli, ekstracelularnog volumena tečnosti, kao i u održavanju integriteta bubrežne strukture. Nekoliko faktora i mehanizama, kao što je VEGF, TGF- β 1, leptin i mehanički stres, stimulišu ekspresiju i aktivnost NO sistema u dijabetesnom bubregu. Svakako, i ekspresija i aktivacija endotelnog NO sistema je povećana u DN, i inhibitori NO sistema preveniraju glomerulnu hiperfiltraciju u eksperimentnim modelim DN, ali je takođe pokazano da vaskulna endotelna disfunkcija koja vodi ka albuminuriji u DN rezultat redukovane aktivnosti endotelnog NO sistema i smanjenog stvaranja i biorpoloživosti NO. Naime, VED u DN je rezultat smanjene proizvodnje NO, smanjene aktivacije azot oksid sintetaze (NOS), i povećane proizvodnje reaktivnih kiseoničkih supstanci (ROS). Ovako izmenjena endotelna funkcija dovodi do ekspresije protrombinskih i proinflamatornih medijatora, koji su umešani u patogenezu DN. Hiperglikemija uzrokuje apoptozu endotelnih ćelija sa odnošenjem NO te indikuje VED koja sa druge strane dovodi do povećanog taloženja ECM, glomeruloskleroze, progresivnog pada JGF i progresije nefropatije (116, 117).

1.4.4. Prostaglandini

U sklopu humoralne regulacije bubrežnog protoka krvi, prostaglandinski sistem predstavlja deo vazodilatatornog sistema bubrega. Ove efekte prostaglandini ostvaruju u interakciji sa drugim lokalnim bubrežnim i vanbubrežnim kontrolnim sistemima (118). Danas postoje nepobitni dokazi da prostaglandini učestvuju u regulaciji bubrežnog protoka krvi i JGF. Prostaglandini predstavljaju veliku porodicu biološki aktivnih jedinjenja koja nastaju iz arahidonske kiseline. Ovi aktivni produkti nastaju u ciklooksigenaznom putu metabolizma arahidonske kiseline. Arahidonska kiselina se pod dejstvom enzima fosfolipaze A₂ izdvaja iz fosfolipida ćelijskih membrana. Dejstvom enzima ciklooksigenaze na arahidonsku kiselinu dolazi do konverzije slobodne arahidonske kiseline u ciklične endoperoksidge, najpre PGG₂, a zatim PGH₂. Ciklični endoperoksidge su intermedijarni nestabilni produkti iz kojih posredstvom specifičnih enzima nastaju prostaglandini: PGE₂, PGF_{2alfa}, PGD₂, a zatim PGI₂ (prostaciklin) i tromboksan A₂ (TxA₂) (13). Prostaglandini se praktično stvaraju u svim tkivima pa i u bubregu; deluju lokalno u kratkom vremenskom periodu pre nego što enzimskim i neenzimskim putem budu inaktivisani prelazeći u relativno stabilne metabolite. Prostaglandini se sintetišu kako u medulskim tako i u kortikalnim strukturama nefrona, s tim da je mesto predominantne sinteze pojedinih vrsta prostaglandina različito. PGE₂, i PGF_{2alfa} su glavni produkti bubrežne sinteze prostaglandina, PGI₂ se sintetišu u znatnim količinama, dok je produkcija PGD₂ u bubregu praktično zanemarljiva (119, 120). Arahidonska kiselina takođe može biti oksidisana od strane lipooksigenaze. Postoji dokazi da produkti nastali dejstvom lipooksigenaze mogu doprineti razvoju DN. U prilog tome govori i povišen nivo lipooksigenaze 12 i 15 u dijabetesnih životinja. Pored toga, hiperglikemija povećava ekspresiju lipooksigenaze 12 i 15 u kulturi MĆ. Možemo reći da ovaj patološki put ima ključnu ulogu u procesu hipertrofije MĆ i akumulacije ECM, koje su posredovane preko produkcije TGF-β1 i Ang II (121). Na eksperimentalnim modelima DN, kao što je streptozocinom indukovan dijabetes kod pacova, pokazano je da nivo inflamatornih prostanoida kao što je PGE₂ i PGI₂, raste. Takođe je pokazana povišena ekspresija ciklooksigenaze 2 na životinjskim modelima dijabetesa i u makuli dense bubrega kod pacijenata sa dijabetesom. Kod dijabetičkih pacova, inhibicija ciklooksigenaze 2 je povezana sa smanjenjem glomerularne hiperfiltracije. Međutim, potrebna su detaljnija istraživanja o tome kako produkcija prostaglandina utiče na patogenezu DN (122, 123).

1.5. Uloga faktora rasta u razvoju dijabetesne nefropatije

1.5.1. Transformišući faktor rasta - β 1

TGF- β 1 je potentan profibrotički citokin i njegov tip II receptor je povećan u tipu 1 i 2 dijabetesa (34, 35, 124). U DN povećana ekspresija TGF- β 1 u tubularnim ćelijama i MĆ, kako je u prethodnom delu opisano, je indukovana hiperglikemijom, delovanjem AGE i ROS-a kao i Ang II (34, 125). Iako je produkcija TGF- β 1 u MĆ stimulisana hiperglikemijom, blokada ovog faktora rasta inhibira glukozom indukovanu hipertrofiju MĆ i sintezu proteina ECM, što ukazuje da su ovi efekti TGF- β 1 posredovani preko autokrinog mehanizma delovanja (34, 75). Očigledno je da TGF- β 1 ključni citokin koji indukuje prizvodnju različitih proteina ECM u bubrežnim ćelijama kao i inhibiciju degradacije ECM (35, 126, 127). Sistem TGF- β 1 u podocitima takođe stimuliše produkciju ECM od strane podocita (što doprinosi zadebljanju GBM) i promovise apoptozu i smanjenu ekspresije integrina, što vodi ka podocitopatiji odnosno podocitopeniji (126, 128). U dijabetesnom bubregu, ekspresija TGF- β 1 je povezana i sa povećanom apoptozom tubularnih ćelija što dovodi do tubularne degradacije i atrofije. Epitelne ćelije proksimalnih tubula imaju potencijal da doprinesu patogenezi bubrežne fibroze produkcijom TGF- β 1, zbog toga što proksimalne tubulske ćelije „dovodeći“ TGF- β 1, sa jedne strane, regulišu terminalnu diferencijaciju intersticijalnih fibroblasta preko genske ekspresije kolagena i njegove inkorporacije u ECM, a sa druge strane, stimulišu značajnu promenu ćelijske morfologije, pa se epitelne ćelije izdužuju, postaju vretenaste, sa fibroblastičnom pojavom koja je povezana sa izmeštanjem aktina unutar njihovog citoskeleta. Gubitak glomerularnih i peritubularnih kapilara je povezan sa povećanom apoptozom endotelne ćelije, što je direktno indukovano od strane TGF- β 1 (129). Osim toga, TGF- β 1 može indirektno promovisati apoptozu endotelne ćelije preko oštećenja ćelija koje proizvode VEGF. Ekspresija ovog vaskularnog faktora je normalno prisutna u podocitima i tubularnim ćelijama zdravog bubrega, tako da TGF- β 1 indukovana apoptoza podocita i tubularnih ćelija može uzrokovati opisan gubitak ekspresija VEGF u progresivnim bubrežnim bolestima (126, 129). Na značajnu ulogu TGF- β u razvoju DN ukazuje i činjenica da je urinarna ekskrecija TGF- β povećana kod dijabetičara sa mikro- i makroalbuminurijom (130). Stoga bi određivanje nivoa TGF- β u urinu moglo poslužiti kao prediktivni marker za ranu detekciju, ali i monitoring DN.

1.5.2. Vezivno-tkivni faktor rasta

Vezivno-tkivni faktor rasta (CTGF) je još jedan prosklerotski citokin čije je učešće pokazano u ranom i kasnijem stadijumu razvoja DN (34, 35). U prilog ove hipoteze, o značaju CTGF u DN, govori činjenica da je ekspresija CTGF minimalna u zdravom bubregu, ali je značajno indukovana u DN što je utvrđeno i na eksperimentalnim modelima DN. Naime, CTGF je jedan od ključnih faktora koji doprinosi povećanoj produkciji ECM, ali može imati ulogu i u drugim profibroznim aktivnostima u kojima posreduje TGF- β . Mason i sar. (35) su ukazali da u mezangijalnim ćelijama koje su izložene CTGF-u dolazi do smanjene ekspresije Smad 7, potentnog inhibitora Smad zavisnog puta, u kojem TGF- β posredstvom CTGF ostvaruje svoje efekte. CTGF može uticati na ćelijsku migraciju ali i izazvati proces epitelsko-mezenhimske tranzicije (EMT). Povećanoj ekspresiji CTGF u renalnim tubulskim ćelijama, osim TGF- β , doprinosi i hronična hiperglikemija (delom TGF- β , a delom PKC zavisnim putem), mehaničko istezanje ćelija i AGE produkti (131, 132). Blokodom aktivnosti CTGF može se inhibirati produkcija ECM i to kako ona indukovana aktivacijom CTGF, tako i ona indukovana sa AGE ili sa TGF- β . S druge strane, blokodom TGF- β (anti-TGF- β -antitelima) ne dolazi do blokade sinteze EM indukovane pomoću CTGF. Pored toga, CTGF indirektno igra značajnu ulogu u patogenezi DN modulacijom biološke aktivnosti drugih citokina umešanih u patogenezu glomerulskih oštećenja, jer CTGF poboljšava prosklerotični efekat IGF -I i povećava vezivanje TGF- β 1 za svoje receptore (75).

1.5.3. Faktor rasta trombocitnog porekla

Pored TGF- β 1, još je jedan faktor rasta uključen u progresivno bubrežno oštećenje, a to je faktor rasta trombocitnog porekla (PDGF) (133). Sistem PDGF je pokazao povećanu ekspresiju u glomerulima dijabetesnih pacova i kulturi MĆ izloženih hiperglikemiji, stimulišući sintezu TGF- β 1 u bubrežnim ćelijama i kasnije hipertrofiju i povećanu proizvodnju kolagena. Naime, PDGF posreduje preko oba mehanizma i hiperglikemijom i AGE zavisnom indukcijom kolagena III u kultivisanim MĆ kroz povećanu sintezu TGF- β 1 , što ukazuje da PDGF deluje kao intermedijalni faktor (127).

1.5.4. Hepatocitni faktor rasta i koštani morfogenički protein-7

Hepatocitni faktor rasta (HGF), multifunkcionalni polipeptid, i njegov specifičan tirozin kinaza receptor igraju značajnu ulogu u razvoju bubrega. U bubrezima, ekspresija HGF je ograničena na mezenhimalne ćelije, uključujući glomerularne MĆ, endotelne ćelije, intersticijalne fibroblaste i makrofage. Iako je HGF i njegov receptor stimulisan u dijabetesnim bubrezima pacova i ekspresija HGF indukovana hiperglikemijom u kulturi ćelija proksimalnih tubula i sabirnih kanalića, postoje novi dokazi da administracija HGF proteina, ili njegovog gena, na različitim životinjskim modelima hronične bubrežne bolesti potiskuje profibrogeni citokin TGF- β 1 i njegov receptor, inhibira aktiviranje miofibroblasta i slabi taloženje ECM i intersticijalnu fibrozu (134).

Poslednjih nekoliko godina, drugi protein, koji se zove koštani morfogeni protein-7 (BMP-7), zaokuplja sve veću naučnu pažnju vezano za dijabetesne bubrege. BMP-7, koji predstavlja homodimerni član superfamilije TGF- β 1, je prvenstveno eksprimiran u bubrežnim tubulima i glomerulima (135, 136). Na eksperimentalnim modelima DN, bubrežna kortikalna ekspresija BMP-7 se progresivno smanjuje i u tubulima i u glomerulima što je indukovano od strane TGF- β 1 (137). Nedavna istraživanja su pokazala takođe na eksperimentalnim modelima DN da primena BMP-7 redukuje glomerulsku patologiju, smanjujući fibrozu pri čemu je jedan od mehanizama inhibicija epitelno mezenhimalne transformacije (138).

1.5.5. Insulinu sličan faktor rasta I

Insulinu sličan faktor rasta I (IGF-I) je potentan mitogeni polipeptid. Iako je nivo cirkulišućeg IGF-I normalan ili smanjen kod pacijenata sa dijabetesom, lokalna produkcija IGF-I je povećana u bubrežnim ćelijama i ultrafiltratu, kao i fibroblastima u uslovima hiperglikemije, što ukazuje na ulogu IGF-I u patogenezi glomerularne hipertrofije i hiperfiltracije u dijabetesu (139). Povećan nivo bubrežnog IGF-I je u korelaciji sa patološkim promenama, kao što su povećana proliferacija mezangijalnih i tubularnih ćelija. Dodatni efekti IGF-I u bubrezima na ćelijskom nivou su promocija akumulacije ECM u MĆ, tubularnim ćelijama kao i fibroblastima. Pored toga, IGF-I zajedno sa CTGF, oba produkovana od strane bubrežnih fibroblasta, pokazuju kooperativnu indukciju povećane

sinteze kolagena tipa I i III u uslovima hiperglikemije, gde CTGF sam nema efekta na sekreciju kolagena (140).

1.5.6. Vaskularni endotelni faktor rasta

Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF), homodimerički glikoprotein, endotelni specifični faktor rasta koji promoviše glomerularnu i peritubularnu endotelnu ćelijsku proliferaciju i diferencijaciju, potentan je induktor vaskularne propustljivosti i vazodilatacije. U podocitima, distalnim tubulima i sabirnim kanalićima bubrega, dolazi do ekspresije VEGF. U DM, kako tipa 1, tako i tipa 2, serumska koncentracija VEGF je značajno povišena. Takođe, u bubrezima obolelih od DN, i to još u ranim fazama, dolazi do povećane ekspresije VEGF mRNA (141). Nakon upotrebe monoklonskih anti-VEGF antitela u dijabetesnih pacova, dolazi do smanjenja stepena bubrežne hiperfiltracije, albuminurije i glomerulske hipertrofije, što ukazuje na mehanizme štetnog delovanja VEGF (142).

1.5.7. Prorenin

Povišena vrednost serumskog prorenina, faktor je rizika za razvoj dijabetesne nefropatije kod dece i adolescenata (143). Prorenin se veže za specifični tkivni receptor kojim dolazi do aktivacije signalnog puta mitogen-aktivirajućih protein kinaza (engl. mitogen-activated protein kinases – MAPK), što potencira nastajanje bubrežnog oštećenja (144, 145). Na moguću važnu ulogu prorenina u razvoju dijabetesne nefropatije ukazali su Ichihara i sar. (146) na eksperimentalnom modelu DN. Naime, u njihovoj studiji, produžena blokada proreninskog receptora poništila je aktivaciju MAPK i na taj način je prevenirala razvoj DN usprkos povišenoj aktivnosti Ang II.

1.6. Hipoksija, oksidativni stres i inflamacija u dijabetesnoj nefropatiji

1.6.1. Hipoksija

Hronična hipoksija intersticijuma, važno obeležje DN, multifaktorijalna je i javlja se kao posledica nekoliko mehanizama koji deluju udruženo, kao što je anemija u ranoj fazi i gubitak peritubularnih kapilara u intersticijumu u kasnijoj fazi (147). Hipoksija je veoma potentan regulator genske ekspresije za širok spektar molekula i važan faktor u DN, pogoršava intersticijalnu fibrozu delom preko indukcije faktora kao što su TGF- β 1 i VEGF, koji vode apoptozi tubularnih ćelija ili EMT. Ova indukcija faktora rasta i citokina je posredovana preko hipoksija-inducibilnog faktora -1 (HIF-1) i Ang II. Administracija eritropoetina i blokada RAS u cilju očuvanja peritubularnog kapilarnog protoka i smanjenja oksidativnog stresa su značajni faktori poboljšanja bubrežne oksigenacije 34, 147, 148).

1.6.2. Oksidativni stres

Kiseonični radikali kontinuirano se produkuju u fiziološkim uslovima i efikasno eliminišu putem ekstra i intraćelijskih antioksidativnih mehanizama. Prevaga pro-oksidativnih nad antioksidativnim aktivnostima, koje mogu rezultovati celularnim oštećenjima, označava se kao oksidativni stres. Povećana produkcija kiseoničnih radikala jedan je od glavnih činilaca koji doprinose razvoju vaskularnih komplikacija dijabetesa (149), a oksidativni stres je povećan u bubrezima dijabetičara i pre ispoljavanja kliničkih znakova nefropatije (150). Sposobnost produkcije kiseoničnih radikala u uslovima hiperglikemije poseduju endotelne ćelije, vaskularne glatkomišićne ćelije, mezangijalne ćelije i ćelije renalnog tubulskog epitela, a dugotrajna hiperglikemija ne samo da uzrokuje povećanu produkciju kiseoničnih radikala, već deluje i inhibitorno na antioksidativne mehanizme (150). Naime, hiperglikemija dovodi do povećanja njihovog stvaranja, što po ćelije ima štetan efekat. Jedan od njih je povećano iskorišćavanje NO sa posledičnom generacijom peroksinitrita (151). Produkcija peroksinitrita dovodi do oštećenja proteina i DNA (152).

Zbog svojih reaktivnih hemijskih osobina da direktno vrše oksidaciju i oštećenja DNA, lipida, ugljenih hidrata i proteina, kiseoničnim radikalima se pripisuje jedna od ključnih uloga u razvoju dijabetesnih komplikacija. Osim direktnog toksičnog dejstva, kiseonični radikali mogu imati i karakteristike signalnih molekula sposobnih za aktivaciju

mnogobrojnih patoloških puteva, koji dovode do ćelijskih oštećenja (153). Tako kiseonični radikali, nastali u uslovima hiperglikemije, dovode do aktivacije transkripcionih faktora uz aktivaciju probirinoznih gena (154), a u mezangijalnim ćelijama posredstvom aktivacije PKC dovode do povećane aktivnosti MAP kinaze. Takođe, reaktivni kiseonični radikali posreduju u hiperglikemijom indukovanoj aktivaciji NF- κ B, kao i NF- κ B zavisnoj ekspresiji monocit hemoatraktantnog proteina (MCP-1) (155), ali i u povećanoj aktivnosti inhibitora aktivatora plazminogena-1 (PAI-1) i epitelnoj mezenhimalnoj tranziciji u bubrežnim tubulima (156, 157). Sa druge strane, PKC, TGF- β i Ang II mogu u uslovima hiperglikemije indukovati produkciju reaktivnih kiseoničnih radikala. NADPH oksidaza zavisnim putem, TGF- β i Ang II, dovode do povećane produkcije reaktivnih kiseoničnih radikala u bubrežnim ćelijama (156, 159). Stoga, jedan od renoprotektivnih mehanizama kojima ACE inhibitori ili inhibitori ANG II receptora deluju je i smanjenje produkcije reaktivnih kiseoničnih radikala (160). Osim toga, pokazano je da antioksidans taurin dovodi do sprečavanja aktivnosti PKC u glomerulima dijabetičara (161), što je jedan od dokaza da je aktivacija PKC posredovana i reaktivnim kiseoničnim radikalima.

1.6.3. Inflamacija

Inflamatorni putevi imaju centralnu ulogu u razvoju dijabetesnih komplikacija kao što je DN. Inflamaciju u dijabetesnom bubregu karakteriše povećana sinteza proinflamatornih citokina (IL-1, IL-6, IL-8, tumor nekrosis faktor), ushodna regulacija adhezionih molekula i povećana ekspresija hemoatraktnih citokina (MCP-1 i RANTES), sa poredičnom transmigracijom monocita, neutrofila i limfocita u bubrežno tkivo (162). Sve je više dokaza o ulozi proinflamatornih citokina u patogenezi DN (videti sliku 5). Pretpostavlja se da IL-1 povećava vaskularnu permeabilnost, proliferaciju mezangijalnih ćelija i taloženje EM (163), dok IL-6 pored uticaja na proliferaciju mezangijskih ćelija, doprinosi i povećanju količine fibronektina, kao i povećanoj ekspresiji adhezionih molekula na endotelnim ćelijama i vaskularnim glatko-mišićnim ćelijama (164).

Kod životinja sa dijabetesnom nefropatijom, pokazana je značajno veća renalna ekspresija TNF- α u poređenju sa životinjama koje nemaju dijabetes (165). Ovo povećanje renalne produkcije TNF- α kod dijabetičara može se pripisati hiperglikemijskim uslovima i delovanju AGE produkata. TNF- α se u bubrežima dijabetičara može proizvoditi i iz renalnih

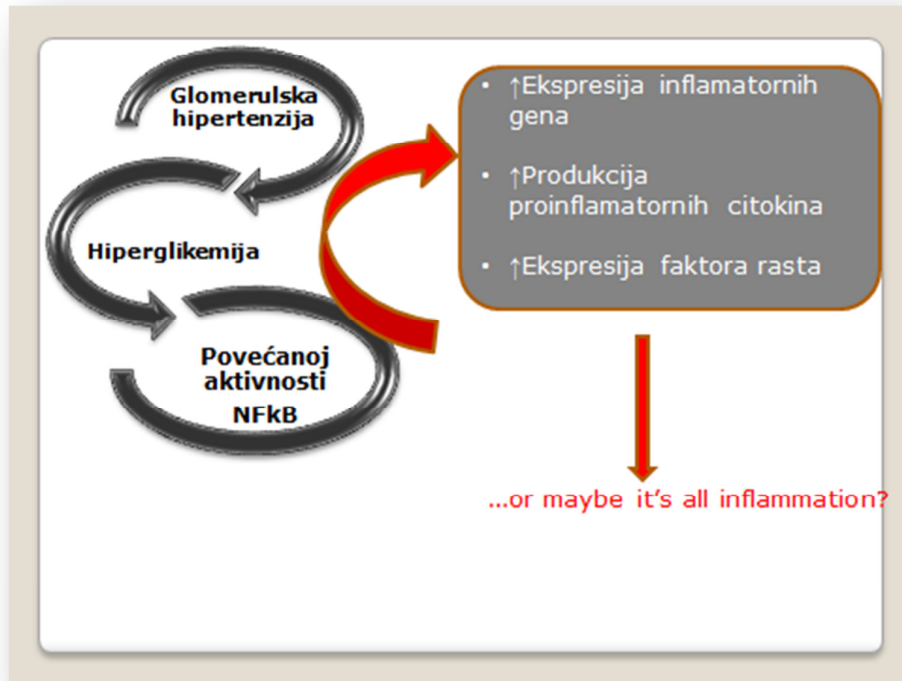
ćelija: mezangijalnih, glomerulskih, tubulskih i endotelnih (164). Osim toga, u ranoj fazi DN, MCP-1 stimuliše infiltraciju monocita u bubrežno tkivo (166), što dovodi do povećanog oslobađanja inflamatornih medijatora među kojima i TNF- α . Dijabetičari sa mikro- i makroalbuminurijom, odnosno bubrežnom insuficijencijom, imaju pored serumskih, povišenu koncentraciju TNF- α i u urinu (167). Štaviše, određivanje urinarne koncentracije TNF- α može se koristiti kao prediktivni marker razvoja i progresije renalnih oštećenja u DN. TNF- α dovodi do disbalansa između vazodilatatornih i vazokonstriktornih medijatora, do povećane produkcije slobodnih kiseoničnih radikala, uz posledično oštećenje glomerulske membrane i uz povećanu propustljivost za albumine (nezavisno od hemodinamskih promena na nivou bubrega, karakterističnih za dijabetes). Izlaganje epitelnih ćelija bubrežnih tubula povećanoj koncentraciji TNF- α dovodi do povećane sekrecije limfocit hemoatraktantnog faktora, kao i do povećane ekspresije intraćelijskog adhezionog molekula-1 (ICAM-1). Ovi procesi imaju ulogu u razvoju bubrežnih oštećenja u dijabetesu. Pored toga, TNF- α ispoljava i direktne citotoksične efekte na mezangijalne, glomerulske i epitelne ćelije bubrega (168).

C-reaktivni protein (CRP), pozitivni reaktant akutne faze, senzitivan je marker subkliničke sistemske inflamacije. Nivo CRP-a raste u ranim stadijumima DN, a s obzirom na njegovu udruženost sa biomarkerima glomerulskog i tubulointersticijskog oštećenja (kao što je npr. urinarna ekskrecija albumina) (169), može se upotrebiti kao koristan marker za detekciju i progresiju DN.

ICAM-1, protein čiju produkciju indukuju inflamatorni citokini, u značajnoj meri doprinosi renalnoj infiltraciji makrofaga u DN (170). Studije ukazuju da je renalna ekspresija, odnosno serumska koncentracija ICAM-1 povećana, kako u eksperimentalnim modelima DN, tako i kod bolesnika sa DN u poređenju sa osobama bez renalnih oštećenja (171, 172). Može se zaključiti da se serumski, ali i urinarni nivo ICAM-1 mogu iskoristiti kao markeri razvoja renalnih oštećenja u DN.

Kao što je već napomenuto, MCP-1 stimuliše infiltraciju monocita u bubrežno tkivo i to u ranoj fazi DN. Njegovu produkciju (in vitro) iz mezangijalnih ćelija, podocita i epitelnih tubulskih ćelija stimulišu hiperglikemija i AGE proizvodi. Pored toga, nivo MCP-1 je povišen u urinu pacijenata sa DN i u značajnoj je korelaciji sa padom JGF (173). Stoga bi se i urinarni nivo MCP-1 mogao koristiti kao jedan od markera progresije bubrežne bolesti kod bolesnika sa DN.

Slika 5 Uloga inflamacije u razvoju dijabetesne nefropatije



1.7. Strukturne promene u dijabetesnoj nefropatiji

Za nastanak morfoloških promena u DN odgovorni su brojni metabolički činioci i procesi, kao što su: hiperglikemija i neenzimatska glikolizacija (promene bazalne membrane i drugih struktura glomerula), povećan sadržaj poliola-sorbitola, smanjen sadržaj mioinozitola (oštećenje osmoregulacije u ćelijama), biohemijske promene u ekstraćelijskom matriksu (smanjena sinteza najvažnijeg glikozoaminoglikana heparin-sulfata, kao i sinteza sijalične kiseline – sijaloglikoprotein, povećana biosinteza kolagena, glavnog sastojka ekstraćelijskog matriksa), gubitak negativnog naelektrisanja glomerulske bazalne membrane, povećani intraglomerulski pritisak, kao i fizička sila, što sve može da ošteti površinu endotela i epitela, kao i normalnu funkciju glomerulske barijere; i dovodi do proteinurije i akumulacije proteina plazme u mezangijumu. U ranoj fazi dijabetesne nefropatije bubrezi su uvećni, kao i svi glomeruli i njihovi nefroni. Na ovo utiču hemodinamski činioci, kao i hiperglikemija (174, 175). Jedna od značajnijih strukturnih promena koja nastaje u toku razvoja i progresije DN je svakako promena na nivou podocita, što će detaljno biti opisano u narednom poglavlju.

1.7.1. Podociti i dijabetesna nefropatija

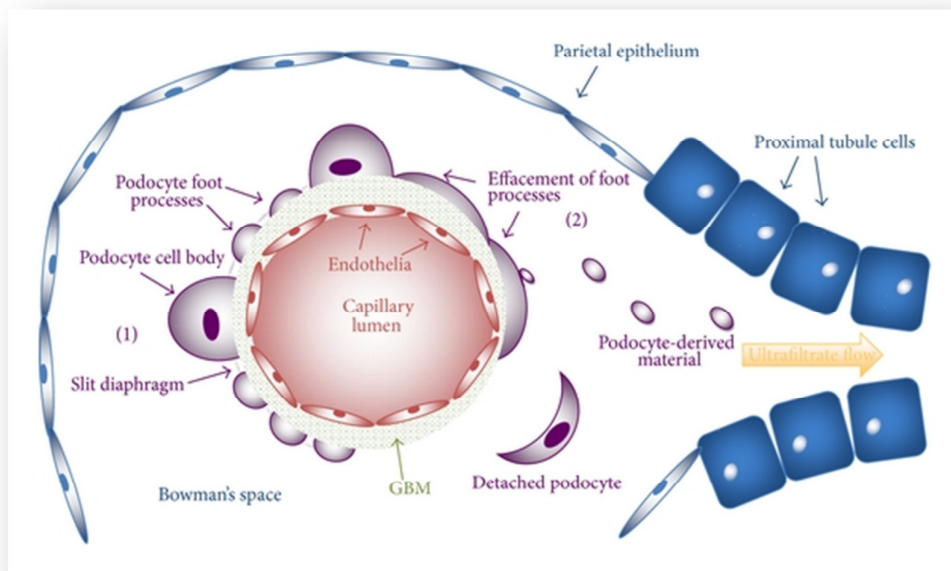
Iako se patofiziologija MČ već dugo smatra kao centralno mesto razvoja DN, istraživanja poslednjih godina su identifikovali podocyte kao centralnu metu za efekte metaboličkog ambijenta u razvoju i progresiji albuminurije u oba tipa DM (74, 125). Podociti su visoko diferencirane ćelije sa složenom ćelijskom morfologijom, koje direktno pokrivaju GBM (34, 75). »Telo« ćelije se grana u produžetke prvog, a potom drugog reda, a ovi u prstaste produžetke (engl. „*foot procesus*“) koji pokrivaju površinu kapilara u vidu isprepletanih prstiju dve šake. Prstasti produžeci (PP) naležu na GBM, a između njih se nalazi međućelijska spona ili opna (engl. »*slit diaphragm*« SD) koja pokriva pukotinaste procepe (176). SD je ključno mesto za održavanje integriteta i funkcije podocita, a zapravo je kompleks koji predstavlja funkcionalnu jedinicu sastavljenu od većeg broja proteina (kao npr. nefrin, ZO-1, P-kadherin, katenini, podocin, ACTN4, and CD2 –associated protein). Glavna komponenta ovoga kompleksa jeste nefrin, član superfamilije imunoglobulinskih adhezivnih proteina, sa dugim ekstracelularnim i kratkim intracelularnim delom molekula. Smatra se da se molekuli nefrina, antiparalelno postavljeni između susednih PP, sustiču na sredini SD i da tvore filter za proteine. Bazalnim delom PP naležu na GBM, a interakcija citoskelet-GBM ostvaruje se vezom receptora u PP, $\alpha 3/\beta 1$ integrina i distroglikana (»sidra PP«) sa ligandima u GBM, lamininom-11 ($\alpha 5/\beta 2/\gamma 1$), kolagenom tipa IV, agrinom, perlekanom i drugim sastojcima GBM. Ovi proteini, kao i proteini SD, od ključnog su značaja za normalnu funkciju filtracione barijere (177, 178).

Podociti su glavne glomerularne ćelije uključene u formiranju GBM, jer proizvode većinu komponenti GBM, kao što su $\alpha 3$ lanac kolagena tipa IV, fibronektin, laminin, agrinin, i heparin sulfat proteoglikan. Kod dijabetičnog glomerula dolazi do povećanja kolagena tipa IV, fibronektina i laminina, dok je ekspresija agrinina i heparin sulfat proteoglikana smanjena (179). Smanjen sadržaj ovih negativno naelektrisanih molekula GBM doprinosi gubitku elektronegativnosti glomerularne filtracione barijere, što doprinosi razvoju i progresiji proteinurije (180).

Osim toga, strukturne abnormalnosti PP podocita opisane kod DN, direktno korelišu sa stopom urinarne ekskrecije albumina (UEA). Pored strukturnih promena PP podocita, broj i gustina podocita je značajno smanjena (podocitopenia) u dijabetičara sa tipom 1 ili 2 dijabetesa (181). U bubregu odraslih osoba, podociti nisu u stanju da se podvrgnu regenerativnoj proliferaciji da bi se nadoknadio gubitak podocita ili povećanje površine

GBM. Stoga nije jasno da li u DN postoji apsolutna redukcija broja podocita, ili relativna redukcija, zbog povećanja površine GBM (182). Zbog toga će strukturne promene PP podocita, kao što je hipertrofija PP, biti kompenzatorni odgovor preostalih podocita u pokušaju da se pokrije ogoljeni deo GBM. U stvari, podocitopenia se pogoršava sa napredovanjem proteinurije, u kojoj gubitak ćelija može nastati kao rezultat disregulacije od $\alpha 3/\beta 1$ integrina, glavnog adhezionog kompleksa koji povezuje podocite sa GBM, što je pokazano u nekoliko do sada objavljenih studija (183). Osim toga, disregulacija produkcije nefrina i njegovo smanjenje u DN, takođe utiče na strukturne promene PP podocita i doprinosi razvoju proteinurije (slika 6).

Slika 6. Podocitopatija – „brisanje“ PP i gubitak podocita



(1) Prikazuje izgled zdravog normalnog PP sa postojećom SD između. Nasuprot tome, desna strana kapilara ukazuje na povredu podocita, strukturne promene PP i gubitak podocita (2) (Preuzeto: R C Wiggins. *The spectrum of podocytopathies: A unifying view of glomerular diseases. Kidney International* 2007; 71:1205–1214)

Takođe postoje alternativna objašnjenja proteinurije kod DN kao rezultat disregulacije od strane tubulskih ćelija. Naime, do sada se smatralo kako je reapsorpcija proteina u proksimalnim kanalčićima jednostavan proces, nespecifična endocitoza. Uvrnućem apikalne membrane ćelija proksimalnih tubula nastaju pinocitotski mehurići koji sadržavaju

reapsorbovane proteine, koji se potom spajaju s lizosomima, ćelijskim organelama koje sadrže kisele hidrolaze. Apsorbovani proteini budu u potpunosti hidrolizirani unutar lizosoma, te se na kraju slobodne aminokiseline vraćaju u cirkulaciju na kontraluminalnim membranama. Danas znamo da je proces pinocitoze odnosno endocitoze regulisan receptorima koji se nalaze na četkastoj površini ćelija proksimalnih tubula. Najvažniji receptori su megalin i kubulin. Manji dio albumina nakon filtracije se ne reapsorbuje i izlučuje se urinom (oko 10 mg u 24 sata), a veći deo se veže za receptore, megalin i kubulin, i reapsorbuje se endocitozom. Unutar ćelija razgrađuje se u lizosomima i vraća u cirkulaciju, a oslobođeni receptori vraćaju se na površinu tubularnih ćelija. Stoga albuminurija u patofiziološkim uslovima, kao što je DN, može biti posledica oslabljene reapsorpcije od strane tubulskih ćelija (184).

1.7.2. Tubulointersticijalna fibroza u dijabetesnoj nefropatiji, endotelna i epitelna mezenhimalna transformacija

Patofiziologija tubulointersticijalne fibroze može se podeliti u četiri proizvoljne faze (185):

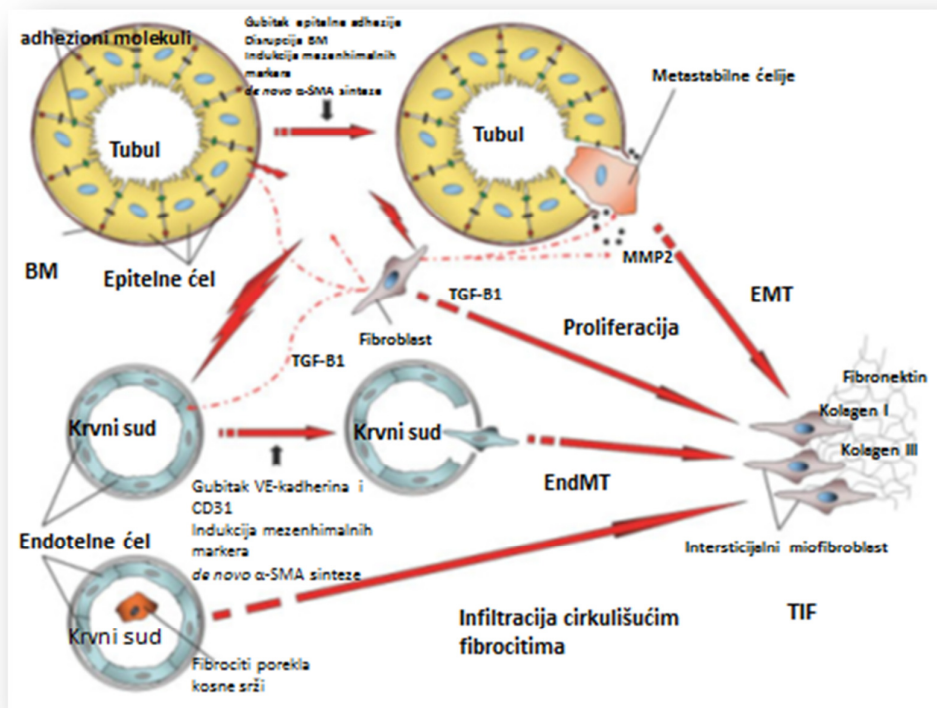
1. faza ćelijske aktivacije i povrede,
2. faza fibrogene signalizacije,
3. faza fibrogeneze,
4. faza destrukcije.

U prvoj fazi, tubularne, perivaskulne i mononuklearne ćelije se aktiviraju; one počinju da naseljavaju intersticijum i oslobađaju proinflamatorne molekule i molekule povrede. Druga faza se karakteriše produkcijom profibrotičkih faktora kao što su TGF- β 1, CTGF, Ang II i PDGF. U trećoj fazi produkcija ECM se povećava, degradacija matriksa smanjuje, što rezultuje četvrtom fazom, gde se broj intaktnih nefrona progresivno smanjuje rezultujući progresivnim smanjenjem glomerulske filtracije.

U nastanku tubulointersticijalne fibroze značaj imaju dva mehanizma, koja se zovu endotelno-mezenhimalna transformacija (EndMT) i epitelno-mezenhimalna transformacija (EMT) (186, 187). To su procesi u kojima endotelne i tubularne ćelije gube endotelni i epitelni fenotip i stiču karakteristična mezenhimalna svojstva uključujući i mogućnost sinteze matriksa. U oba procesa ćelije podležu biohemijskim promenama i dediferencijaciji u aktivne miofibroblaste. Miofibroblasti zauzvrat doprinose razvoju dijabetesne bubrežne intersticijalne fibroze preko sinteze i sekrecije ECM. Naime, proksimalne tubulske ćelije su dominantni tip ćelija u normalnom bubrežnom intersticijumu u kojem postoji relativno malo intersticijalnih fibroblasta. Ove intersticijalni fibroblasti leže blizu suprotne strane proksimalne tubulske bazalne membrane (TBM) i njihov broj se progresivno uvećava u DN (188). Tubulske ćelije, kako je rečeno, preuzimaju fenotipski izgled aktivisanih miofibroblasta, koji su pozitivni na α -glatko mišićni ćelijski aktin (α -SMA) i fibroblast specifični protein (FSP-1), i oni su glavni izvor proširenja ECM, i direktni uzrok fibroze. Uloga aktiviranih miofibroblasta u bubrežnoj fibrozi je široko prihvaćena, ali je njihovo poreklo još uvek kontraverzno. Prvi su Strutz i sar. (189) postavili hipotezu, a onda su Iwano i sar. (190) potvrdili da više od 36% svih intersticijalnih fibroblasta vode poreklo od tubularnih ćelija preko EMT. EMT je precizno regulisan proces koji karakterišu četiri ključna događaja:

1. gubitak adhezije epitelnih ćelija (npr. E-kadherin adhezionog kompleksa),
2. de novo α -SMA ekspresija i reorganizacija aktina,
3. narušavanje TBM, i
4. povećana ćelijska migracija i invazija intersticijuma (191).

Slika 7. Proces tubulointercijalne fibroze u dijabetesnoj nefropatiji.



Legenda: EndMT-endotelno mezenhimalna transformacija, EMT-epitelno mezenhimalna transformacija, TIF-tubulointercijalna fibroza, BM-bazalna membrana. (Preuzeto Trends Endocrinol Metab 2010; 21:50–6)

Poznato je nekoliko faktora koji igraju važnu ulogu u indukciji EMT i posledičnoj fibrozi. Npr., hronična hipoksija u tubulointercijumu proizvodi AGE, CTGF i metaloproteinaze, stimuliše EMT u modelima bubrežnih bolesti, ali iznad svih, kao centralni medijator fibrotičkog odgovora dijabetesnog bubrega i regulatora EMT se izdvojio multifunkcionalni citokin TGF- β 1. Drugi otkriveni mehanizam stvaranja miofibroblasta u ranoj fazi dijabetesne bubrežne fibroze je EndMT, gde su aktivisani miofibroblasti endotelnog porekla. Slično EMT i EndMT takođe može biti indukovana TGF- β 1 i inhibisana od strane BMP-7 (192, 193) (slika 7).

Pokazano je, takođe, da povećanje TBM predstavlja sastavni deo rane nefropatije kao rezultat hiperglikemije i izmenjene produkcija komponenti matrixa tubularne bazalne membrane (194). Npr., izlaganje humanih proksimalnih tubulskih ćelija visokim koncentracijama glukoze dovodi do povećane produkcije kolagena tipa IV i fibronektina u supernatantu kulture, sa disregulacijom procesa odgovornih za njihovu razgradnju. Tubulske

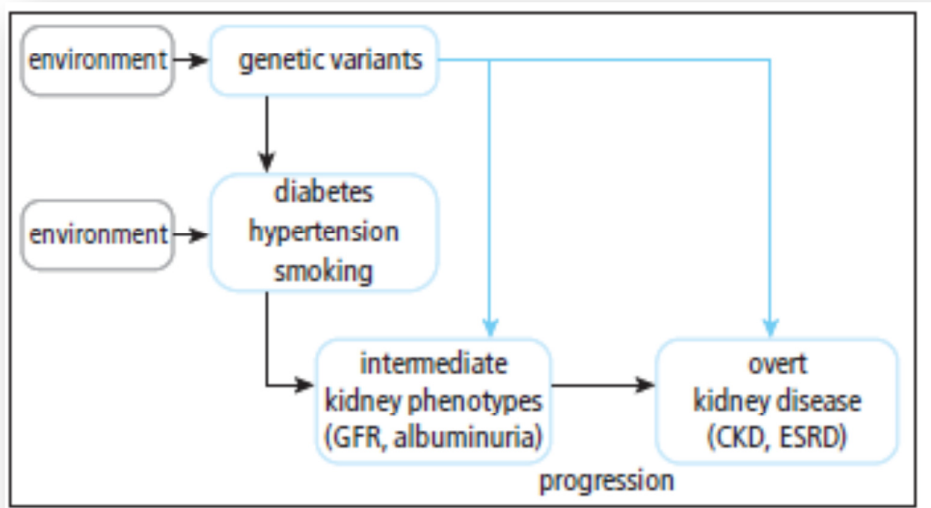
ćelije u dijabetesu pokazuju visoku koncentraciju glukoze i posledica ove intracelularne akumulacije glukoze je aktivacija patoloških metaboličkih puteva kao što je put poliola. Metabolizam heksoze ili pentoznih šećera od strane ovog puta je od velikog značaja u glukozi-posredovanim promenama proksimalni tubulskih ćelija, ali je takođe pokazano da postoji značajna varijabilnost u sposobnosti proksimalne tubulskih ćelija za aktiviranje puta poliola, što može da bude jedan od faktora koji objašnjava heterogenu prirodu DN (195). Dodatna promena bubrežne strukture u ranoj fazi DN je tubularna hipertrofija, koja nije posredovana aktivacijom patološkog puta poliola, ali je donekle povezana sa povećanom absorpcijom natrijuma od strane proksimalnih tubula. Tubularnoepitelna hipertrofija se karakteriše zaustavljanjem ćelija u G1 fazi ćelijskog ciklusa, što je jedan od prekusora kasnijih ireverzibilnih promena tubulointersticijalne ultrastrukture, dovodeći do tubularne atrofije i intersticijalne fibroze. Udruženost između rasta i fibrogeneze može biti zbog iste mreže citokina i faktora rasta, koji indukuje ćelijsku hipertrofiju kao i stimulaciju sinteze i deponovanja ECM (194). Mast ćelije, koje igraju ključnu ulogu u inflamatornim procesima, takođe su povezane sa razvojem DN kod ljudi. Broj ovih infiltrirajućih ćelija je značajno povećan u intersticijumu u DN u poređenju sa zdravim bubrežnim tkivom. Mast ćelije su uglavnom lokalizovane periglomerularno i peritubularno, nikada unutar glomerula, i one direktno doprinose akumulaciji ECM i utiču na fibroblastnu aktivnost u DN (196).

1.8. Značaj genetskih faktora u razvoju dijabetesne nefropatije

Nekoliko faktora, kao što su hiperglikemija, hiperlipidemija, hipertenzija i proteinurija, doprinose progresiji bubrežnog oštećenja u dijabetesnoj nefropatiji. Međutim, oni su podržani i specifičnom genetskom osnovom, jer kako je prethodno rečeno, 20–40% pacijenata sa tipom 1 i 2 razvije dijabetesnu nefropatiju bez obzira na glikemijsku kontrolu. Pored toga, bolest često uključuje bliske srodnike i određene etničke grupe.

Glavna pitanja vezana za DN još uvek nemaju odgovor, a to su: šta tačno pokreće nastanak i progresiju DN; kako se može proceniti rizik za DN; i koji je relativni doprinos genetske osnove, pojedinačnog genetskog profila, glikemijske kontrole i faktora okoline (197, 198) (slika 8).

Slika 8. Predloženi model interakcije gena, faktora rizika okoline i faktora rizika za hronične bolesti bubrega u razvoju dijabetesne nefropatije.



Legenda: ESRD-terminalni stadijum bubrežne bolesti, GFR-jačina glomerulske filtracije, CKD-hronična bubrežna bolest. (Preuzeto: *Genetic risk factors for diabetic nephropathy, Chapter 3, Diabetes and Kidney Disease, First Edition. Edited by Gunter Wolf, 2013*)

Prvi dokazi koji povezuju genetsku osnovu sa DN su prikupljeni iz familijarnih studija i incidentnih modela. Još pre mnogo godina u Wisconsin epidemiološkoj studiji Kleina i sar. (199) uočeno je da se metabolička kontrola nije razlikovala kod onih sa i bez nefropatije, kao i da veći broj pacijenata sa dijabetesom nije razvio nefropatiju, uprkos višegodišnjoj hroničnoj hiperglikemiji. Familijarno grupisanje bolesti nezavisno od metaboličke kontrole zabeleženo je i u studiji Seakuist i sar. (200), koji su pokazali da bliski srodnici bolesnika sa dijabetesom tipa 1 i nefropatijom imaju četiri puta veći rizik za razvoj DN, što neminovno ukazuje na genetski uticaj ishoda ove studije.

Poslednjih godina veliki broj istraživanja je usmeren na ispitivanje povezanosti gena kandidata i razvoja dijabetesne nefropatije. Možemo reći da je DN kompleksna genetska bolest u čiji razvoj može biti uključeno više gena. Strategije za „traženje“ gena predstavljaju dva različita pristupa, i to „case-control“ povezane studije i familijarne studije. Studije gena kandidata u pogledu genetskog aspekta DN do sada su dala dosta nekonzistentne rezultate (201). Što se tiče familijarnih studija, pristup nije lak jer ne postoji jednostavan Mendelian

model nasleđa, a zbog kraćeg životnog veka oboleli roditelji potomaka sa dijabetesom su umrli. Iz tog razloga, mnoge porodične studije su bazirane na osnovu analiziranja braće ili sestara.

Izbor gena kandidata koji se istražuje zavisi od njegove uloge u patofiziologiji DN, kao što su oni koji učestvuju u kontroli krvnog pritiska, u nastanku i težini proteinurije, zatim inzulinske rezistencije, metabolizmu lipida i drugih patoloških puteva uključenih u razvoj i progresiju DN (202, 203). Među brojnim genima kandidatima, koji bi mogli da budu odgovorni za određivanje brzine njene progresije, i u dijabetesu tipa 1 i u dijabetesu tipa 2, najčešće se pominju oni vezani za *ACE genotip* (204, 205). Naime, poslednjih godina potvrđeno je da je genska predispozicija za dijabetesnu nefropatiju i esencijalnu hipertenziju zajednička. Geni uključeni u regulaciju arterijskog pritiska se smatraju za gene kandidate koji su odgovorni za pojavu i razvoj nefropatije. S druge strane genetska predispozicija za komplikacije na bubrezima kod dijabetičara može biti nezavisna od sistemskog pritiska. Lokalne promene, kao posledica prisustva različitih polimorfizama gena renin-angiotenzinskog sistema, ispoljavaju se kao promene u bubrežnoj hemodinamici, povećanju intraglomerularnog pritiska i nivoa glomerularne filtracije, kao značajnih determinanti bubrežne funkcije. Ispitivanjem "osetljivosti na so", čija je incidenca povećana kod hipertenzivnih bolesnika sa dijabetesom tipa 2 je bar delimično, genetski određena, pri čemu još uvek nije jasno, da li ovaj fenotip određuju isti geni, koji određuju ACE/ID polimorfizam, da li on ima uticaja na povećanje rizika za nastanak funkcionalnog i/ili strukturnog oštećenja bubrega i da li, na bilo koji način, utiče na antiproteinurijski odgovor na neke antihipertenzivne lekove (206, 207).

Sledeći gen kandidat koji je bio donekle proučavan u pogledu uloge u razvoju DN je vezan za aldozoreduktazu enzim, koji ima značajnu ulogu u poliolskom metaboličkom putu i doprinosi razvoju mikrovaskularnih komplikacija dijabetesa. Nekoliko mehanizama je predloženo da objasni kako povišena AKR1B1 aktivnost vodi hiperglikemijom indukovanoj leziji različitih tkiva (208). Ko i sar. prvi su identifikovali sedam alela na lokusu (AC)_n dinukleotid ponovljene sekvence uzvodno od AKR1B1. Najčešće alel sadrži 24 (AC) sekvencu i dobio je ime Z (209). Nekoliko studija je pokazalo korelaciju između alela Z-2, i osjetljivosti sa povećanim rizikom za razvoj DN u oba tipa dijabetesa (210; 211; 212; 213 214). Drugi AKR1B1 polimorfizam je uočen kod položaja 106 njegove promotorske regije. Ovaj C106T polimorfizam je identifikovan u Kavkazijskih i Azijskih ispitanika sa tipom 1 ili 2 dijabetesa koji su imali dijabetesnu nefropatiju. Sivenius i sar. (215) i Goseki sar.(216) su

predložili da ovaj polimorfizam može biti uključen u rani razvoj mikroalbuminurije kod finskih pacijenata sa tipom 2 dijabetesa. Svi ovi rezultati pokazuju da AKR1B1 polimorfizmi igraju ulogu u razvoju DN.

Transporter glukoze 1 (GLUT-1), koji je glavni predstavnik familije transportera glukoze, a koji su prisutni na površini glomerularnih ćelija odnosno, MĆ, endotelnim ćelijama i podocitima, takođe je ispitivan kao gen kandidat u razvoju komplikacija dijabetesne bolesti. GLUT-1 ima značajnu ulogu u povećanju intraćelijske koncentracije glukoze, aktiviranjem patoloških puteva (217, 218). Nekoliko do sada objavljenih studija pokušalo je utvrditi da li GLUT-1 može biti gen kandidat koji vodi ka povećanoj osetljivosti za razvoj DN. U studiji Ng i sar. (219), potvrđuje se da su pojedinačne nukleotidne sekvence (SNP) na GLUT-1 (XbaI-intronski 2 i HaeIII SNP-eksonu 2) povezane sa povećanom osetljivošću ka razvoju DN kod dijabetesa tipa 1. Iako ove SNP daju znatan pojedinačan rizik za DN, one se odnose na ograničen broj slučajeva među pacijentima sa tipom 1 DM. Meta-analize su ukazale na značajnu povezanost između SLC2A1 XbaI polimorfno mesto i DN, ali su potrebne veće studije da bi potvrdile ovu tezu (220).

Apolipoprotein E gen (APOE) na hromozomu 19q je takođe povezan sa povećanom osetljivošću za razvoj DN u tipu 1 DM (221) i tipu 2 DM (222). APOE je polimorfni protein koji sadrži tri izoforme, E2, E3 i E4, kodirni od strane alela ϵ_2 , ϵ_3 , ϵ_4 , (223). E2 alel se smatra vodećim u povećanom riziku za razvoj DN, dok se za E4 alel smatra da ima protektivnu ulogu. Oba alela su povezana sa razvojem DN u meta analizama (224).

Adiponektin je adipocitokin produkovan od strane lipocita (225). Nivo cirkulišućeg adiponektina je redukovano kod pojedinaca koji su gojazni i imaju dijabetes, pri čemu se njegov nivo povećava kod redukcije telesne mase. Pozitivna korelacija je uočena između nivoa cirkulišućeg adiponektina i HDL-a, kao i negativna korelacija u odnosu na inflamatorne markere, trigliceride i u odnosu na inzulinsku rezistenciju. Adiponektin gen (ADIPOQ) polimorfizam je pokazao protektivnu ulogu u osetljivosti za razvoj koronarnih srčanih bolesti (226). Imajući u vidu jasnu vezu između ateroskleroze i DN, ADIPOQ gen bi mogao igrati ulogu u oba vaskularna procesa. U nedavno objavljenim analizama je pokazano da rs17300539 gena ADIPOQ-na, za koji se veruje da ublažava oštećenja krvnih sudova, nije bio povezan sa DN (224).

Peroksizmalni proliferativni aktivisan receptor gama 2 (PPAR γ 2) je predominantna adipozna izoforma ovog receptora sa selektivnom ekspresijom u adipoznom tkivu gde

modulira ekspresiju gena uključenih u adipocitnu diferencijaciju i glukoznu homeostazu. Zbog toga se PPAR γ 2 smatra glavnim genom kandidatom za tip 2 DM i/ili gojaznost i nedavno za tip 2 DN. Do sada su tri studije evaluirale njegovu vezu sa tipom 2 DN. U studiji Herrmann i sar. (227), pro12Ala polimorfizam je povezan sa niskim nivoom urinarne albuminske ekskrecije među nosiocima Ala12 kod ispitanika sa tipom 2 DN. Ovi rezultati su potvrđeni i od strane Caramori i sar. (228). Takođe, Pollex i sar. (229) su pokazali da nosioci alela Ala12 imaju manju incidencu mikroalbuminurije. Svi ovi rezultati ukazuju na protektivnu korelaciju između Ala12 polimorfizma i nivoa albuminske ekskrecije. Tačan mehanizam koji dovodi do protektivnog delovanja Ala12 alela još uvek je nepoznat.

Aducin (ADD) je heterodimerni citoskeletni protein sastavljen od α , β , γ . Ovi proteini su kodirani od strane tri gena (ADD1, ADD2 i ADD3) koji su mapirani na različitim hromozomima. ADD geni pokazuju sličnu gensku strukturu što ukazuje na njihovu devijaciju od jednog gena koji je prošao duplikaciju i pregradnju tokom evolucije. Kod čoveka, ADD1 pokazuje značajnu ekspresiju, dok je ADD2 posebno eksprimiran u nervnom, bubrežnom i eitropoetskom tkivu (230). α -subjedinica reguliše aktivnost transmembranske jonske pumpe i kodirana je od strane ADD1 gena, lociranog na hromozomu 4q21. U velikoj studiji koja je proučavala povezanost α -aducin gena i genetske osnove za razvoj DN, Conway i sar. (231) su otkrili da nema dokaza o povezanosti varijacija-adducin gena i razvoja nefropatije kod irskog stanovništva. Dok oni ne mogu isključiti mogućnost manjeg učinka gena, malo je verovatno da uobičajena varijacija unutar-adducin gena igra važnu ulogu u genetskoj predispoziciji za DN kod irskog stanovništva. Rezultati druge studije, koja je proučavala gen ADD2, ukazuju na to da zajednički polimorfizam i eventualne funkcionalne varijante u genu ADD2 ne mogu uticati na genetsku osetljivost za DN kod bolesnika bele rase sa tipom 1 DM (232). Većina studija o ulozi adducina je sprovedena na hipertoničarima, a manji broj na oblolelim od DN. Lanzani i sar. (233) su opisali epistatsku interakciju između adducin gena (ADD1 i ADD3) u velikoj grupi nelečenih hipertenzivnih ispitanika. Pacijenti koji su nosili oba alela ADD1 Trp i ADD3 G/G imali su značajno više vrednosti sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska. Do sada postoji mali broj studija koji su se bavili efektom aducina na razvoj i progresiju DN.

Inflamatorni citokini geni takođe mogu biti geni kandidati za povećanu osetljivost ka razvoju i progresiji DN. Nekoliko gena, kao što su geni vezani za IL-1, IL-6, IL-18, i MCP-1, do sada su bili proučavani u tom pravcu. Ng i sar.(234) su objavili povezanost haplotip IL-6

gen sa smanjenom funkcijom bubrega kod DN. IL-6 gen je pronađen na hromosomu 7p21, koji sadrži lokus povezan sa smanjenom JGF kod dijabetesa tipa 2. Ispitali su reprezentativnih šest SNP-ova u IL-6 gen- pet „tiggig“ SNP-ova i jedna prethodno pronađen promotor SNP (rs1800796,-634G> C), i pokazali da je haplotip koji sadrži svih tih šest SNP-ova bio značajno povezan s oslabljenom funkcijom bubrega, ali ne i sa urinarnom ekskrecijom albumina kod bolesnika s dijabetesom tipa 2. Poveznost IL-6 gena sa DN je takođe bila predmet proučavanja drugih studija, kao što je studija Kitamura i sar (235), koji su ispitali vezu rs1800796 (-634G>C) sa albuminurijom, i Abrahamian i sar. (236), koji su ispitali vezu između rs1800795 (-174G>C) sa albuminurijom. Međutim, zbog malog broja ispitanika koji su bili uključeni u ove studije rezultati nisu bili ubedljivi, te su potrebna dalja istraživanja koja bi potvrdila vezu između IL-6 genskog polimorfizma i ove bolesti. Što se tiče drugih inflamatornih gena, uključujući IL-1 gen smešten na hromosomu 2q i TNF alfa na hromosomu 6p21, zatim hemokini i njihovi receptori bili su takođe ispitivani ali nisu dale definitivne zaključke (237).

Poslednjih godina, međutim, dobro organizovani pristupi ispitivanja genetske osnove za DN, kao što su *Genome-wide association studies (GWAS)*, sprovede se u nekoliko nezavisnih populacija; što će omogućiti bolje rezultate u pogledu genetske osetljivosti za dijabetesnu nefropatiju i to u bliskoj budućnosti .

2. FAZE RAZVOJA DIJABETESNE NEFROPATIJE

Prirodni tok razvoja DN može se podeliti u nekoliko jasno definisanih faza koje su prikazane u tabeli 1, a više se odnose na bolesnike sa šećernom bolesti tipa 1 i u manjoj meri na one koji imaju dijabetes tipa 2 (238). Na ranu fazu hiperfunkcije bubrega nadovezuje se razdoblje kliničke latencije koje može trajati i do 20 godina. Nakon toga sledi period u kojem mikroalbuminurija napreduje do jasne nefropatije, brzog smanjivanja JGF u razdoblju od nekoliko godina i terminalnog stadijuma hronične bubrežne insuficijencije. Brzina gubitka JGF je individualna, i kreće se od 2 do 20 ml/min/godišnje. Kod 50% bolesnika sa šećernom bolesti tipa 1 i DN, terminalni stadijum bubrežne insuficijencije nastane nakon 10 godina, a kod 75% bolesnika nakon 20 godina (239).

Tabela 1. Faze razvoja dijabetesne nefropatije

Faze razvoja	JGF	Albuminurija	Krvni pritisak	Razdoblje (godine)
Hiperfunkcija bubrega	Povećana	Odsutna	Normalan	Dijagnostikovanje
Klinička latencija	Visoka/ normalna	Odsutna		
Mikroalbuminurija	Normalna	(30–300 mg/dan)	Normalan ili povišen	5–15
Manifestne proteinurija	Snižena	(>300 mg/dan)	Povišen	10-15
Bubrežne insuficijencija	Jako snižena	Masivna	Povišen	15–30

Najranije promene u funkciji bubrega kod dijabetesne nefropatije su, kao što je prethodno naglašeno, glomerulska hiperfiltracija i hipertenzija, za šta su odgovorni hemodinamski i vazoaktivni faktori. U ranoj fazi DM tipa 1 javljaju se i promene u funkciji tubula, povećana reapsorpcija glukoze prati i povećana reapsorpcija natrijuma, smanjuje se njegov dotok u distalne tubule, što uslovljava povećanje JGF-a putem glomerulo-tubulske povratne sprege. Smanjena je tubulska reapsorpcija fosfata, a insulin povećava tubulsku reapsorpciju natrijuma u distalnim i fosfata u proksimalnim tubulima (1, 37).

Druga značajna funkcionalna promena bubrega u dijabetesnoj nefropatiji jeste mikroalbuminurija, koja je kod DM tipa 1 znak rane pojave dijabetesne nefropatije, a kod DM tipa 2 znak povećanog rizika od kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta (240). U kasnoj fazi dolazi do progresivnog smanjenja JGF-a uz smanjenje efektivnog bubrežnog protoka plazme, odnosno smanjenja koeficijenta ultrafiltracije (smanjenje kapilarne površine glomeruskog filtra). Proteinurija je obilnija i manje selektivna, što je posledica gubitka selektivnosti zavisne od veličine molekula, ali se održava i smanjena selektivnost uzrokovana promenom naelektrisanja membrane, i ona je tubulskog porekla. Progresija dijabetesne nefropatije dovodi do izraženog nefrotskog sindroma. Kad se razvije, bolest naglo napreduje, razvija se azotemija, a terminalni stadijum nastupa nakon 5–10 godina od pojave proteinurije. Bolesnici sa nefrotskom proteinurijom imaju brzo pogoršanje i 1/3 njih završi u terminalnoj fazi (241, 242).

Kod mnogih bolesnika s dijabetesom tipa 2 moguće je dijagnosticirati mikroalbuminuriju i manifestnu nefropatiju gotovo istovremeno s postavljanjem dijagnoze šećerne bolesti, što je uglavnom posledica kasnog prepoznavanja bolesti (8, 9, 238). Bez specifičnog lečenja kod 20 do 40% bolesnika s dijabetesom tipa 2 i mikroalbuminurijom razviti će se DN, koja će tokom sledećih 20 godina kod približno 20% bolesnika napredovati do terminalnog stadijuma hronične bubrežne insuficijencije. Brzina progresije bolesti individualna je i ne razlikuje se bitno od one kod bolesnika s dijabetesom tipa 1 (240, 243).

3. FUNKCIJSKO ISPITIVANJE BUBREGA U DIJABETESU

U toku razvoja DN dolazi do funkcionalnih i strukturnih promena bubrega pod dejstvom različitih hemodinamskih i metaboličkih faktora. Izuzetno je značajno da se određenim funkcijskim metodama prati stanje i funkcija bubrega jer blagovremeno otkrivanje i adekvatan tretman mogu znatno da uspore razvoj i progresiju dijabetesne nefropatije. Kako je bubrežna funkcija izuzetno složena, jasno je da je vrlo teško pronaći idealan i jednostavan način da se proceni i obuhvati najveći broj promena koji se dešavaju tokom razvoja patološkog procesa. S toga su nam na raspolaganju brojne metode funkcijskog ispitivanja bubrega u dijabetesnih bolesnika gde spadaju pregled urina, određivanje azotnih materija u krvi i određivanje ukupnih bubrežnih klirensa za procenu jačine glomerulske filtracije i efektivnog bubrežnog protoka plazme.

Analiza sastava urina predstavlja prvu stepenicu u dijagnostičkom algoritmu za procenu funkcionog statusa bubrega kod dijabetesnih bolesnika. Određivanje glukoze u urinu dijabetesnih bolesnika nema veliki značaj u proceni funkcije bubrega osim da nalaz glikozurije kod lečenih dijabetesnih bolesnika ukazuje na neadekvatnu regulaciju šećerne bolesti što je jedan od faktora rizika za razvoj i progresiju dijabetesne nefropatije. Sa druge strane određivanje albuminurije i proteinurije ima poseban značaj u proceni funkcionog statusa bubrega kod dijabetesnih bolesnika što će u narednom poglavlju biti detaljno opisano.

Određivanje azotnih materija u krvi, a to su urea, kreatinin i mokraćna kiselina, u proceni funkcionog statusa bubrega kod dijabetesnih bolesnika, samo u najširem smislu spada u

funkcijsko ispitivanje bubrega. Razlog tome je činjenica da se njihova koncentracijka u krvi povećava tek kada je masa funkcionalnih nefrona svedena na ispod 50% od normalne vrednosti i da normalna koncentracija azotnih materija u krvi može ukazati da ne postoji manifestna bubrežna insuficijencija kod dijabetesnih bolesnika. Međutim, veoma širok dijapazon gubitka funkcione rezerve bubrega ostaje u tzv. „nemom“ opsegu, a što se može otkriti merenjem bubrežnih klirensa za procenu jačine glomerulske filtracije i efektivnog bubrežnog protoka plazme.

3.1. Merenje albuminurije/proteinurije

Hemodinamski faktori, zadebljanje glomerulske bazalne membrane i gubitak negativno naelektrisanih proteoglikana su veoma važni faktori u razvoju proteinurije kod DN. Povećano izlučivanje belančevina urinom, kod bolesnika sa dijabetesom tipa 1, označava pojavu dijabetesne nefropatije. Kod bolesnika sa dijabetesom tipa 2, međutim, proteinurija (češće, mikroalbuminurija) je, kao i hipertenzija, ne tako retko prisutna već u vreme postavljanja dijagnoze šećerne bolesti, što je najverovatnije posledica generalizovanog poremećaja funkcije vaskularnog endotela. U toku razvoja ove komplikacije dijabetesa zapaža se progresivno povećavanje vrednosti proteinurije i arterijskog krvnog pritiska što doprinosi progresiji nefropatije (246).

Mikroalbuminurija (McA) se definiše kao izlučivanje 30–300 mg albumina u 24 sata u najmanje dva od tri uzastopna uzorka urina. Urin za određivanje albuminurije može se sakupljati merenjem diureze, prekonocnim uzorcima ili putem kapi jutarnjeg urina. Vremenski uzorci su najprecizniji, naročito sakupljanje 24-časovnog urina, koji još uvek predstavlja zlatni standard za određivanje albuminurije. Na ovaj način se određuje stopa dnevne urinarne ekskrecije albumina (SUEA) i izražava u mg/24 h, dok termin urinarna ekskrecija albumina označava količinu izlučenog albumina u litru urina i izražava se u mg/l (videti u tabeli 2). Što se tiče prekonocnog sakupljanja, treba imati u vidu da je ekskrecija albumina niža tokom noći (snižen krvni pritisak, snižena glomerulska filtracija) i da su vrednosti obično za oko 25% manje od celodnevnog uzorka. Preciznost metoda merenja se može poboljšati određivanjem odnosa koncentracije albumina i koncentracije kreatinina u urinu u vidu albuminsko/kreatininskog indeksa (A/C indeks). Razblažen urin može imati sniženu koncentraciju albumina, pa rezultat može biti lažno negativan. Istovremenim

merjenjem i koncentracije kreatinina, senzitivnost za dijagnozu albuminurije raste i iznosi 80 do 100%, a specifičnost 69 do 100%. Ovaj metod je najlakši za sprovođenje, jednostavan je i precizan, i trebalo bi ga određivati kao prvi jutarnji uzorak. To je ujedno i najčešća skrining metoda za mikroalbuminuriju, jer zahteva kap jutarnjeg urina, a pozitivan nalaz bi trebalo upotpuniti jednom od kvalitativnih metoda (244, 245, 247).

Tabela 2. Definicija patološkog nalaza u izlučivanju albumina u urinu

Kategorija	A/C indeks (µg/ml)	Dnevni uzorci (mg/24h)	Vremenski uzorci (µg/min)
Normoalbuminurija	< 30	< 30	< 20
Mikroalbuminurija	30-299	30-299	20-199
Makroalbuminurija	≥ 300	≥ 300	≥ 200

Određivanje UEA omogućuje definisanje i početne (kontinuirane mikroalbuminurije) i klinički manifestne dijabetesne nefropatije (makroalbuminurija, odn. kontinuirana proteinurija). Prema preporuci Američke asocijacije za dijabetes (ADA) i Nacionalne fondacije za bolesti bubrega, za dijagnozu perzistentne McA neophodan je pozitivan nalaz u bar dva od tri uzorka urina u razmaku od tri do šest meseci. Za praćenje terapijskih procedura potrebno je meriti srednju vrednost stope urinarne ekskrecije albumina u dva do tri 24-časovna uzorka urina, koja su sakupljana sa razmakom od dva do tri dana, kako bi se uticaj individualnih i dnevnih varijacija sveo na najmanju meru. U tom smislu, jednokratno merenje UEA nema naročit značaj, ni u dijagnostici, niti u terapijskom praćenju bolesnika (248, 249).

Prema tome, nalaz mikroalbuminurije je indikator proširene vaskularne bolesti, ali i bolesnika koji zahtevaju agresivniji pristup u terapiji hipertenzije i makroangiopatije. Budući da je vreme nastanka tipa 2 dijabetesa teško precizno utvrditi i da oko 25% bolesnika već poseduje McA u vreme postavljanja dijagnoze osnovnog oboljenja, merenje albuminurije treba započeti sa pojavom ovog tipa dijabetesa. Ukoliko se jednokratnim merenjem uoči McA, trebalo bi utvrditi eventualno postojanje drugih stanja koja utiču na pojačano izlučivanje albumina, kao što su loša glikoregulacija, preterana fizička aktivnost, infekcije i

slično. Po otklanjanju ovih stanja, neophodno je ponoviti merenje, još najmanje dva puta u roku od tri do šest meseci. Ukoliko je nalaz pozitivan u bar dva od tri uzastopna merenja, smatra se da bolesnik poseduje kontinuiranu McA i zahteva dalje lečenje po utvrđenim preporukama. Ukoliko su ponovljeni nalazi negativni, dalji skrining bi trebalo obavljati jednom godišnje (250, 251, 252).

Poslednjih godina se vodi debata o kliničkom značaju mikroalbuminurije. Različite studije saopštavaju da oko 20% bolesnika sa mikroalbuminurijom razvije manifestnu dijabetesnu nefropatiju, a u 30–50% pacijenata mikroalbuminurija regredira u normoalbuminuriju (253, 254). Osim toga, Maclsaac i sar. (255) su ukazali na to da je oko 40% bolesnika sa DM tip 2, koji su imali oštećenu bubrežnu funkciju, normoalbuminurično. Studija Tsalamandrisa i sar. (256) pokazala je da u tipu 2 DM, i to nešto više kod žena, može doći do redukcije klirensa kreatinina i bez povećane urinarne ekskrecije albumina (normoalbuminurija). U ovoj studiji oko 30% bolesnika je ispoljilo pad JGF u odsustvu odgovarajuće povećane ekskrecije albumina mokraćom. Naime, osim što se pad JGF i povećana ekskrecija albumina mogu istovremeno desiti kod istog pacijenta, moguće je i da dođe do promene ovih parametara nezavisno jedan od drugog. Može se zaključiti da povećanje ekskrecije albumina ne mora uvek da bude prediktor pada JGF, kao i da izbegavanje prelaska iz normo- u mikro- i makrolabuminuriju ne može garantovati i očuvanje JGF kod dijabetičara. Iz tog razloga postoji koncept normoalbuminuričnog i albuminuričnog puta bubrežnog oštećenja (255), a rana i tačna procena JGF je od izuzetnog kliničkog značaja za bolesnike sa DM (257).

3.2. Određivanje jačine glomerulske filtracije

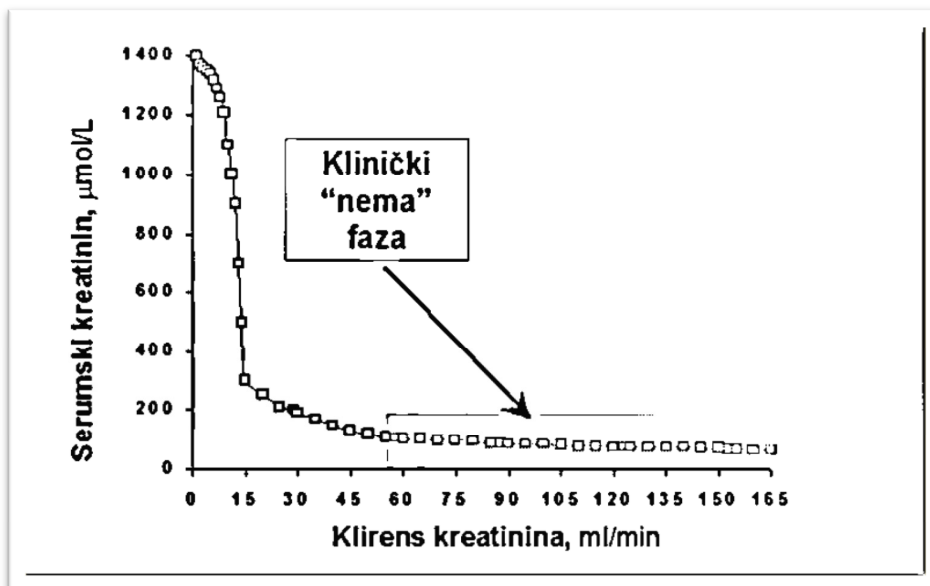
Jačinu glomerulske filtracije (JGF) nije moguće određivati direktno tako da se određivanje JGF zasniva na merenju koncentracije različitih endogenih i egzogenih supstanci u krvi i u urinu. Supstance koje se koriste za merenje JGF moraju da poseduju određena svojstva tj. treba da budu fiziološki inertna, da ne budu vezana za protein i da se slobodno filtriraju kao i da se ne reapsorbuju, sekretuju, sintetišu ili metabolišu u renalnim tubulima. JGF je široko prihvaćena kao najbolja mera funkcije bubrega. Najpreciznija i najpouzdanija metoda za evaluaciju bubrežne funkcije je procena JGF merenjem klirensa egzogenih supstanci kao što su Inulin, ^{51}Cr Etilenediamintetrasirćetna kiselina (^{51}Cr -EDTA), $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -

dietilentriaminpentasirćetna kiselina (^{99m}Tc -DTPA) ili ^{125}J -iotalamat koji važe za idealne markere JGF. Inulin je polimer fruktoze izolovan iz Jerusalimske artičoke sa molekulskom masom koja je približno 5 kDa. Smatra se zlatnim standardom za merenje JGF. Određivanje JGF pomoću klirensa inulina zahteva kontinuiranu intravensku infuziju tokom koje se uzorkuju plazma i urin u vremenski definisanim intervalima. Inulin se u uzorcima određuje spektroskopski uz upotrebu rezorcinola. Ovaj metod je skup za izvođenje i zahteva posebnu opremu što mu ograničava primenu u rutinskoj kliničkoj praksi. Pored klirensa inulina primenjuje se i klirensi radionuklida. Zbog dobre korelacije sa klirensom inulina i jednostavnog merenja u plazmi i urinu, ^{125}J -iotalamat je preporučljiv za precizno i pouzdano određivanje JGF i pored činjenice da je 5–25 % vezano za proteine plazme a 20 % njegove količine u urinu potiče od sekrecije. Primenu ^{125}J -iothalamata u kliničkoj praksi ograničavaju visoka cena i relativno zahtevna oprema. Metoda sa primenom radiofarmaka ^{99m}Tc -DTPA je relativno jeftina, jednostavan za pripremu, dobro korelira sa klirensom inulina, a bolesnik je izložen niskoj dozi radijacije. Zbog toga je klirens ^{99m}Tc -DTPA u odnosu na druge radionuklide najviše primenljivana metoda za procenu JGF u kliničkoj praksi.

Iako se klirensi različitih radionuklida ili inulina smatraju „zlatnim standardom“ za određivanje JGF, u svakodnevnoj rutinskoj laboratoriji se zbog svoje jednostavnosti, niže cene i/ili manjeg utroška vremena, najčešće koriste serumske koncentracije kreatinina ili određivanje endogenog klirensa kreatinina. Njihov odnos u toku evolucije dijabetesne nefropatije je dobro poznat i shematski prikazan na slici (videti sliku 9). Jasno je da vrednosti serumskih koncentracija kreatinina ne premašuju gornju granicu normalnog raspona sve dok ne bude izgubljeno više od polovine bubrežne funkcije. Takođe, očigledno je i da se ove koncentracije povećavaju nesrazmerno brže, u poređenju sa smanjivanjem klirensa kreatinina, kada bubrežna insuficijencija postane manifestna (258).

Da bi se poboljšale karakteristike markera kao što je kreatinin za procenu JGF razvijene su posebne prediktivne jednačine da bi prevazišle nedostatke markera i da budu približno jednako pouzdane za sva patološka stanja. Ove jednačine su nastale primenom regresionih tehnika na povezanost između serumskih nivoa filtracionih markera i izmerene JGF u proučavanoj populaciji. U njima se koristi nivo kreatinina i cistatina C u serumu. Razvijene su za svaki parametar pojedinačno, uzimaju u obzir telesnu površinu kao zamenu za mišićnu masu, pol, rasu i starost. NKDEP preporučuje da laboratorije izdaju paralelno sa nivoom kreatinina i preračunatu JGF, eJGF.

Slika 9. Odnos serumskog kreatinina prema klirensu kreatinina u toku evolucije dijabetesne nefropatije (70).



Tako je klirens kreatinina moguće izračunati uz pomoć Cockcroft Gaultove ili MDRD (engl. *Modification of Diet in Renal Disease*) formule. Cockcroft-Gault-ova formula se široko upotrebljava u farmokokinetičkim studijama kao vodič za doziranje lekova koji se eliminišu putem bubrega. Razvijena je 1973. godine iz podataka dobijenih od 1249 muškaraca sa klirensom kreatinina u rasponu od 30 do 130 mL/min (259). Ova jednačina predviđa primenu klirensa kreatinina (mL/min) iz koncentracije kreatinina u serumu, telesne težine i godina starosti. Klirens nije prilagođen za površinu tela. Cockcroft-Gaultova formula sistematski precenjuje JGF zbog tubularne sekrecije kreatinina. Pokazano je da je ova jednačina manje tačna kod starijih i gojaznih osoba (260). Ovo je veoma važno za bolesnike sa tipom 2 dijabetesa koji su uglavnom sa perkomernom težinom ili gojazni. Jednačina iz MDRD studije daje vrednost JGF prilagođenu površini tela od $1,73\text{m}^2$. Izvedena je iz vrednosti JGF izmerenih preko klirensa iotalamata kod 1628 odraslih osoba i zatim je potvrđena kod druge grupe od 1775 odraslih osoba u AASK (African American Study of Kidney Disease) studiji (261). Nedavno objavljene kliničke studije su istakle ograničenja postojećih prediktivnih jednačina za preračunavanje JGF kod bolesnika sa dijabetesom. Naime, za bolesnike sa JGF u normalnom ili supranormalnom, odnosno hiperfunkcionom opsegu, JGF je bila značajno potcenjena MDRD formulom u približno 10–40% . Brojne studije su pokazale, da su nivoi JGF unutar ovog opsega takođe potcenjeni po CG formuli, mada su neki prijavili precenjivanje (262, 263, 264). Velike varijacije u proceni bubrežne funkcije primenom CG

formule najverovatnije su posledice različitih karakteristika ispitivanih populacija, posebno razlika u telesnoj težini, mišićnoj masi i pitanje korekcije na površinu tela. Pored toga, longitudinalne studije su pokazale da obe, MDRD i CG formule, takođe značajno potcenjuju stopu pada u JGF kada se uporede sa merenim referentnim metodama. Da bi se prevazišla ograničenja MDRD jednačine, nova formula koja sadrži promenljive koje se koriste u formuli MDRD, osmišljena je da poboljša procenu JGF kod osoba sa $JGF > 60 \text{ mL/min/1.73m}^2$. CKD-EPI jednačina razvijena je na osnovu podataka od 8254 pojedinaca iz 10 studija i potvrđen u 3896 pojedinci iz 16 studija (265, 266, 267). Treba napomenuti da CKD-EPI jednačina tek treba da bude rigorozno testirana kod ispitanika sa dijabetesom sa visokim nivoima JGF.

U poslednje vreme, preporučena je upotreba serumskog cistatina C u proceni jačine glomerulske filtracije (268). Pre više od 20 godina, Grubb je predložio cistatin C kao potencijalni marker JGF, zasnovano na činjenici da na vrednosti cistatina C, za razliku od kreatinina, ne utiču ekstrarenalni faktori kao što su godine, pol, mišićna masa i način ishrane (269). Cistatin C je neglikozilirani osnovni protein i pripada familiji cistein proteaza inhibitora. Cistatin C stvaraju sve nuklearne ćelije konstantnom brzinom tokom celog života. Iz cirkulacije se eliminiše skoro potpuno putem glomerularne filtracije. U odsustvu značajnog oštećenja tubula, cistatin C se reapsorbuje i metaboliše u epitelijalnim ćelijama proksimalnih tubula i ne vraća se u cirkulaciju u nepromenjenoj formi. Upravo iz serumske koncentracije cistatina C je izvedeno nekoliko jednostavnih formula za izračunavanje JGF (270).

Povećanje JGF predstavlja faktor rizika za razvoj DN. Naime, kod približno polovine obolelih od tipa 1 dijabetesa kod kojih bolest traje manje od pet godina, postoji povećanje JGF za oko 25–50 % od normalnih vrednosti. Upravo su ovi bolesnici izloženi povećanom riziku razvoja dijabetesne nefropatije (271). Situacija u dijabetesnoj bolesti tipa 2 nešto je drukčija. Više od 45% bolesnika u trenutku postavljanja dijagnoze ima JGF koja je dve standardne devijacije veća od JGF kontrolnih grupa (nedijabetičari i gojazni bolesnici iste dobi) (272). Doduše, veličina hiperfiltracije (prosečno 117–133ml/min) manja je nego kod tipa 1. Dijabetičari tipa 2 starije su životne dobi i shodno tome imaju veću verovatnoću za razvoj aterosklerotskih promena koja utiču na JGF i veličinu glomerula (273).

3.3. Određivanje ukupnog efektivnog bubrežnog protoka plazme

U proceni hemodinamskog statusa bubrega kod dijabetesnih bolesnika značajnu ulogu ima i određivanje efektivnog bubrežnog protoka plazme (EBPP). Rane promene u glomerulskoj hemodinamici u uslovima hiperglikemije i glomerulske hipertenzije preko aktivacije različitih vazoaktivnih faktora dovode i do promena bubrežnog protoka plazme u pravcu njenog povećanja. Zatim u daljem toku razvoja DN hemodinamski i brojni nehemodinamski faktori preko pojačane produkcije citokina i faktora rasta doprinose daljoj progresiji bolesti (bubrežnih funkcionalnih i strukturnih promena) što neminovno dovodi i do redukcije efektivnog bubrežnog protoka plazme. U eksperimentalnim istraživanjima kao i u kliničkoj praksi koriste se razne metode za procenu bubrežnog protoka krvi, što je uslovljeno nepostojanjem metode izbora, koja bi dala najpouzdanije informacije o stanju bubrežne cirkulacije. Ipak, do sada najčešće korišćene metode su određivanje klirensa supstanci koje se iz krvi gotovo u potpunosti ekstrahuju pri prvom prolazu kroz bubreg, i to isključivo putem funkcije bubrega. S obzirom da je maksimalna vrednost klirensa neke supstance ograničena volumenom plazme koji u jedinici vremena protiče kroz bubreg, klirens supstance koja se u jednom prolasku kroz bubreg potpuno očisti iz plazme predstavlja merilo bubrežnog protoka plazme. Referentna supstanca za određivanje bubrežnog protoka plazme je paramino-hipurna kiselina (PAH). PAH se iz krvi odstranjuje u najvećoj meri putem aktivne tubulske sekrecije (80%) i u manjoj meri putem glomerulske filtracije (20%). Bubrežni protok plazme meren pomoću klirensa PAH-a, ima za 10% nižu vrednost u odnosu na stvarni bubrežni protok plazme, s obzirom da je koeficijent ekstrakcije PAH-a u bubregu oko 90% (71, 72). Naime, oko 10% od ukupnog efektivnog bubrežnog protoka plazme otpada na perfuziju sekretorno neaktivnih tkiva kao što su medula, urotel i kapsula bubrega. Stoga klirens PAH-a odgovara takozvanom efektivnom bubrežnom protoku plazme (EBPP), koji označava ekstrakcionu efikasnost sekretorno aktivnih struktura bubrega. Danas se klirens PAH-a veoma retko izvodi u kliničkoj praksi usled zametnosti i invazivnosti same metode koja zahteva primenu kontinuirane infuzije i kateterizaciju mokraćne bešike. Za merenje ukupnog efektivnog bubrežnog protoka plazme danas je široko prihvaćena metoda određivanja klirensa hipurana, odnosno orto-jodo-hipurne kiseline obeležene radiojodom. Ovaj radioobeleživač predstavlja izvanrednu zamenu za PAH s obzirom da su mehanizmi izlučivanja ove dve supstance praktično identični.

4. PREVENCIJA DIJABETESNE NEFROPATIJE

Neprekidni porast broja bolesnika sa dijabetesnom nefropatijom u terminalnoj insuficijenciji bubrega zahteva da se više pažnje posveti prevenciji ove bolesti. Savremene mere prevencije dijabetesne nefropatije zasnivaju se na poznavanju njene patogeneze. Glavni patogenetski faktor u nastanku dijabetesne nefropatije je hiperglikemija koja uslovljava povećan transport glukoze u ćelije glomerula. To vodi metaboličkim poremećajima u kojima se stvara niz produkata (reaktivni kiseonički radikali, krajnji produkt glikozilacije proteina, angiotenzin II, endotelin-1), koji uzrokuju kao funkcione odnosno hemodinamske promene tako i leziju svih struktura glomerula. Zbog toga je kontrola glikemije glavni cilj terapije, dok se transplantacija pankreasa smatra najboljim pristupom za smanjenje bubrežnog oštećenja.

Kao najvažnije mere prevencije dijabetesne nefropatije smatraju se: (1) održavanje glikemije i HbA1C (<7,0%) blizu preporučenih vrednosti, (2) lečenje hipertenzije i održavanje krvnog pritiska ispod 130/80 mmHg, (3) blokada sistema renin-angiotenzin primenom inhibitora angiotenzin konvertujućeg enzima ili blokatora receptora angiotenzina, (4) prestanak pušenja, (5) izbegavanje nefrotoksičnih sredstava, (6) lečenje hiperlipidemije, (7) fizička aktivnost, i (8) smanjenje telesne težine kod gojaznih. U budućnosti se očekuje da će novi lekovi, koji će uticati na dejstvo pojedinih faktora rasta, reaktivnih kiseoničkih radikala, produkata glikozilacije proteina, biti efikasna sredstva u prevenciji dijabetesne nefropatije (274).

Rezultati mnogih studija, koje su obuhvatile veliki broj bolesnika sa tipom 1 i 2 dijabetesa, pokazali su da od početka dijabetesa do pojave proteinurije prođe najmanje desetak godina (29, 239). To je vreme u kom je neophodno dosledno i striktno regulisati glikemiju i lečiti hipertenziju da bi se sprečila pojava dijabetesne nefropatije. Kada se jednom razvije, dijabetesna nefropatija do pojave hronične insuficijencije bubrega obično prođe oko pet godina, a mere za usporavanje progresije dijabetesne nefropatije su manje efikasne nego mere prevencije (29, 239, 275).

S obzirom na to da je dijabetes melitus sve češći uzrok pojave DN, kao bubrežne bolesti koja vodi u terminalnu fazu bubrežne insuficijencije, to je kontrola glikemije kod ovih pacijenata veoma bitna za prevenciju DN. Dobra kontrola glikemije i njeni efekti na razvoj nefropatije se prate promenama u nivou glikemije i vrednosti HbA1c (glikoliziranog

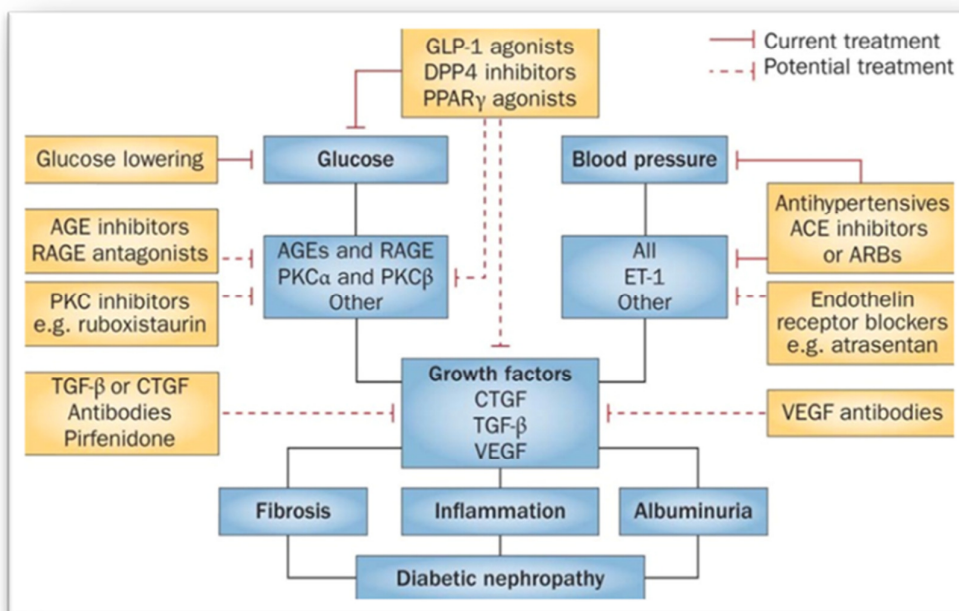
hemoglobina). Intenzivirana insulinska terapija (IIT-PEN, insulinska pumpa), kod bolesnika koji boluju od dijabetesa tip 1 i tip 2, omogućava bolju glikoregulaciju (glikozilirani hemoglobin-HbA1c <7%) i smanjuje rizik za razvoj i progresiju dijabetesne nefropatije (239-245, 276). Nekoliko kontrolisanih randomiziranih studija je pokazalo da intenzivna kontrola glikemije znatno smanjuje rizik od razvoja mikroalbuminurije, makroalbuminurije i/ili nefropatije kod pacijenata sa dijabetesom tip 1 (277, 278) i tip 2 (279, 280). Na osnovu ovih studija CARI (The Caring for Australians with Renal Insufficiency) smernice preporučuju da vrednost ciljanog PPG (preprandijalna glukoza) bude između 4,4–6,7mmol/L, a HbA1c ≤7% za sve pacijente sa dijabetesom (281). Međutim, trenutno nema dokaza da glikoregulacija menja ishod već razvijene nefropatije.

Druga značajna i efikasna mera prevencije dijabetesne nefropatije je *lečenje hipertenzije* i održavanje krvnog pritiska ispod 130/80 mmHg uz obavezni primenu lekova koji sprečavaju dejstvo angiotenzina – inhibitori angiotenzin konvertujućeg enzima (ACEI) i blokatori receptora za angiotenzin (ARB) (245). Veliki broj studija bio je posvećen ispitivanju efikasnosti ovih lekova u primarnoj i sekundarnoj prevenciji dijabetesne nefropatije. BENEDICT studija je pokazala da kod bolesnika sa tipom 2 dijabetesa i hipertenzijom, ali bez mikroalbuminurije, primena trandolaprila i verapamila, ili samo trandolaprila, smanjuje incidenciju mikroalbuminurije u istom stepenu. S druge strane, sam verapamil nije imao nikakvu dejstvo na pojavu mikroalbuminurije i njena incidenca je bila podjednaka kod bolesnika lečenih verapamilom i onih koji su uzimali placebo (282). Kada je dokazana efikasnost terapije koja blokira dejstvo angiotenzina (ACEI ili ARB) kod bolesnika sa dijabetesom i hipertenzijom, postavilo se pitanje da li bi ta terapija mogla da spreči pojavu mikroalbuminurije i kod bolesnika sa normalnim krvnim pritiskom. Nekoliko urađenih studija dalo je negativan odgovor na ovo pitanje. Randomizirana studija iz DIRECT (Diabetic Retinopathy CandesartanTrials) programa uključila je 3326 bolesnika sa tipom 1 dijabetesa i 1905 sa tipom 2 dijabetesa. Bolesnici nisu imali mikroalbuminuriju, a većina nije imala ni hipertenziju. Bolesnici su podeljeni u grupu koja je lečena candesartanom u dozi od 32 mg dnevno, ili su primali placebo tokom 4,7 godina. Candesartan nije uspeo da spreči pojavu mikroalbuminurije kod normotenzivnih bolesnika sa tipom 1 i 2 dijabetesa (283). Ovi rezultati su suprotni onima dobijenim u nekoliko drugih studija – BENEDICT (282), HOPE (283), ADVANCE (284), ali su bolesnici u tim studijama bili stariji, imali veći krvni pritisak i/ili veći rizik od kardiovaskularnih bolesti nego bolesnici u DIRECT studiji. Autori ove poslednje studije pretpostavljaju da kod bolesnika sa hipertenzijom ili već postojećim drugim

vaskularnim bolestima postoji veća aktivnost renin-angiotenzin-aldosteron sistema i kod njih je odgovor na blokadu ovog sistema veći. Bolesnici uključeni u DIRECT studiju nisu imali hipertenziju ni vaskularne bolesti, pa se pretpostavlja da je i aktivnost renin-angiotenzin sistema bila niska, što je uslovalo i slab efekat blokade ovog sistema.

Rezultati većeg broja studija su pokazale da se najbolji rezultati u prevenciji komplikacija dijabetesa postižu istovremenim delovanjem na više faktora rizika. Različiti faktori rizika za vaskularne komplikacije dijabetesa ne samo da deluju istovremeno nego uvećavaju dejstvo jedni drugima (286). Zbog toga je pokušano da se istovremenim intenzivnim intervencijama na više faktora rizika, hiperglikemiju, hipertenziju, hiperlipidemiju, pušenje, smanji rizik za vaskularne komplikacije dijabetesa (286, 287, 288).

Slika 10 Postojeći i potencijalni lekovi u tretmanu dijabetesne nefropatije



Preuzeto: Danie Fineberg, Karin , M. Jandeleit-Dahm, Mark E. Cooper. Diabetic nephropathy: diagnosis and treatment. *Nature Reviews Endocrinology* 2013;9:713–723

Među prvim studijama koje su pokazale značaj multifaktorijalnog pristupa prevenciji proteinurije bila je Steno2 studija (289) u kojoj je pokazano da multifaktorijalni pristup, koji je obuhvatao odgovarajući dijetetski režim i fizičku aktivnost, prestanak pušenja, intenzivnu terapiju hiperglikemije, hiperlipidemije i hipertenzije uz primenu ACEI, primenu antioksidantnih sredstava i aspirina, značajno redukuje pojavu mikrovaskularnih komplikacija. Uprkos tome što su ove studije ukazale na efikasnost multifaktorijalnog pristupa prevenciji, primena svih ovih mera u praksi je nedovoljna (290).

U budućnosti se očekuje da će novi lekovi, koji će uticati na dejstvo pojedinih faktora rasta, AGE ili reaktivnih kiseoničkih radikala, vazoaktivnih faktora gde spadaju i blokatori ET receptora, biti efikasna sredstva u prevenciji dijabetesne nefropatije (videti sliku 10).

5. ENDOTELINSKI SISTEM

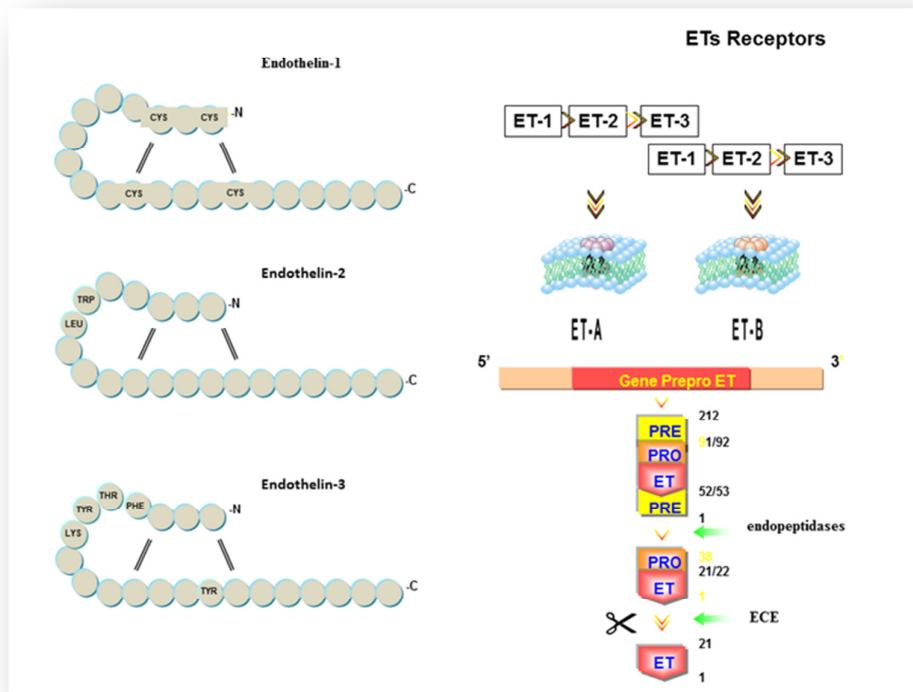
Sredinom osamdesetih godina prošlog veka prvi put je izolovan iz kulture endotelih ćelija goveđe aorte jedan od najsnažnijih vazokonstriktornih peptida (291, 292, 293). Ubrzo nakon otkrića, grupa japanskih naučnih radnika je objavila njegovu strukturu i nazvala ga endotelinom (20, 294). Endotelini čine grupu endogenih peptida, koji su slične građe i imaju snažno i dugotrajno vazokonstriktivno dejstvo. Porodicu endotelina, koji su široko rasprostranjeni u različitim ćelijama i tkivima, čine uz ET-1, još dva člana ET-2 i ET-3. Strukturno su veoma slično građeni, sadrže 21 aminokiselinu, imaju disulfidne veze između cisteina na položaju 1-15 i 3-13, te mesta na završecima koja određuju afinitet i vezivno mesto za receptor (21).

Svaka od izoformi endotelina kodirana je zasebnim genom. Ljudski gen za ET-1 nalazi se na 6 hromosomu, za ET-2 na hromosomu 20, a za ET-3 na hromosomu 1. Sinteza endotelina započinje stvaranjem pre-pro-endotelina (pre-pro-ET), koji se kod čoveka sastoji od 212 aminokiselina. (295, 296). Pod dejstvom specifičnih endopeptidaza u endoplazmatskom retikulumu, pre-pro-ET hidrolizom prelazi u pro-endotelin (pro-ET ili big ET) koji se sastoji od 38 aminokiselina. Dalja sudbina pro-ET ili big ET je dvostruka: deo pro-ET koji nastaje u samoj ćeliji se već intraćelijski prerađuje u zreli ET, dok se jedan deo izlučuje u nepromjenjenom obliku i kao takav se u perifernim tkivima pretvara u zreli oblik. Pretvaranje pro-ET u ET obavlja neutralna peptidaza, koja je smeštena na ćelijskoj membrani i u endoplazmatskom retikulumu. Ova neutralna peptidaza, nazvana konvertujući enzim endotelina (Endothelin Converting Enzyme-ECE) ima ulogu u hidrolizi samo pro-ET, ali ne i drugih peptida. Dejstvom neutralne peptidaze odnosno konvertujućeg enzima endotelina uz zreli endotelin nastaje i biološki neaktivna C-sekvenca. Danas postoje dokazi o postojanju različitih formi ECE. Ove forme ECE se međusobno razlikuju prema afinitetu za pojedine endoteline (297, 298).

Receptori za endoteline otkriveni su u brojnim tkivima i organima poput krvnih sudova, srca, nadbubrežnih žlezda, bubrega, mozga, pluća, jetre i drugim organima. Otkrivena su tri endotelinska receptora: vazokonstriktorni ETA receptor i vazodilatatorni ETB receptor (**slika 11**) (299). Oba pripadaju superporodici G protein-zavisnih receptora. Nešto kasnije je otkriven i ETC receptor čije funkcija i distribucija još uvek u potpunosti nisu jasne. Prema aminokiselinskom sastavu osetljivosti na agoniste i antagonistu dokazana je

selektivnost i različitost u funkcijama navedenih receptora za pojedine izoforme ET. ETA receptor veže ET-1 i ET-2 s većim afinitetom nego ET-3. S druge strane, ETB receptor pokazuje jednake afinitete za sve tri izoforme endotelina, dok se ETC receptor selektivno aktivira samo vezanjem ET-3 (299, 300).

Slika 11 Endotelinski sistem (struktura, receptori i produkcija)



Preuzeto: Maria das Graças Muller de Oliveira Henriques. Chapter 2: New Therapeutic Targets for the Control of Inflammatory Arthritis: A Pivotal Role for Endothelins In: Medicine » Orthopedics, Physical Medicine and Rehabilitation » "Innovative Rheumatology", book edited by Hiroaki Matsuno, Published: January 2, 2013

Danas je potpuno jasno da su različiti biološki efekti endotelina posredovani aktivacijom različitih puteva prenosa signala koji verovatno doprinose i različitosti odgovora na njihove podražaje. Delovanje endotelina preko ETA-receptora na membrani glatkih mišćnih ćelija krvnih sudova aktivira sistem fosfolipaze C zavisne o fosfatidilinozitol 4,5-bisulfatu koja povećava koncentraciju slobodnog intraćelijskog Ca^{++} i koči njegovo izbacivanje iz ćelije s posledičnom vazokonstrikcijom. Ovom efektu endotelina prethodi kratkotrajni vazodilatacijski učinak. Njega izaziva autokrino povratno delovanje endotelina

preko ETB-receptora na membranama endotelnih ćelija što onda prolazno podstiče stvaranje prostaciklina i azotovog monoksida (NO) koji izazivaju vazodilataciju (301, 302).

5.1. Endotelinski sistem bubrega

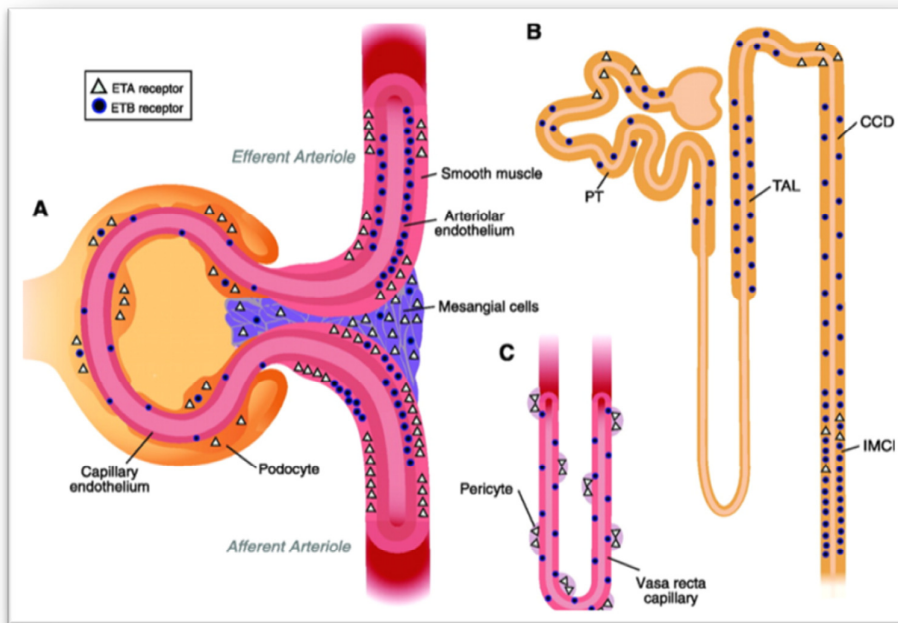
Endotelini su prvi put otkriveni 1988. kao moćni vazokonstriktori sa ET-1 kao najpotentnijim članom „familije“. Započete su brojne studije o njegovoj ulozi u patogenezi hipertenzije kao i o ulozi u razvoju i progresiji bubrežnih bolesti.

Rane studije o endotelinu su ukazale na posebno značajnu ulogu bubrega u biologiji endotelinskog sistema. Kitamura i sar. (303) su ukazali na izuzetno povećanu produkciju ET-1 u bubrežima u odnosu na druga tkiva, dok su druge pojedinačne studije ukazale na to da skoro svaka bubrežna ćelija ima sposobnost sinteze ET-1 kao i ekspresije endotelinskih receptora (304). S obzirom na ovako visoku produkciju endotelina i ekspresiju receptora, nije iznenađujuća njegova uloga u regulaciji bubrežne funkcije, utičući tako na brojne bubrežne funkcione parametre. Danas je poznato da ES u bubrežima može da reguliše bubrežni protok krvi, jačinu glomerulske filtracije, transport Na i vode, acido-bazni balans, ćelijsku proliferaciju, akumulaciju ekstracelularnog matriksa, inflamaciju i dr. (305). Stoga se ES pojavio kao jedan od značajnijih faktora u nastanku oštećenja bubrežne funkcije i/ili progresiji bubrežnih bolesti kod različitih patoloških stanja (306).

Slično RAAS i endotelinski sistem je, kao što je već rečeno, kompleksan i uključuje konvertujuće enzime i dva funkcionalno aktivna receptora: ETA receptor (ETA-R) i ETB receptor (ETB-R). Primarno ETA-R posreduje vazokonstrukciji igrajući značajnu ulogu u patogenezi hipertenzije, endotelne disfunkcije, insulinske rezistencije, inflamacije i fibroze. Peptidoselektivni ETB-R su uglavnom zastupljeni u endotelnim ćelijama, posredujući vazodilataciji preko oslobađanja azot monoksida i prostaciklina, i na kraju inhibišući ćelijsku proliferaciju. Oba receptora su zastupljena u bubrežima ispoljavajući različitu funkciju kao i lokalizaciju (slika 12): ETA-R su lokalizovani u bubrežnim krvnim sudovima dok su ETB-R prisutni uglavnom u meduli, kao i glomerulskim ćelijama (mezangijalnim, endotelnim ćelijama i podocitima) (304, 305, 306). S tim da treba napomenuti da postoje razlike u distribuciji i ekspresiji receptora za ET-1 u bubrežima čoveka i pacova. U bubrežima pacova oba receptora su pronađena u interlobularnim arterijama kao i u aferentnim i eferentnim arteriolama, ali jedino ETA-R je prisutan u interlobarnim arterijama i arterijama arkuate.

ETB-R imunoreaktivnost bila je retka na endotelnim ćelijama bubrežnih arterija, dok je značajnija imunoreaktivnost bila viđena na peritubularnim i glomerularnim kapilarima kao i endotelu vasa recta. ETA- R su prisutni u mezangijalnim ćelijama glomerula i pericitima descendentnog dela vasa recte. U bubrežnom tubulskom sistemu, ETB- R su lokalizovani u epitelnim ćelijama proksimalnih tubula i medularnom sabirnom sistemu, dok su ETA-R pronađeni u distalnim tubulima i kortikalnom sabirnom sistemu. U bubrežima zdravog čoveka, ET- 1 i njegovi receptori su uglavnom lokalizovani u vaskularnom tkivu i u manjoj meri na glomerulskim strukturama (307, 308).

Slika 12 Distribucija endotelinskih receptora u bubregu



Legenda:ETA receptor-endotelinski A receptor, ETB receptor-endotelinski B receptor
(Preuzeto iz: Kohan D E et al. *Physiol Rev* 2011; 91: 1–77)

5.1.1. Dejstvo endotelina-1 na bubrežnu hemodinamiku

Kao i u drugima tkivima dejstvo endotelina na bubrežni vaskularni sistem je posredovan aktivacijom ETA i ETB receptora. ET prouzrokuje snažnu i produženu vazokonstrikciju aktivacijom kako ETA-R, tako i ETB-R, bez direktnog uticaja na

tubuloglomerularni povratni mehanizam. Veza između ET i regulacije bubrežne hemodinamike je kompleksna i veoma varira (309). Najbolji podaci o specifičnom dejstvu ET na bubrežnu mikrocirkulaciju dobijenu su in vitro studijama. Neke od prvih studija su koristile izolovane arteriole, kao što je Edwards i sar., i ocenjivale mikrovaskularnu reaktivnost na ET-1, ET-2 i ET-3 (310). Ove studije su pokazale da ET-1 izaziva doznno zavisnu i dugo delujuću vazokonstrikciju na aferentne i eferentne arteriole, pri čemu ET-2 ima sličan efekat ET-1, dok je potencijal ET-3 značajnije slabiji u odnosu na ET-1 i ET-2. U sličnim radovima, na izolovanoj mikrovaskulaturi pacova, uočeno je da je efekat ET-1 na eferentnu arteriolu izraženiji u odnosu na aferentnu arteriolu, što ide u prilog parakrine regulacije glomerulske hemodinamike, zbog uticaja na glomerulski filtracioni pritisak (311). Zatim in vivo i in vitro studije na hidronefrotično izmenjenim bubrezima, u kojima su opisani značajniji vazokonstriktorni efekti ET-1 na distalne aferentne i eferentne arteriole u odnosu na preglomerulske segmente (312). Studije na izolovanim perfudovanim jukstaglomerulskim nefronima su ukazale na nesumnjiv vazokonstriktorni efekat ET-1, ET-2 i ET-3 na aferentne i eferentne arteriole. Vazokonstriktorni efekat ET-1 i ET-3 se pokazao značajnije na nivou aferentne arteriole u odnosu na eferentnu arteriolu, dok je vazokonstriktorni efekat ET-2 na aferentnu i eferentnu arteriolu bio sličan. Takođe, rezultati ovih studija su pokazali da je vazokonstriktorni efekat ET-1 na nižim koncentracijama posredovan preko ETA-R i da se njegovom blokadom u potpunosti eliminiše ET-1 uzrokovan pad BPP i JGF (312, 313).

Gore navedene studije ukazuju da je aferentna vazokonstrikcija rezultat aktivacije oba receptora, a da se blokadom ETA-R može skoro u potpunosti ponišiti vazokonstriktorni efekat. Eferentna vazokonstrikcija je takođe rezultat aktivacije oba receptora, ali se pokazalo da postoje mnogo kompleksnije interakcije. In vivo bubrežne hemodinamske studije na izolovanim perfundovanim bubrezima su pokazale da sistemski i intrarenalno injektiran ET uzrokuje značajnu i uniformnu vazokonstrikciju u celom bubregu (313). Ranije in vivo i in vitro studije su potvrdile da intrarenalna infuzija ET-1 u bubrezima pacova i zeca uzrokuje redukciju bubrežnog protoka krvi, povećava bubrežni vaskularni otpor i redukuje JGF, sa značajnijom vazokonstrikcijom preglomerulske vaskulature. Takođe, brojne studije urađene na bubrezima pacova i zečeva ukazivale su da intrarenalna infuzija ET-1 dovodi do pada bubrežnog protoka krvi i povećanja otpora u aferentnim i eferentnim arteriolama istog intenziteta (311, 313, 316).

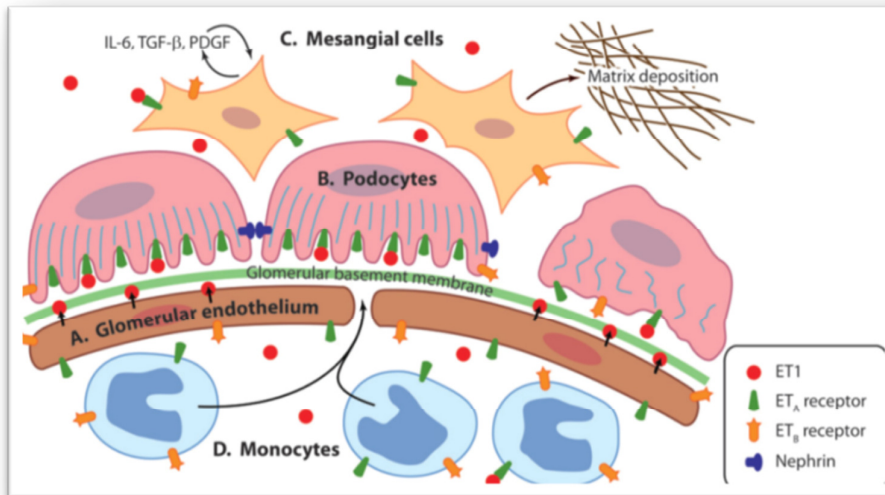
Nasuprot ovim studijama, Kon i saradnici su ukazali na značajnije povećanje otpora u aferentnim arteriolama u odnosu na eferentni vaskularni otpor (317). Studije sa antagonistima endotelina su pokazale da je bubrežna hemodinamika odnosno mikrocirkulacija pod uticajem endogenog ET-1. Infiuzija kombinovanog antagoniste ETA/ETB receptora, tzv. bosentan-a, dovodi do blage redukcije krvnog pritiska sa značajnom redukcijom intraglomerulskog kapilarnog pritiska. U istom slučaju selektivna blokada ETA receptora nije imala uticaja na srednji arterijski pritisak pa i na glomerulsku hemodinamiku, što ukazuje da endogeni ET ispoljava vazodilatatorni efekat na bubrežnu mikrocirkulaciju preko aktivacije ETB receptora (314). Stoga, izgleda, da endogeni azot monoksid doprinosi modulaciji dejstva ET na otpor u bubrežnom vaskularnom sistemu, kao što su pokazale rane studije o ET sistemu (311). Bubrežna vazokonstrikcija je rezultat kombinovanog direktnog dejstva ET-1 na bubrežni vaskularni otpor, kao i indirektnog delovanja ET-1 na produkciju drugih vazoaktivnih medijatora, kao što je tromboksan, adrenergični uticaj i uticaj angiotenzina II. Stoga regulacija bubrežnog vaskularnog otpora od strane ET uključuje direktno delovanje preko ETA i ETB-R na modulaciju aferentnog i eferentnog arteriornog otpora, a u isto vreme ET-zavisni efekti su modulisani od strane drugih vazokonstriktornih i vazodilatatornih faktora očigledno na receptorskom nivou (318).

5.1.2. Dejstvo endotelina-1 na glomerule i tubulski sistem

ET-1 ima i specifičnu proinflamatornu, profibrotičku i mitogenu ulogu u bubrežima, pored vazokonstriktivnog efekta. U sabirnim tubulima, ET- sistem je uključen u fiziološku regulaciju natrijuma, tečnosti, kao i ekskreciji kiselina. Aktivacija ETB-R na glavnim tubularnim ćelijama dovodi do inhibicije transporta natrijuma. Aktivacija ETB-R u tubularnim ćelijama takođe dovode do inhibicije transporta vode. Aktivacija ETB-R na tubulskim interkalarnim ćelijama povećava lučenje kiseline, najverovatnije preko azot monooksida zavisnog mehanizma (319, 320). Tačna uloga ETA-R na sabirni sistem bubrega još uvek nije jasna. Nedavna istraživanja ukazuju na natriuretični i diurezni efekat. ET- 1 takođe inhibiše epitelne Na^+ kanale koji su odgovorni za reapsorpciju Na^+ u kortikalnom sabirnom sistemu u interakciji sa $14 - 3/\text{Nedd}4 - 2$ patološkim putem. To bi naravno moglo predstavljati važnu vezu između bubrežne ekspresije ET, urinarne ekskrecije ET i patogeneze hipertenzije. Stoga izmenjena produkcija ET-1 ili izmenjeni bubrežni klirens ET-1 u

uslovima oslabljene bubrežne funkcije može izazvati neadekvatnu reapsorpciju Na^+ i zadržavanje vode, što doprinosi razvoju i održavanju hipertenzije (321, 322, 323).

Slika 13 . Efekti ET-1 u glomerulu



Legenda ET-1 effects on the glomerulus. (A) ET-1 is secreted on abluminal surface of glomerular endothelial cells. (B) ET-1 causes contraction of podocyte actin cytoskeleton and loss of slit diaphragm proteins such as nephrin. (C) Mesangial cells are activated to produce pro-inflammatory cytokines and matrix proteins. (D) ET-1 acts as a chemoattractant to monocytes. (Preuzeto iz: *N Dhaun et al. British Journal of Pharmacology (2012) 167: 720–731*).

U glomerulima, specifično dejstvo ET-1 je u brzom intraćelijskog tranzitu Ca^{++} u mezangijalnim ćelijama (MĆ) i podocitima. MĆ su sposobne da oslobađaju ET-1 kao odgovor na dejstvo različitih faktora, naročito u uslovima oštećenja glomerula kod hipertenzije, povećane koncentracije glukoze kao što je u dijabetesu (324). Takođe povećana ekspresija ETR i njihova aktivacija indukuje hipertrofiju, proliferaciju i kontrakciju MĆ, kao i produkciju ekstracelularnog matriksa. Takođe i u podocitima dolazi do povećane ekspresije ET-1 u odgovoru na različite povrede (slika 13). Na kraju, možemo reći da su ET-1 i njegovi receptori uključeni u homeostazu Na^+ u bubrežima, a time u lokalnu i sistemska kontrolu krvnog pritiska (325, 326). Stoga, povećana ekspresija ET-1 sa naknadnom aktivacijom oba ETR u bubrežima rezultira mezangio ćelijskoj hipertrofiji, proliferaciji, kontrakciji, akumulaciji ekstracelularnog matriksa, disfunkciji podocita, i aktivaciji proinflamatornih i profibrotičkih patoloških puteva, koji pogoduju nastanku i progresiji bubrežnih bolesti kao što je dijabetična nefropatija (327, 328).

5.2. Uloga endotelina-1 u razvoju dijabetesne nefropatije

Ubrzo nakon otkrivanja endotelinskog sistema počelo se sa istraživanjima o blokadi ES samog ili u kombinaciji sa RAS kao novom terapijskom pristupu kod hipertenzije i bubrežnih bolesti gde je nivo sistemskog endotelina -1 i eksretovanog urinom povećan (329, 330). Kod pacijenata sa dijabetesom ovo je objašnjeno kao uticaj hiperglikemije na povećanu produkciju ET-1. Takođe je utvrđeno da insulin povećava ekspresiju bubrežnog endotelina, kako se pokazalo tokom eksperimentalnih studija, što ide u prilog značajne patofiziološke uloge endotelinskog sistema kod dijabetesne nefropatije. Praktično, interakcija između insulina, insulinske rezistencije i endotelina je utvrđena i uključena kao relevantan faktor u komplikaciji dijabetesne bolesti (331, 332).

U toku razvoja DN, kao što je prethodno naglašeno, prolazi kroz pet stadijuma: stadijum hemodinamskih promena, stadijum strukturnih promena, stadijum incipijentne dijabetesne nefropatije, stadijum klinički manifestne dijabetesne nefropatije i završni stadijum oštećenja bubrega, pri čemu se stadijum incipijentne nefropatije odlikuje pojavom mikroalbuminurije (333).

Dejstvo ET-1 kao vazoaktivne supstance i faktora stimulacije rasta, uočava se u prvom i drugom stadijumu DN koju karakteriše bubrežna hipertrofija i hiperfiltracija (334). Tako su eksperimentalna istraživanja na miševima i zečevima u ranom stadijumu DN pokazala povećano vezivanje za ETA-R u bubrežnom korteksu i meduli (334, 335). Mnogi autori su ukazivali na to da u ranom stadijumu DN, ET-1 može imati značajnu parakrinu ulogu na glomerule, gde reguliše jačinu glomerulske filtracije preko parakrine-autokrine uloge na mezangijalne ćelije i podocyte (336). Ovo može voditi ka trećem stadijumu DN, odnosno incipijentne DN, koja se funkcionalno karakteriše prisustvom mikroalbuminurije i hipertenzije. Aktivacija ET receptora na mezangijalnim ćelijama i podocitima mogu uticati na strukturne promene, kao što je zadebljanje bazalne membrane, hiperplazija mezangijalnih ćelija, ekspanzija mezangijalnog matriksa i uvećanje podocita sa gubitkom stopastih produžetaka – „foot processes“, kao i funkcionalne promene, kao što su povećana propustljivost glomerularne filtracione membrane za albumin preko gubitka nefrina u SD bazalne membrane i povišeni proinflamatorni markeri (337). Prisutna mikroalbuminurija i proteinurija same od sebe indukuje specifični genetski program u tubularnim epitelnim

ćelijama koje vode ka tubularnoj atrofiji, intersticijalnoj inflamaciji i fibrozi. Pored ovoga, i povećana ekspresija ET-1 vodi ka daljoj progresiji DN odnosno četvrtom stadijumu ili manifestnoj DN koju karakteriše proteinurija i/ili nefrotski sindrom sa značajno sniženom JGF. U petom stadijumu ili završnom stadijumu DN, ET-1 i dalje favorizuje glomerularnu i tubulointersticijalnu fibrozu preko uticaja na mezangijalni matriks (ekspanija i remodeliranje) kao i produkciju kolagena od strane intersticijalnih fibroblasta. ET-1 aktivira mezangijalne ćelije da oslobađaju proinflamatorne i profibrotičke citokine, a oni stimulišu proliferaciju ćelija i povećanu produkciju proteinskog matriksa, što vodi ka daljoj glomerulosklerozi (338). ET-1 takođe deluje kao hemotaksin za leukocite, uključujući makrofage, koji infiltriraju glomerule i/ili intersticijum i mogu dalje doprineti bubrežnoj inflamaciji. Brojne studije, i prekliničke i kliničke, imaju potrebu da jasno definišu efekte ET-1 na različite tipove bubrežnih ćelija u cilju utvrđivanja uloge antagonista ET receptora koju bi imali u inhibiciji inflamacije i održavanju glomerularne arhitektonike (339).

6. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I RADNA HIPOTEZA

U okviru ispitivanja odnosa endotelina-1 i funkcionog statusa bubrega kod bolesnika sa tipom 2 šećerne bolesti definisani su sledeći ciljevi:

1. Odrediti nivo plazmatskog endotelina-1 kod bolesnika sa tipom 2 šećerne bolesti u odnosu na zdravu populaciju;
2. Ispitati odnos između nivoa plazmatskog endotelina-1 i jačine glomerulske filtracije, efektivnog bubrežnog protoka plazme i frakcije filtracije kod bolesnika sa tipom 2 šećerne bolesti.

Ispitivanje odnosa endotelina-1 i funkcionog statusa bubrega kod bolesnika sa tipom 2 šećerne bolesti zasnovano je na sledećim hipotezama:

1. Kod bolesnika sa šećernom bolesti tipa 2 nalazi se povišeni nivo plazmatskog endotelina-1 u odnosu na zdravu populaciju;
2. Kod bolesnika sa šećernom bolesti tipa 2, jačina glomerulske filtracije, efektivni bubrežni protok plazme i frakcija filtracije su direktno zavisni od plazmatske koncentracije endotelina-1.

7. MATERIJAL I METODE

7.1. ISPITANICI

Ispitivanjem je obuhvaćeno ukupno 150 ispitanika, od toga 120 bolesnika sa tipom 2 šećerne bolesti, 62 žene i 58 muškaraca, starosti od 40 do 77 godina koji su lečeni ili se kontrolišu na Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, KC Vojvodine u Novom Sadu. Odabir bolesnika je bio selektivanog tipa, s obzirom na to da su u istraživanje uključivani bolesnici sa tipom 2 šećerne bolesti, koji su sekundarno insulin zavisni, odnosno na insulinskoj terapiji dužoj od 6 meseci. Osnovni kriterijum za uključivanje bolesnika u istraživanje je bio da funkciona rezerva bubrega nije redukovana više od 85%, odnosno da klirens kreatinina nije niži od 15 ml/min.

Istraživanje je sprovedeno po grupama u koje su bolesnici razvrstani na osnovu ukupne jačine glomerulske filtracije određivane metodom klirensa endogenog kreatinina, ali i upotrebom prediktivnih jednačina izvedenih iz serumskih koncentracije kreatinina i serumske koncentracije cistatina C.

Prvu grupu ispitanika je činilo ukupno 60 bolesnika (m/ž) čija je jačina glomerulske filtracije bila veća od 60 ml/min/1,73m².

Drugu grupu ispitanika je činilo ukupno 60 bolesnika (m/ž) čija je jačina glomerulske filtracije bila jednaka ili manja od 60 ml/min/1,73m².

Klinička obrada bolesnika sastojala se od detaljno uzete anamneze, fizikalnog pregleda i merenja krvnog pritiska. Priprema bolesnika podrazumevala je uzimanje uzoraka krvi našte i da u poslednja tri meseca nisu imali promene konkomitantne terapije i suplementacije, nivoa fizičke aktivnosti, promene u telesnoj masi, ishrani i navici pušenja.

Kontrolnu grupu činilo je 30 osoba, oba pola, približno iste životne dobi, klinički zdravih.

7.2. METODE ISTRAŽIVANJA

Protokol istraživanja je podrazumevao procenu funkcionog statusa bubrega, odnosno određivanje hemodinamskih parametara, koji su podrazumevali određivanje jačine glomerulske filtracije, efektivnog bubrežnog protoka plazme i frakcije filtracije sa uporednim merenjem nivoa plazmatskog endotelina-1. U proceni funkcionog statusa bubrega, pored gore navedenih hemodinamskih parametara, određivane su i serumske koncentracije kreatinina, uree, mokraćne kiseline, zatim vrednosti cistatina C i 24-tvoročasovna albuminurija i proteinurija.

Osim navedenih parametara, vršena je i procena glikoregulacije i lipoproteinskog statusa. Takođe, protokol istraživanja je podrazumevao i određivanje elektrolitskog statusa, ukupnih proteina, jetrenih enzima, hsCRP i fibrinogena i hematoloških pokazatelja u cilju isključivanja postojanja aktuelnih inflamatornih oboljenja, jetrenih oštećenja i drugih pridruženih bolesti.

7.2.1. Opšti podaci vezani za ispitanike

- pol
- starost
- dužina trajanja šećerne bolesti
- dužina trajanja insulinske terapije
- prisustvo hipertenzije
- dužina trajanja hipertenzije
- lekovi za hipertenziju

7.2.2. Procena funkcionog statusa bubrega

7.2.2.1. Određivanje jačine glomerulske filtracije

Osnovni kriterijum za razvrstavanje pacijenata po grupama bila je upravo ukupna jačina glomerulske filtracije koja je određivana klirensom endogenog kreatinina, modifikovanom metodom po Jaffe-u. Korišćena je 24-tvoročasovna diureza uz određivanje koncentracije kreatinina u deproteiniziranom serumu i urinu. Izračunate vrednosti su normalizovane u odnosu na telesnu površinu, a zatim upoređivane sa očekivanim vrednostima u odnosu na pol i starost ispitanika, radi procene stepena redukcije jačine glomerulske filtracije. Telesna površina je računata na osnovu sledeće formule:

$$\text{Telesna Površina (m}^2\text{)} = \text{masa (kg)}^{0,425} \times \text{visina (cm)}^{0,725} \times 0,007184 \quad (340).$$

Klirens kreatinina je rađen u kontrolisanim uslovima uz prethodno usmeno objašnjenje ispitanicima, kao i priloženo pismeno upustvo o metodologiji sakupljanja 24-voročasovnog urina.

7.2.2.2. Određivanje ukupnog efektivnog bubrežnog protoka plazme

Za određivanje ukupnog efektivnog bubrežnog protoka plazme korišćena je metoda određivanja klirensa ^{131}J -hipurana uz uzimanja dva uzorka plazme po metodi Blaufoxa (341). Korišćen je dvostruko prečišćen ortojodohipuran (OIH) obeležen izotopom ^{131}J , proizvod Instituta „Boris Kidrič“ u Vinči, Beograd.

Preparat je hromatografski prečišćen, dobijen od proizvođača u radioaktivnoj koncentraciji od 18.5 MBq/ml, sterilan i spreman za intravensku upotrebu. U kubitalnu venu bolesnika strogo intravenski injicirano je od 2.5 do 3.5 MBq ^{131}J -hipurana. Nakon toga u 20. i 30. minuti uzeti su iz kubitalne vene suprotne ruke uzorci venske krvi, uz odvajanje plazme. Radioaktivnost plazme merena je u gama scintilacionom brojaču, CAPTUS 3000 firme Capintec. Iz dobijenih vrednosti radioaktivnosti plazme i radioaktivnosti alikvota standarda, uz poznatu neto injiciranu dozu, preko volumena distribucije ^{131}J -hipurana i konstante brzine opadanja radioaktivnosti plazme izračunavana je vrednost klirensa ^{131}J -hipurana u ml/min.

Dobijene vrednosti su normalizovane na standardnu telesnu površinu i korigovane prema životnoj dobi bolesnika uz izračunavanje odstupanja u odnosu na očekivanu normalnu vrednost. Raspon normalnih vrednosti ukupnog efektivnog bubrežnog protoka plazme odnosno klirensa ^{131}J -hipurana za muškarce do 30 godina starosti iznosi 640–770 ml/min/1.73m², a za žene iste životne dobi 625–720 ml/min/1.73m² telesne površine.

7.2.2.3. Određivanje frakcije filtracije

Frakcija filtracije predstavlja deo plazme koji se filtrira putem glomerula i važan je pokazatelj glomerulo-tubulske ravnoteže. Frakcija filtracije je izračunata iz odnosa ukupne vrednosti jačine glomerulske filtracije i ukupnog efektivnog bubrežnog protoka plazme. Normalna vrednost frakcije filtracije iznosi 0.2+/-0.01.

7.2.2.4. Određivanje serumske koncentracije kreatinina

Serumska koncentracija kreatinina određivana je kinetičkim kolor testom (metoda po Jaffe-u) za kvantitativno određivanje kreatinina u serumu na OLYMPUS biohemijском analizatoru, uz korišćenje komercijalnih Beckman Coulter kitova (Irska). Kreatinin formira žuto/oranž obojenu smešu u kontaktu sa pikrinskom kiselinom u alkalnoj sredini, a stopa promene u apsorpciji na 520/800nm je proporcionalna koncentraciji kreatinina u uzorku. Gornja granica referentnih vrednosti koncentracije kreatinina u serumu je za žene do 96 μmol/l, za muškarce do 50 godina do 110 μmol/l, odnosno za muškarce iznad 50 godina do 127 μmol/l.

Iz serumske koncentracije kreatinina procenjivana je JGF upotrebom prediktivnih formula prikazanih u tabeli 3 (263, 265):

Tabela 3. Prediktivne formule za izračunavanje JGF

Cockroft-Gault-ova formula:		
JGF (ml/min) = {(140 – godine) x telesna masa (kg)} / {0,81 x S _{Cr} } x {0,85 ako je žena}		
MDRD formula:		
JGF (ml/min/1,73 m ²) = 32.788 x (S _{Cr}) ^{-1,154} x (godine) ^{-0,203} x (0,742 ako je žena) x (1,21 ako je crnac)		
CKD-EPI formula:		
Pol	S _{Cr} (μmol/L)	Formula
Žene	≤ 62	JGF = 144 x (S _{Cr} /0,7) ^{-0,329} x (0,993) ^{starost (godine)}
	> 62	JGF = 144 x (S _{Cr} /0,7) ^{-1,209} x (0,993) ^{starost (godine)}
Muškarci	≤ 0	JGF = 141 x (S _{Cr} /0,9) ^{-0,411} x (0,993) ^{starost (godine)}
	> 80	JGF = 141 x (S _{Cr} /0,9) ^{-1,209} x (0,993) ^{starost (godine)}

Legenda: S_{Cr}- koncentracija kreatinina u serumu (μmol/L ili mg/dL); JGF- jačina glomerulske filtracije u ml/min/1,73 m²

7.2.2.5. Serumska koncentracija uree

Serumska koncentracija uree određivana je kinetičkim UV testom za kvantitativno određivanje uree u serumu na OLYMPUS biohemijском analizatoru, uz korišćenje komercijalnih Beckman Coulter kitova (Irska). Ovaj test zasniva se na principu hidrolize uree u prisustvu ureaze i vode, pri čemu nastaju amonijak i ugljen-dioksid. Nastali amonijak u reakciji sa 2-oksoglutaratom i NADH u prisustvu glutamat-dehidrogenaze stvara NAD⁺ i glutamat. Smanjenje apsorbcije NADH u jedinici vremena proporcionalno je koncentraciji uree. Referentne vrednosti serumske koncentracije uree su 2,8–7,2 mmol/L.

7.2.2.6. Serumska koncentracija mokraćne kiseline

Serumska koncentracija mokraćne kiseline određivana je standardnim enzimatskim kolor testom (PAP metod sa urikazom i peroksidazom) za kvantitativno određivanje mokraćne kiseline u serumu na OLYMPUS biohemijskom analizatoru, uz korišćenje komercijalnih Beckman Coulter kitova (Irska). Referentne vrednosti su: za muškarce 208,3–428,4 $\mu\text{mol/L}$, odnosno za žene 154,7–357,0 $\mu\text{mol/L}$.

7.2.2.7. Serumska koncentracija cistatina C

Serumska koncentracija cistatina C određivana je imunoturbidimetrijskom metodom na OLYMPUS biohemijskom analizatoru uz korišćenje komercijalnih Diazyme kitova (Poway, SAD). Cistatin C iz uzorka veže se sa anti-cistatin C antitelima koja su obložena lateks česticama što prouzrokuje aglutinaciju. Step en zamućenja uzrokovan aglutinacijom meri se optički i proporcionalan je koncentraciji cistatina C u uzorku. Referentne vrednosti iznose 0,5–1,03 mg/L.

Iz serumske koncentracije cistatina C odgovarajućom formulom (za metodu i bolest) procenjuje se JGF (Tan GD 2002):

$$\text{JGF (ml/min/1,73m}^2\text{)} = 87,1 / \square \text{cistatin C (mg/L)} - 6,87$$

7.2.2.8. Određivanje urinarne ekskrecije albumina – albuminurija

Albuminurija je određivana iz uzorka 24-tvoročasovnog urina sendvič-imunometrijskom metodom, uz korišćenje komercijalnih NycoCard testova (Oslo, Norveška) na NycoCard čitaču. Nakon vezivanja albumina iz uzorka za anti-albuminska antitela, kao i za antitela iz dodatog konjugata (sendvič reakcija), dolazi do promene boje na membrani (na kojoj se odigrava reakcija) čiji je intenzitet srazmeran koncentraciji albumina u uzorku. Gornja granica referentnih vrednosti je 30 mg/dU.

7.2.2.9. Određivanje proteinurije

Proteinurija je određivana iz uzorka 24-tvoročasovnog urina, modifikovanom bojenom metodom (sa pirogalol crvenim) po Fujiti i sar. (Fujita Y1983) na biohemijskom analizatoru ADVIA 1800, uz korišćenje komercijalnih Siemens kitova (Siemens Health Care Diagnostics, Tarrytown, SAD). Pirogalol crveno u kiseloj sredini uz jone molibdata gradi komplekse sa proteinima. Očitavanje se vrši na 596/694 nm, a optička gustina je direktno proporcionalna koncentraciji proteina u uzorku. Gornja granica referentnih vrednosti je 140 mg/dU.

7.2.3. Određivanje endotelina-1 u krvi

Nivo plazmatskog endotelina-1 određivana je ELISA metodom korišćenjem komercijalnih setova firme R&D Systems na aparatu RYTO. Test je zasnovan na direktnoj sendvič tehnici sa monoklonskim antitelima uperenim ka ET-1. Tokom inkubacije, ET-1 iz uzorka reaguje sa anti-ET-1 antitelima koja oblažu zid reakcionih posuda. Nakon ispiranja, dodavanja konjugata (kada nastupa inkubacija u kojoj reaguju vezana ET-1 sa konjugatom, što ima za posledicu vezanje konjugata za ET-1) i ponovnog ispiranja, vezani konjugat se detektuje u reakciji sa tetrametilbenzidinom (TMB). Dodavanjem kiseline reakcija se stopira nakon čega sledi očitavanje uzoraka na 450 nm.

7.2.4. Procena stanja glikoregulacije

7.2.4.1. Glikemija

Za procenu stanja metaboličke regulacije šećerne bolesti uzete su vrednosti glikemije našte. Prema preporukama Nacionalnog vodiča dobre kliničke prakse iz 2012 godine, poželjne vrednosti preprandijalne glikemije kod bolesnika sa tipom 2 šećerne bolesti treba da iznose manje od 7mmol/L, a postprandijalne manje od 9mmol/L.

Serumska koncentracije glukoze određivana je standardnim enzimatskim UV testom (metoda sa heksokinazom) na OLYMPUS biohemijском analizatoru, korišćenjem komercijalnih Beckman Coulter kitova (Irska). Referentne vrednosti iznose 3,9–6,1 mmol/L.

7.2.4.2. HbA1c

HbA1c služi kao parametar glikoregulacije u retrogradnom periodu od 2–3 meseca. Preporučene vrednosti HbA1c kod bolesnika sa tipom 2 šećerne bolesti, a prema Nacionalnom vodiču za dobru kliničku praksu iz 2012 godine, iznose manje od 7%.

Nivo HbA1c određivan je imuno-inhibicionim testom na OLYMPUS biohemijском analizatoru, korišćenjem komercijalnih Beckman Coulter kitova (Irska). Prisustvo HbA1c u uzorku sprečava aglutinaciju specifičnih monoklonskih antitela obloženih lateks česticama (reagens 1) sa aglutinatorom (reagens 2), sprečavajući povećanje absorbance koje nastaje u ovoj reakciji. Dakle, povećanje apsorbance obrnuto je srazmerno koncentraciji HbA1c i meri se na 700 nm.

Osim apsolutnog nivoa HbA1c u sklopu ovog eseja određuje se i apsolutni nivo ukupnog hemoglobina (THb), u svrhu izračunavanja odnosa THb/HbA1c koji se izražava u %. U preanalitičkoj fazi, puna krv se meša sa denaturantom u odnosu 1:41, nakon čega dolazi do lize eritrocita a potom i do hidrolize hemoglobina. Nivo THb proporcionalan je konverziji derivata hemoglobina u hematin, a intenzitet stvorene zelene solucije u nastaloj reakciji meri se na 600 nm.

Referentne vrednosti za HbA1c iznose 4,0–6,2% (DCCT).

7.2.5. Procena lipoproteinskog statusa

Određivane su vrednosti ukupnog holesterola, LDL, HDL i triglicerida, kao i apolipoproteina A-I i B, Lpa, i njihovi međusobni odnosi.

Parametri lipidskog statusa određivani su standardnim biohemijским analizama. Ukupni holesterol i trigliceridi određivani su standardnim enzimskim postupkom uz korišćenje reagenasa firme BIOMERIEUX. Holesterol u HDL-frakciji je određivan nakon

izolovanja ove frakcije metodom po Bursteinu i sar. LDL holesterol se izračunavao po formuli Friedewalda i sar. Referentne vrednosti za lipidski status su uzete iz Odeljenja za specijalizovanu laboratorijsku dijagnostiku, Centra za laboratorijsku medicinu, KC Vojvodine.

Serumske koncentracije apo A-I i apo B određivane su imunoturbidimetrijskom metodom na OLYMPUS biohemijском analizatoru, uz korišćenje komercijalnih Beckman Coulter kitova (Irska). Nakon mešanja sa puferom i antiserum-solucijom (sadrži apoAI i apoB antitela), apolipoproteini iz uzorka specifično reaguju sa antitelima gradeći nerastvorljive agregate (nastaje zamućenost uzorka koja je proporcionalna koncentraciji apolipoproteina u uzorku). Referentne vrednosti su uzete iz Odeljenja za specijalizovanu laboratorijsku dijagnostiku, Centra za laboratorijsku medicinu, KC Vojvodine i iznose za žene: 1,18–1,86 g/L (apoAI) i 0,38–0,9 g/L (apoB), odnosno za muškarce: 1,03–1,83 g/L (apoAI) i 0,35–1,07 g/L (apoB).

Serumska koncentracija Lp(a) određivana je imunoturbidimetrijskom metodom na OLYMPUS biohemijском analizatoru, uz korišćenje komercijalnih Sentinel kitova (Irska). Lp(a) iz uzorka reaguje sa anti-Lp(a) antitelima koja su obložena lateks česticama, što prouzrokuje aglutinaciju (zamućenje) koja je proporcionalna koncentraciji Lp(a) u uzorku.

7.2.6. Procena stanja uhranjenosti

Stanje uhranjenosti procenjeno je na osnovu antropometrijskih merenja, TT, TV i izračunavanja indeksa telesne mase (BMI) po formuli Quetelet-a.

$$\text{BMI} = \text{telesna težina (kg)} / \text{telesna visina (m)}^2$$

7.2.7. Određivanje inflamatornih markera, elektrolitskog statusa, ukupnih proteina i jetrenih enzima

7.2.7.1. Serumska koncentracija C-reaktivnog proteina

Serumska koncentracija C-reaktivnog proteina određivana je metodom imunoturbidimetrije na OLYMPUS analajzeru, uz korišćenje komercijalnih Beckman Coulter kitova (Irska). Metoda se zasniva na reakciji CRP-a iz uzorka sa anti-humanim CRP-antitelima obloženim lateks česticama, pri čemu se stvaraju nerastvorljivi agregati. Apsorbicija sposobnost ovih agregata je proporcionalna koncentraciji CRP-a u serumu. Gornja granica referentnih vrednosti je 5 mg/L.

7.2.7.2. Plazmatska koncentracija fibrinogena

Plazmatska koncentracija fibrinogena je određivana Klausovom metodom u citratnoj plazmi (Clauss A1957) na ACL sistemu, uz korišćenje komercijalnih setova firme Instrumentation Laboratory (Italija). Referentne vrednosti iznose 2,2–4,96 g/L.

13. Kompletna krvna slika određivana je metodom protočne citometrije, uz korišćenje komercijalnih reagenasa firme Abbott (SAD), na automatskom hematološkom brojaču Sapphire, iste firme.

7.2.7.3. Serumska koncentracija ukupnih proteina

Serumska koncentracija ukupnih proteina određivana je standardnim fotometrijskim kolor testom na analizatoru OLYMPUS, korišćenjem komercijalnih Beckman Coulter kitova (Irska). U alkalnoj sredini, joni bakra reaguju sa proteinima iz uzorka dovodeći do bojene reakcije. Intenzitet boje srazmeran je koncentraciji proteina u uzorku. Referentne vrednosti iznose 60–80 g/L.

7.2.7.4. Serumska koncentracija GGT

Serumska koncentracija GGT određivana je kinetičkim kolor testom na analizatoru OLYMPUS, korišćenjem komercijalnih Beckman Coulter kitova (Irska). GGT katalizuje transfer gama-glutaminske grupe sa supstrata (gama-glutamil-3-karboksi-4-nitroanilid) na glicilglicin, formirajući 5-amino-2-nitrobenzoat. Produkcija 5-amino-2-nitrobenzoat direktno je proporcionalna aktivnosti GGT u uzorku. Referentne vrednosti iznose: do 55 U/L za muškarce, odnosno do 38 U/L za žene.

7.2.7.5. Elektrolitski status

Određivanje serumske koncentracije natrijuma i kalijuma vršeno je standardnom metodom plamene fotometrije na Ilyte plamenom fotometru, dok je određivanje serumske koncentracije kalcijuma vršeno fotometrijskim kolor testom na OLYMPUS biohemijskom analizatoru, uz upotrebu komercijalnih Beckman Coulter kitova (Irska). Referentne vrednosti iznose: Na: 135–150 mmol/L, K: 3,5–5,5 mmol/L, Ca:2,2–2,7 mmol/L.

7.3. STATISTIČKE METODE

Podaci prikupljeni tokom istraživanja uneti su u kompjutersku bazu u obliku tabele, a za statističku obradu podataka korišćen je softver SPSS, verzija 12.0 (StatSoft inc., Tulsa, OK, USA).

Za prikazivanje podataka korišćene su deskriptivne statističke metode: frekvencije, procenti, srednje vrednosti, standardne greške, standardne devijacije itd. Podaci su prikazani tabelarno i grafički. Saglasnost sa normalnom raspodelom je testirana pomoću Kolmogorov-Smirnov testa.

Od statističkih testova korišćeni su parametarski (t-test, ANOVA) i neparametarski testovi (Mann-Whitney-ev, χ^2 – test, Kruskal-Valisov test).

Za utvrđivanje povezanosti korišćeni su Pirsonov koeficijent linerane korelacije i Spirmanov koeficijent korelacije ranga.

U cilju procene nezavisnog doprinosa plazmatske koncentracije endotelina-1 na jačinu glomerulske filtracije, korišćena je multivarijantna regresiona analiza. U procenu su uključene varijable koje su pokazale statističku značajnost u univarijantnoj analizi: plazmatska koncentracija endotelina-1, albuminurija, proteinurija i dužina trajanja hipertenzije.

Statističke hipoteze su testirane na nivou statističke značajnosti od 0,05.

8. REZULTATI

Ispitivanje odnosa plazmatskog endotelina-1 i funkcionog statusa bubrega kod bolesnika sa tipom 2 šećerne bolesti sprovedeno je u formi studije preseka.

U studiju je uključeno 120 ispitanika sa tipom 2 šećerne bolesti i 30 klinički zdravih osoba. Tokom ispitivanja, bolesnici sa tipom 2 šećerne bolesti podeljeni su u dve grupe, na osnovu funkcijskog statusa bubrega:

- Prvu grupu (grupa I) sačinjavalo je 60 ispitanika obolelih od šećerne bolesti tip 2, koji su sekundarno insulin zavisni, čija je vrednost JGF bila veća od $60 \text{ ml/min/1.73m}^2$
- Drugu grupu (grupa II) sačinjavalo je takođe 60 ispitanika obolelih od šećerne bolesti tip 2 sekundarno insulin zavisni, čija je vrednost JGF bila jednaka ili manja od $60 \text{ ml/min/1.73m}^2$

Kontrolnu grupu (KG) sačinjavalo je 30 klinički zdravih ispitanika.

U svim navedenim grupama ispitanika analizirani su svi, u metodologiji navedeni parametri, i potom su dobijeni rezultati upoređivani među grupama.

8.1. Opšte karakteristike ispitivanih grupa

8.1.1. Starosna i polna struktura

Kontrolnu grupu (KG) činilo je 30 klinički zdravih ispitanika kod kojih je isključeno postojanje poremećaja bubrežne funkcije, kao i kardiovaskularnih oboljenja. U tabeli 4 prikazana je starosna struktura ispitanika kontrolne grupe.

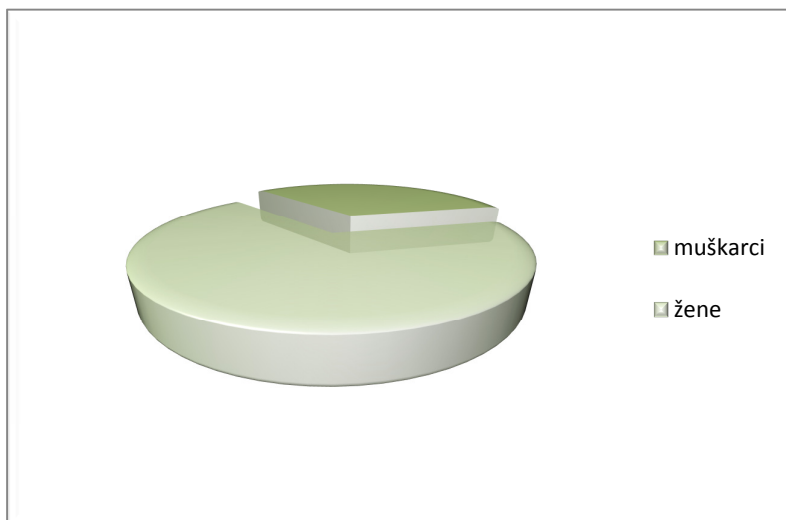
Tabela 4. Starosna struktura kontrolne grupe

Starost (godine)	n	\bar{x}	SD	med	min	max
KG	30	60	11	60	40	78

Legenda: KG-kontrolna grupa

Od ukupnog broja ispitanika kontrolne grupe, njih 10 je bilo muškaraca, a 20 žena. Na grafikonu 1 prikazana je polna struktura ispitanika kontrolne grupe.

Grafikon 1. Polna struktura kontrolne grupe



Grupu I je sačinjavalo 60 ispitanika sa tipom 2 šećerne bolesti, sekundarno insulin zavisni sa JGF koja je veća od 60 ml/min/1.73m².

U tabeli 5 je prikazana starosna struktura ispitanika grupe I.

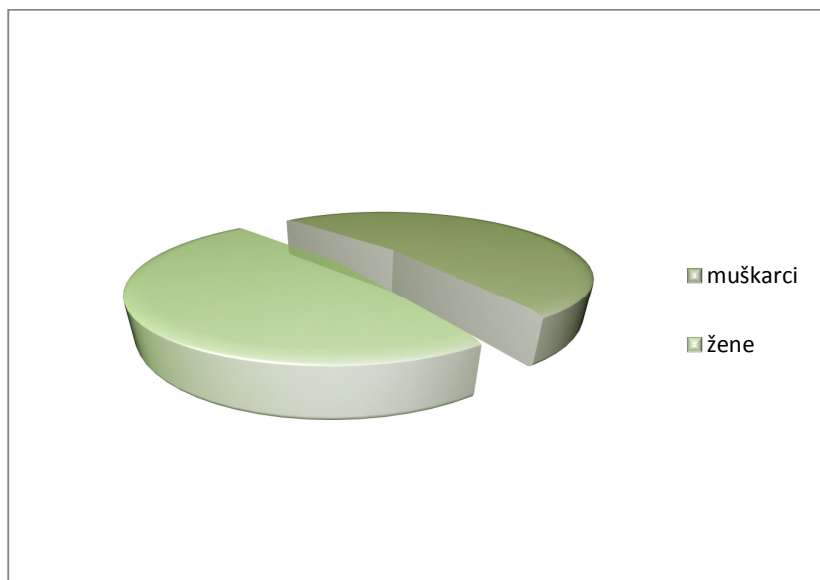
Tabela 5. Starosna struktura grupe I

Starost (godine)	n	\bar{x}	SD	med	min	max
Grupa I	60	60	8	59	40	77

Legenda: Grupa I-ispitanici sa JGF> 60ml/min

Od ukupnog broja ispitanika grupe I bilo je 32 muškarca i 28 žena. Na grafikonu 2 prikazana je polna struktura ispitanika grupe I.

Grafikon 2. Polna struktura ispitanika grupe I



Grupu II je sačinjavalo 60 ispitanika sa tipom 2 šećerne bolesti, sekundarno insulin zavisni čija je jačina glomerulske filtracije bila manja od 60 ml/min/1.73m².

U tabeli 6 je prikazana starosna struktura ispitanika grupe II.

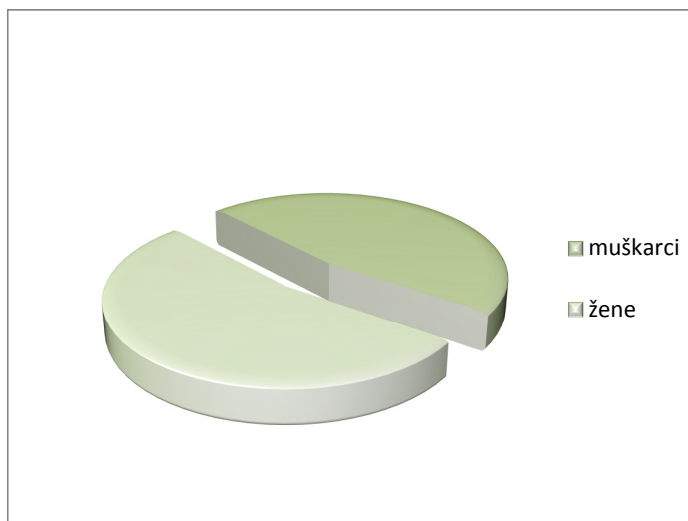
Tabela 6. Starosna struktura grupe II

Starost (godine)	n	\bar{x}	SD	med	min	max
Grupa II	60	62	7	63	44	74

Legenda: Grupa II-ispitanici sa JGF< 60ml/min

Od ukupnog broja ispitanika grupe II bilo je 27 muškaraca i 33 žene. Na grafikonu 3 je prikazana polna struktura ispitanika grupe I.

Grafikon 3. Polna struktura ispitanika grupe II



Između ispitanika sa šećernom bolesti i kontrolne grupe ispitanika nije bilo statistički značajne razlike u prosečnoj starosti ($t=1,407$; $p=0,168$), kao ni statistički značajne razlike u učestalosti pola između ispitivanih grupa (Hi-kvadrat=3,261; $p=0,196$).

8.1.2. Dužina trajanja šećerne bolesti i insulinske terapije

U tabeli 7 prikazana je dužina trajanja šećerne bolesti u ispitivanim grupama.

Tabela 7. Vrednosti dužine trajanja šećerne bolesti ispitivanih grupa

Trajanje bolesti (godine)	n	\bar{x}	SD	med	min	max
Grupa I	60	13	8	13	1	35
Grupa II	60	15	7	15	2	32

Legenda: Grupa I-ispitanici sa JGF> 60ml/min, Grupa II- ispitanici sa JGF< 60ml/min

U tabeli 8 su prikazane vrednosti dužine trajanja insulinske terapije u ispitivanim grupama.

Tabela 8. – Vrednosti dužine trajanja insulinske terapije ispitivanih grupa

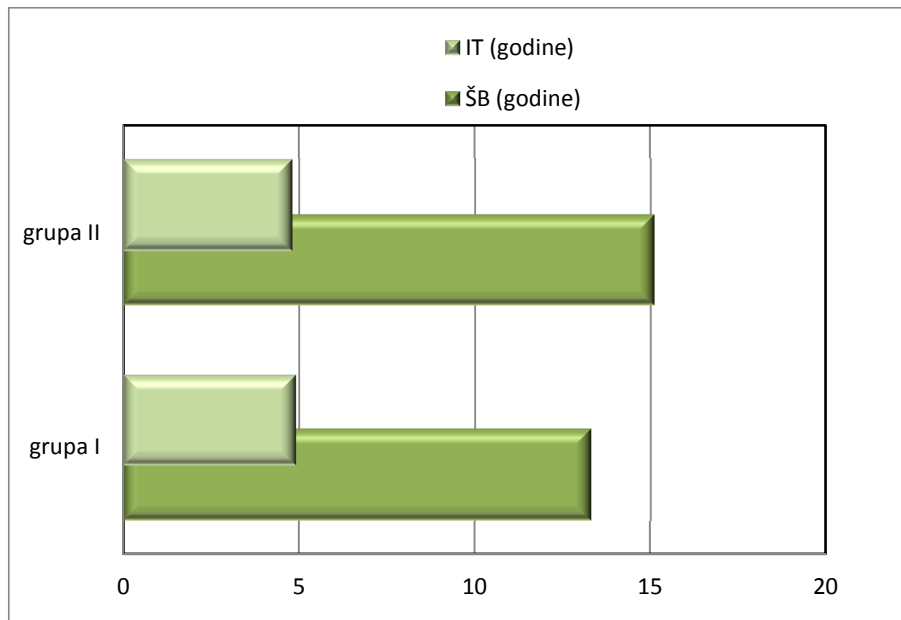
Dužina terapije (godine)	n	\bar{x}	SD	med	min	max
Grupa I	60	5	4	4	1	25
Grupa II	60	5	4	5	1	20

Legenda: Grupa I-ispitanici sa JGF> 60 ml/min, Grupa II- ispitanici sa JGF< 60 ml/min

Ne postoji statistički značajna razlika u medijanama dužine trajanja šećerne bolesti između ispitivanih grupa ($U=1489,5$; $p=0,102$), kao i dužine trajanja insulinske terapije ($U=1700,0$; $p=0,597$).

Na grafikonu 4 prikazana je prosečna dužina trajanja šećerne bolesti i insulinske terapije ispitivanih grupa.

Grafikon 4. Trajanje šećerne bolesti i insulinske terapije ispitivanih grupa



Legenda: Grupa I-ispitanici sa JGF> 60 ml/min, Grupa II- ispitanici sa JGF< 60 ml/min

8.1.3. Parametri glikemijske kontrole

U tabeli 9 i 10 su prikazane vrednosti glikemije našte i HbA1c u ispitivanim grupama.

Tabela 9. Vrednosti glikemije našte u ispitivanim grupama.

Glikemija našte (mmol/l)	n	\bar{x}	SD	med	min	max
KG	30	5,3	0,7	5,3	3,9	6,5
Grupa I	60	9,4	3,4	8,7	4,6	14,4
Grupa II	60	9,7	4,3	8,8	4	15,5

Legenda: KG– kontrolna grupa, Grupa I-ispitanici sa JGF> 60 ml/min, Grupa II- ispitanici sa JGF< 60 ml/min

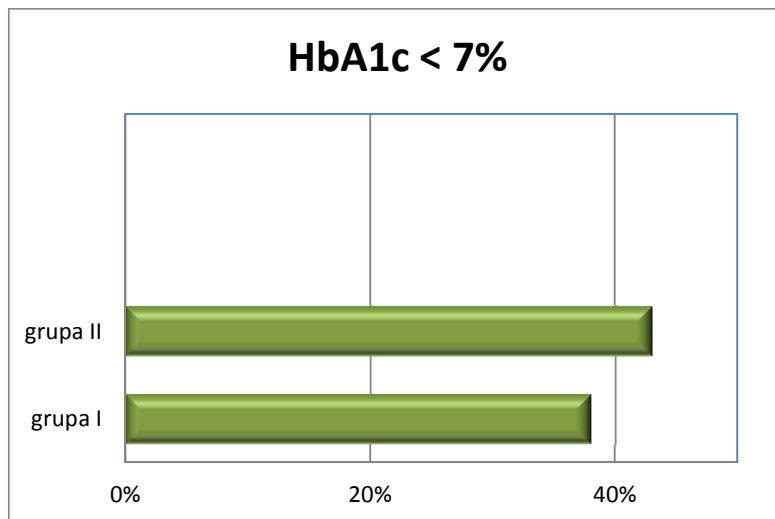
Tabela 10. Vrednosti HbA1c u ispitivanim grupama

HbA1c (%)	n	\bar{x}	SD	med	min	max
KG	30	5,4	0,5	5,4	5	6,5
Grupa I	60	7,9	1,5	7,7	5,6	10
Grupa II	60	7,8	1,5	7,4	6	10

Legenda: KG- kontrolna grupa, Grupa I-ispitanici sa JGF> 60 ml/min, Grupa II- ispitaniici sa JGF< 60 ml/min

Na grafikonu je prikazana zastupljenost ispitanika sa nivoom HbA1c< 7% u ispitivanim grupama bolesnika.

Grafikon 5. Frekvencija (%) ispitanika sa nivoom HbA1c < 7%



Legenda: Grupa I-ispitanici sa JGF> 60 ml/min, Grupa II- ispitaniici sa JGF< 60 ml/min

Između kontrolne grupe ispitanika i bolesnika iz grupe I i II, postoje značajne razlike u vrednostima glukoze i HbA1c u krvi, što je i očekivano, dok između ispitivanih grupa bolesnika sa šećernom bolesti nema značajnijih razlika u navedenim parametrima.

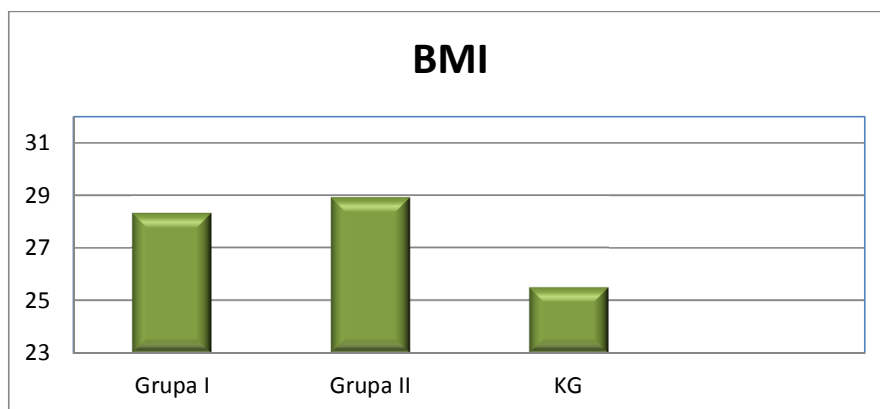
U obe grupe ispitanika sa šećernom bolesti podjednak je broj ispitanika sa zadovoljavajuće regulisanom glikemijom (grupa I=38%, a grupa II=43%) ($p > 0,05$).

8.1.4. Stanje uhranjenosti

Postoji statistički značajna razlika u medijanama vrednosti BMI između ispitivanih grupa ($p=0,015$). Statistički značajna razlika u medijanama vrednosti BMI postoji između ispitanika kontrolne grupe u odnosu na grupe bolesnika sa šećernom bolesti ($p<0,05$), dok između ispitanika grupe I i grupe II ne postoji statistički značajna razlika u medijanama BMI ($p=0,603$). U obe grupe bolesnika sa šećernom bolesti zastupljenost ispitanika sa BMI>25 kg/m² (~75%) bila je veća u odnosu na ispitanike kontrolne grupe (43%), što je prikazano na grafikonu 7.

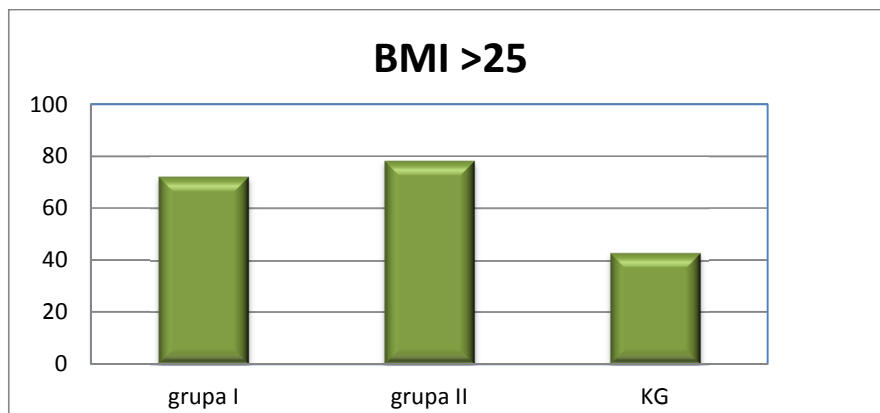
Na grafikonu 6 su prikazane prosečne vrednosti BMI (kg/m²) u ispitivanim grupama.

Grafikon 6. Vrednosti BMI (kg/m²) u ispitivanim grupama



Legenda: KG-kontrolna grupa, Grupa I-ispitanici sa JGF> 60 ml/min, Grupa II- ispitanici sa JGF< 60 ml/min

Grafikon 7. Zastupljenost ispitanika (%) sa vrednostima BMI>25 kg/m²



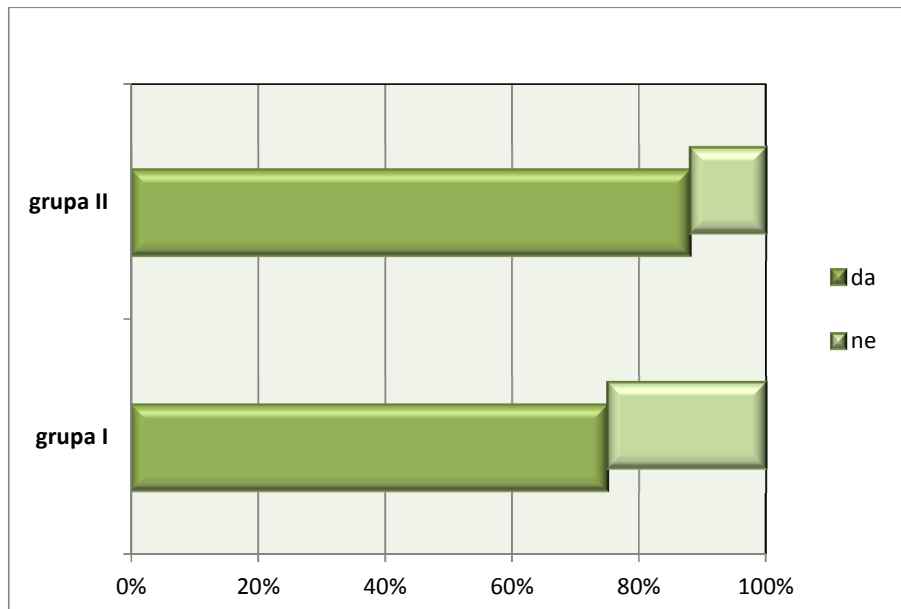
Legenda: KG-kontrolna grupa, Grupa I-ispitanici sa JGF> 60 ml/min, Grupa II- ispitanici sa JGF< 60 ml/min

8.1.5. Hipertenzija

Od ukupnog broja ispitanika sa šećernom bolesti njih 98 (82%) je imalo hipertenziju, od čega u grupi I njih 45 (75%), a u grupi II bolesnika sa šećernom bolesti njih 53 (88%). Ne postoji statistički značajna razlika u prisustvu hipertenzije između grupa ispitanika ($p>0,05$).

Na grafikonu 8 prikazano je prisustvo hipertenzije (%) u ispitivanim grupama.

Grafikon 8. Prisustvo hipertenzije (%) u ispitivanim grupama



Legenda: Grupa I-ispitanici sa JGF> 60 ml/min, Grupa II- ispitanici sa JGF< 60 ml/min

U tabeli 11 su prikazane vrednosti dužine trajanja hipertenzije u ispitivanim grupama.

Tabela 11. – Vrednosti dužine trajanja hipertenzije u ispitivanim grupama

Trajanje hipertenzije (godine)	n	\bar{x}	sd	med	min	max
Grupa I	60	9	7	5	1	30
Grupa II	60	11	8	10	2	40

Legenda: Grupa I-ispitanici sa JGF>60/ml/min, Grupa II- ispitanici sa JGF<60 ml/min

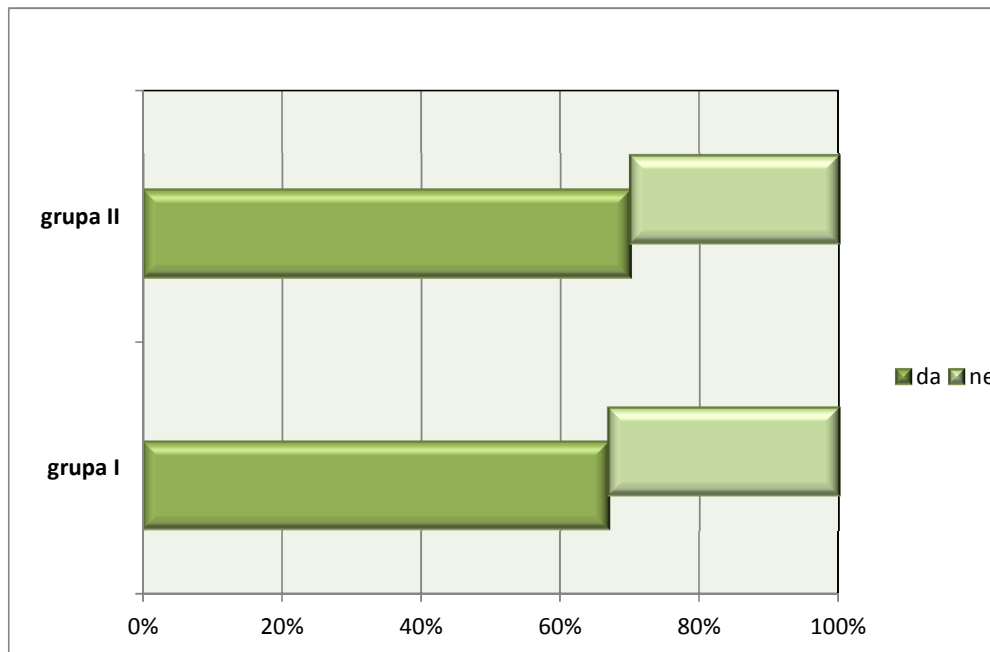
Postoji statistički značajna razlika u medijanama dužine trajanja hipertenzije između ispitivanih grupa ($U=89,5$; $p=0,035$), odnosno dijabetičari sa težim funkcijskim oštećenjem

bubrega su imali značajnije duže trajanja hipertenzije u odnosu na dijabetičare sa manjim funkcijskim oštećenjem bubrega.

Od svih ispitanika sa hipertenzijom njih 67 (56%) je u terapiji hipertenzije uzimalo ACE inhibitor. U grupi ispitanika sa manjim stepenom bubrežne hipofunkcije njih 67% je uzimalo ACE inhibitore, dok je u grupi II sa težim stepenom bubrežne hipofunkcije njih 70% uzimalo ACE inhibitore. Nije postojala statistički značajna razlika u učestalosti uzimanja ACE inhibitora u ispitivanim grupama ($p>0,05$).

Na grafikonu 9 prikazana je učestalost primene ACE inhibitora (%) u ispitivanim grupama.

Grafikon 9. Učestalost primene ACE- inhibitora (%) u ispitivanim grupama



Legenda: Grupa I-ispitanici sa JGF> 60 ml/min, Grupa II- ispitanici sa JGF< 60 ml/min

7.1.6. Parametri lipoproteinskog statusa

U tabeli 12 prikazane su vrednosti lipoproteinskog statusa svih ispitanika.

Tabela 12. Vrednosti parametara lipoproteinskog statusa ispitivanih grupa

	Grupa I	Grupa II	KG
Holesterol (mmol/l)	5,6 (±1,2)	5,2 (±1,02)	5,6 (±1,23)
Trigliceridi (mmol/l)	1,8 (±0,92)	1,8 (±1,24)	1,5 (±0,7)
HDL (mmol/l)	1,2 (±0,34)	1,0 (±0,29)	1,6 (±0,38)
LDL (mmol/l)	3,6 (±1,0)	3,1 (±0,75)	3,1 (± 1,0)
Index ateroskleroze	3,2 (±1,12)	3,0 (±0,91)	2,2 (±0,91)
ApoA-I (g/l)	1,3 (±0,47)	1,26 (±0,25)	1,5 (± 0,29)
Apo B (g/l)	1,2 (±0,25)	1,0 (±0,18)	1,1 (±0,2)
ApoB/A-I	0,9 (±0,32)	0,8 (±0,27)	0,7 (±0,24)
Lp-a (g/l)	0,6 (±0,41)	0,3 (±0,27)	0,3 (±0,31)

Legenda: KG-kontrolna grupa, Grupa I-ispitanici sa JGF> 60 ml/min, Grupa II- ispitanici sa JGF< 60 ml/min

Između ispitivanih grupa nema značajnije razlike u serumskim koncentracijama holesterola ($p>0,05$). Vrednosti triglicerida su bile više u grupi dijabetesnih bolesnika ali nije bilo statističke značajnosti između ispitivanih grupa.

Značajno niže vrednosti HDL holesterola imale su obe grupe dijabetesnih bolesnika u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ($p < 0,05$), dok su vrednosti LDL holesterola bile najviše u grupi bolesnika sa manjim stepenom bubrežne hipofunkcije. Vrednosti indeksa ateroskleroze su bile značajno više u grupi dijabetesnih bolesnika u odnosu na kontrolnu grupu zdravih.

Vrednosti ApoA-I su značajnije bile više u kontrolnoj grupi zdravih u odnosu na grupe dijabetesnih bolesnika sa bubrežnom hipofunkcijom, dok su vrednosti ApoB značajnije bile više u grupi I ispitanika u odnosu na ostale grupe ispitanika. Odnos ApoB/ApoA-I je značajnije niži u kontrolnoj grupi zdravih u odnosu na grupe dijabetesnih bolesnika. Što se tiče vrednosti Lp-a, one su bile najviše u grupi I dijabetesnih bolesnika u odnosu na ostale grupe ispitanika.

8.1.7. Parametri inflamacije, elektrolitskog statusa, ukupnih proteina i jetrenih enzima

Protokol istraživanja je takođe podrazumevao i određivanje elektrolitskog statusa, ukupnih proteina, jetrenih enzima, hsCRP i fibrinogena i hematoloških pokazatelja, u cilju isključivanja postojanja aktuelnih inflamatornih oboljenja, jetrenih oštećenja i drugih pridruženih bolesti.

U tabeli 13 prikazane su serumske koncentracije CRP, fibrinogena, elektrolita, ukupnih proteina i jetrenih enzima u grupama ispitanika.

Tabela 13. Vrednosti serumske koncentracije CRP, fibrinogena, elektrolita, ukupnih proteina i jetrenih enzima kod ispitivanih grupa

	Grupa I	Grupa II	KG
Fibrinogen (g/l)	3,4 (±0,5)	3,6 (±0,7)	3,2 (±0,4)
hsCRP (mg/l)	4,1(±4,35)	4,9 (±4,4)	1,7 (±1,4)
Kalcijum (mmol/l)	2,4 (±0,8)	2,4 (±1)	2,3 (±1)
Fosfor (mmol/l)	1,1 (±0,8)	1,1 (±0,17)	1,1 (±0,21)
Natrijum (mmol/l)	141 (±1,9)	140 (±2,5)	142 (±2,0)
Hlor (mmol/l)	106 (±2)	106 (±2,8)	105 (±1,5)
Magnezijum (mmol/l)	0,8 (±0,09)	0,7 (±0,07)	0,9 (±0,06)
Kalijum (mmol/l)	4,4 (±0,5)	4,6 (±0,4)	4,5 (±0,29)
Ukupni proteini (g/l)	71 (±2)	68 (±3)	70 (±1)
AST (U/L)	23 (±6,5)	25 (±7,8)	21 (±6)
ALT (U/L)	19 (±9)	20 (±7)	19 (±7)
GGT (U/L)	23 (±9)	24 (±12)	20 (±9,9)

Legenda: KG-kontrolna grupa, Grupa I-ispitanici sa JGF> 60 ml/min, Grupa II- ispitanici sa JGF< 60 ml/min

8.2. REZULTATI ISPITIVANJA FUNKCIONOG STATUSA BUBREGA

U tabeli 14 prikazane su vrednosti funkcijskih parametara bubrega kod ispitanika kontrolne grupe.

Tabela 14. Vrednosti funkcijskih parametara bubrega u kontrolnoj grupi

KG	x	SD	med	min	max
JGF (ml/min)	89	12	90	70	115
EBPP (ml/min)	513	51	510	410	600
FF (JGF/EBPP)	0,19	0,01	0,19	0,17	0,23
Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	71	7,6	71	56	90
Urea (mmol/l)	5,6	1,5	5,8	2,5	7,6
Mokraćna kiselina ($\mu\text{mol/l}$)	272	60	275	156	383
Cistatin C (mg/l)	0,8	0,1	0,8	0,6	1,1
Albuminurija (mg/l)	9	2	9	5	12
Proteinurija (mg/dU)	67	14	67	40	90

Legenda: KG-kontrolna grupa

Ispitanici kontrolne grupe imali su vrednosti JGF i EBPP u okviru očekivanih za uzrast i pol. Vrednosti funkcijskih parametara bubrega odnosno JGF, EBPP i FF kontrolne grupe su se statistički značajno razlikovali u odnosu na grupe ispitanika sa šećernom bolesti i različitim stepenom bubrežne hipofunkcije ($p < 0,01$).

U tabeli 15 i 16 prikazane su vrednosti funkcijskih parametara bubrega u ispitivanim grupama (grupa I i grupa II).

Tabela 15. Vrednosti funkcijskih parametara bubrega u grupi I

Grupa I	\bar{x}	SD	med	min	max
	JGF (ml/min)	73	8	72	60
Stepen redukcije JGF (%)	16	5	15	10	30
EBPP (ml/min)	428	37	422	350	515
Stepen redukcije EBPP (%)	17	4	16	8	26
FF (JGF/EBPP)	0,17	0,01	0,17	0,15	0,20
Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	79	9,6	79	60	100
Urea (mmol/l)	6	1,1	6	2,6	9
Mokraćna kiselina ($\mu\text{mol/l}$)	295	78	312	120	417
Cistatin C (mg/l)	1	0,1	1	0,8	1,2
Albuminurija (mg/l)	35	54	13	5	288
Proteinurija (mg/dU)	161	128	124	12	640

Legenda: Grupa I – ispitanici sa JGF>60/ml/min

Tabela 16. Vrednosti funkcijskih parametara bubrega u grupi II

Grupa II	\bar{x}	SD	med	min	max
JGF (ml/min)	44	11	43	18	59
Stepen redukcije JGF (%)	47	14	47	23	77
EBPP (ml/min)	257	64	248	120	366
Stepen redukcije EBPP (%)	48	13	49	25	75
FF (JGF/EBPP)	0,17	0,02	0,17	0,13	0,22
Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	124,5	59	102	85	484
Urea (mmol/l)	9	2,5	8	6	20
Mokraćna kiselina ($\mu\text{mol/l}$)	348	78	337	205	538
Cistatin C (mg/l)	1,5	0,4	1,4	1,2	2,9
Albuminurija (mg/l)	150,5	178	60	5	860
Proteinurija (mg/dU)	520,5	792	310	40	4554

Legenda: Grupa II – ispitanici sa JGF<60/ml/min

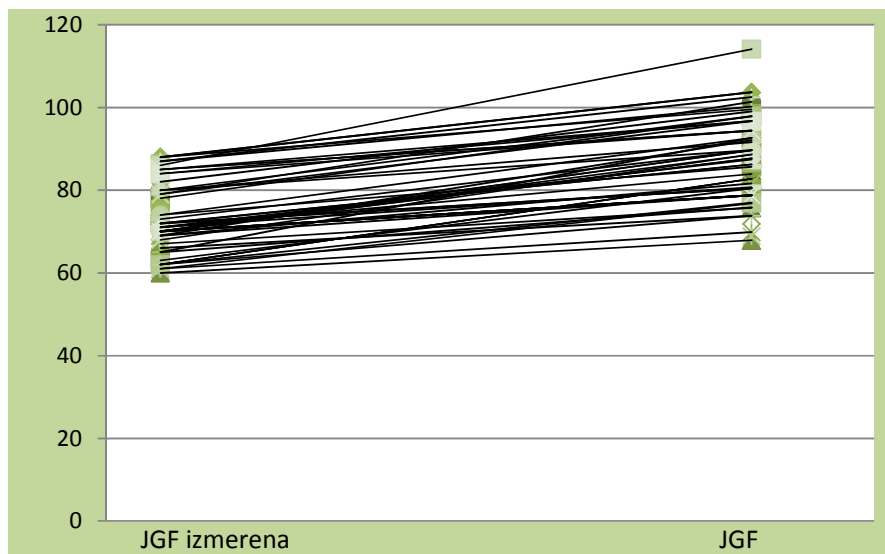
Između ispitivanih grupa bolesnika sa šećernom bolesti i različitim stepenom bubrežne hipofunkcije postoje statistički značajne razlike u vrednostima JGF i EBPP, kao i stepenu redukcije istih ($p < 0,05$), dok se prosečne vrednosti FF statistički nisu značajno razlikovale ($p = 0,562$).

Što se tiče ostalih pokazatelja bubrežne funkcije, postoji statistički značajna razlika u vrednostima kreatinina između ispitivanih grupa (Hi-kvadrat=103,07; DF=2; $p<0,001$). Statistički značajna razlika u vrednostima kreatinina postoji između ispitanika sa JGF<60 mL/min u odnosu na JGF>60 mL/min ($p<0,001$) i kontrolnu grupu ($p<0,001$), kao i između ispitanika JGF >60 mL/min i kontrolne grupe ($p<0,001$). Takođe postoji statistički značajna razlika u vrednostima uree (Hi-kvadrat=75,840; DF=2; $p<0,001$) i mokraćne kiseline (F=12,958; DF=2, 147; $p<0,001$) između ispitivanih grupa. Statistički značajna razlika u vrednostima uree i mokraćne kiseline postoji između ispitanika sa JGF <60 mL/min u odnosu na JGF >60 mL/min ($p<0,001$) i kontrolnu grupu ($p<0,001$), dok između ispitanika JGF >60 mL/min i kontrolne grupe ne postoji statistički značajna razlika u vrednostima uree i mokraćne kiseline ($p=0,051$; $p=0,370$).

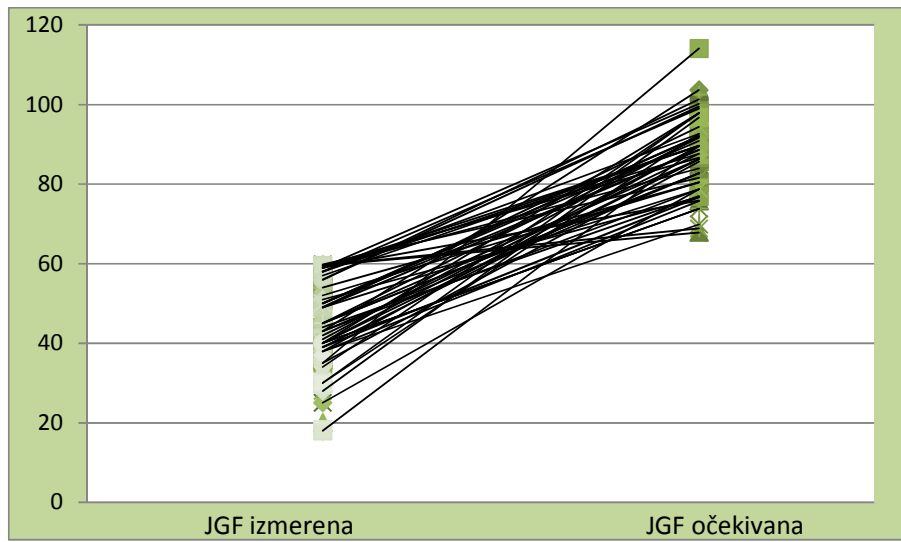
Vrednosti cistatina C u krvi kao pokazatelja JGF bile su značajno više u grupama dijabetesnih bolesnika u odnosu na kontrolnu grupu zdraviha (Hi-kvadrat=123,629; DF=2; $p<0,001$). Statistički značajna razlika u vrednosti cistatina C postoji između ispitanika sa JGF <60 mL/min u odnosu na JGF >60 mL/min ($p<0,001$) i kontrolnu grupu ($p<0,001$), kao i između ispitanika JGF >60 mL/min i kontrolne grupe ($p<0,001$).

Na grafikonima 10 i 11 prikazane su izmerene i očekivane vrednosti JGF u ml/min/1,73m² u ispitivanim grupama.

Grafikon 10 Prikaz izmerenih i očekivanih vrednosti JGF (ml/min/1,73m²) u grupi I

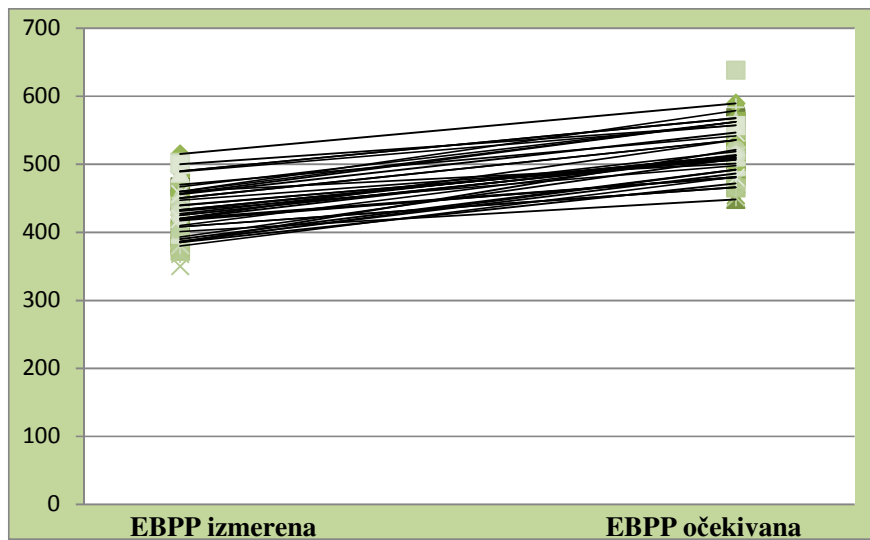


Grafikon 11 Prikaz izmerenih i očekivanih vrednosti JGF (ml/min/1,73m²) u grupi II

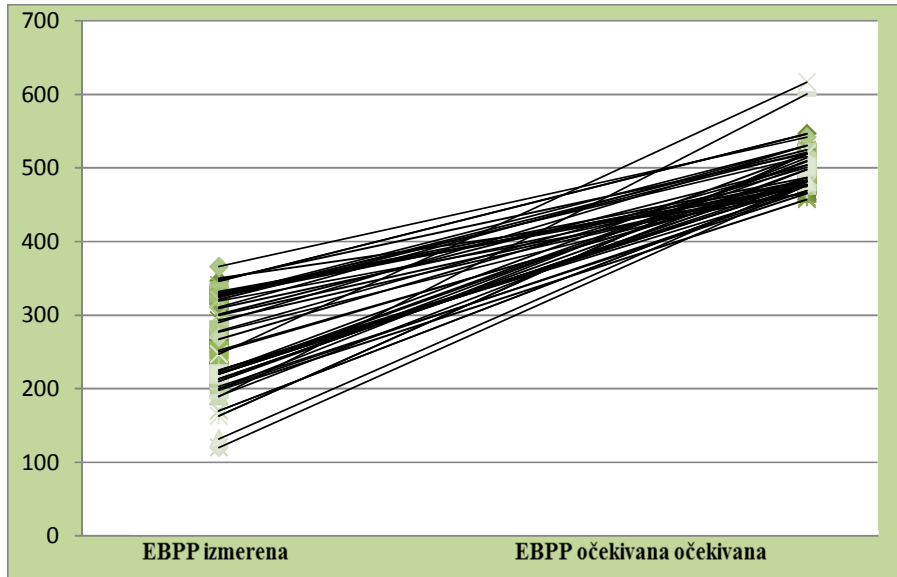


Na grafikonima 12 i 13 prikazane su izmerene i očekivane vrednosti EBPP u ml/min/1,73m² u ispitivanim grupama.

Grafikon 12 Prikaz izmerenih i očekivanih vrednosti EBPP (ml/min/1,73m²) u grupi I

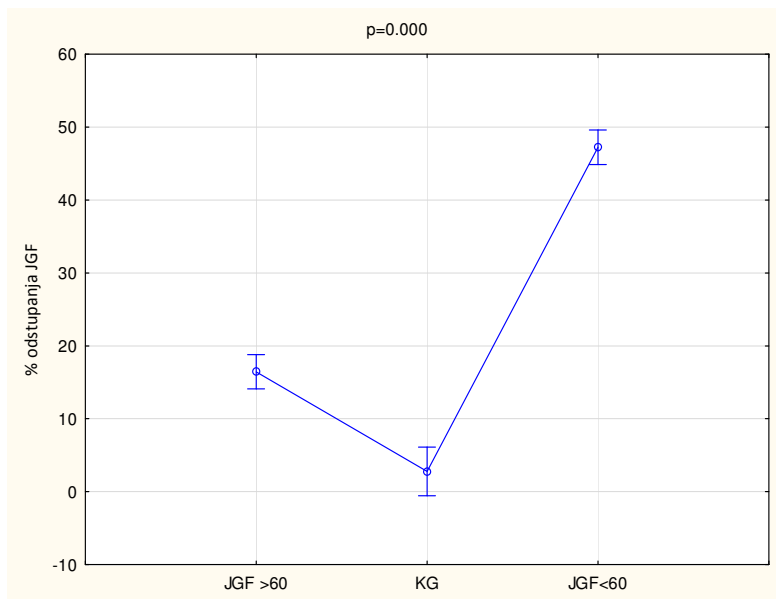


Grafikon 13 Prikaz izmerenih i očekivanih vrednosti EBPP (ml/min/1,73m²) u grupi II

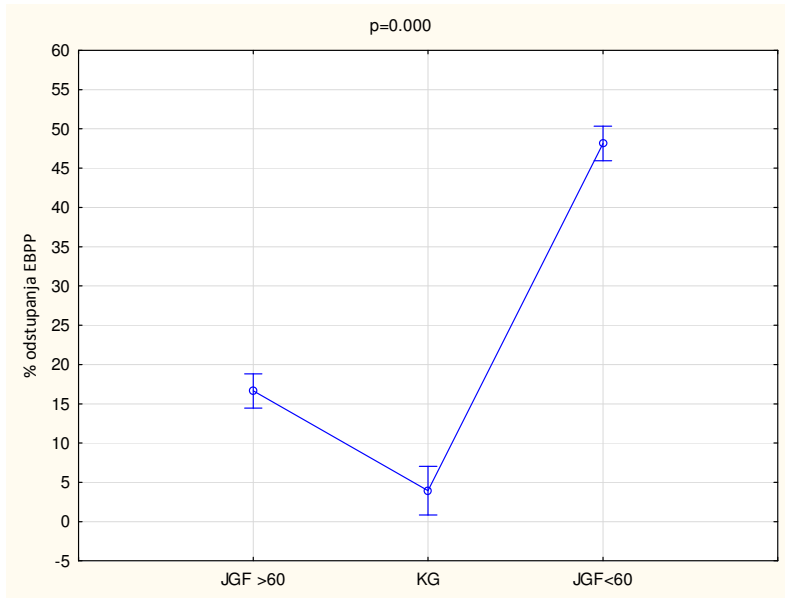


Na grafikonima 14 i 15 su prikazane prosečne vrednosti stepena redukcije JGF i EBPP (%) u ispitivanim grupama.

Grafikon 14. Distribucija vrednosti stepena redukcije JGF (%) u ispitivanim grupama

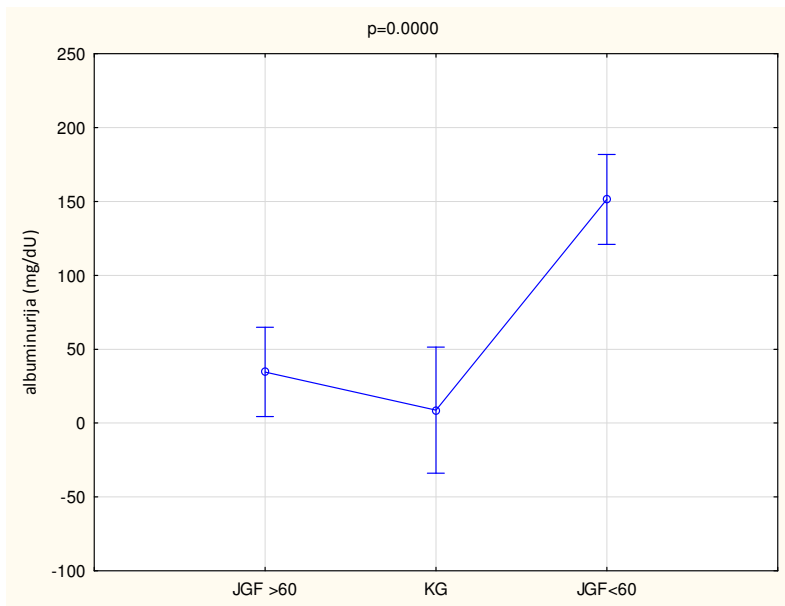


Grafikon 15. Distribucija vrednosti stepena redukcije EBPP (%) u ispitivanim grupama

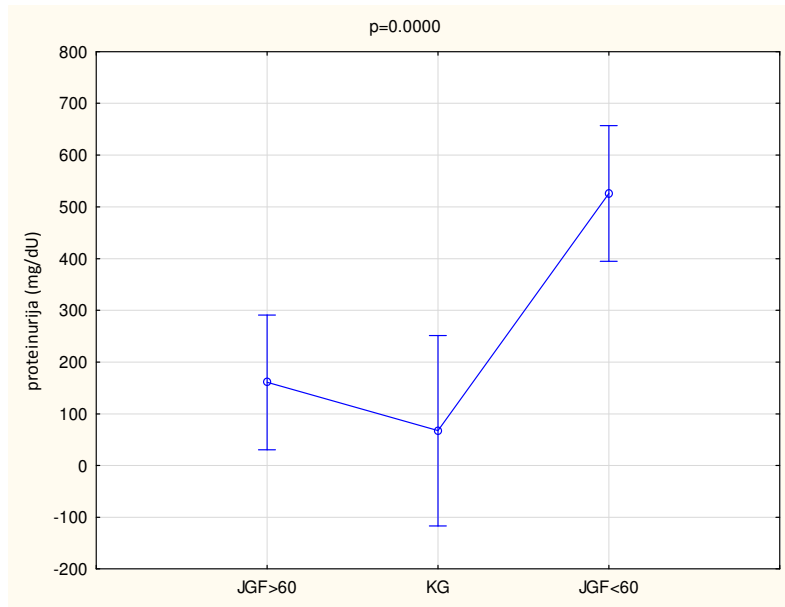


Na grafikonima 16 i 17 su prikazane prosečne vrednosti mikroalbuminurije i proteinurije u ispitivanim grupama.

Grafikon 16. Vrednosti albuminurije u ispitivanim grupama



Grafikon 17. Vrednosti proteinurije u ispitivanim grupama



Bolesnici sa većom redukcijom bubrežne funkcije su imali značajno više vrednosti mikroalbuminurije i proteinurije u odnosu na ostale grupe ispitanika ($p<0,001$). Takođe postoji značajna razlika u vrednostima mikroalbuminurije i proteinurije između bolesnika sa manjim stepenom bubrežne hipofunkcije (grupa I) i kontrolne grupe ispitanika ($p<0,001$).

8.3. ENDOTELIN-1

U tabeli 17 prikazane su vrednosti endotelina-1 u ispitivanim grupama.

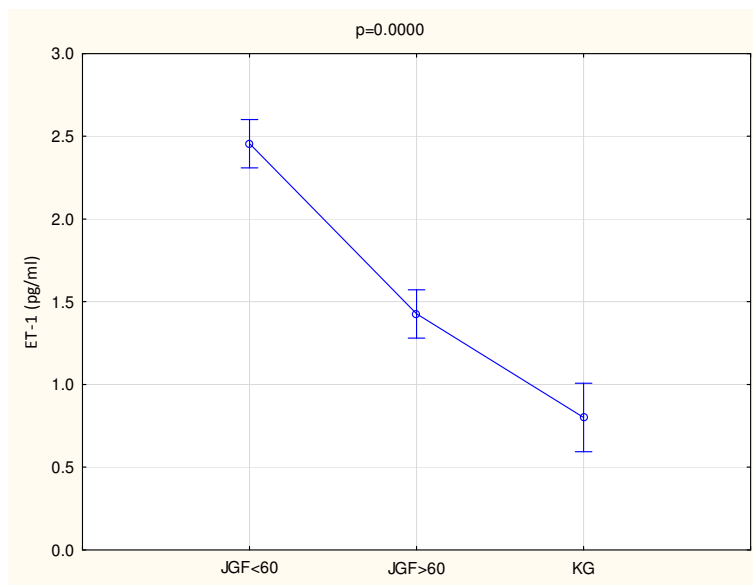
Tabela 17. Vrednosti plazmatske koncentracije ET-1 u ispitivanim grupama

Endotelin-1 (pg/ml)	n	\bar{x}	SD	med	min	max
KG	30	0,8	0,25	0,8	0,4	1,3
Grupa I	60	1,4	0,4	1,5	0,8	2,5
Grupa II	60	2,5	0,8	2,4	1,0	4,8

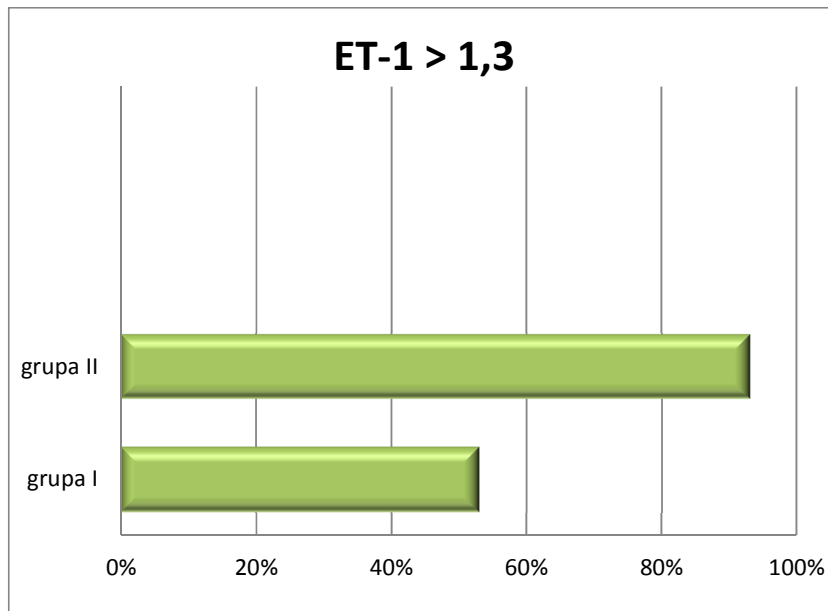
Legenda: Grupa I-ispitanici sa JGF>60/ml/min, Grupa II- ispitanci sa JGF<60 ml/min, KG-kontrolna grupa

Na grafikonu 18 prikazana je distribucija vrednosti endotelina-1 u ispitivanim grupama.

Grafikon 18. Vrednosti ET-1 u ispitivanim grupama



Grafikon 19. Zastupljenost ispitanika (%) sa vrednostima endotelina-1 > 1.3 pg/ml



Legenda: Grupa I-ispitanici sa JGF > 60 ml/min, Grupa II- ispitanici sa JGF < 60 ml/min

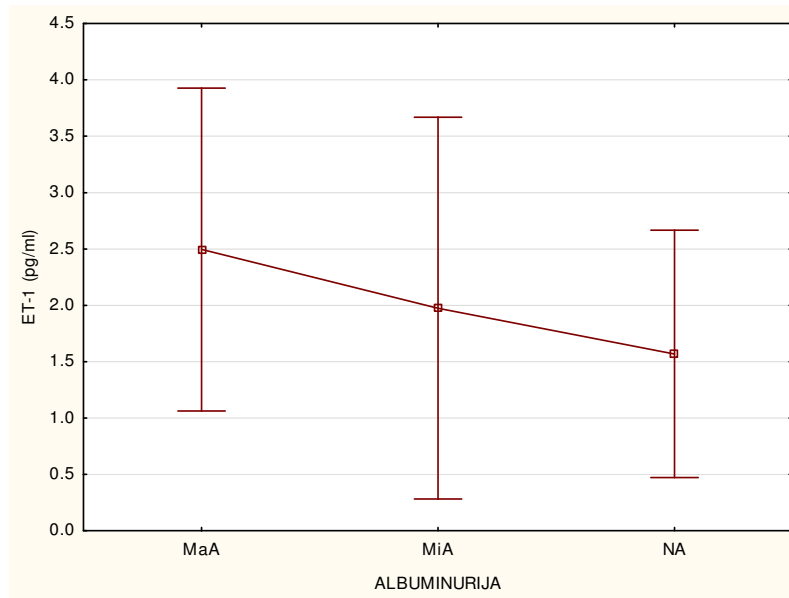
Postoji statistički značajna razlika u vrednosti endotelina-1 između ispitivanih grupa ($p < 0,001$). Značajno niže vrednosti plazmatske koncentracije endotelina-1 su imali ispitanici kontrolne grupe u odnosu na ispitanike sa šećernom bolesti. Značajno više vrednosti endotelina-1 su imali bolesnici sa šećernom bolesti i većim stepenom redukcije JGF u odnosu na bolesnike sa manjim stepenom redukcije JGF.

Na grafikonu 19 prikazana je procentualna zastupljenost ispitanika sa povišenim vrednostima endotelina-1 u ispitivanim grupama.

Zastupljenost bolesnika sa povišenim vrednostima ET-1 bila je značajno viša u grupi bolesnika sa šećernom bolesti koji su imali veću redukciju JGF (93%) u odnosu na bolesnike sa šećernom bolesti i manjom redukcijom JGF (JGF > 60ml/min) (53%).

Na grafikonu 20 su prikazane vrednosti endotelina-1 u odnosu na prisustvo normo, mikro i makroalbuminurije.

Grafikon 20. Distribucija vrednosti ET-1 u odnosu na albuminuriju



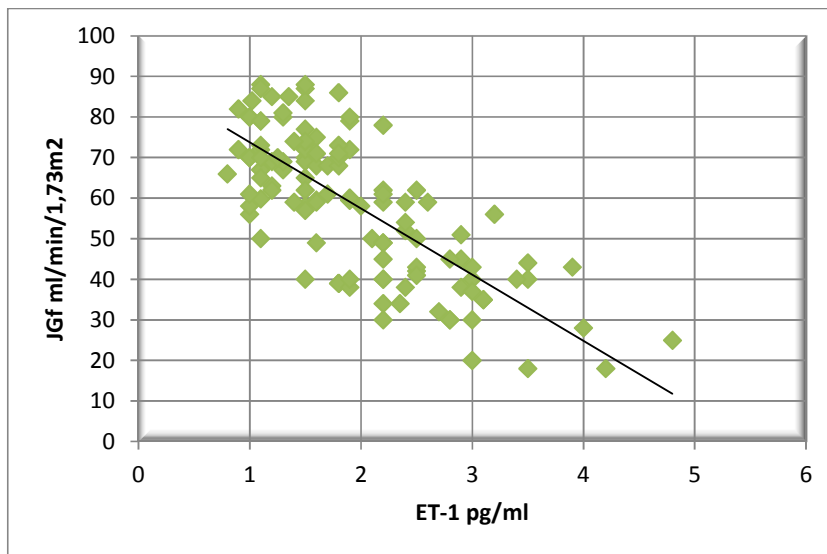
Legenda: MaA-makroalbuminurija; MiA-mikroalbuminurija; NA-normoalbuminurija

Uočena je značajna razlika u vrednostima ET-1 u odnosu na albuminuriju, tako da su bolesnici sa vrednostima albuminurije preko 300mg/dU (makroalbuminurija) imali značajno više vrednosti ET-1 u krvi u odnosu na ispitanike sa mikroalbuminurijom (30-300mg/dU), kao i u odnosu na ispitanike sa normoalbuminurijom ($p < 0,05$). Vrednosti ET-1 su bile takođe značajno više u bolesnika sa mikroalbuminurijom u odnosu na bolesnike sa normoalbuminurijom ($p < 0,05$).

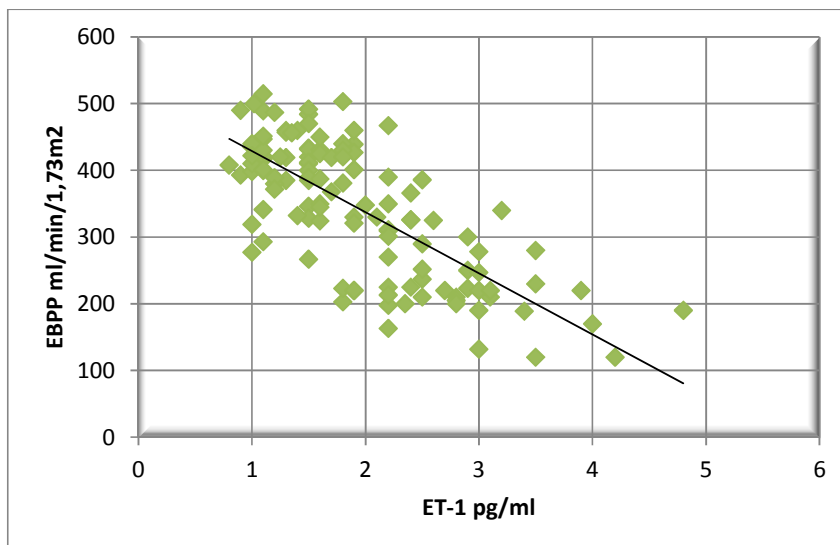
8.4. REZULTATI KORELACIJE ENDOTELINA-1 SA FUNKCIONIM STATUSOM BUBREGA

Na grafikonima 21 i 22 prikazane su korelacije plazmatskih koncentracija ET-1 sa JGF i EBPP.

Grafikon 21. Korelacija endotelina-1 i JGF



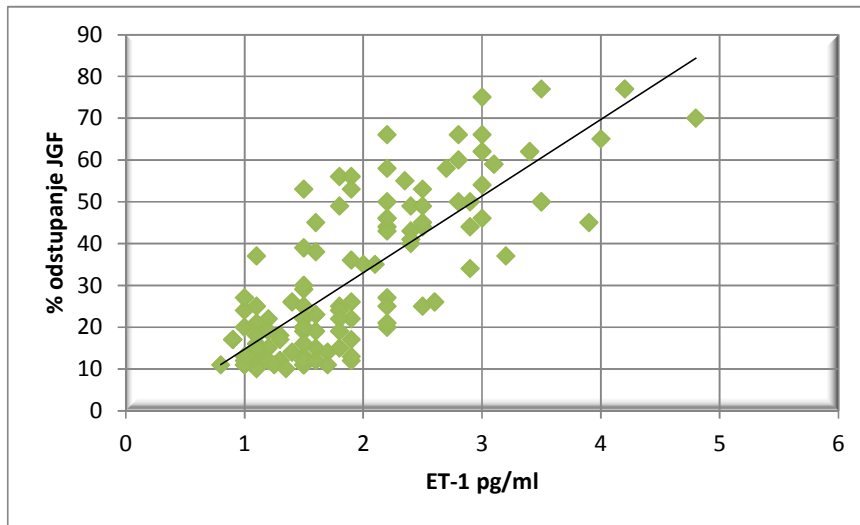
Grafikon 22. Korelacija endotelina-1 i EBPP



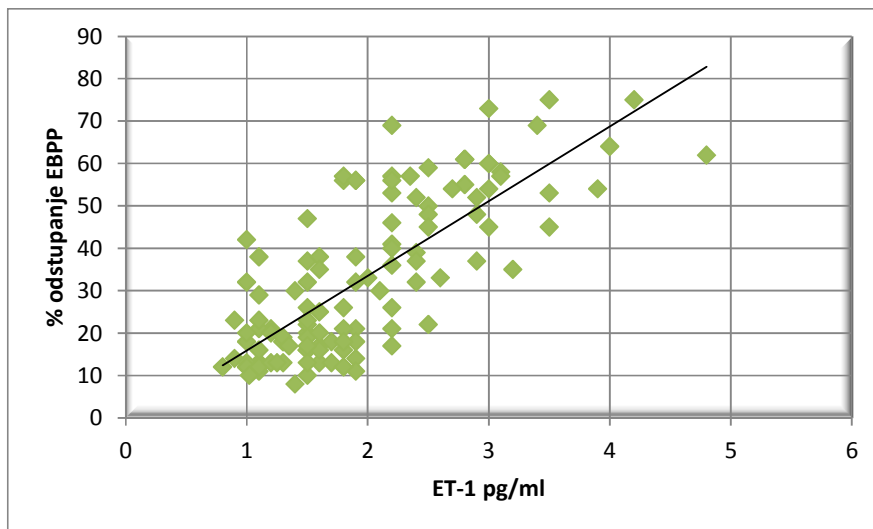
U grupi bolesnika sa tipom 2 šećerne bolesti postoji statistički značajna povezanost između plazmatskog nivoa endotelina-1 i izmerene vrednosti jačine glomerulske filtracije i efektivnog bubrežnog protoka plazme ($r = -0,75$; $p = 0,000$; $r = -0,74$; $p = 0,000$), odnosno bolesnici sa šećernom bolesti kod kojih postoje povišene vrednosti ET-1 imaju veću redukciju i JGF i EBPP.

Na grafikonima 23 i 24 je prikazana korelacija između endotelina-1 u krvi i stepena redukcije JGF i EBPP (%) ispitanika.

Grafikon 23. Korelacija ET-1 i stepena redukcije JGF (%)



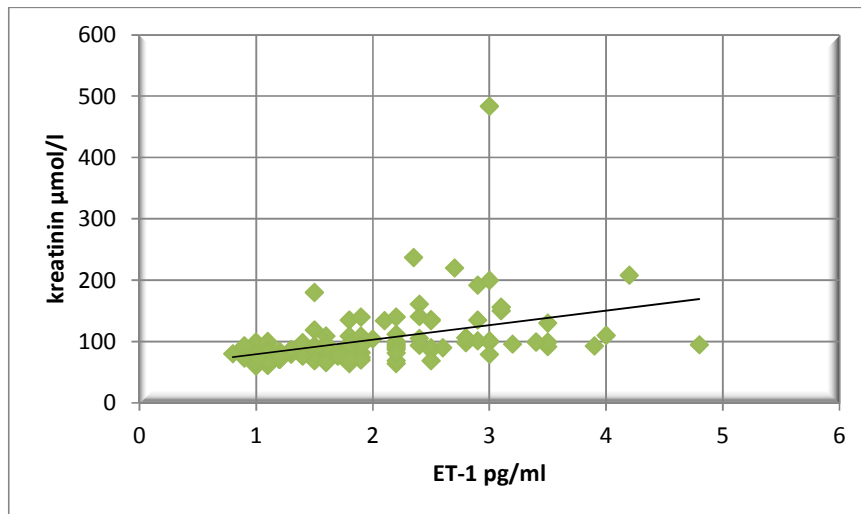
Grafikon 24. Korelacija ET-1 i stepena redukcije EBPP (%)



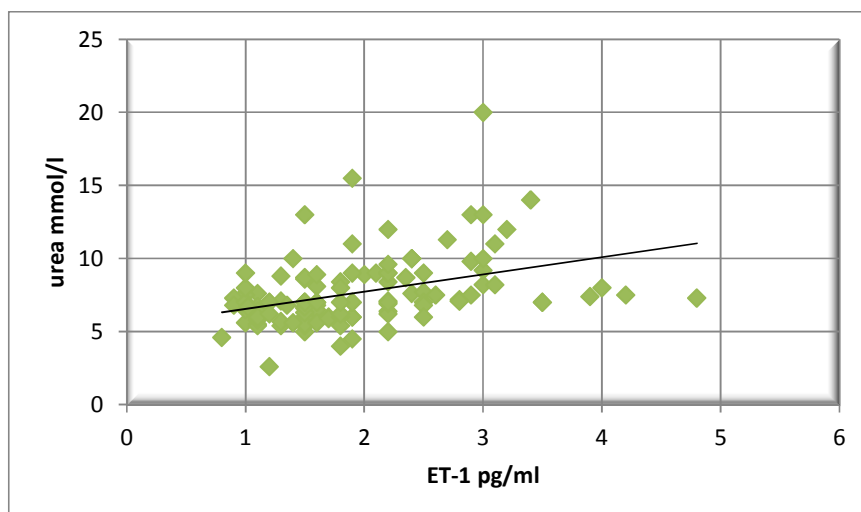
Postoji takođe i značajno visoka povezanost između vrednosti ET-1 u krvi i stepena redukcije JGF i EBPP (%) ($r=0,79$; $r=0,76$, $p=0,000$).

Na grafikonima 25, 26 i 27 su prikazane korelacije endotelina-1 sa serumskim koncentracijama kreatinina, uree, mokraćne kiseline.

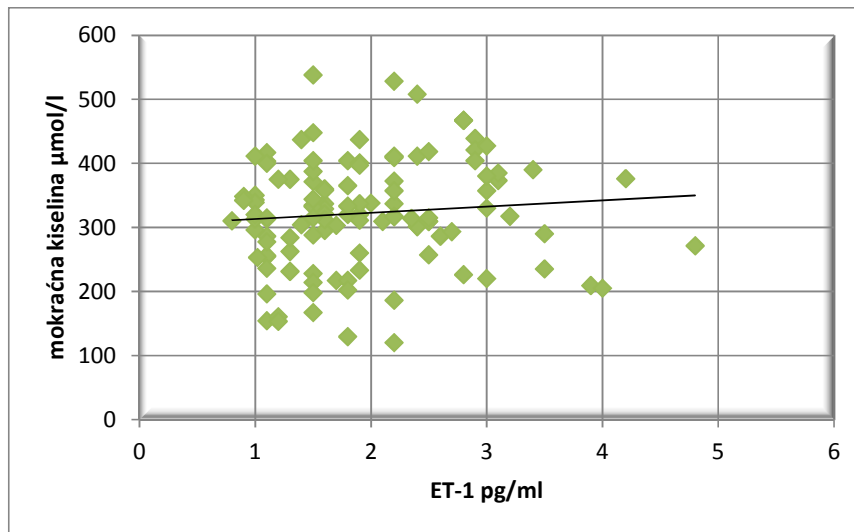
Grafikon 25. Korelacija ET-1 i kreatinina



Grafikon 26. Korelacija ET-1 i uree



Grafikon 27. Korelacija ET-1 i mokraćne kiseline

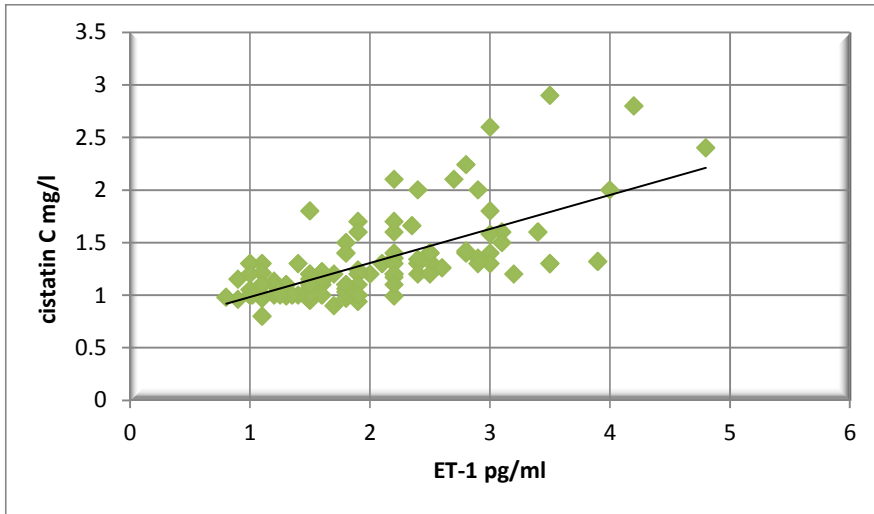


Postoji statistički značajna povezanost između vrednosti ET-1 u krvi i serumske koncentracije kreatinina ($r=0,558$; $p=0,0000$), uree ($r=0,60$; $p=0,0000$), kao i mokraćne kiseline ($r=0,33$; $p<0,005$) u grupi dijabetesnih bolesnika sa značajnijim stepenom redukcije bubrežne funkcije u odnosu na grupu bolesnika sa relativno očuvanom funkcijom rezervom bubrega, gde nije dobijena statistički značajna povezanost.

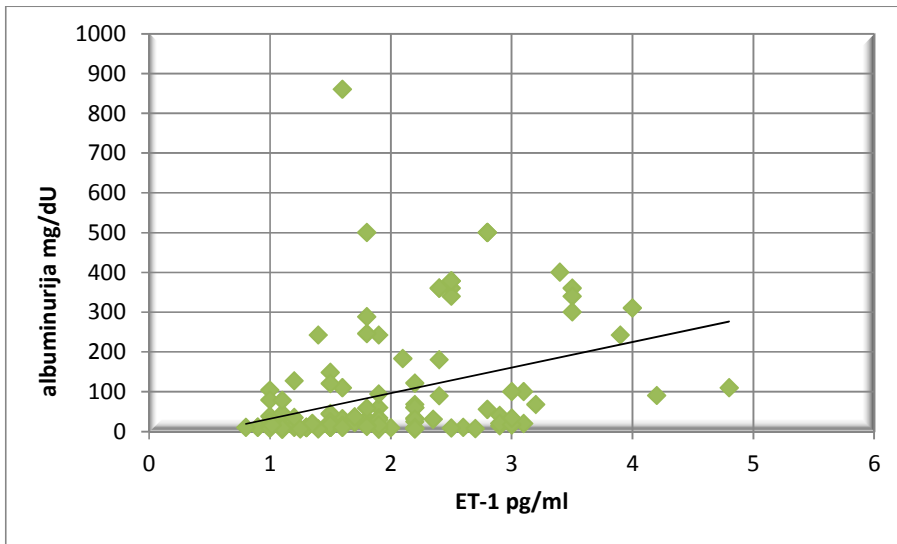
Dobijena je i statistički značajna povezanost između plazma vrednosti ET- i Cistatina C ($r=0,68$; $p=0,0000$) u grupi dijabetesnih bolesnika sa značajnijim stepenom redukcije ukupne funkcione rezerve bubrega u odnosu na grupu bolesnika čija je JGF >60 ml/min.

Na grafikonu 28 je prikazana korelacija ET-1 i cistatina C, dok su na grafikonu 29 i 30 prikazane korelacije ET-1 sa mikroalbuminurijom i proteinurijom. Uočena je statistički značajna povezanost između vrednosti ET-1 u krvi sa vrednostima albuminurije ($r=0,36$; $p<0,001$) i proteinurije ($r=0,58$; $p=0,0000$).

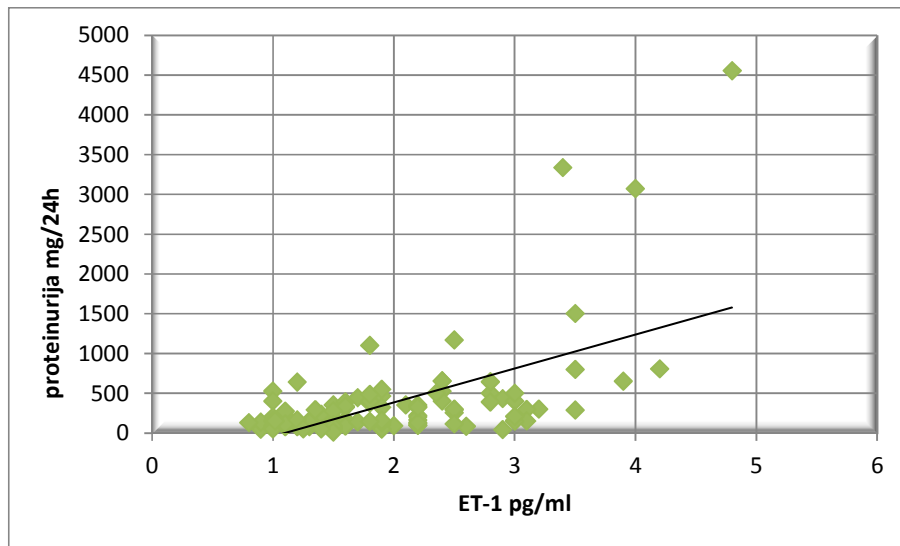
Grafikon 28. Korelacija ET-1 i cistatina C



Grafikon 29. Korelacija ET-1 i albuminurije



Grafikon 30. Korelacija ET-1 i proteinurije



Urađena je multipla regresiona analiza u cilju procene nezavisne predikcije plazmatske koncentracije ET-1 na JGF među ostalim varijablama: albuminurija, proteinurija i dužina trajanja hipertenzije. U modelu ($F = 44.174$, $R^2 = 0.609$) jedino plazmatska koncentracija ET-1 ($\beta = -0.710$, $p < 0.001$) i dužina trajanja hipertenzije ($\beta = -0.203$, $p < 0.001$) nezavisni su i značajni prediktori pada jačine glomerulske filtracije kod bolesnika sa dijabetesnom nefropatijom.

9. DISKUSIJA

Šećerna bolest postaje sve veći zdravstveni problem sa povećanjem broja obolelih kao i sa pojavom bolesti u sve mlađoj životnoj dobi (342, 343). Prati je niz komplikacija na velikim (makrovaskularne) i malim (mikrovaskularne komplikacije) krvnim sudovima. Jedna od njenih najtežih hroničnih mikrovaskularnih komplikacija jeste svakako dijabetesna nefropatija, koja je danas vodeći uzrok terminalnog stadijuma bubrežne insuficijencije (344). Uprkos poboljšanjima u dijagnozi i tretmanu dijabetesne nefropatije, dostignuto je samo delimično nefroprotektivno dejstvo (19). Oko 30–40% bolesnika sa tipom 2 šećerne bolesti razvije DN, čija je incidencija i prevalencija i dalje u porastu, naročito u razvijenim zemljama.

Promene u bubrežnoj mikrocirkulaciji odnosno hemodinamici, predstavljaju važan faktor progresije kardiovaskularnih i bubrežnih bolesti. Hemodinamski status bubrega zavisi kako od bubrežnog protoka krvi, tako i od preraspodele krvi unutar pojedinih regija bubrega, kao i od brojnih vazoaktivnih faktora koji putem parakrine i/ili autokrine regulacije vaskularnog tonusa aferentne i eferentne arteriole regulišu glomerularni hemodinamski status. Hemodinamski status kod parenhimskog oštećenja bubrega zavisi od sadejstva brojnih vazoaktivnih faktora, čije je delovanje, sa druge strane, uslovljeno stepenom oštećenja same bubrežne funkcije što ima za krajnji rezultat promenu hemodinamski zavisnih funkcijskih parametara, kao što su jačina glomerulske filtracije i efektivni bubrežni protok plazme.

Predmet ovog istraživanja jeste bio da se ispita odnos ET-1 i funkcijskih parametara bubrega kod bolesnika sa šećernom bolesti i različitim stepenom bubrežne hipofunkcije.

Ispitivanu grupu činilo je 120 bolesnika sa tipom 2 šećerne bolesti, prosečne starosti 62 godine. U odnosu na polnu strukturu ispitivane grupe bolesnika, nije bilo statistički značajne razlike: 49% je bilo muškog, a 51% ženskog pola. Kontrolnu grupu je činilo 30 zdravih ispitanika, prosečne starosti 59,9 godina, od toga 40% muškaraca i 60% žena. Nije bilo statistički značajne razlike u polnoj i starosnoj strukturi između ispitivane grupe i kontrolne grupe zdravih. U toku daljeg ispitivanja, grupu dijabetesnih bolesnika (120) podelili smo u 2 grupe na osnovu jačine glomerulske filtracije i to: na grupu bolesnika sa JGF <60 ml/min, i grupu bolesnika sa JGF >60 ml/min.

Dužina trajanja dijabetesa, kao i primena insulinske terapije između grupa ispitanika sa većim i manjim stepenom bubrežne hipofunkcije, statistički se nije značajno razlikovala. Obe grupe ispitanika su imale prosečnu dužinu trajanja šećerne bolesti preko 10 godina, što se poklapa sa rezultatima mnogih studija koje su obuhvatile veliki broj bolesnika sa tipom 1 i 2 dijabetesa pokazale da od početka dijabetesa pa do pojave DN prođe najmanje desetak godina (239, 29, 274).

Za procenu stanja glikoregulacije, uzete su vrednosti glikemije našte i vrednosti HbA1c. Obe grupe dijabetesnih bolesnika, sa većom i manjom redukcijom JGF, imale su visoke vrednosti glikemije našte i vrednosti HbA1c, pri čemu niti u jednom parametru nije bilo statistički značajne razlike između ove dve grupe ispitanika. Na osnovu dobijenih parametara glikoregulacije možemo reći da je ispitivana grupa dijabetesnih bolesnika bila metabolički loše regulisana, ako se uzmu u obzir preporučene ciljne vrednosti glikemije našte ispod 7 mmol/l i vrednosti HbA1c ispod 7% prema Nacionalnom vodiču dobre kliničke prakse za dijabetes melitus iz 2012 godine. Procenat ispitanika koji su postigli ciljani HbA1c iznosio je 38% u grupi bolesnika sa manjom redukcijom JGF i 43% u grupi ispitanika sa većom redukcijom JGF. Kao što je u uvodnom delu naglašeno, hiperglikemija predstavlja jedan od osnovnih uzroka u nastanku hroničnih komplikacija, dominantno mikrovaskularnih, gde spada i DN. Neregulisana glikemija ima negativan uticaj na tok nefropatije u svim fazama DM tipa 2 (274).

U odnosu na prisustvo hipertenzije, od ukupnog broja bolesnika sa šećernom bolesti, njih 78% (94) je imalo hipertenziju. Kod novootkrivenih slučajeva DM tip 2 arterijska hipertenzija obično je već prisutna, a često joj može i prethoditi. Podaci ukazuju na to da prevalenca HTA kod novootkrivenih bolesnika iznosi oko 50%, a sa razvojem mikroalbuminurije raste i dostiže vrednosti od oko 80%, odnosno pri razvoju makroalbuminurije i do 90% (55). Upravo visoka učestalost HTA kod bolesnika sa DM tip 2 posledica je povezanosti insulinske neosetljivosti i hiperinsulinemije sa hipertenzijom (56). U grupi dijabetesnih bolesnika kod kojih je JGF>60 ml/min, njih 72% (43/60) je imalo hipertenziju, dok je u grupi dijabetesnih bolesnika sa JGF<60 ml/min njih 85% (51/60) imalo hipertenziju, što se statistički nije značajno razlikovalo. Takođe treba naglasiti da je prosečna dužina trajanja hipertenzije u grupi bolesnika sa većom redukcijom JGF bila 11 godina, dok je u grupi bolesnika sa manjim stepenom bubrežnog oštećenja bila 8,5 godina, što je očekivano s obzirom na rezultate brojnih studija koji ukazuju da je dužina trajanje hipertenzije takođe jedan od značajnih faktora progresije bubrežnog oštećenja u tipu 2

dijabetesa. Naročito štetna za bubrežno tkivo kod dijabetičara je kombinacija sistemske i glomerulske hipertenzije. Stoga je jedna od esencijalnih komponenti u postizanju redukcije kardiovaskularnih bolesti (KVB) i mikrovaskularnih komplikacija u DM intenzivna kontrola krvnog pritiska, koja kod hipertenzivnih dijabetičara obično zahteva kombinaciju dva do tri leka. Međutim, i pored svih saznanja, samo 28–36% bolesnika sa DM ima krvni pritisak \leq 130/80 (55). Efikasna mera prevencije dijabetesne nefropatije je lečenje hipertenzije obaveznom primenom lekova koji sprečavaju dejstvo angiotenzina – inhibitori angiotenzin koncertujućeg enzima (ACEI) i/ili blokatorima receptora za angiotenzin (ARB).

U našoj grupi dijabetesnih bolesnika nešto više od polovine ispitanika (njih 56%) je uzimalo ACE inhibitore u terapiji hipertenzije. U grupi ispitanika sa manjim stepenom bubrežne hipofunkcije njih 67% je uzimalo ACE inhibitore, dok je u grupi ispitanika sa težim stepenom bubrežne hipofunkcije njih 70% uzimalo ACE inhibitore u terapiji hipertenzije, što se statistički nije značajno razlikovalo ($p>0,05$)

Serumske koncentracije parametara lipidskog statusa dobijene u ovoj studiji bile su uglavnom u skladu sa odlikama dijabetesne dislipidemije (345, 346) karakterističnim za ispitivane grupe bolesnika, koje su se karakterisale kako kvalitativnim, tako i kvantitativnim poremećajima lipida. Tako su serumske koncentracije HDL holesterola bile značajnije niže u grupi dijabetesnih bolesnika u odnosu na grupu zdravih. Takođe, vrednosti indeksa ateroskleroze su bile značajnije više u grupi dijabetesnih bolesnika sa različitim stepenom bubrežne hipofunkcije u odnosu na kontrolnu grupu zdravih. Serumske koncentracije apolipoproteina AI, su značajnije bile više u kontrolnoj grupi zdravih u odnosu na grupe dijabetesnih bolesnika sa bubrežnom hipofunkcijom, dok su vrednosti ApoB značajnije bile više u grupi I ispitanika u odnosu na ostale grupe ispitanika. Odnos ApoB/AI je značajnije niži u kontrolnoj grupi zdravih u odnosu na grupe dijabetesnih bolesnika. Serumske koncentracije ukupnog holesterola se nisu statistički značajnije razlikovale između ispitivanih grupa, dok su vrednosti triglicerida bile više u grupi dijabetesnih bolesnika ali nije bilo statističke značajnosti. Rezultate ovih vrednosti treba tumačiti u skladu sa hipolipemijskom terapijom koju je većina pacijenata koristila (88%), što je jedna od osnovnih terapijskih smernica u prevenciji razvoja i progresije mikrovaskularnih komplikacija dijabetesa.

Što se tiče rezultata funkcionog statusa bubrega po grupama ispitanika, oni su se statistički značajno razlikovali, što je očekivano s obzirom na to da je kriterijum za podelu ispitanika po grupama bila jačina glomerulske filtracije kao najbolja mera bubrežne funkcije.

Procena funkcionog statusa bubrega, odnosno jačina glomerulske filtracije, računata je korišćenjem više parametara, u cilju izbegavanja eventualnih metodoloških grešaka, a korišćene metode su klirens kreatinina, zatim vrednosti izračunate iz formula za preračunavanje JGF na osnovu serumskog kreatinina, kao i merenje cistatina C koji se zadnjih godina koristi kao značajan marker JGF (347).

Kao granična vrednost jačine glomerulske filtracije za podelu u grupe uzeta je vrednost od 60 ml/min/1.73m². Prema američkim organizacijama, National Kidney Foundation, Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K/DOQI) i National Kidney Disease Education Program (NKDEP), rane faze hronične bolesti bubrega definišu se jačinom glomerulske filtracije manjom od 60 mL/min/1,73m².

U ispitivanoj grupi dijabetesnih bolesnika sa različitim stepenom bubrežne hipofunkcije, serumske koncentracije cistatina C su bile značajnije više u odnosu na kontrolnu grupu zdravih (p<0,001). Statistički značajna razlika u serumskim koncentracijama cistatina C postojala je i između ispitanika sa JGF <60 mL/min u odnosu na JGF >60 mL/min (p<0,001) što je i očekivano. U studiji Richarda i sar. (348) postojala je značajna korelacija vrednosti JGF dobijene iz serumske koncentracije cistatina C sa vrednostima JGF dobijene referentnim kliresnim metodama i to u svim fazama bubrežne hipofunkcije u grupi dijabetesnih bolesnika.

Sledeći značajan parametar u proceni funkcionog odnosno hemodinamskog statusa bubrega bio je efektivni bubrežni protok plazme (EBPP), koji se takođe statistički značajno razlikovao po grupama ispitanika. Prosečna vrednost klirensa hipurana kao pokazatelja ukupnog EBPP u grupi ispitanika sa dijabetesom i manjim stepenom redukcije bubrežne funkcije bila je 428 ml/min, što se statistički značajno razlikovalo u odnosu na grupu dijabetesnih bolesnika sa većim stepenom redukcije JGF gde je prosečna vrednost EBPP bila 257 ml/min, što je i očekivano jer promene u glomerulskoj hemodinamici u uslovima hiperglikemije i glomerulske hipertenzije preko aktivacije različitih vazoaktivnih faktora dovode do promena bubrežnog protoka plazme. Takođe, i brojni nehodinamički faktori preko pojačane produkcije citokina i faktora rasta doprinose ožiljavanju bubrežnog parenhima, što takođe doprinosi progresiji bubrežnog oštećenja i padu efektivnog bubrežnog protoka plazme (349). Treba naglasiti da je stepen redukcije EBPP u grupama bolesnika sa dijabetesnom nefropatijom korelisao sa stepenom redukcije JGF, što ukazuje na prisustvo značajnijih hemodinamskih promena u toku razvoja i progresije dijabetesne nefropatije.

Pozitivna korelaciju između JGF i EBPP utvrđena je i u drugima studijama, čak i u ranim fazama dijabetesne nefropatije, koju karakteriše glomerulska hiperfiltracija, kao što je u studiji Jiten P.Voral i sar. (350) gde su u novodijagnostikovanih bolesnika sa tipom 2 DM uočene rane hemodinamske promene u bubrežima, glomerulska hiperfiltracija i povećanje EBPP (351).

Indirektni pokazatelji funkcionog statusa bubrega, dobijeni merenjem serumskih koncentracija kreatinina, ureje i mokraćne kiseline, značajnije su se razlikovali po grupama bolesnika, što je očekivano s obzirom na to da njihova ekskrecija zavisi od jačine glomerulske filtracije. Vrednosti JGF manje od 50% u odnosu na normalno očekivane vrednosti vezano za pol i starost ispitanika, dovode do povećanja vrednosti kreatinina, ureje i mokraćne kiseline, stoga su njihove serumske koncentracije bile značajnije više u grupi bolesnika sa većim stepenom redukcije JGF (JGF < 60ml/min).

Albuminurija, odnosno proteinurija, značajni su faktori rizika za progresiju bubrežne bolesti. Odnos koji postoji između evolucije dijabetesne nefropatije i proteinurije, kao i hipertenzije, veoma je kompleksan. U toku razvoja ove komplikacije dijabetesa zapaža se progresivno povećavanje vrednosti proteinurije i arterijskog krvnog pritiska. Istovremeno, proteinurija i arterijska hipertenzija ubrzavaju progresiju nefropatije, što su pokazale mnogobrojne studije (28, 53, 54, 352, 353, 354).

Prisustvo mikroalbuminurije, odnosno proteinurije, i njihove prosečne vrednosti, bile su značajnije više u grupi bolesnika sa dijabetesom koji su imali veći stepen redukcije JGF (prosečna vrednost mikroalbuminurije u II grupi bolesnika je bila 150 mg/l dok je u I grupi bila 35 mg/l; $p < 0,001$). Naime, u grupi bolesnika sa redukcijom JGF manjom od 60 ml/min, njih 73% (44/60) je imalo mikroalbuminuriju i proteinuriju, dok je u grupi bolesnika sa JGF većom od 60 ml/min njih 27% (16/60) imalo mikroalbuminuriju odnosno proteinuriju. Ovakvi rezultati su u skladu sa rezultatima brojnih većih kliničkih studija koje su ispitivale povezanost albuminurije/proteinurije sa ishodom bubrežne bolesti (91, 355, 356, 357, 358). Tako je u studiji Irbesartan Diabetic Nephropathy Trial (IDNT) sprovedenoj na 1715 pacijenata s dijabetesom tipa 2, hipertenzijom i proteinurijom, uočeno da dvostruko uvećanje početnog nivoa proteinurije tokom četvorogodišnjeg praćenja ima za posledicu dva puta veći rizik od razvoja terminalnog stadijuma ili udvostručenje serumskog kreatinina (359). Slično tome, u velikoj kliničkoj studiji RENAAL (Reduction of Endpoints in Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus with the Angiotensin II Antagonist Losartan), koja je uključila

1513 bolesnika sa tipom 2 dijabetesa i nefropatijom, prisustvo albuminurije i njeno povećanje je značajno povećalo rizik za razvoj terminalnog stadijuma ili udvostručenje vrednosti serumskog kreatinina (360).

Kod bolesnika sa dijabetesom i različitim funkcionim statusom bubrega, kao i u kontrolnoj grupi zdravih ispitanika, izmerene su vrednosti plazmatskog ET-1 koji predstavlja moćan vazokonstriktor i faktor rasta, sa visokom ekspresijom u bubrežnoj vaskulaturi i parenhimu. Kitamura i sar. (101, 303) ukazali su na izuzetno povećanu produkciju ET-1 u bubrežima u odnosu na druga tkiva, dok su druge pojedinačne studije ukazale da skoro svaka bubrežna ćelija ima sposobnost sinteze ET-1 kao i ekspresiju endotelinskih receptora (305, 361, 362, 363). S obzirom na ovako visoku produkciju endotelina i ekspresiju receptora, nije iznenađujuća njegova uloga u regulaciji bubrežne funkcije, utičući tako na brojne bubrežne funkcione parametre. Rezultati brojnih eksperimentalnih i prekliničkih studija ukazali su na uključenost endotelinskog sistema u patogenezu hipertenzije i bubrežnih bolesti, naročito kod proteinurijskih nefropatija, kao i na patogenezu i progresiju dijabetesne nefropatije (111, 364, 365, 366).

Izmerene vrednosti plazmatskog ET-1 su bile statistički značajno više u grupi dijabetesnih bolesnika u poređenju sa zdravom kontrolnom grupom ($p < 0,05$). Dokazi o povećanoj aktivnosti ET-1 u dijabetesnih bolesnika potiču od brojnih studija, kako eksperimentalnih, tako i kliničkih (111, 331, 332, 367, 368, 369). Povišene vrednosti plazmatskog ET-1 kod bolesnika sa dijabetesom u odnosu na zdravu populaciju donekle su objašnjene stimulisanom produkcijom ET-1 hiperglikemijom i hiperinzulinemijom. U eksperimentalnoj studiji G.M Hargrove i sar. (332) uočeno je da hiperglikemija pojačava transkripcionu aktivnost ET-1 gena, što dovodi do povećanja glomerularnog nivoa ET-1 mRNK i proteina u pacovskog modela DM. Ovi rezultati idu u prilog direktnog efekta glukoze na aktivnost gena za ET-1. S druge strane, insulin, da li u slučaju frank dijabetesa ili inzulinske rezistencije, stimuliše oba, i produkciju i delovanje ET-1 kod eksperimentalnih životinja i/ili ljudi. Insulin povećava ekspresiju bubrežnog ET što se smatra važnim dokazom za patofiziološku ulogu ET sistema u DN (368, 370). Praktično, međudelovanje insulina, inzulinske rezistencije i ET je dokumentovano i potvrđeno kao relevantan faktor dijabetesnih komplikacija (371, 372, 373, 374, 375, 376).

U ovoj studiji, povišene koncentracije plazmatskog ET-1 bile su karakteristike ispitanika sa značajnije redukovanom funkcionom rezervom bubrega ($JGF < 60 \text{ ml/min}$), kod

kojih je, u većini slučajeva (~ 90% ispitanika) plazmatski ET-1 bio povišen, što je bilo značajno više u odnosu na grupu bolesnika sa manjim stepenom redukcije JGF (~ 50%) ($p < 0,001$). Ovo ide u prilog značajne uloge ET-1 u patogenezi i progresiji dijabetesne nefropatije. Naime, ET-1 se produkuje u svim bubrežnim ćelijama (glomerularnim, endotelnim, mezangijalnim i epitelnim ćelijama). U uslovima bubrežnog oštećenje i/ili prisustva kardiovaskularnih faktora rizika, endotelin se pojačano produkuje i promoviše razvoj glomeruloskleroze. Aktivacija ET receptora u bubrezima vodi ka vazokonstrukciji bubrežnih krvnih sudova, inhibiciji reapsorpcije soli i vode, kao i povećanoj glomerulskoj proliferaciji (305). Poremećaji u delovanju ET-1, kako na nivou mRNA i na receptorskom nivou je viđena u eksperimentalnim studijama sa životinjskim modelima dijabetesa. Prva preklinička studija koja je ukazivala na ulogu endotelina u hroničnim proteinurijskim nefropatijama objavljena je pre oko 20 godina od strane Benigni i sar., koji su koristeći preventivni tip studijskog protokola zapazili značajno poboljšanje proteinurije i glomeruloskleroze nakon selektivne blokade ETA receptora kod modela pacova redukovane bubrežne mase, usled hipertenzivne glomerularne bolesti (329). Ovi podaci su podržani daljim radovima koji su ukazali na prekomernu sistemsku ekspresiju humanog preproendotelin gena kod miševa sa glomerulosklerozom, nezavisno od krvnog pritiska (377). Od tada, brojne kliničke studije potvrđuju renoprotektivan efekat blokade ETA receptora i pokazuju da takva blokada potencijalno inhibiše proliferativni efekat endotelina u hipertenzivnoj nefropatiji (378, 379, 380), kao i u brojnim normotenzivnim uslovima kao što su gojaznost i dijabetes (381, 382, 383).

Rezultati naše studije takođe ukazuju na značajno više vrednosti plazmatskog ET-1 u grupi dijabetesnih bolesnika sa makroalbuminurijom u odnosu na grupu bolesnika sa mikro i normoalbuminurijom, kao i značajno više vrednosti plazmatskog ET-1 u grupi sa mikroalbuminurijom u odnosu na bolesnike sa normoalbuminurijom, što je u skladu sa rezultatima drugih studija. Takođe je dobijena pozitivna korelacija između plazmatskog ET-1 i albuminurije odnosno prteinurije ($r=0,36$; $p < 0,001$ i $r=0,58$; $p=0,0000$) (365, 384). Naime, ET-1 remeti citoskelet podocita koji je neophodan za strukturnu podršku i signalizaciju ovih ćelija, što doprinosi proteinuriji (385, 386, 387, 388, 389). U in vitro eksperimentalnoj studiji Morigi M. i sar. (390) zapaženo je da podociti podležu fenotipskim promenama odnosno dediferencijaciji pod uticajem autokrinog i parakrinog delovanja ET-1, što doprinosi oštećenju glomerularne filtracione membrane. Ovi podaci su i u skladu sa in vivo dokazima na mišjem modelu „overload“ proteinurije autora Benigni A. i sar. (391), koji prikazuju

povećanu bubrežnu proizvodnju ET-1 uz razvoj strukturnog oštećenja podocita. Postoje čvrsti dokazi da ET-1 ima centralnu ulogu u patogenezi proteinurije i glomeruloskeroze, koja je posredovana preko aktivacije ETA receptora, što potvrđuju i kliničke studije sa antagonistima ETA receptora koji dovode do redukcije proteinurije (392). U studiji Bruno CM (393) dobijene su povišene vrednosti plazmatskog ET-1 kod normotenzivnih dijabetičkih bolesnika sa mikroalbuminurijom u odnosu na zdravu populaciju, kao i njegova značajna korelacija sa jačinom urinarne albuminske ekskrecije, što je u skladu i sa rezultatima naše studije.

Nekoliko kliničkih studija je pokazalo značajnu korelaciju između plazmatskog i urinarnog nivoa ET-1 sa znacima dijabetičke nefropatije u različitim fazama u pogledu glomerulske hiperfiltracije, mezangijalne ekspanzije, makro i/ili mikroalbuminurije i uremije (365, 368, 384, 394, 395). Plazmatska koncentracija ET-1 značajno raste u hroničnim bolestima bubrega, što verovatno odražava ravnotežu između povećane vaskularne produkcije i smanjenog bubrežnog klirensa ET-1. Ova povišena koncentracija može doprineti povećanom vaskularnom tonusu i visokoj incidenci kardiovaskularnih mortaliteta povezanih sa hroničnim bolestima bubrega, kao i napredovanju tj. progresiji hroničnih bolesti bubrega. Još 1989. godine u svom radu Koyama H i sar. (396) uočili su značajnije više vrednosti plazmatskog ET-1 kod uremičnih pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu ne-uremičnih bolesnika. Takođe je uočena i značajnije viša vrednost ET-1 u krvi uremičnih bolesnika koji su na dijalizi u odnosu na uremične bolesnike u pred-dijaliznom periodu (397). Bubrežna produkcija ET-1 je takođe povećana u hroničnim bolestima bubrega, što takođe potvrđuje ulogu bubrežnog ET-1 u progresiji. U eksperimentalnom modelu Orisio S. i sar. (398) uočili su povećanu gensku ekspresiju bubrežnog endotelina u preostalom bubrežnom tkivu koja je korelirala sa progresijom bolesti. U prilog ovoj hipotezi govore i studije koje su pokazale da primena antagonista ETA receptora na životinjskim modelima povećava bubrežni protok krvi i usporava progresiju bubrežne insuficijencije (399, 400). Veći broj radova je potvrdio efekat blokade samog ETA receptora ili oba ETA i ETB receptora na sistemski krvni pritisak i kod zdravih ispitanika, kod kojih dolazi do snižavanja istog, kao i do snižavanja sistemskog vaskularnog tonusa, sa povećanjem efektivnog bubrežnog protoka plazme (401, 402, 403). Goddard J i sar. (314) su u svom radu pokazali da blokada ETA receptora snižava sistemski krvni pritisak i povećava EBPP i kod hipertenzivnih bolesnika sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom.

U prilog značajnog uticaja plazmatskog ET-1 na hemodinamski odnosno funkcioni status bubrega kod djiabetesnih bolesnika ukazuju i rezultati naše studije gde je dobijena značajna korelacije plazmatskog ET-1 i nivoa JGF ($r=-0,72$, $p<0,00001$), kao i plazmatskog ET-1 i EBPP ($r=-0,72$, $p<0,00001$). Znatno manji broj kliničkih studija koji se bavio odnosom endotelina i funkcionog statusa bubrega kod bolesnika sa različitim stadijumom bubrežne insuficijencije, ukazao je na značajno visoku korelacija JGF sa frakcijom ekskrecije ET-1 u odnosu na plazmatski ET-1, što je očekivano s obzirom na visoku endogenu produkciju endotelina kod bubrežnog oštećenja (315). Takođe, eksperimentalne studije koje su rađene na bubrezima pacova i zečeva, ukazivale su na to da intrarenalna infuzija ET-1 dovodi do pada bubrežnog protoka krvi i povećanja otpora u aferentnim i eferentnim arteriolama istog intenziteta, kao i do pada JGF (404). Studije sa antagonistima endotelina su pokazale da je bubrežna hemodinamika odnosno mikrocirkulacija pod uticajem kako egzogenog tako i endogenog ET-1 (405).

Takođe urađene eksperimentalne studije na dijabetesnim pacovima ukazuju na moguću ulogu povišenih vrednosti ET-1 u glomerulskom i intersticijskom bubrežnom oštećenju, koje je proporcionalno plazmatskoj koncentraciji ET-1 (406). Smatra se da povišena koncentracija ET-1 u krvi može doprineti razvoju, odnosno progresiji mikrovaskularnih komplikacija u dijabetesu tip 2 (394, 395). U prilog povišene aktivnosti ET sistema kod bolesnika sa redukcijom bubrežne funkcije ukazuje studija Wang L. i sar. (407), u kojoj je dobijena signifikantno pozitivna korelacija između ET-1 i serumskog kreatinina, uree, urinarne ekskrecije albumina i signifikantno negativna korelacija između nivoa ET-1 i JGF kod dijabetesnih bolesnika, što ukazuje na blisku povezanost nivoa plazmatskog ET-1 i različitog stadijuma bubrežne insuficijencije. Rezultati naše studije takođe ukazuju na značajnu korelaciju plazmatskog ET-1 sa ostalim parametrima funkcionog statusa bubrega (serumskom koncentracijom kreatinina, uree, mokraćne kiseline, Cistatina C), i to u grupi dijabetesnih bolesnika sa značajnijom redukcijom ukupne funkcione rezerve bubrega, dok ta povezanost nije statistički značajna kod bolesnika sa relativno očuvanom funkcionom rezervom bubrega. Rezultati drugih studija takođe nisu ukazivali na značajniju korelaciju serumskog kreatinina, ureje i mokraćne kiseline sa ET-1 kod dijabetesnih bolesnika sa manjim stepenom bubrežne hipofunkcije odnosno gde su vrednosti JGF bile relativno očuvane (393).

Rezultati multiple regresione analize nesumnjivo ukazuju na značajan doprinos povišenih vrednosti plazmatskog endotelina-1 na funkcioni status bubrega gde zajedno sa

dužinom trajanja hipertenzije predstavlja značajan nezavisan prediktor pada jačine glomerulske filtracije kod bolesnika sa dijabetesnom nefropatijom.

U području nefrologije takođe je veoma važan proces interakcije endotelinskog sistema sa drugim vazoaktivnim sistemima, kao što je renin-angiotenzin-aldosteronskim sistemom i NOS, što je danas predmet intenzivnih istraživanja (408, 409). Uzimajući u obzir veliki broj dokaza, pokazalo se da ET-1 kao najpotentniji endogeni vazokonstriktor preuzima glavnu ulogu u regulaciji hemodinaskog statusa i time doprinosi oštećenju ciljnih organa, uglavnom pod eksperimentalnim i klinički patofiziološkim uslovima (410, 411, 412). Osim toga, brojne interakcije su prepoznate od strane Ang II i ET-1, kao što je ET-1 posredovana vazokonstrikcija infuzijom Ang II, zatim značajna stimulacija od strane Ang II sinteze i oslobađanja ET-1 i sinergistični efekat nehipertenzivne količine ET-1 i nepresorne doze Ang II da izazove vazokonstrikciju. Takođe je uočeno da endotelin-1 značajno doprinosi preko svojih hipertrofnih i mitogenih efekata na funkcionalne i strukturne abnormalnosti, kako kardiovaskularnog sistema, tako i bubrega, kod eksperimentalno „so“ osetljivih hipertenzija, zbog infuzije niske doze Ang II (410, 413). Stoga se ET-1 danas smatra moćnim posrednikom Ang II zavisne vazokonstrikcije i oštećenja organa (414). Takođe, bubrežna vazodilatacija u uslovima blokads ES prevashodno ETA receptora, uslovljena je i očuvanom endogenom produkcijom NO (415, 416, 417). Povećana ekspresija ET-1 pod uticajem je Ang II, norepinefrina, vazopresina, F-izoprostana, serotonina, dok sa druge strane vazodilatatori kao što su NO, prostaglandini E2 i I2, natriurezni peptid inhibišu sintezu i oslobađanje ET-1 (418, 419, 420).

Posmatrajući rezultate ove studije, kao i rezultate drugih studija, možemo reći da endotelin-1, osim što je marker endotelne disfunkcije kod dijabetesnih bolesnika, u povišenoj plazmatskoj koncentraciji ima i potencijalne štetne efekte na hemodinamski, odnosno funkcioni status bubrega, koji doprinosi daljoj progresiji oštećenja bubrežne funkcije, ali i drugih vaskularnih komplikacija.

10. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Patofiziološki poremećaji u dijabetes melitusu imaju za posledicu i promene funkcijskog statusa bubrega, odnosno imaju važnu ulogu u razvoju i progresiji dijabetesne nefropatije, koja danas predstavlja najčešći uzrok terminalnog stadijuma hronične bubrežne insuficijencije.
2. Endotelinski sistem sa endotelinom-1 kao najpotentnijim članom predstavlja moćan vazokonstriktorni sistem, koji u bubregu ostvaruje brojne fiziološke funkcije ali ima i značajnu ulogu u patogenezi glomerulske hipertenzije, endotelne disfunkcije, inflamacije i fibroze.
3. Kod bolesnika sa dijabetes melitusom funkcijske poremećaje bubrega u najranijoj fazi karakteriše postojanje glomerulske hiperfiltracije koja je u najvećoj meri uzrokovana povećanjem glomerulskog intrakapilarnog pritiska.
4. Kod bolesnika sa dijabetes melitusom tip 2 koji su sekundarno insulin zavisni nalaze se značajno više vrednosti plazmatske koncentracije endotelina-1 u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika.
5. Porast plazmatske koncentracije endotelina-1 je značajno veći u ispitanika sa izraženijim stepenom redukcije bubrežne funkcije u odnosu na ispitanike sa relativno dobro očuvanom funkcijom rezervom bubrega ili blažim stepenom hipofunkcije.
6. Kod bolesnika sa tipom 2 šećerne bolesti postoji značajna povezanost plazmatskog nivoa endotelina-1 sa vrednostima jačine glomerulske filtracije i efektivnog bubrežnog protoka plazme, odnosno ispitanici sa višim vrednostima endotelina-1 imaju veći stepen redukcije jačine glomerulske filtracije i efektivnog bubrežnog protoka plazme.
7. Vrednosti dvadesetčetvoročasovne proteinurije i urinarne ekskrecije albumina u bolesnika sa tipom 2 dijabetes melitusa su u značajnoj korelaciji sa plazmatskim koncentracijama endotelina-1.
8. Kod bolesnika sa tipom 2 dijabetes melitusa i većim stepenom redukcije bubrežne funkcije postoji korelacija vrednosti serumskih koncentracija ureje, kreatinina, acidum urikuma i

Cistatina C sa plazmatskim koncentracijama endotelina-1 ali ne i u ispitanika sa relativno dobro očuvanom funkcijom rezervom bubrega, odnosno blažim stepenom hipofunkcije.

9. Kod bolesnika sa tipom 2 dijabetes melitusa i dijabetesnom nefropatijom povišena koncentracija plazmatskog endotelina-1 i dužina trajanja hipertenzije predstavljaju značajne nezavisne prediktore smanjenja jačine glomerulske filtracije.

10. Kod bolesnika sa tipom 2 dijabetes melitusa i različitim stepenom bubrežne hipofunkcije endotelin-1 u značajnoj meri utiče na vrednosti jačine glomerulske filtracije i efektivnog bubrežnog protoka plazme ali i druge funkcijske parametre bubrega i samim tim može imati važnu ulogu u nastanku i razvoju dijabetesne nefropatije.

LITERATURA

1. Djukanović Lj. Dijabetesna nefropatija. U: Djukanović Lj i Oštrić V, urednici. Bolesti bubrega. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 1999: 247-258
2. Ritz E, Rychlík I, Locatelli F, Halimi S. Endstage renal failure in type 2 diabetes: A medical catastrophe of worldwide dimensions. *Am J Kidney Dis* 1999;34(5):795-808.
3. Van Dijk PC, Jager KJ, Stengel B, Grönhagen-Riska C, Feest TG, Briggs JD. Renal replacement therapy for diabetic end-stage renal disease: data from 10 registries in Europe (1991-2000). *Kidney Int* 2005;67(4):1489-1499.
4. U.S. Renal Data System. *USRDS 2009 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States*. National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; Bethesda, MD: 2009
5. Djukanović Lj, urednik. *Godišnji izveštaj o lečenju dijalizama i transplantacijom bubrega u Srbiji, 2009*. Beograd: Udruženje nefrologa Srbije; 2011.
6. Groop PH, Forsblom C. Diabetic nephropathy-an acquired or inherited disease? *Int Congress Series* 2003;1253:149-61
7. Ahmad J. Renin-angiotensin system blockade in diabetic nephropathy. *Diabetes Metab Syndrome: Clin Res Rev* 2008;2:135-58
8. Remuzzi G, Benigni A, Remuzzi A. Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest* 2006;116:288-96.
9. Thomas SM, Viberti GC. Cardiovascular risk in diabetic kidney disease:a model of chronic renal disease. *Kidney Int* 2005;68(Suppl 98):518-20
10. Cooper, M. Interaction of metabolic and hemodynamic factors in mediating experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia* 2001;44 (11):1957–1972.
11. G.M. Hargrove, J. D. Wong, Diabetes mellitus increases endothelin-1 gene transcription in rat kidney,. *Kidney Int.*2000;58 (4):1534–1545.

12. M. Haneda, S. A. Mitogen-activated protein kinase cascade is activated in glomeruli of diabetic rats and glomerular mesangial cells cultured under high glucose conditions. *Diabetes* 1997; 46 (5): 847–853.
13. A Arya, Sahil A., H. N. Yadav. Pathogenesis of diabetic nephropathy. *J. Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2010; 2:24-29.
14. Dunlop ME, M. E. Small heat shock protein alteration provide a mechanism to reduce mesangial cell contractility in diabetes and oxidative stress. *Kidney Int* 2000, 57, 464–475.
15. Remmuzi G, Schieppati A, Ruggenti P. Clin practice. Nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Eng J Med* 2002;346:1145-51
16. Thomas SM, Viberti GC. Cardiovascular risk in diabetic kidney disease: a model of chronic renal disease. *Kidney Int* 2005;68(Suppl 98):518-20
17. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, Hadden D, Turner RC, Holman RR: Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ* 2000;321:S405–S412
18. Appel GB, Radhakrishnan J, Avram MM, DeFronzo RA, Escobar-Jimenez F, Campos MM, Burgess E, Hille DA, Dickson TZ, Shahinfar S, Brenner BM: Analysis of metabolic parameters as predictors of risk in the RENAAL study. *Diabetes Care* 2003; 26:S1402–S1407
19. Barton M, Kohan DE (eds): *Endothelin in Renal Physiology and Disease. Contrib Nephrol.* Basel, Karger, 2011;172:139–148
20. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al.. 1988. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411-415 .
21. Battistini B, Berthiaumen N., Kelland NF. i sar. Profile of past and current clinical trials involving endothelin receptor antagonists: the novel “-sentan” class of drug. *Experimental Biology and Medicine* 2006;231:653-95.
22. Krum H, Viskoper RJ, Lacourciere Y, Budde M, Charlon V. The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1998;338:784-90.

23. Chen S1, Apostolova MD, Cherian MG, Chakrabarti S. Interaction of endothelin-1 with vasoactive factors in mediating glucose-induced increased permeability in endothelial cells. *Lab Invest.* 2000 Aug;80(8):1311-21.
24. Schildroth J, Rettig- Zimmermann J, Kalk P, Steege A, Fahling M, Sendeski M, Paliege A, Lai EY, Bachmann S, Persson PB, Hoher B, Patzak A. Endothelin type A and B receptors in the control of afferent and efferent arterioles in mice. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26:S779– 789.
25. Choudhury, D.; Tuncel, M. & Levi, M. (2010). Diabetic nephropathy a multifaceted target of new therapies. *Discovery Medicine*, (2010);10 (54):406-415.
26. Kaku K., *Pathophysiology of Type 2 Diabetes and Its Treatment Policy.* JMAJ, 2010; 53(1): 41–46
27. Stošić Z. i Borota R., urednici, *Osnovi kliničke patofiziologije.* Novi Sad : Medicinski fakultet, 2012:134-137
28. M. Kanat, A. Mari, L. Norton, D. Winnier, R. A. DeFronzo, C. Jenkinson, M. A. Abdul-Ghani. Distinct β -Cell Defects in Impaired Fasting Glucose and Impaired Glucose Tolerance. *Diabetes* 2012;61:447–453
29. Remuzzi G, Schieppati A, Ruggenti P. Clin practice. Nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Eng J Med* 2002;346:1145-51
30. Lee GS. Retarding the progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetes mellitus: focus on hypertension and proteinuria. *Ann Acad Med Singap* 2005;34:24-30
31. Berger M, Mönks D, Wanner C, Lindner TH. Diabetic nephropathy: an inherited disease or just a diabetic complication? *Kidney Blood Press Res* 2003;26:143–54.
32. Hostetter TH. Hyperfiltration and glomerulosclerosis. *Semin Nephrol.* 2003 Mar;23(2):194-9.
33. Ruggenti P, Schieppati A, Remuzzi G. Progression, remission, regression of chronic renal diseases. *Lancet* 2001;357: 1601–8
34. Wolf G. New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from haemodynamics to molecular pathology. *Eur J Clin Invest* 2004;34:785-96

35. Mason RM, Wahab NA. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy . J Am Soc Nephrol 2003;14:1358–73.
36. Steffes MW , Osterby R, Chavers B, Mauer SM. Mesangial expansion as a central mechanism for loss of kidney function in diabetic patients . Diabetes 1989;38:1077–81.
37. Mauer SM, Steffes MW , Ellis EN, et al. Structural-functional relationships in diabetic nephropathy . J Clin Invest 1984; 74:1143–55.
38. Osterby R, Tapia J, Nyberg G, et al. Renal structures in type 2 diabetic patients with elevated albumin excretion rate . APMIS 2001;109:751–61.
39. Osterby R, Hartmann A, Nyengaard JR, Bangstad HJ. Development of renal structural lesions in type -1 diabetic patients with microalbuminuria. Observations by light microscopy in 8-year follow -up biopsies . Virchows Arch 2002;440:94–101.
40. Tap RJ, Shaw JE, Zimmet PZ, Balkau B, Chadban SJ, Tonkin AM et al. Albuminuria is evident in the early stages of diabetes onset: results from the Australian Diabetes, Obesity, and Lifestyle Study (AusDiab). Am J Kidney Dis 2004;44:792-8.
41. Khattab M, Khader Y, Al-Khawaldeh, Ajlouni K. Factors associated with poor glycemic control among patients with Type 2 diabetes. J Diabetes Complications 2010;24:84-9
42. Đukanović Lj. Progresija nefropatije u tipu 2 dijabetes melitusa. U: Stefanović V. Dijabetesna nefropatija, Univerzitet u Nišu, 2002
43. Stefanović V. Prevencija i lečenje dijabetesne nefropatije. U:Stefanović V i sar. Dijabetesna nefropatija. Univerzitet u Nišu. 2002
44. Murussi M, Baglio P, Gross JL, Silveiro SP. Risk factors for microalbuminuria and macroalbuminuria in type 2 diabetic patients: A 9-year follow-up study. Diabetes Care 2002;25:1101-3
45. Forsblom CM, Groop PH, Ekstrand A, Totterman KJ, Sane T, Saloranta C, Groop L. Predictors of progression from normoalbuminuria to microalbuminuria in NIDDM. Diabetes Care 1998;21:1932-8

46. Shikata K, Haneda M, Koya D, Suzuki Y, Tomino Y, Yamada K, et al. Diabetic nephropathy remission and regression team trial in Japan (DNETT-Japan): Rationale and study design. *Diabetes Res Clin Pract* 2010;87:228-32
47. The ADVANCE Collaborative Group. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008;358:2560-72
48. Haneda M, Morikawa A. Which hypoglycaemic agents to use in type 2 diabetic subjects with CKD and how? *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:338-41
49. Bash LD, Selvin E, Steffes M, Coresh J, Astor BC. Poor glycemic control in diabetes and the risk of incident chronic kidney disease even in the absence of albuminuria and retinopathy: Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Arch Intern Med* 2008;168:2440-7.
50. Krolewski M, Eggers PW, Warram JH. Magnitude of end stage renal disease in IDDM: A 35 year follow-up study. *Kidney Int* 1996;50:2041.
51. Janssen U, Riley S, Vassiliadou A, Floege J, Phillips A. Hypertension superimposed on type II diabetes in Goto Kakizaki rats induces progressive nephropathy. *Kidney Int* 2003;63:2162-70
52. Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S, Nelson RG, Myers BD, Rennke H, et al. Podocyte loss and progressive glomerular injury type II diabetes. *J Clin Invest* 1997;99:342-8
53. Schrier RW, Estacio RO, Esler A, Mehler P. Effects of aggressive blood pressure control in normotensive type 2 diabetics on albuminuria, retinopathy, and strokes. *Kidney Int* 2002;61:1086-97
54. UKPDS Group. UK Prospective Diabetes Study 38:tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes. *BMJ* 1998;317:703-13
55. Stults B, Jones E. Management of hypertension in diabetes. *Diabetes Spectr* 2006;19:25-31
56. Šmalcelj A, Mohaček I. Poremećaji tlaka i protoka krvi. U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i sar. *Patofiziologija, Medicinska naklada; Zagreb, 2002*

57. Schaeffner ES, Kurth T, Curhan GC, Glynn RJ, Rexrode KM, Baigent C, et al. Cholesterol and the risk of renal dysfunction in apparently healthy men. *J Am Soc Nephrol* 2003;27:227-34
58. Sung KC, Rhee EJ, Kim H, Park JB, Kim YK, Woo S, et al. An elevated apolipoprotein B/AI ratio is independently associated with microalbuminuria in male subjects with impaired fasting glucose. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010; doi:10.1016/j.numecd.2010.01.001
59. Misra A, Kumar S, Kishore Vikram N, Kumar A. The role of lipids in the development of diabetic microvascular complications: Implication of therapy. *Am J Cardiovasc Drugs* 2003;3:325-38
60. Ujihara N, Sakka Y, Takeda M, Hirayama M, Ishii A, Tomonaga O, et al. Association between plasma oxidized low-density lipoprotein and diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract* 2002;58:109-14
61. Bonnet F, Cooper ME. Potential influence of lipids in diabetic nephropathy: insights from experimental data and clinical studies. *Diabetes Metab* 2000;26:254-64
62. Gall MA, Hougaard P, Borch-Johnsen K, Parving H-H. Risk factors for development of incipient and overt diabetic nephropathy in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus: Prospective, observational study. *BMJ* 1997;314:783-8
63. Vasquez-Perez S, Arangoncillo P, De Los Heras N. Atrovastatin prevents glomerulosclerosis and venal endothelial dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 40-4
64. Božidar Vujičić, Tamara Turk, Željka Crnčević-Orlić, Gordana Đorđević, Sanjin Rački. Diabetic nephropathy. *Medicina Fluminensis* 2010;46: 360-375.
65. Eliasson B. Cigarette smoking and diabetes. *Prog Cardiovasc Dis* 2003;45:405-13
66. Tonstad S. Cigarette smoking, smoking cessation, and diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2009;85:4-13
67. Brancati FL, Whittle JC, Whelton PK, Seidler AJ, Klag MJ. The excess incidence of diabetic end-stage renal disease among blacks. A population-based study of potential explanatory factors. *JAMA* 1992;268:3079-84.

68. Pettitt DJ, Saad MF, Bennett PH, Nelson RG, Knowler WC. Familial predisposition to renal disease in two generations of Pima Indians with type 2 (noninsulin- dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1990;33:438-42.
69. Shah VO, Scavini M, Nikolic J et al. Z-2 microsatellite allele is linked to increased expression of the aldose reductase gene in diabetic nephropathy. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2886-91.
70. Jelić S. Analiza mogućnosti modifikovanja progresije mikroalbuminurije kod bolesnika sa dijabetes melitusom tipa 2. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, 2002
71. Nelson RG, Knowler WC, McCance DR, Sievers ML, Pettitt DJ, Charles MA, Hanson RL, Liu QZ, Bennett PH. Determinants of end-stage renal disease in Pima Indians with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and proteinuria. *Diabetologia*. 1993;36(10):1087-93.
72. Stephens GW, Gillaspay JA, Clyne D, et al. Racial differences in the incidence of end-stage renal disease in types I and II diabetes mellitus. *Am J Kidney Dis* 1990; 15: 562–567
73. Nelson RG, Knowler WC, Pettitt DJ, Hanson RL, Bennett PH. Incidence and determinants of elevated urinary albumin excretion in Pima Indians with NIDDM. *Diabetes Care* 1995; 18: 182–187
74. Wolf G, Ziyadeh FN. Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy. *Nephron Physiol* 2007;106:26–31.
75. Gruden G, Perin PC, Camussi G. Insight on the pathogenesis of diabetic nephropathy from the study of podocyte and mesangial cell biology . *Curr Diabetes Rev* 2005;1:27–40.
76. Shigeta Y, Kikkawa R. A role of mesangial dysfunction in the development of diabetic nephropathy . *Jpn J Med* 1991;30: 622–4.
77. Fogo AB. Mesangial matrix modulation and glomerulosclerosis. *Exp Nephrol* 1999;7:147–59.
78. Lewko B, Bryl E, Witkowski JM, Latawiec E, Angielski S, Stepinski J. Mechanical stress and glucose concentration modulate glucose transport in cultured rat podocytes. *Nephrol Dial. Transplant* 2005;20(2):306-311.

79. Kilaru P, Bakris GL. Renal mortality associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Diab Comp* 1997; 11: 104–111
80. Dragović T. Uticaj metaboličke kontrole na nastanak i razvoj bubrežne lezije u šećernoj bolesti *Vojnosanit Pregl* 2002; 59(3): 293–297.
81. Dunlop M. Aldose reductase and the role of the polyol pathway in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2000; 58: 3–12.
82. Molinatti GM, Porta M. Vascular complications of diabetes. *Medicographia* 1990; 12: 33–5.
83. Stehouwer C, Schaper N. The pathogenesis of vascular complications of diabetes mellitus: one voice or many? *Eur J Clin Invest* 1996; 26: 535–43.
84. Chan NN, Vallance P, Colhoum HM. Nitric oxide and vascular responses in Type I diabetes. *Diabetologia* 2000; 43: 137–47
85. Del Prete D, Anglani F, Coel M, D'Angelo A, Forino M, Vianello D, et al. Molecular biology of diabetic glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13:20–25.
86. McLennan S, Martell SV, Yue DK. High glucose concentration inhibits the expression of membrane type metalloproteinase by mesangial cells: possible role in mesangium accumulation. *Diabetologia* 2000; 43: 642–8.
87. Del Prete D, Anglani F, Forino M, Ceol M, Fioretto P, Nosadini R, et al. Down-regulation of glomerular matrix metalloproteinase-2 gene in human NIDDM. *Diabetologia* 1997; 40: 1449–54.
88. Yamamoto Y, Kato I, Doi T, Yonekura H, Ohashi S, Takeuchi M, et al. The role of AGE-RAGE system in the development of diabetic nephropathy in vivo. *Int Congress Series* 2002;1245:45-50
89. Thomas MC, MacIsaac RJ, Tsalamandris C, Power D, Jerums G. Unrecognized anemia in patients with diabetes: a cross-sectional survey. *Diabetes Care* 2003;26:1164-9
90. Yan SF, Ramasamy R, Bucchiere LG, et al. RAGE and its ligands: a lasting memory in diabetic complications? *Diab Vasc Dis Res* 2004;1:10-20

91. Friedman E. Advanced glycosylated end products and hyperglycemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care* 1999; 22 Suppl 2: B65–71.
92. Wassef L, Langham RG, Kelly DJ. Vasoactive renal factors and the progression of diabetic nephropathy. *Curr Pharm Des.* 2004;10(27):3373-84.
93. Navar LG, Harrison-Bernard LM, Imig JD, Wang CT, Cervenka L, Mitchell KD. Intrarenal angiotensin II generation and renal effects of AT1 receptors blockade. *J Am Soc Nephrol* 1999;10(Suppl 12):266-72
94. Hsueh W. Treatment of type 2 diabetic nephropathy by blockade of the renin-angiotensin system: a comparison of angiotensin-converting-enzyme inhibitors and angiotensin receptor antagonists. *Curr Opin Pharmacol* 2002;2:182-8
95. Hsueh W. Treatment of type 2 diabetic nephropathy by blockade of the renin-angiotensin system: a comparison of angiotensin-converting-enzyme inhibitors and angiotensin receptor antagonists. *Curr Opin Pharmacol* 2002;2:182-8
96. Miyata N, Park F, Li XF, Cowley Jr AW. Distribution of angiotensin AT1 and AT2 receptors sub types in the rat kidney. *Am J Physiol* 1999;277:437-46
97. Harrison-Bernard LM, Navar LG, Ho MM, Vinson GP, El Dahr SS. Immunohistochemical localization of ANG II AT1 receptor in adult rat kidney using monoclonal antibody. *Am J Soc Nephrol* 1999;273:170-7
98. Kagami S, Kuhara T, Okada K, Kuroda Y, Border NA, Noble NA. Dual effects of angiotensin II on the plasminogen/plasmin system in rat mesangial cells. *Kidney Int* 1997;51:664-71
99. Arima S, Ito S. Angiotensin II type receptors in the kidney: evidence for endothelial-cell-mediated renal vasodilatation. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:448-51
100. Zimpelman J, Burns KD. Angiotensin II (AT2) receptors inhibit growth responses in proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;281:264-9
101. Ahmad J. Renin-angiotensin system blockade in diabetic nephropathy. *Diabetes Metab Syndrome: Clin Res Rev* 2008;2:135-58

102. Jaimer EA, Galceran JM, Raji L. Angiotensin II induces superoxide anion production by mesangial cells. *Kidney Int* 1997;51:664-71
103. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxipeptidase (ACE2) converts angiotensin 1 to angiotensin (1-9). *Circulation Res* 2000;87:1-9
104. Tallant EA, Diz DI, Ferrario CM. Antiproliferative actions of angiotensin (1-7) in vascular smooth muscle. *Hypertension* 1999;34:950-7
105. Xu, D., Emoto, N., Giaid, A., et al. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell*.1994;78:473–485.
106. Haynes, W.G., Webb, D.J. Venoconstriction to endothelin-1 in humans: role of calcium and potassium channels. *Am J Physiol*.1993;265:H1676- H1681.
107. Verhaar, MC., Strachan, F.E., Newby, D.E., et al. Endothelin-A receptor antagonist-mediated vasodilatation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-B receptor blockade. *Circulation*.1998;97:752–756.
108. Benigni, A., Colosio, V., Brena, C., et al. Unselective inhibition of endothelin receptors reduces renal dysfunction in experimental diabetes. *Diabetes*.1998;47:450–456.
109. Huang, S., Chen M, Li Y, Tian Q. Expression of ET-1 and Pr ET-1 mRNA in kidney of early diabetic rats. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao*.1999;30: 293–295.
110. Sorokin, A., Kohan, D.E. Physiology and pathology of endothelin-1 in renal mesangium. *Am J Physiol Renal Physiol*.2003;285:F579–F589.
111. Mishra, R., Emancipator, S.N., Kern, T.S., Simonson, M.S. Association between endothelin-1 and collagen deposition in db/db diabetic mouse kidneys. *Biochem Biophys Res Commun*.2006;339: 65–70.
112. Sasser, J.M., Sullivan, J.C., Hobbs, J.L., et al. Endothelin A receptor blockade reduces diabetic renal injury via an anti-inflammatory mechanism. *J Am Soc Nephrol*.2007;18:143–154.

113. Xu, M., Dai, D.Z., Dai, Y. Normalizing NADPH oxidase contributes to attenuating diabetic nephropathy by the dual endothelin receptor antagonist CPU 0213 in rats. *Am J Nephrol.* 2009;29:252–256.
114. Kone BC, B. C. Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. *Am J Physiol* 1997;272:561–578.
115. Komers R, A. S. Paradoxes of nitric oxide in the diabetic kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;284:1121–1137.
116. Schwartz D, S. I. An analysis of renal nitric oxide contribution to hyperfiltration in diabetic rats. *J Lab Clin Med* 2001;137:107–114.
117. Komers R, L. J. Role of neuronal nitric oxide synthase (NOS1) in the pathogenesis of renal hemodynamic changes in diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279:573–583.
118. John D. Imig Eicosanoid regulation of the renal vasculature. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279: F965-F981.
119. Audoly, LP, Ruan X, Allen-Wagner V, Goulet J, Tilley SL, Koller BH, Coffman TM, and Arendshorst WJ. Importance of prostaglandin E2 (EP) receptors in the control of renal hemodynamics: a study using knockout mice . *FASEBJ* 2000; 14: A136.
120. E. Cediél., B. Vázquez-Cruz, Navarro-Cid J., N. De Las Heras, D. Sanz-Rosa, V. Cachofeiro and V. Lahera. Role of endothelin-1 and thromboxane A2 in renal vasoconstriction induced by angiotensin II in diabetes and hypertension. *Kidney International* (2002) 62, S2–S7.
121. Hao CM and Breyer MD (2007) Roles of lipid mediators in kidney injury. *Semin Nephrol* 27: 338–351
122. Imig JD (2006) Eicosanoids and renal vascular function in diseases. *Clin Sci (Lond)* 111: 21–34.
123. Pope JE et al. (1993) A meta-analysis of the effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on blood pressure. *Arch Intern Med* 153: 477–484.
124. Yamamoto T, et al. Expression of transforming growth factor beta is elevated in human and experimental diabetic nephropathy . *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:1814–8.

125. Ziyadeh FN, Wolf G. Pathogenesis of the podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy . *Curr Diabetes Rev* 2008;4:39–45.
126. Lehmann R, Spinass GA. [Diabetic nephropathy: significance of microalbuminuria and proteinuria in Type I and Type II diabetes mellitus]. *Praxis* 1995;84:1265–71.
127. Vallon V, Richter K, Blantz RC, et al. Glomerular hyperfiltration in experimental diabetes mellitus: potential role of tubular reabsorption . *J Am Soc Nephrol* 1999;10:2569–76.
128. Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN. From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy . *Diabetes* 2005;54:1626–34.
129. Böttinger EP , Bitzer M. TGF-beta signaling in renal disease . *J Am Soc Nephrol* 2002;13:2600–10.
130. Rivarola EW, Moyses-Neto M, Dantas M, Da-Silva CG, Volpini R, Coimbra TM. Transforming growth factor beta activity in urine of patients with type 2 diabetes and diabetic nephropathy. *Braz J Med Biol Res.* 1999;32:1525–8
131. Wahab NA, Yevdokimova N, Weston BS, Roberts T, Li XJ, Brinkman H, Mason RM. Role of connective tissue growth factor in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Biochem J* 2001; 359 : 77–87
132. Qi W, Twigg S, Chen X, Polhill TS, Poronnik P, Gilbert RE, Pollock CA: Integrated actions of transforming growth factor- 1 and connective tissue growth factor in renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;288: 800–9
133. KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Diabetes and Chronic Kidney Disease . *Am J Kidney Dis* 2007;49: 152–154.
134. Liu Y. Hepatocyte growth factor and the kidney . *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002;11:23–30.
135. Zhang Y, Zhang Q. Bone morphogenetic protein-7 and Gremlin: New emerging therapeutic targets for diabetic nephropathy . *Biochem Biophys Res Commun* 383; 2009:1–3.

136. Wang SN, Lapage J, Hirschberg R. Loss of tubular bone morphogenetic protein 7 in diabetic nephropathy . *J Am Soc Nephrol* 2001;12:2392–99.
137. De Petris L, Hruska KA, Chiechio S, Liapis H. Bone morphogenetic protein -7 delays podocyte injury due to high glucose . *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:3442–50.
138. Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, et al. BMP-7 counteracts TGF -beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* 2003;9:964–8.
139. Lam S, van der Geest RN, Verhagen NA, et al. Connective tissue growth factor and IGF-I are produced by human renal fibroblasts and cooperate in the induction of collagen production by high glucose. *Diabetes* 2003;52:2975–83.
140. Vasylyeva TL, Ferry RJ Jr .Novel roles of the IGF -IGFBP axis in etiopathophysiology of diabetic nephropathy . *Diabetes Res Clin Pract* 2007;76:177–86.
141. Schrijvers BF , Flyvbjerg A, De Zeeuw AS. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology .*Kidney Int* 2004;65:2003–17.
142. De Zeeuw AS, Tilton RG, Elger M, Stephan CC, Kriz W, Lamiere NH. Antibodies against vascular endothelial growth factor improve early renal dysfunction in experimental diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:993-1000
143. Wilson DM and Luetscher JA (1990) Plasma prorenin activity and complications in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 323: 1101–1106 |
144. Daneman D et al. (1994) Plasma prorenin as an early marker of nephropathy in diabetic (IDDM) adolescents. *Kidney Int* 46: 1154–1159|
145. Nguyen G (2006) Renin/prorenin receptors. *Kidney Int* 69: 1503–1506 |
146. Ichihara A et al. (2006) Prorenin receptor blockade inhibits development of glomerulosclerosis in diabetic angiotensin II type 1a receptor-deficient mice. *J Am Soc Nephrol* 17: 1950–1961
147. Singh DK, Winocour P, Farrington K. Mechanisms of disease: the hypoxic tubular hypothesis of diabetic nephropathy . *Nat Clin Pract Nephrol* 2008;4:216–26.

148. Nangaku M. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:17–25.
149. Rösen P, Nawroth PP, King G, Möller W, Tritschler HJ, Packer L. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a congress series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diab Metab Res Rev* 2001;58(suppl 77):19-25
150. Ha H, Kim KH. Pathogenesis of diabetic nephropathy: the role of oxidative stress and protein kinase C. *Diab Res Clin Pract* 1999;45:147-151
151. Xiao H, Li Y, Qi J, Wang H, Liu K. Peroxynitrite plays a key role in glomerular lesions in diabetic rats. *J Nephrol* 2009;22:800-8
152. Liang JH, Li YN, Qi JS, Jia XX. Peroxynitrite-induced protein nitration is responsible for renal mitochondrial damage in diabetic rat. *J Endocrinol Invest* 2010;33:140-6
153. Ha H, Hwang IA, Park JH, Lee HB. Role of reactive oxygen species in pathogenesis of diabetic nephropathy. *Diab Res Clin Pract* 2008;82:42-5
154. Lee HB, Yu MR, Yang Y, Jiang Z, Ha H. Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(suppl.8):241-5
155. Ha H, Yu MR, Choi YJ, Kitamura M, Lee HB. Role of high glucose-induced nuclear factor-kappa B activation in monocyte chemoattractant protein-1 expression by mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:894-902
156. Lee HB, Yu MR, Yang Y, Jiang Z, Ha H. Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(suppl.8):241-5
157. Rhyu DY, Yang Y, Ha H, Lee GT, Song JS, Uh ST, et al. Role of reactive oxygen species mediated TGF- β 1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 2006;16:667-75
158. Oldfield MD, Bach LA, Forbes JM, et al. Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Clin Invest* 2001;108:1853-63

159. Leehey DJ, Isreb MA, Marcic S, Singh AK, Singh R. Effect of high glucose on superoxide in human mesangial cells: role of angiotensin II. *Nephron Exp Nephrol* 2005;100:46-53
160. Onozato ML, Tojo A, Goto A, Fujita T, Wilcox CS. Oxidative stress and nitric oxide synthase in rat diabetic nephropathy: effects of ACEI and ARB. *Kidney Int* 2002;61:186-94
161. Ha H, Yu MR, Choi YJ, Lee HB. Activation of protein kinase C- δ and - ϵ by oxidative stress in early diabetic kidney. *Am J Kidney Dis* 2001;38:204-7.
162. Navarro-González JF, Mora-Fernández C, Muros de Fuentes M, García-Pérez J. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 2011;7:327-40.
163. Rivero A, Mora C, Muros M, Garcia J, Herrera H, Navarro-Gonzalez JF. Pathogenic perspectives for the role of inflammation in diabetic nephropathy. *Clin Sci* 2009;116:479-92
164. Elmarakby A, Abdelsayed R, Yao Liu J, Mozaffari M. Inflammatory cytokines as predictive markers for early detection and progression of diabetic nephropathy. *EPMA J* 2010;1:117-29
165. Fornoni A, Ijaz A, Tejada T, Lenz O. Role of inflammation in diabetic nephropathy. *Curr Diab Rev* 2008;4:10-17
166. Takebayashi K, Suetsugu M, Matsumoto R, Wakabayashi S, Aso Y, Inukai T. Correlation of high-sensitive C-reactive protein and plasma fibrinogen with individual complications in patients with type 2 diabetes. *Sout Med J* 2006;99:23-7
167. Kalantarinia K, Awad AS, Siragy HM. Urinary and renal interstitial concentrations of TNF- α increase prior to the rise in albuminuria in diabetic rats. *Kidney Int* 2003;64:1208-13
168. Navarro JF, Mora C, Garcia J. Urinary tumor necrosis factor- α excretion independently correlates with clinical markers of glomerular and tubulointerstitial injury in type 2 diabetic patients. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:3428-34
169. Navarro JF, Mora C, Maca M, Garcia J. Inflammatory parameters are independently associated with urinary albumin in type 2 diabetes mellitus. *Am J Kidney Dis* 2003;42:53-61

170. Chow FY, Nikolic-Paterson DJ, Oyols E, Atkins RC, Tesch GH. Intercellular adhesion molecule-1 deficiency is protective against nephropathy in type 2 diabetic db/db mice. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1711-22
171. Galkina E, Ley K. Leukocyte recruitment and vascular injury in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:368-77
172. Guler S, Cakir B, Demirbas B, et al. Plasma soluble intercellular adhesion molecule 1 levels are increased in type 2 diabetic patients with nephropathy. *Horm Res* 2002;58:67-70
173. Tam FW, Riser BL, Meeran K, Rambow J, Pusey CD, Frankel AH. Urinary monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and connective tissue growth factor (CCN2) as prognostic marker for progression of diabetic nephropathy. *Cytokine* 2009;47:37-42
174. Osterby R. Glomerular structural changes in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: causes, consequences and prevention. *Diabetologia* 1992; 35: 803–12.
175. Ismail N, Becker B, Strzelszyk P, Ritz E. Renal disease and hypertension in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Kidney Int* 1999; 55: 1–28.
176. Farquhar MG (1995) The primary glomerular filtration barrier: Basement membrane or epithelial slits? Editorial review. *Kidney Int* 8:197-211
177. Diez-Sampedro A, Lenz O, Fornoni A. Podocytopathy in diabetes: a metabolic and endocrine disorder. *Am J Kidney Dis* 2011;58:637–46.
178. Hermann Pavenstädt, Wilhelm Kriz, Matthias Kretzler. Cell Biology of the Glomerular Podocyte. *Physiological Reviews* 2003;83: 253-307.
179. Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M: Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev.* 2003;83:253- 307.
180. Kawachi H, Miyauchi N, Suzuki K, Dong Han G, Orikasa M, Shimizu F. Role of podocyte slit diaphragm as a filtration barrier. *Nephrology.* 2006;11:274-81.
181. Endlich K, Kriz W, Witzgall R. Update in podocyte biology. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2001;10:331-40.
182. Barisoni L, Mundel P. Podocyte Biology and the Emerging Understanding of Podocyte Diseases. *Am J Nephrol* 2003;23:353-60.

183. Holthöfer H. Molecular architecture of the glomerular slit diaphragm: lessons learnt for a better understanding of disease pathogenesis. *Nephrol Dial Transplants*. 2007;22:2124-8.
184. Christensens EI, Birn H, Verroust P, Moestrup SK .Membrane receptors for endocytosis in the renal proximal tubule. *Int Rev Cytol* 1998 ;180:237-84
185. Eddy AA. Molecular basis of renal fibrosis . *Pediatr Nephrol* 2000;15:290–301.
186. Essawy M, Soylemezoglu O, Muchaneta-Kubara EC, et al. Myofibroblasts and the progression of diabetic nephropathy .*Nephrol Dial Transplant* 1997;12:43–50.
187. . Zeisberg M, Kalluri R. The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis . *J Mol Med* 2004;82:175–82.
188. Meran S, Steadman R. Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis . *Int J Exp Pathol* 2011;92:158–67.
189. Strutz F, da H, Lo CW , et al. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1 . *J Cell Biol* 1995;130:393–405.
190. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, et al. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis . *J Clin Invest* 2002;110:341–50.
191. Yang J, Liu, Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis . *Am J Pathol* 2001; 159:1465–75.
192. Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention . *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:1–12.
193. Hills CE, Squires PE. TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and therapeutic intervention in diabetic nephropathy . *Am J Nephrol* 2010;31: 68–74.
194. Phillips AO, Steadman R. Diabetic nephropathy: the central role of renal proximal tubular cells in tubulointerstitial injury . *Histol Histopathol* 2002;17:247–52.
195. Wolf G, Ziyadeh FN. Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy . *Kidney Int* 1999;56:393–405.

196. Ruger BM, Hasan Q, Greenhill NS, et al. Mast cells and type VIII collagen in human diabetic nephropathy . *Diabetologia* 1996;39:1215–22.
197. Gunter Wolf. Diabetes and Kidney Disease. Chapter 3 Genetic risk factors for diabetic Nephropathy .Carsten A. Boger and Peter R. Mertens January 2013, Wiley-Blackwell.
198. Satko SG, Langefeld CD, Daeihagh P, Bowden DB, Rich SS, Freedman BI. Nephropathy in siblings of African Americans with overt type 2 diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2002;40:489-94.
199. Klein R, Klein BE, Moss SE, et al. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. IV. Diabetic macular edema . *Ophthalmology* 1984;91:1464–74.
200. Seaquist ER, Goetz FC, Rich S, Barbosa J. Familial clustering of diabetic kidney disease. Evidence for genetic susceptibility to diabetic nephropathy . *N Engl J Med* 1989;320:1161–5.
201. Adler S. G., Pahl M., Seldin M. F. Deciphering diabetic nephropathy: progress using genetic strategies. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2000; 9(2):99-106.
202. Smith MW, et al.: A high-density admixture map for disease gene discovery in African Americans. *Am J Hum Genet* 2004;74 :1001– 1013,
203. Scott LJ, et al.: A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 2007;316 :1341– 1345,
204. Schmidt S, Ritz E. Angiotensin I converting enzyme gene polymorphism and diabetic nephropathy in type II diabetes. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 37–41
205. Jeffers BW, Estacio RO, Raynolds MV, Schrier RW. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in non-insulin dependent diabetes mellitus and its relationship with diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1997; 52(2): 473–477
206. Penno G, Chaturvedi N, Talmud PJ, Cotroneo P, Manto A, Nannipieri M et al. Effect of angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphism on progression of renal disease and the influence of ACE inhibition in IDDM patients: findings from the EUCLID Randomized Controlled Trial. EURODIAB Controlled Trial of Lisinopril in IDDM. *Diabetes* 1998; 47:1507-11

207. Perna A, Ruggenti P, Testa A, Spoto B, Benini R, Misefari V et al. ACE genotype and ACE inhibitors induced renoprotection in chronic proteinuric nephropathies. *Kidney Int* 2000; 57:274-281
208. Chung S. S., Chung S. K.: Genetic analysis of aldose reductase in diabetic complications. *Curr Med Chem.*2003; 10: 1375–1387
209. Ko G. T., Chow C. C., Li C. Y., Yeung V. T., Cockram C. S. (1995): Insulin-dependent diabetes mellitus presenting as diabetic ketoacidosis in pregnancy. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.*35: 321–3220
210. Shah V. O., Scavini M., Nikolic J., Sun Y., Vai S., Griffith J. K. et al.(1998): Z-2 microsatellite allele is linked to increased expression of the aldose reductase gene in diabetic nephropathy. *J ClinEndocrinolMetab.*83: 2886–2891.
211. Olmos P., Acosta A. M., Schiaffino R., Díaz R., Alvarado D., O'Brien A. et al. (1999): Aldose reductase gene polymorphism and rate of appearance of retinopathy in non insulin dependent diabetics. *Rev Med Chil.* 127: 399–409.;
212. Moczulski D. K., Scott L., Antonellis A., Rogus J. J., Rich S. S., Warram J. H. et al. (2000): Aldose reductase gene polymorphisms and susceptibility to diabetic nephropathy in Type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 17: 111–118.
213. Neamat-Allah M., Feeney S. A., Savage D. A., Maxwell A. P., Hanson R. L., Knowler W. C. et al.(2001): Analysis of the association between diabetic nephropathy and polymorphisms in the aldose reductase gene in Type 1 and Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med.*18: 906–914.
214. Liu Y. F., Wat N. M., Chung S. S., Ko BC., Lam K. S. (2002): Diabetic nephropathy is associated with the 5-end dinucleotide repeat polymorphism of the aldose reductase gene in Chinese subjects with Type 2 diabetes. *Diabet Med.* 19: 113–118.
215. Sivenius K., Niskanen L., Voutilainen-Kaunisto R., Laakso M., Uusitupa M. (2004): Aldose reductase gene polymorphisms and susceptibility to microvascular complications in Type 2 diabetes. *Diabet Med.* 21: 1325–1333.

216. Gosek K., Moczulski D., Zukowska-Szczechowska E. (2005): C-106T polymorphism in promoter of aldose reductase gene is a risk factor for diabetic nephropathy in type 2 diabetes patients with poor glycaemic control. *Nephron Exp Nephrol* 2005;99: e63–e67.
217. Koya D, King G. L. (1998): Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*. 47: 859–866.;
218. Larkins RG, Dunlop ME. (1992): The link between hyperglycaemia and diabetic nephropathy. *Diabetologia*. 35(6):499- 504.
219. Ng D. P., Canani L., Araki S., Smiles A., Moczulski D., Warram J. H. et al. (2002): Minor effect of GLUT1 polymorphisms on susceptibility to diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes*. 51(7):2264-9.
220. Zintzaras E, Stefanidis I. (2005): Association between the GLUT1 gene polymorphism and the risk of diabetic nephropathy: a meta-analysis. *J Hum Genet*. 50: 84–91.
221. Araki S., Moczulski D. K., Hanna L., Scott L.J., Warram J. H., Krolewski A. S. (2000): APOE polymorphisms and the development of diabetic nephropathy in type 1 diabetes: Results of case-control and family-based studies. *Diabetes*.49:2190– 2195.
222. Hsu C. C., Kao K. C., Coresh J., Pankow J. S., Marsh-Manzi J.,Boerwinkle E.et al. (2005): Apolipoprotein E and progression of chronic kidney disease. *JAMA*. 293: 2892–2899.
223. Mahley R. W., Rall S. C. (2000): Apolipoprotein E: Far more than a lipid transport protein. *Ann Rev Genomics Hum Genet*. 1:507–537.
224. Mooyaart A. L., Valk E. J., van Es L. A., Bruijn J. A., de Heer E., Freedman B. I., et al. (2011): Genetic associations in diabetic nephropathy: a meta-analysis. *Diabetologia*. 54(3):544-553.
225. Guzik T. J., Mangalat D., Korbust R. (2006): Adipocytokines: Novel link between inflammation and vascular function?.*J Physiol Pharmacol*. 57: 505–528.
226. Qi L., Doria A., Manson J. E., Meigs J. B., Hunter D., Mantzoros CS., Hu F. B. (2006): Adiponectin genetic variability, plasma adiponectin, and cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 55: 1512–1516.

227. Herrmann S. M., Ringel J., Wang J. G., Staessen J. A., Brand E.(2002): Peroxisome proliferator activated receptor gamma 2 polymorphism Pro12Ala is associated with nephropathy in type 2 diabetes: the Berlin Diabetes Mellitus (BeDiaM) Study. *Diabetes*. 51: 2653–2657.
228. Caramori M. L., Canani L. H., Costa L. A., Gross J. L. (2003): The human peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 (PPARgamma2) Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 52: 3010–3013.
229. Pollex R. L., Mamakeesick M., Zinman B., Harris SB., Hegele R. A., Hanley A. J. (2007): Peroxisome proliferator activated receptor gamma polymorphism Pro12Ala is associated with nephropathy in type 2 diabetes. *J Diabetes Complications*. 21: 166–171.
230. Matsuoka Y., Li X., Bennett V. (2000): Adducin: structure, function and regulation. *Cell Mol Life Sci*. 57:884–895.
231. Conway B. R, Martin R, McKnight A. J, Savage D.A, Brady H. R, Maxwell A. P. (2004): Role of alpha-adducin DNA polymorphisms in the genetic predisposition to diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 19(8):2019-24
232. Currie D, Maxwell A. P, Sadlier D, McKnight A. J., Warren 3/UK GoKinD Study Group. (2008): Investigation of Adducin 2 (beta) DNA polymorphisms in genetic predisposition to diabetic nephropathy in Type 1 diabetes. *Diabet Med*. 25(8):1001-5.
233. Lanzani C., Citterio L., Jankaricova M., Sciarrone M. T., , Barlassina C., Fattori S. et al. (2005): Role of the adducin family genes in human essential hypertension. *J Hypertens*. 23(3):543-9.
234. Ng DPK, Nurbaya S, Ye SHJ, Krolewski AS. An IL-6 haplotype on human chromosome 7p21 confers risk for impaired renal function in type 2 diabetic patients. *Kidney Int* 2008; 74: 521–527.
235. Kitamura A, Hasegawa G, Obayashi H et al. Interleukin-6 polymorphism (-634C/G) in the promoter region and the progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *Diabet Med* 2002; 19: 1000–1005.

236. Abrahamian H, Endler G, Exner M et al. Association of low-grade inflammation with nephropathy in type 2 diabetic patients: role of elevated CRP-levels and 2 different gene-polymorphisms of proinflammatory cytokines. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2007; 115:
237. Shiro Maeda. Do inflammatory cytokine genes confer susceptibility to diabetic nephropathy? *Kidney International* (2008) 74, 413–415.
238. Mogensen CE, Christensen CK. Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. *N Engl J Med* 1984;311:89-93.
239. Dikow R, Ritz E. The patient with diabetes mellitus. U: Davison AM, Cameron JS, Grunfeld J-P, Ponticelli C, Ritz E, Winearls CG, van Ypersele C, ur. *Clinical Nephrology*. 3. izd. Oxford University, 2005
240. Dahlquist G, Stattin EL, Rudberg S. Urinary albumin excretion rate and glomerular filtration rate in the prediction of diabetic nephropathy; a long-term follow-up study of childhood onset type-1 diabetic patients. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16(7): 1382–6.
241. Guizar JM, Kornhauser C, Malacara JM, Amador N, Barrera JA, Esparza R. Renal functional reserve in patients with recently diagnosed Type 2 diabetes mellitus with and without microalbuminuria. *Nephron* 2001; 87(3): 223–30.
242. Giorgino F, Laviola L, Cavallo Perin P, Solnica B, Fuller J, Chaturvedi N. Factors associated with progression to macroalbuminuria in microalbuminuric Type 1 diabetic patients: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetologia* 2004; 47(6): 1020–8.
243. Brosius FC, Khoury CC, Buller CL, Chen S. Abnormalities in signaling pathways in diabetic nephropathy. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2010;5(1):51-64.
244. Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM, Parrott M. Guidelines and recommendations of laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2002;48:436-72
245. Nacionalni Vodič Dobre Kliničke Prakse za Dijagnostikovanje i Lečenje Diabetes Mellitusa, Novembar 2012.

246. Trevisan R, Barnes D, Viberti GC. Pathogenesis of diabetic nephropathy. In: Pickup J, Williams G, Johns P, Keen H, editors. Textbook of diabetes. 2nd ed. London: Blackwell Science; 1997. p. 52.1–53.1.
247. Dragović T. Microalbuminuria in diabetes: definition, identification techniques, and the significance of early recognition. *Vojnosanit Pregl* 2006; 63(12): 1027–1032.
248. American Diabetes Association, standards of medical care in diabetes-2007, *Diabetes Care* 2007;30;4-41
249. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002;39(Suppl 1):1-266
250. Barnett A. Multiprofessional management. In: Barnett A, editor. Diabetes & renal disease. London: Medical Education Partnership; 2005. p. 47–9.
251. Mortensen HB. Microalbuminuria in young patients with type 1 diabetes. In: Mogensen CE, editor. The kidney and hypertension in diabetes mellitus. 5th ed. Boston: Kluwer Academic; 2000. p. 363–79.
252. Fenton JJ, Von Korff M, Lin EH, Ciechanowski P, Young BA. Quality of preventive care for diabetes: effects of visit frequency and competing demands. *Ann Fam Med* 2006; 4(1): 32–9.
253. Tabei BP, Al-Kassab AS, Ilag LL, Zawacki CM, Herman WH. Does microalbuminuria predict diabetic nephropathy? *Diabetes Care* 2001;24:1560-6
254. Caramori ML, Fioretto P, Mauer M. The need for early predictors of diabetic nephropathy risk: is albumin excretion rate sufficient? *Diabetes* 2000;49:1399-408
255. Maclsaac RJ, Jerums G. Albuminuric and non-albuminuric pathways to renal impairment in diabetes. *Minerva Endocrinol* 2005;30:161-77
256. Tsalamandris C, Allen TJ, Gilbert RE, Sinha A, Panagiotopoulos S, Cooper ME, Jerums G: Progressive decline in renal function in diabetic patients with and without albuminuria. *Diabetes* 1994;43:649–655

257. Jerums G, Premaratne E, Panagiotopoulos S, Clarke S, Power DA, MacIsaac RJ. New and old markers of progression of diabetic nephropathy. *Diab Res Clin Pract* 2008;82:30-7
258. David W Johnson, Graham R D Jones, Gavin J Becker and Timothy H Mathew Automated reporting of eGFR: a useful tool for identifying and managing kidney disease *Med J Aust* 2009; 190 (4): 200-203.
259. Cockcroft DW. Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976; 16: 31–41.
260. Cirillo M, Anastasio P, De Santo NG. Relationship of gender, age and body mass index to errors in predicted kidney function. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20:1791– 8.
261. Lewis J, Agodoa L, Cheek D, Greene T, Middleton J, O'Connor D, et al. African-American Study of Hypertension and Kidney Disease. Comparison of crosssectional renal function measurements in African Americans with hypertensive nephrosclerosis and of primary formulas to estimate glomerular filtration rate. *Am J Kidney Dis* 2001; 38: 744–53.
262. Poggio ED, Wang X, Greene T, et al. Performance of the Modification of Diet in Renal Disease and Cockcroft–Gault equations in the estimation of GFR in health and in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 459-466
263. Rigalleau V, Lasseur C, Perlemoine C, et al. Estimation of glomerular filtration rate in diabetic subjects: Cockcroft formula or Modification of Diet in Renal Disease study equation? *Diabetes Care* 2005; 28: 838-843.
264. Stevens LA, Coresh J, Feldman HI, et al. Evaluation of the modification of diet in renal disease study equation in a large diverse population. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 2749-2757
265. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al; CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009; 150: 604-612.
- 266 Levey AS, Stevens LA. Estimating GFR using the CKD Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) creatinine equation: more accurate GFR estimates, lower CKD prevalence estimates, and better risk predictions. *Am J Kidney Dis* 2010; 55: 622-627.
267. Stevens LA, Schmid CH, Greene T, et al. Comparative performance of the CKD Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) and the Modification of Diet in Renal Disease

(MDRD) study equations for estimating GFR levels above 60 mL/min/ 1.73m². *Am J Kidney Dis* 2010; 56: 486-495

268. Newman DJ, Thakkar H, Edwards RG, Wilkie M, White T, Grubb AO, et al. Serum cystatin C measured by automated immunoassay: a more sensitive marker of changes in GFR than serum creatinine for glomerular filtration rate. *Kidney Int* 1995; 47: 312–8.

269. Grubb A, Simonsen O, Sturfelt G, Truedsson L, Thysell H: Serum concentration of cystatin C, Factor D and beta2-microglobulin as a measure of glomerular filtration rate. *Acta Med Scand* 218:499–503, 1985

270. Grubb A, Nyman U, Björk J, Lindström V, Rippe B, Sterner G, et al. Simple cystatin C based prediction equations for glomerular filtration rate compared with the modification of diet in renal disease prediction equation for adults and the Schwartz and the Counahan-Barratt prediction equations for children. *Clin Chem* 2005; 51: 1420–31.

271. Pavkov Me, Bennett PH, Knowler WC, Krakoff J, Sievers ML, Nelson RG. Effect of youth-onset type 2 diabetes mellitus on incidence of end-stage renal disease and mortality in young and middle-aged Pima Indians. *JAMA* 2006;296:421-6.

272. Vora JP, Dolben J, Dean JD, Thomas D, Williams JD, Owens DR et al. Renal hemodynamics in newly presenting non-insulin dependent diabetes mellitus. *Kidney Int* 1992;41:829-35.

273. Gambara V, Mecca G, Remuzzi G, Bertani T. Heterogeneous nature of renal lesions in type II diabetes. *J Am Soc Nephrol* 1993;3:1458-66.

274. Đukanović LJ. Prevencija dijabetesne nefropatije. *Biomedicinska Istraživanja*. 2012;3(2):67-76

275. Pylypchuk G, Beaubien E. Diabetic nephropathy. Prevention and early referral. *Can Fam Physician* 2000;46:636-42.

276. Christensen PK, Hansen HP, Parving HH. Impaired autoregulation of GFR in hypertensive non-insulin dependent diabetic patients. *Kidney Int* 1997;52:1369-1374.

277. Lewko B, Stepinski J. Hyperglycemia and mechanical stress: targeting the renal podocyte. *JCell Physiol* 2009;221(2):288-295.

278. Lewko B, Bryl E, Witkowski JM, Latawiec E, Angielski S, Stepinski J. Mechanical stress and glucose concentration modulate glucose transport in cultured rat podocytes. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20(2):306-311.
279. Dronavalli S, Duka I, Bakris GL. The pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008;4(8):444-452.
280. Parving HH, Kastrup J, Smidt UM, Andersen AR, Feldt-Rasmussen B, Christiansen JS. Impaired autoregulation of glomerular filtration rate in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients with nephropathy. *Diabetologia* 1984;27:547-552.
281. Hollenberg NK, Price DA, Fisher ND, Lansang MC, Perkins B, Gordon MS, Williams GH, Laffel LM: Glomerular hemodynamics and the renin angiotensin system in patients with type 1 diabetes mellitus. *Kidney Int* 2003;63:172–178.
282. Ruggenti P, Fassi A, Ilieva AP, et al; Bergamo Nephrologic Diabetes Complications Trial (BENEDICT) Investigators. Preventing microalbuminuria in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2004;351(19):1941–1951.
283. R, Orchard T, Porta M, Parving HH. Effect of candesartan on microalbuminuria and albumin excretion rate in diabetes: three randomized trials. *Ann Intern Med.* 2009;151(1):11–20.
284. Effects of ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in people with diabetes mellitus: results of the HOPE study and MICRO- HOPE substudy. Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *Lancet* 2000;355:253–259.
285. Patel A; ADVANCE Collaborative Group. Effects of a fixed combination of perindopril and indapamide on macrovascular and microvascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus (the ADVANCE trial): a randomised
286. Ryan L, Krolewski AS. A nonlinear effect of hyperglycemia and current cigarette smoking are major determinants of the onset of microalbuminuria in type 1 diabetes. *Diabetes* 2001;50(12):2842–2849.
287. Steiner G. How can we improve the management of vascular risk in type 2 diabetes: insights from FIELD. *Cardiovasc Drugs Ther* 2009;23(5):403–408.

288. Fioretto P, Solini A. Antihypertensive treatment and multifactorial approach for renal protection in diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2005;16 Suppl 1:S18–21.
289. Gaede P, Vedel P, Parving HH, Pedersen O. Intensified multifactorial intervention in patients with type 2 diabetes mellitus and microalbuminuria: The Steno type 2 randomised study. *Lancet* 1999;353:617–622.
290. Senior PA, MacNair L, Jindal K. Delivery of multifactorial interventions by nurse and dietitian teams in a community setting to prevent diabetic complications: a quality-improvement report. *Am J Kidney Dis* 2008;51(3):425–434.
291. Furchgott RF, Zawadzki JV. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376 .
292. De Mey JG, Claeys M, Vanhoutte PM. 1982. Endothelium-dependent inhibitory effects of acetylcholine, adenosine diphosphate, thrombin and arachidonic acid in the canine femoral artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 222: 166-173 .
293. Hickey KA, Rubanyi GM, Paul RJ, Highsmith RF. 1985. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 248: 550-556 .
294. Masaki T. The discovery of endothelins. *Cardiovasc. Res.* (1998) 39: 530-533 .
295. Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol. Rev.* (1994); 46: 325-415 .
296. Yanagisawa M, Masaki T.. Molecular biology and biochemistry of the endothelins. *Trends Pharmacol. Sci.* (1989);10: 374-378 .
297. Inoue A, Yanagisawa M, Takuwa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T. The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J Biol Chem.* 1989;264(25):14954-9.
298. Harrison VJ, Barnes K, Turner AJ, Wood E, Corder R, Vane JR. Identification of Endothelin 1 and Big Endothelin 1 in Secretory Vesicles Isolated from Bovine Aortic Endothelial Cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1995;92(14):6344-8.
299. Masaki T, Vane JR, Vanhoutte PM. V. International union of pharmacology nomenclature of endothelin receptors. *Pharmacol Rev* 1994;46:137-42.

300. Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETc receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem* 1993;268:19126-33.
301. Luscher TF, Barton M. 2000. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* 102: 2434-2440 .
302. Kedzierski RM, Yanagisawa M. 2001. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41: 851-876 .
303. Kitamura K, Tanaka T, Kato J, Eto T, Tanaka K.. Regional distribution of immunoreactive endothelin in porcine tissue: abundance in inner medulla of kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161: 348-5,
304. Schildroth J, Rettig- Zimmermann J, Kalk P, Steege A, Fahling M, Sendeski M, Paliege A, Lai EY, Bachmann S, Persson PB, Hocher B, Patzak A. Endothelin type A and B receptors in the control of afferent and efferent arterioles in mice. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26:S779- 789.
305. Kohan D E et al. Endothelin in Renal Physiology and Disease. *Physiol Rev* 2011;91:1-77
306. Kohan DE: Endothelin, hypertension and chronic kidney disease: new insights. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2010;19:134- 139. 10
307. Kirchengast M, Luz M. 2005. Endothelin receptor antagonists: clinical realities and future directions. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 45: 182-191 .
308. Barton M. 2000. Endothelial dysfunction and atherosclerosis: endothelin receptor antagonists as novel therapeutics. *Curr. Hypertens. Rep.* 2: 84-91
309. M. Wendel, L. Knels, W. Kummer, T. Koch Distribution of endothelin receptor subtypes ETA and ETB in the rat kidney. *J Histochem Cytochem*, 54 (2006), pp. 1193-1203
310. R.M. Edwards, W. Trizna, E.H. Ohlstein Renal microvascular effects of endothelin. *Am J Physiol*, 1990; 259:217-221.

311. J. Schildroth, J. Rettig-Zimmermann, P. Kalk, A. Steege, M. Fahling, M. Sendeski et al. Endothelin type A and B receptors in the control of afferent and efferent arterioles in mice. *Nephrol Dial Transplant*, 26 (2011), pp. 779–789
312. J.L. Vuurmans, P. Boer, H.A. Koomans Effects of endothelin-1 and endothelin-1-receptor blockade on renal function in humans *Nephrol Dial Transplant*, 19 (2004), pp. 2742–2746
313. K.M. Denton, A. Shweta, L. Finkelstein, R.L. Flower, R.G. Evans Effect of endothelin-1 on regional kidney blood flow and renal arteriole calibre in rabbits *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 31 (2004), pp. 494–501
314. J. Goddard, N.R. Johnston, M.F. Hand, A.D. Cumming, T.J. Rabelink, A.J. Rankin et al. Endothelin-A receptor antagonism reduces blood pressure and increases renal blood flow in hypertensive patients with chronic renal failure: a comparison of selective and combined endothelin receptor blockade. *Circulation*, 109 (2004), pp. 1186–1193
315. N. Dhaun, C.J. Ferro, A.P. Davenport, W.G. Haynes, J. Goddard, D.J. Webb. Haemodynamic and renal effects of endothelin receptor antagonism in patients with chronic kidney disease *Nephrol Dial Transplant*, 2007; 22:3228–3234.
316. C. Qiu, L. Samsell, C. Baylis Actions of endogenous endothelin on glomerular hemodynamics in the rat *Am J Physiol*, 269 (1995), pp. R469–R473
317. D.E. Kohan, E. Padilla, A.K. Hughes Endothelin B receptor mediates ET-1 effects on cAMP and PGE₂ accumulation in rat IMCD *Am J Physiol*, 265 (1993),:670–676.
318. Vignon-Zellweger N1, Heiden S, Miyauchi T, Emoto N. Endothelin and endothelin receptors in the renal and cardiovascular systems. *Life Sci*. 2012 15;91:490-500.
319. Y. Liu, J. Yang, H. Ren, D. He, A. Pascua, M.I. Armando et al. Inhibitory effect of ETB receptor on Na(+)-K(+) ATPase activity by extracellular Ca(2+) entry and Ca(2+) release from the endoplasmic reticulum in renal proximal tubule cells. *Hypertens Res*, 32 (2009), 846–852.
320. L. Liu, M. Zacchia, X. Tian, L. Wan, A. Sakamoto, M. anagisawa et al. Acid regulation of NaDC-1 requires a functional endothelin B receptor *Kidney Int*, 78 (2010), pp. 895–904.

321. M.P. Schneider, Y. Ge, D.M. Pollock, J.S. Pollock, D.E. Kohan Collecting duct-derived endothelin regulates arterial pressure and Na excretion via nitric oxide. *Hypertension*, 51 (2008), pp. 1605–1610
322. T.S. Pavlov, A. Chahdi, D.V. Ilatovskaya, V. Levchenko, A. Vandewalle, O. Pochynyuk et al. Endothelin-1 inhibits the epithelial Na⁺ channel through betaPix/14-3-3/Nedd4-2. *J Am Soc Nephrol*, 21 (2010): 833–843.
323. P.K. Stricklett, A.K. Hughes, D.E. Kohan Endothelin-1 stimulates NO production and inhibits cAMP accumulation in rat inner medullary collecting duct through independent pathways *Am J Physiol Renal Physiol*, 290 (2006): 1315–1319.
324. Kohan DE. Endothelins in the normal and diseased kidney. *Am J Kid Dis*. 1997;29:2–26.
325. Iwasaki S, Homma T, Matsuda Y, Kon V. Endothelin receptor subtype B mediates autoinduction of endothelin-1 in rat mesangial cells. *J Biol Chem*. 1995;270:6997–7003.
326. Jaffer FE, Knauss TC, Poptic E, Abboud HE. Endothelin stimulates PDGF secretion in cultured human mesangial cells. *Kidney Int*. 1990;38:1193–1198.
327. Collino F, Bussolati B, Gerbaudo E, Marozio L, Pelissetto S, Benedetto C, et al. Preeclamptic sera induce nephrin shedding from podocytes through endothelin-1 release by endothelial glomerular cells. *Am J Physiol*. 2008;294:1185–1194.
328. Orth SR, Amann K, Gehlen F, Unger L, Wagner J, Raschack M, et al. Adult human mesangial cells (HMCs) express endothelin-B-receptors which mediate endothelin-1-induced cell growth. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000;36:232–237.
329. Benigni A, Perico N, Gaspari F, Zoja C, Bellizzi M, Gabanelli M, et al. Increased renal endothelin production in rats with reduced renal mass. *Am J Physiol*. 1991;260:331–339.
330. Hocher B, Schwarz A, Reinbacher D, Jacobi J, Lun A, Priem F, et al. Effects of endothelin receptor antagonists on the progression of diabetic nephropathy. *Nephron*. 2001;87:161–169.
331. Takahashi K, Ghatei MA, Lam HC, et al. Elevated plasma endothelin in patients with diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1990;33:306–10

332. Hargrove GM, Dufresne J, Whiteside C, Muruve DA, Wong NC. Diabetes mellitus increases endothelin-1 gene transcription in rat kidney. *Kidney Int.* 2000;58(4):1534-1545.
333. Jauregui A, Mintz DH, Mundel P, Fornoni A: Role of altered insulin signaling pathways in the pathogenesis of podocyte malfunction and microalbuminuria. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2009;18:539– 545.
334. Khan MA, Dashwood MR, Mumtaz FH, Thompson CS, Mikhailidis DP, Morgan RJ: Upregulation of endothelin A receptor sites in the rabbit diabetic kidney: potential relevance to the early pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nephron* 1999;83:261– 267.
335. Gross ML, El- Shakmak A, Szabo A, Koch A, Kuhlmann A, Munter K, Ritz E, Amann K: ACE- inhibitors but not endothelin receptor blockers prevent podocyte loss in early diabetic nephropathy. *Diabetologia* 2003;46:856– 68
336. Rebibou JM, He CJ, Delarue F, Peraldi MN, Adida C, Rondeau E, Sraer JD: Functional endothelin 1 receptors on human glomerular podocytes and mesangial cells. *Nephrol Dial Transplant* 1992;7:288– 292.
337. Saleh MA, Boesen EI, Pollock JS, Savin VJ, Pollock DM: Endothelin- 1 increases glomerular permeability and inflammation independent of blood pressure in the rat. *Hypertension* 2010;56:942– 949
338. Bruzzi I, Remuzzi G, Benigni A: Endothelin: a mediator of renal disease progression. *J Nephrol* 1997;10:179– 183.
339. N. Dhaun, David J Webb, David C Kluth. Endothelin-1 and the kidney – beyond BP. *BJP* (2012) 167 720–731.
340. DuBois D, DuBois DF. A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. *Arch Int Med* 1916;17:863-71.
341. M. Donald Blaufox, E. James Potchen and John P. Merrill. Measurement of Effective Renal Plasma Flow in Man by External Counting Methods. *J Nucl Med.* 1967;8:77-85.
342. Guarnieri, G.; Zanetti, M.; Vinci, P.; Cattin, M.R.; Pirulli, A. & Barazzoni, R. Metabolic syndrome and chronic kidney disease. *Journal of Renal Nutritio* 2010; 20:S19-23.

343. Hu F.B. (2011). Globalization of diabetes: the role of diet, lifestyle, and genes. *Diabetes Care* 2011;34:1249-57.
344. Deepak Parchwani et al. Diabetic Nephropathy: Progression and Pathophysiology. *International Journal of Medical Science and Public Health* 2012; 1:59-75.
345. Verges B. New insight into the pathophysiology of lipid abnormalities in type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 2005;31:429-39
346. Verges B. Dyslipidemia in diabetes mellitus. Review of the main lipoprotein abnormalities and their consequences on the development of atherogenesis. *Diabetes Metab* 1999;25(suppl 3):32-40
347. W. M. Michels, D. C. Grootendorst, M. Verduijn, E G Elliott, F Wilhelm Dekker, R. T. Krediet. Performance of the Cockcroft-Gault, MDRD, and New CKD-EPI Formulas in Relation to GFR, Age, and Body Size. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010; 5(6):1003–1009.
348. Richard J MacIsaac, Erosha Premaratne, George Jerums. Estimating Glomerular Filtration Rate in Diabetes Using Serum Cystatin C; *Clin Biochem Rev.* 2011; 32(2): 61–67.
349. Benítez Segura A, Martín-Comín J, Ricart Y, González MT, Cortés M, Roca M, Díaz MC, Ramos M. Isotopic renal study in diabetic nephropathy. *Rev Esp Med Nucl.* 2002;21(1):12-6.
350. Jiten P Vora¹, John Dolben¹, John D Dean¹, David Thomas¹, John D Williams¹, David R Owens¹ and John R Peters¹. Renal hemodynamics in newly presenting non-insulin dependent diabetes mellitus. *Kidney International* 1992;41:829–835.
351. Veldman BA, Vervoort G, Blom H, Smits P. Reduced plasma total homocysteine concentrations in Type 1 diabetes mellitus is determined by increased renal clearance. *Diabet Med.* 2005; 22(3):301-5.
352. Berrut G, Bouhanick B, Fabbri P, Guilloteau G, Bled F, Le Jeune JJ, Fressinaud P, Marre M: Microalbuminuria as a predictor of a drop in glomerular filtration rate in subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus and hypertension. *Clin Nephrol* 48:92–97, 1997
353. Abbott K, Basta E, Bakris GL. Blood pressure control and nephroprotection in diabetes. *J Clin Pharmacol* 2004;44:431-8

354. Frank A, Holtkamp, Dick de Zeeuw, Pieter A. de Graeff, et al., Albuminuria and blood pressure, independent targets for cardioprotective therapy in patients with diabetes and nephropathy: a post hoc analysis of the combined RENAAL and IDNT trials. *European Heart Journal* 2011; 32:1493–1499
355. Kaene W, Brenner B, Zeeuw D, Grunfeld J-P, McGill J, Mitch W, et al. The risk of developing end-stage renal disease in patients with type 2 diabetes and nephropathy: The RENAAL Study. *Kidney Int* 2003;63:1499-1507
356. Bruno G, Biggeri A, Merleti F, Bargero G, Ferrero S, Pagano G. Low incidence of end-stage renal disease and chronic renal failure in type 2 diabetes. A 10-year prospective study. *Diabetes Care* 2003; 26:2353-8
357. Murussi M, Gross JL, Silveiro SP. Glomerular filtration rate changes in normoalbuminuric and microalbuminuric type 2 diabetic patients and normal individuals. A 10-year follow-up. *J Diabetes Its Compl* 2006;20:210-5
358. Hoefield R, Kalra P, Baker P, Sousa I, Diggle P, Gibson M, et al. The use of eGFR and ACR to predict decline in renal function in people with diabetes. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:887-92
359. Tomas Berl, MD; Lawrence G. Hunsicker, MD; Julia B. Lewis, et al, Collaborative Study Group. Cardiovascular Outcomes in the Irbesartan Diabetic Nephropathy Trial of Patients with Type 2 Diabetes and Overt Nephropathy. *Ann Intern Med.* 2003;138(7):542-549.
360. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D et al., RENAAL Study Investigators. The losartan renal protection study—rationale, study design and baseline characteristics of RENAAL (Reduction of Endpoints in NIDDM with the Angiotensin II Antagonist Losartan). *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2000;1:328–335
361. Herman WH, Emancipator SN, Rhoten RL, Simonson MS. Vascular and glomerular expression of endothelin-1 in normal human kidney. *Am J Physiol* 1998; 275: 8–17.
362. Morita S, Kitamura K, Yamamoto Y, Eto T, Osada Y, Sumiyoshi A, et al. Immunoreactive endothelin in human kidney. *Ann Clin Biochem.* 1991;28:267–271.

363. Zager RA, Johnson ACM, Andress D et al. Progressive endothelin-1 gene activation initiates chronic/end-stage renal disease following experimental ischemic/reperfusion injury. *Kidney Int* 2013; 84: 703–712.
364. Peppas-Patrikiou M, Dracopoulou M, Dacou-Voutetakis C. Urinary endothelin in adolescents and young adults with insulin-dependent diabetes mellitus: relation to urinary albumin, blood pressure, and other factors. *Metabolism*. 1998;47(11):1408-1412.
365. Lee YJ, Shin SJ, Tsai JH. Increased urinary endothelin-1-like immunoreactivity excretion in NIDDM patients with albuminuria. *Diabetes Care*. 1994;17(4):263-266.
366. Wenzel RR, Littke T, Kuranoff S, et al; SPP301 (Avosentan) Endothelin Antagonist Evaluation in Diabetic Nephropathy Study Investigators. Avosentan reduces albumin excretion in diabetics with macroalbuminuria. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(3):655-664.
367. Caballero AE, Arora S, Saouaf R, et al. Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes. *Diabetes*. 1999;48:1856–62.
368. Ak G, Buyukberber S, Sevinc A, Turk HM, Ates M, Sari R, Savli H, Cigli A. The relation between plasma endothelin-1 levels and metabolic control, risk factors, treatment modalities, and diabetic microangiopathy in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Its Complications* 2001;15(3):150-7.
369. Perfetto F, Tarquini R, de Leonardis V, Piluso A, Lombardi V, Tarquini B. Angiopathy affects circulating endothelin-1 levels in type 2 diabetic patients. *Acta Diabetol*. 1995;32(4):263-7.
370. Maria Assunta Potenza, Francesco Addabbo, and Monica Montagnani. Vascular actions of insulin with implications for endothelial dysfunction. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*.
371. Kerstin Benz Kerstin Amann. Endothelin in Diabetic Renal Disease. *J Cardiometab Syndr*. 2008;3(3):183-7.
372. Sarafidis PA1, Lasaridis AN. Insulin resistance and endothelin: another pathway for renal injury in patients with the cardiometabolic syndrome? *J Cardiometab Syndr*. 2008 Summer;3(3):183-7.

373. Sarafidis PA. Obesity, insulin resistance and kidney disease risk: insights into the relationship. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2008;17(5):450-6
374. Ferri C, Pittoni V, Piccoli A, et al. Insulin stimulates endothelin-1 secretion from human endothelial cells and modulates its circulating levels in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80:829–35.
375. Anfossi G, Cavelot F, Massucco P, et al. Insulin influences immunoreactive endothelin release by human vascular smooth muscle cells. *Metabolism*. 1993;42:1081–83.
376. Piatti PM, Monti LD, Conti M, et al. Hypertriglyceridemia and hyperinsulinemia are potent inducers of endothelin-1 release in humans. *Diabetes*. 1996;45(3):316-21.
377. Hocher B et al. (1997) Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension. *J Clin Invest* 99: 1380–1389
378. Opocensky M et al. (2006) Late-onset endothelin-A receptor blockade reduces podocyte injury in homozygous Ren-2 rats despite severe hypertension. *Hypertension* 48: 965–971
379. Barton M et al. (2000) Dysfunctional renal nitric oxide synthase as a determinant of salt-sensitive hypertension: mechanisms of renal artery endothelial dysfunction and role of endothelin for vascular hypertrophy and glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 11: 835–845
380. Vernerová Z et al. (2008) Late-onset endothelin receptor blockade in hypertensive heterozygous REN-2 transgenic rats. *Vascul Pharmacol* 48: 165–173.
381. Boffa JJ et al. (2001) Regression of renal vascular fibrosis by endothelin receptor antagonism. *Hypertension* 37: 490–496 .
382. Gross ML et al. (2003) ACE-inhibitors but not endothelin receptor blockers prevent podocyte loss in early diabetic nephropathy. *Diabetologia* 46: 856–868
383. Luscher TF and Barton M (2000) Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* 102: 2434–2440
384. De Mattia G1, Cassone-Faldetta M, Bellini C, Bravi MC, Laurenti O, Baldoncini R, Santucci A, Ferri C. Role of plasma and urinary endothelin-1 in early diabetic and hypertensive nephropathy. *Am J Hypertens*. 1998 Aug;11(8 Pt 1):983-8.

385. Barton M. Reversal of proteinuric renal disease and the emerging role of endothelin. *Nat Clin Pract Nephrol*.2008;
386. Gagliardini E et al. Effect of a selective ETA receptor antagonist on podocyte function and permselective properties of the glomerular barrier in experimental diabetes. Presented at the 10th International Conference on Endothelin: 2007 Bergamo, September 16–19, Bergamo, Italy.
387. Smoyer WE et al. Podocyte alpha-actinin induction precedes foot process effacement in experimental nephrotic syndrome. *Am J Physiol* (1997);273: F150–F157
388. Shankland SJ et al. Podocytes in culture: past, present, and future. *Kidney Int* (2007); 72: 26–36.
389. Yuan H et al. Podocyte slit-diaphragm protein nephrin is linked to the actin cytoskeleton. *Am J Physiology Renal Physiol* (2002); 282: 585–591.
390. Morigi M, Buelli S, Angioletti S, Zanchi C, Longaretti L, Zoja C, Galbusera M, Gastoldi S, Mundel P, Remuzzi G, Benigni A: In response to protein load podocytes reorganize cytoskeleton and modulate endothelin-1 gene: Implication for permselective dysfunction of chronic nephropathies. *Am J Pathol* 2005; 166: 1309 –20,
391. Benigni A: Defining the role of endothelins in renal pathophysiology on the basis of selective and unselective endothelin receptor antagonist studies. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 4 : 349 –353, 1995
392. Goddard J, Johnston NR, Hand MF, Cumming AD, Rabelink TJ, Rankin AJ, Webb DJ: Endothelin-A receptor antagonism reduces blood pressure and increases renal blood flow in hypertensive patients with chronic renal failure: A comparison of selective and combined endothelin receptor blockade. *Circulation* 109 : 1186 –1193, 2004).
393. Bruno CM, Meli S, Marcinno M, Ierna D, Sciacca C, Neri S Plasma endothelin-1 levels and albumin excretion rate in normotensive, microalbuminuric type 2 diabetic patients. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2002;16(2):114-7.
394. Candido R, Allen TJ. Haemodynamics in microvascular complications in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2002;18:286–304.

395. Zanatta CM, Gerchman F, Burtet L, et al. Endothelin-1 levels and albuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diab Res Clin Pract.* 2008;80:299–304.
396. Koyama H, Tabata T, Nishzawa Y, Inoue T, Morii H, Yamaji T. Plasma endothelin levels in patients with uraemia. *Lancet.* 1989 May 6;1(8645):991–992.
397. Dhaun N, Goddard J, Webb DJ. The endothelin system and its antagonism in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:943-955.
398. Orisio S, Benigni A, Bruzzi I, Corna D, Perico N, Zoja C, Benatti L, Remuzzi G: Renal endothelin gene expression is increased in remnant kidney and correlates with disease progression. *Kidney Int* 43 : 354 –358, 1993
399. Kassab S, Miller MT, Novak J, et al. Endothelin-A receptor antagonism attenuates the hypertension and renal injury in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* 1998;31:397-402.
400. N. Dhaun, Charles J. Ferro, Anthony P. Davenport, William G. Haynes1, Jane Goddard and David J. Haemodynamic and renal effects of endothelin receptor antagonism in patients with chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* (2007) 22 (11): 3228-3234.
401. Spratt JCS, Goddard J, Patel N, et al. Systemic ETA receptor antagonism with BQ-123 blocks ET-1 induced forearm vasoconstriction and decreases peripheral vascular resistance in healthy men. *Br J Pharmacol* 2001;134:648-654.
402. Haynes WG, Ferro CJ, O’Kane KP, et al. Systemic endothelin receptor blockade decreases peripheral vascular resistance and blood pressure in man. *Circulation* 1996;93:1860-1870.
403. Freed MI, Wilson DE, Thompson KA, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of SB 209670, an endothelin receptor antagonist: effects on the regulation of renal vascular tone. *Clin Pharmacol Therapeut* 1999;65:473-482.).
404. N. Dhaun and David J. Webb. The road from AKI to CKD: the role of endothelin. *Kidney International* (2013) 84, 637–638.
405. Saeed A, Dibona GF, Guron G. Effects of endothelin receptor antagonists on renal hemodynamics in angiotensin II-infused rats on high NaCl intake. *Kidney Blood Press Res.* 2012;36(1):258-67.

406. Brochu E, Lacasse S, Moreau C, Lebel M, Kingma I, Grose JH, Larivière R. Endothelin ET(A) receptor blockade prevents the progression of renal failure and hypertension in uraemic rats. *Nephrol Dial Transplant*. 1999 Aug;14(8):1881-8.
407. Wang L, Yu Z, Mao T. Relationship between elevated plasma endothelin-1 level and renal function in patients with diabetic nephropathy. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 1995;34(5):318-21.
408. Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO 3rd, Panza JA. Interactions between nitric oxide and endothelin in the regulation of vascular tone of human resistance vessels in vivo. *Hypertension*. 2000;35(6):1237-41.
409. Félétou M, Huang Y, Vanhoutte PM. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol*. 2011;164(3):894-912.
410. Chou SY, Porush JG (1995). Renal actions of endothelin-1 and endothelin-3: interactions with the prostaglandin system and nitric oxide. *Am J Kidney Dis* 26: 116–123.
411. Evans RG, Madden AC, Oliver JJ, Lewis TV (2001). Effects of ET(A)- and ET(B)-receptor antagonists on regional kidney blood flow, and responses to intravenous endothelin-1, in anaesthetized rabbits. *J Hypertens* 19: 1789–1799.
412. Abassi Z, Francis B, Wessale J, Ovcharenko E, Winaver J, Hoffman A (2002). Effects of endothelin receptors ET(A) and ET(B) blockade on renal haemodynamics in normal rats and in rats with experimental congestive heart failure. *Clin Sci* 103: 245–248.
413. Boesen EI, Krishnan KR, Pollock JS, Pollock DM (2011). ETA activation mediates angiotensin II-induced infiltration of renal cortical T cells. *J Am Soc Nephrol* 22: 2187–2192.
414. Jennifer R. Ballew, Stephane W Watis, Gregory D. FinkK. Effects of Salt Intake and Angiotensin II on Vascular Reactivity to Endothelin-1. 296:345–350, 2001
415. Lin H, Smith MJ Jr, Young DB. Roles of prostaglandins and nitric oxide in the effect of endothelin-1 on renal hemodynamics. *Hypertension*. 1996 Sep;28(3):372-8.
416. Erdely A, Freshour G, Maddox DA, Olson JL, Samsell L, Baylis C. Renal disease in rats with type 2 diabetes is associated with decreased renal nitric oxide production. *Diabetologia*. 2004.

417. Rubinstein I, Gurbanov K, Hoffman A, Better OS, Winaver J. Differential effect of endothelin-1 on renal regional blood flow: role of nitric oxide. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995. 26: S208–S210.
418. H. J. Kramer, A. Backer, D. Bokemeyer, H. Meyer-Lehnert. Atrial natriuretic peptide and endothelin: modulators of renal function. *Clin Investig* 1994;72:703-705.
419. Rajagopalan S, Laursen JB, Borthayre A, Kurz S, Keiser J, Haleen S, Giaid A, Harrison DG. Role for endothelin-1 in angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension* 1997; 30:29–34.
420. Shreenivas S, Suzanne O. The role of endothelin 1 in human hypertension. *Clin.Hemorheol. Microcircul.* 2007;37: 1-2.