



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

**Бранкица Терзић**

**ЗНАЧАЈ КОНЦЕНТРАЦИЈА КОЛАГЕНА ТИП IV, ТРАНСФЕРИНА И  
ВЕЗУЈУЋЕГ ПРОТЕИНА МАСНИХ КИСЕЛИНА ЈЕТРЕ У УРИНУ ЗА РАНО  
ОТКРИВАЊЕ ДИЈАБЕТЕСНЕ НЕФРОПАТИЈЕ**

**ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА**

**Ментор: др сци. мед. Мирјана Мијушковић, доцент**

**Крагујевац, 2018.**

## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>
Име и презиме: Бранкица Терзић
Датум и место рођења: 13.03.1970. Лозница, Република Србија
Садашње запослење: лекар субспецијалиста у Клиници за нефрологију Војномедицинске академије у Београду
<i>II Докторска дисертација</i>
Наслов: Значај концентрација колагена тип IV, трансферина и везујућег протеина масних киселина јетре у урину за рано откривање дијабетесне нефропатије
Број страница: 116
Број слика: 5
Број библиографских података: 199
Установа и место где је рад израђен: Војномедицинска академија, Београд, Србија (Клиника за нефрологију, Одељење за клиничку и експерименталну имунологију Института за медицинска истраживања и Клиника за ендокринологију)
Научна област (УДК): Медицина ( Клиничка и експериментална медицина)
Ментор: др сци.мед Мирјана Мијушковић доцент
<i>III Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 15.12.2016.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-584/25 од 07.06.2017.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: 1. Проф. др Дејан Петровић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, председник; 2. Проф. др Александар Ђукић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан; 3. Доц. др Тамара Драговић, доцент Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан.
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: 1. Проф. др Дејан Петровић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, председник; 2. Проф. др Снежана Живанчевић Симоновић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан; 3. Проф. др Александар Ђукић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан; 4. Проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан 5. Проф. др Тамара Драговић, ванредни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан
Датум одбране дисертације:

## Апстракт

Увод: Дијабетесна нефропатија је један од водећих узрока терминалне бубрежне инсуфицијенције. Заступљена је код 20-40% пацијената са дијабетес мелитусом, а као први знак дијабетесне нефропатије још увек се сматра микроалбуминурија . Мала сензитивност и специфичност микроалбуминурије су довели до испитивања нових биомаркера који би могли бити рани показатељи постојања дијабетесне нефропатије.

Пацијенти и методе: У студију је било укључено 80 пацијената оболелих од дијабетес мелитуса, подељених у две групе: група 1 - нормоалбуминурични пацијенти (екскреција албумина до 30mg/dan), група 2 - микроалбуминурични (екскреција албумина од 30-300mg/dan) и 10 здравих контрола. Концентрације колагена тип IV, трансферина и L-FABP је анализирана у 24 часовном узорку урина и у првом јутарњем урину. Биомаркери су одређивани применом високо сензитивног ELISA кита. Статистичка обрада података је вршена применом пакета SPSS 24.0, и за опис параметара од значаја коришћене су методе дескриптивне статистике. Хипотезе су тестиране на нивоу статистичке значајности од 0,05, а вероватноћа мања од 0,05 је сматрана статистички значајном.

Резултати: Од 80 пацијента, 44 (55%) су били мушког, а 36 (45%) женског пола; њих 47 (58.75%) није имало микроалбуминурију, док је 33 (41,25%) имало повећано излучивање албумина. Просечна старост испитаника је била  $59,85 \pm 8.87$  година. Током испитивања нађено је да су концентрације уринарних биомаркера значајно веће код пацијената са микроалбуминуријом у поређењу са пацијентима који су нормоалбуминурични и са здравом контролом. Није било статистички значајне разлике у нивоу уринарних биомаркера у поређењу са гликорегулацијом, индексом телесне масе и дужином трајања дијабетеса, мада је нађена повезаност између концентрације трансферина и дијабетесне ретинопатије.

Закључак: Резултати ове студије су показали да би се уринарни колаген тип IV, трансферин и L-FABP могли користити као рани маркери дијабетесне нефропатије.

Кључне речи: Дијабетес мелитус, микроалбуминурија, биомаркер, колаген тип IV, трансферин, L-FABP

## **Abstract**

**Introduction:** Diabetic nephropathy is one of the leading cause of chronic kidney disease and end-stage renal disease. It occurs in 20-40% patients with diabetes mellitus, and microalbuminuria is still considered as the first sign of diabetic nephropathy. Low sensitivity and specificity of microalbuminuria leads to more sensitive biomarkers that may be used to detect diabetic nephropathy at an earlier stage with higher accuracy. This study was carried out to determine whether urinary biomarkers like collagen type IV, transferrin and L-FABP can serve as an indicator of diabetic nephropathy.

**Patients and methods:** Our study included 80 diabetic adult patients who were classified into two groups: group 1 - normoalbuminuric patients (albumin excretion up to 30 mg/d), group 2 - microalbuminuric patients (albumin excretion from 30 – 300 mg/d), and 10 healthy controls. Concentration of collagen type IV, transferrin and L-FABP in the 24h urine samples as well as in spot urine were measured. The urinary concentrations of biomarkers were measured using a highly sensitive one-step sandwich enzyme immunoassay kit. Statistical analyses were performed using Statistical Package for the Social Science (SPSS) version 24.0. Basic descriptive statistical parameters were presented by measures of central tendency (mean and median), a measure of variability (standard deviation and variation interval) and were expressed in percentages. Statistical hypothesis was tested at 0.05 level of significance, and probability (p) value less than 0.05 was regarded as statistically significant.

**Results:** 80 patients were included in this study, 44 (55%) males and 36 (45%) females, mean age  $59.85 \pm 8.87$  years. Prevalence of microalbuminuria was 41.25% (33 patients) and 58.75% (47 patients) were normoalbuminuric. Concentration of urinary biomarkers were significantly higher in microalbuminuric patients than in the normoalbuminuric and healthy control. There were no correlation between level of urinary biomarkers and glycoregulation, body mass index and duration of diabetes mellitus. We found correlation between concentration of urinary transferrin and diabetic retinopathy.

**Conclusions:** The results from this study provide the evidence that urinary collagen type IV, transferrin and L-FABP could be used as an early marker of diabetic nephropathy

**Key words:** Diabetes mellitus, microalbuminuria, biomarker, collagen type IV, transferrin, L-FABP

## Захвалница

Ова докторска дисертација је резултат вишегодишњег истраживања а у њеној изради су ми помогли породица, пријатељи и колеге.

Највећу захвалност дугујем мом бившем директору и пријатељу, г-дину Петру Белокапићу без чије подршке и помоћи не би било резултата овог рада.

Неизмерну захвалност дугујем проф. др Данилу Војводићу који ми је својим стручним и пријатељским саветима био велика подршка у раду.

Искрену захвалност дугујем др сц. мед Ивану Станојевићу и особљу Лабораторије за клиничку и експерименталну имунологију ВМА, Зорану Радуловићу, Верници Смиљанић и Ирени Мартиновић без чије помоћи овај рад не би био могућ.

Неизмерно хвала проф. др Дејану Петровићу на стручној и пријатељској помоћи.

Искрену захвалност дугујем проф. др Александру Ђукићу и проф. др Снежани Живанчевић Симоновић на стручној и колегијалној помоћи.

Велику захвалност дугујем проф. др Тамари Драговић на стручним и пријатељским сугестијама током израде дисертације.

Неизмерно хвала проф. др Зорану Радојичићу и доц. др Мирку Ресану на несебичној помоћи током израде рада.

Хвала сестрама Одељења за Функцијску дијагностику Клинике за нефрологију, Мирјани Радивојевић, Антици Ранђеловић, Гордани Корлат и особљу Клинике за ендокринологију ВМА.

Неизмерно хвала мојој дугогодишњој пријатељици и мојој менторки доц. др Мирјани Мијушковић која је била уз мене у сваком тренутку и пружила ми неизмерну стручну и пријатељску помоћ.

Неизмерно хвала мојим родитељима који су увек подржавали моје одлуке.

Хвала мојим рођацима и пријатељима који су веровали у мене и мој рад.

Неизмерно хвала мојој породици, супругу Слободану и нашој деци Мили и Борису који су ми били велика подршка у току израде докторске дисертације.

## САДРЖАЈ:

1.	УВОД.....	1
1.1	Историјат.....	1
1.2	Епидемиологија.....	2
1.3	Етиологија, класификација и патогенеза.....	4
1.3.1	Дијабетес мелитус тип 1.....	6
1.3.2	Дијабетес мелитус тип 2.....	8
1.3.3	Други специфични типови дијабетеса.....	11
1.3.4	Гестацијски дијабетес мелитус.....	12
1.4	Клиничка слика и дијагноза дијабетес мелитуса.....	12
1.5	Компликације дијабетес мелитуса.....	14
1.5.1	Акутне компликације.....	14
1.5.1.1	Дијабетесна кетоацидоза.....	15
1.5.1.2	Хиперосмоларно хипергликемично стање.....	15
1.5.1.3	Хипогликемија.....	15
1.5.2	Хроничне компликације.....	16
1.5.2.1	Неваскуларне компликације.....	17
1.5.2.2	Васкуларне компликације.....	17
1.5.2.2.1	Макроваскуларне компликације.....	17
1.5.2.2.2	Микроваскуларне компликације.....	18
1.6	Дијагноза дијабетесне нефропатије.....	22
1.6.1	Уринарни колаген тип IV у дијагнози дијабетесне нефропатије.....	23
1.6.2	Уринарни трансферин у дијагнози дијабетесне нефропатије.....	24
1.6.3	Везујући протеин масних киселина јетре L-FABP у дијагнози дијабетесне нефропатије.....	26
1.7	Лечење.....	27
1.7.1	Терапијски приступи у лечењу дијабетес мелитуса тип 1.....	28
1.7.2	Терапијски приступи у лечењу дијабетес мелитуса тип 2.....	28
1.7.3	Терапија компликација.....	29
2.	ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	33
3.	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	34
3.1	Подаци о испитаницима и анализираним узорцима.....	34
3.1.1	Клиничке карактеристике групе оболелих.....	34

3.1.2	Клиничке карактеристике контролне групе.....	36
3.2	Одређивање концентрације колагена тип IV у урину.....	36
3.3	Одређивање концентрације трансферина у урину .....	37
3.4	Одређивање концентрације L-FABP у урину .....	38
3.5	Одређивање крвне слике и биохемијских параметара крви.....	39
3.6	Статистичка обрада података .....	42
4.	РЕЗУЛТАТИ .....	44
4.1	Опште карактеристике испитаника .....	44
4.1.1	Биохемијски параметри крви .....	48
4.2	Уринарна концентрација колагена тип IV .....	48
4.3	Уринарна концентрација трансферина.....	56
4.4	Уринарна концентрација L-FABP .....	67
4.5	Дијагностички потенцијал колагена тип IV, трансферина и L-FABP за дијагозу дијабетесне нефропатије.....	74
4.5.1	Дијагностички потенцијал колагена тип IV .....	74
4.5.2	Дијагностички потенцијал уринарног трансферина .....	76
4.5.3	Дијагностички потенцијал уринарног L-FABP .....	78
5.	ДИСКУСИЈА .....	83
5.1	Клиничке карактеристике оболелих од дијабетес мелитуса тип 2 .....	84
5.2	Уринарне концентрације колагена тип IV код оболелих од дијабетеса тип 2 и повезаност са дијабетсном нефропатијом.....	89
5.3	Уринарне концентрације трансферина код оболелих од дијабетеса тип 2 и повезаност са дијабетсном нефропатијом.....	93
5.4	Уринарне концентрације везујућег протеина масних киселина јетре (L-FABP) код оболелих од дијабетеса тип 2 .....	96
5.5	Дијагностички потенцијал уринарних концентрација колагена тип IV, трансферина и L-FABP за дијабетесну нефропатију .....	99
6.	ЗАКЉУЧЦИ.....	102
7.	ЛИТЕРАТУРА .....	103

## 1. УВОД

### 1.1 Историјат

Дијабетес мелитус (ДМ) је болест модерног доба, такође и једна од најстаријих болести описаних у историји човека. Први пут се помиње у Египатским рукописима још 1500. године пре нове ере као „превише пражњење урина“. (1) Индијски лекари су га назвали „*madhumeha*“ (медени урин), јер је привлачио мраве, а још 400.-500. године нове ере, Индијци *Sushruta* и *Charaka* су идентификовали два типа дијабетеса, који су касније названи дијабетес тип 1 и тип 2. (2) Пре више од две хиљаде година, дијабетес је препознат као разорна и смртоносна болест.

У првом веку нове ере грчки научник *Aretaeus* (30.-90. године н.е.) описао је хроничну и деструктивну природу болести коју је назвао "дијабетес". Он је описивао да оболели прекомерно узимају течност и прекомерно је избацују мокраћом (течности не остају у организму, већ организам користи само као канал кроз који могу да прођу), а оболели су имали кратак животни век. (1,3) Нешто касније, *Galen* (131.-201. године н.е.) је ово стање описао као нешто ређе оболење и навео да је то бол у бубрезима. Након овог периода, дијабетес се ретко помиње и нема много писаних доказа о овој болести. Прву референцу о дијабетесу, много касније објавио је *Avicenna* (980.–1037. године н.е.), велики Персијски лекар у часопосу „*Canon of Medicine*“ где наводи абнормални апетит код оболелих али детаљно описује и дијабетичну гангрену.

Савремена историја дијабетеса почиње са радовима енглеског лекара *Thomas Willis-a* (1621.-1675. године), који је поново закључио да је урин пацијената који су оболели од ове болести слadak, и потврдио истраживања индијских лекара од преко 1000 година раније. (4) Век касније, 1798. године британски хирург *John Rollo* је увео термин “*mellitus*” (латински: „сладак као мед“) да би се дијабетес мелитус разликовао од инсипидног дијабетеса, код ког је урин био нормално кисео. (3,5) У даљем истраживању на пољу дијабетеса значајну улогу има рад Немачког студента *Paul Langerhans-a*, који је 1869. године у свом докторату идентификовао две врсте ћелија у панкреасу од којих су ћелије које луче инсулин по њему назване „*Langerhans ostrva*“. (6)



Већи број истраживања панкреаса и лучења инсулина је обављен крајем деветнаестог и почетком двадесетог века, а тек 1921. године *Frederick Banting*, *Charles Best* и *James Collip*, су лигирали панкреасни канал код пса и својим експериментима, коначно доказали да је узрок дијабетеса недостатак инсулина. За овај научни допринос су добили Нобелову награду за физиологију и медицину 1923. године. (7)

Након открића инсулина био је олакшан живот оболелих од дијабетеса, али су виђене разлике у одговору на лечење па је 1935. године *Roger Hinsworth* потврдио да постоје две врсте дијабетеса: "инсулин-зависан" (тип 1) и "инсулин-независан" (тип 2). Постављањем разлике између ова два типа дијабетеса *Hinsworth* је утицао на нове терапијске правце тако да су почетком педесетих година прошлог века за лечење дијабетеса произведени први перорални хипогликемици – препарати сулфониурее, а друге врсте ових лекова су се развијале наредних деценија. (4) Осамдесетих година прошлог века *Graham Bell* је произвео први хумани инсулин, а 1982. године је синтетисан и први биосинтетички инсулин (humulin), па је уз велики број пероралних хипогликемика унапређено и олакшано лечење ДМ. (8) Један од савремених начина лечења дијабетеса тип 1 је и трансплантација панкреаса која се у свету ради од 1966. године, а на нивоу спорадичних случајева у лечењу дијабетеса се примењује генска терапија лептином и инсулином.(9)

### 1.2 Епидемиологија

Дијабетес мелитус је хронично оболење које представља глобални здравствени проблем како због своје све веће распрострањености, тако и због свог хроничног и прогресивног тока. Преваленца дијабетеса код одраслих се рапидно повећава током последњих деценија. Процењено је да је 1964. године око 30 милиона људи имало дијабетес (10), да би за нешто мање од 40 година, по процени Светске здравствене организације (СЗО), тај број достигао 171 милион људи који живе са дијабетесом. (11) Драматичан пораст броја оболелих је забележен како у урбаним, тако и у руралним

областима, мада три четвртине (75%) људи који болују од дијабетеса живи у земљама са ниским и средњим приходима, укључујући Азију и Африку, где ће се налазити већина пацијената оболелих од дијабетеса до 2030. године. (11,12) Повећање инциденце у земљама у развоју прати тренд урбанизације и промене у животном стилу, укључујући све мање физичке активности и нездраве навике у исхрани које подразумевају повећан унос високоенергетске хране. Ризик од добијања дијабетеса типа 2 најчешће је повезан са нижим друштвено-економским положајем земаља.(13) До недавно, Индија је имала више оболелих од дијабетеса него било која друга земља на свету, а тренутно је у овој земљи око 62 милиона оболелих, што је више од 7,1% одрасле популације Индије. Просечна старост у моменту откривања болести је око 42,5 година, а сваке године око милион становника Индије умре због ДМ. Висока инциденца се приписује комбинацији генетске предиспозиције и усвајања савременог животног стила са мало физичке активности уз конзумирање већих количина брзе хране у складу са повећањем животног стандарда и броја људи који припадају средњој класи у Индији. (11)

У последњих 7 година у Кини је дошло до пораста инциденце за 30% тако да је сада ова земља на првом месту у свету по броју оболелих од дијабетеса, са бројем од око 92 милиона становника, што значи да је сваки десети становник Кине оболео, а тренд пораста оболелих је и даље присутан.

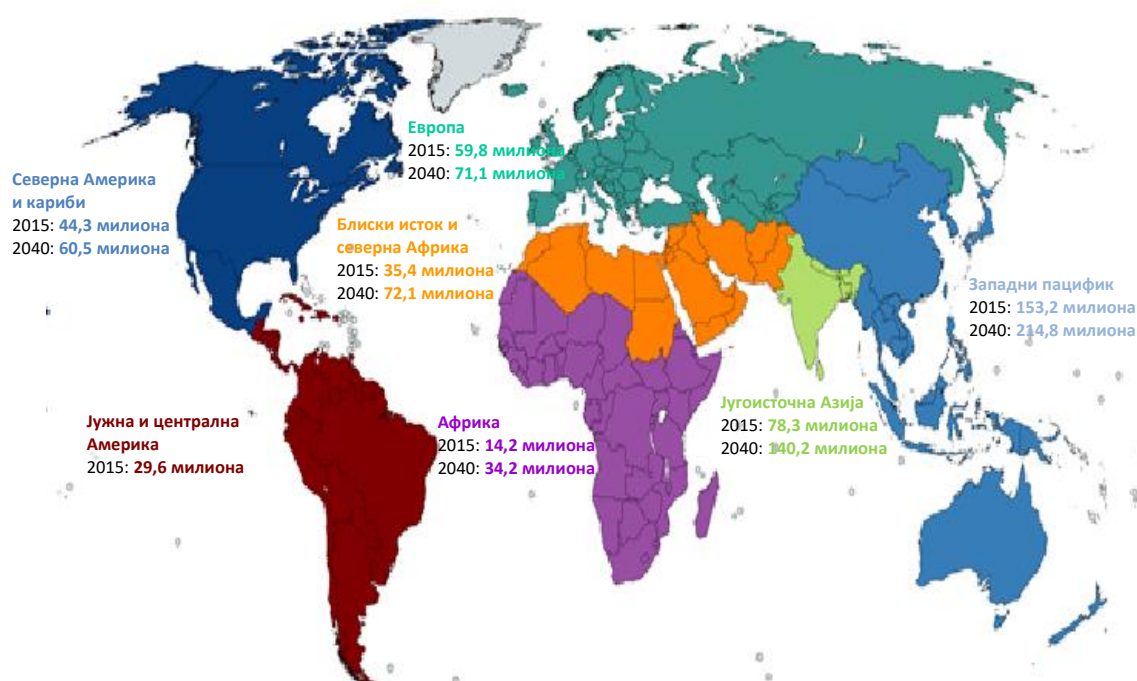
После Кине и Индије, трећа земља у свету по заступљености дијабетеса су Сједињене Америчке Државе где преко 30,3 милиона Американаца има ДМ што је око 9,4% од укупне популације. Од овог броја око 25,2% су старији од 65 година, а то објашњава и чињеницу да је ДМ седми узрок смртности у САД.

У Европи, од ДМ болује око 60 милиона људи, са преваленцом од око 8,5%, с тим што се преваленца у европским земљама креће од 2,4%, колико је у Молдавији, до 14,9% у Турској.(14) Србија, као земља у развоју, тренутно има око 630.000 оболелих од ДМ, што износи 8,6% популације. (15)

Према најновијим подацима, сматра се да од дијабетеса болује око 415 милиона људи широм света, а процењује се да ће до 2040. године број оболелих од дијабетеса износити око 642 милиона са преваленцом од око 10%. (16) Повећање броја оболелих од дијабетес мелитуса је углавном због повећања броја пацијената са дијабетес мелитусом тип 2 што, с обзиром на старост пацијената, има за последицу и повећање

коморбидитета насталих услед овог оболења. (17) Не треба занемарити ни чињеницу да је око 5 милиона смртних исхода у 2015. години настало као последица ДМ, а да се укупни трошкови здравствене потрошње због дијабетеса процењују на око 673 милијарди америчких долара. (18)

На слици 1 приказан је број оболелих од дијабетес мелитуса у свету и преваленца до 2040. године



Слика 1. Број оболелих од ДМ у свету 2015. године са преваленцом до 2040. године

### 1.3 Етиологија, класификација и патогенеза

Дијабетес мелитус представља метаболички поремећај који настаје као последица смањеног лучења инсулина уз већу или мању периферну резистенцију на инсулин, са последичном хипергикемијом. Рани симптоми као што су полидипсија, полиурија и

полифагија су последице хипергликемије, а касније компликације настају као последица дуготрајне нерегулисане или лоше регулисане хипергликемије. (19,20)

Етиологија ДМ се значајно разликује, али је увек везана за недостатак инсулина, било да се ради о смањеној секрецији инсулина или одговору на присутан инсулин, а може бити и комбинација ова два поремећаја. (21)

Најновије интенције за класификацију ДМ се заснивају на етиолошкој класификацији. Стари термини и класификације на инсулин зависни дијабетес (*insulin-dependent diabetes mellitus*-IDDM) и инсулин независни дијабетес (*Non insulin-dependent diabetes mellitus*-NIDDM) који су предложени од стране СЗО 1980. и 1985. године више нису у употреби, а нови систем класификације је идентификовао четири типа дијабетес мелитуса: Тип 1, Тип 2, "други специфични типови" и гестацијски дијабетес. (15,22).

Етиолошка класификација дијабетес мелитуса приказана је у табели 1.

Табела 1. Етиолошка класификација дијабетес мелитуса

<p>1. Тип 1 (деструкција <math>\beta</math> ћелија која доводи до апсолутног дефицита инсулина) - аутоимуни, - идиопатски</p>
<p>2. Тип 2 (креће се од доминантне инсулинске резистенције са релативним недостатком инсулина до доминантног секреторног дефицита инсулина, са или без инсулинске резистенције)</p>
<p>3. Други специфични типови А. Генетски дефекти у функцији <math>\beta</math>-ћелија Хромозом 12, HNF-1a (MODY-3); Хромозом 7, глукокиназа (MODY-2); Хромозом 20, HNF-4a (MODY-1); Митохондријска DNA; В. Генетски дефекти у дејству инсулина Тип А инсулинске резистенције; Leprechaunismus; Rabson-Mendenhall синдром; Липоатрофични дијабетес Ц. Болести егзокриног дела панкреаса Панкреатитис; Траума, панкреатектомија; Неоплазме; Цистична фиброза; Хемохроматоза; Фиброкалкулозна панкреатопатија; Ресекција панкреаса Д. Ендокринопатије Акромегалија; Кушингов синдром; Глукагоном; Феохромоцитом; Хипертиреоза; Соматостатином; Алдостероном Е. Лековима или хемијски индукован родентицид Vacor; пентамидине; никотинска киселина; кортикостероиди; хормони штитњаке; диазоксид; <math>\beta</math>-адренергички агонисти; тиазиди; долантин; <math>\beta</math>-интерферон; други-циклоспорин, такролимус Ф. Заразне болести Конгенитална рубеола; Цутомегаловирус; други-хемолитички уремијски синдром Г. Неуобичајени облици имунолошки посредованог дијабетеса “Stiff-man” sindrom; Cytomegalovirus Х. Генетски синдроми повезани са дијабетесом Downov sindrom; Klinefelterov sindrom; Turnerov sindrom; Wolframov sindrom; Hantingtonova horeja; Laurence-Moon-Biedl sindrom; miotonična distrofiја; porfirija; Prader-Willi sindrom</p>
<p>4. Гестацијски дијабетес (обухвата раније категорије гестационог поремећеја толеранције на глукозу и гестацијског дијабетеса)</p>

### 1.3.1 Дијабетес мелитус тип 1

Дијабетес мелитус тип 1 (ДМ тип 1) (раније означен као јувенилни или дијабетес зависан од инсулина) је заступљен код око 10 % случајева дијабетеса у свету и

најчешће се јавља у Европи и Северној Америци. Постоји значајна географска варијација у инциденци овог оболења, а вероватноћа да неко оболи од ДМ тип 1 у Финској је око 400 пута већа него у Венецуели. (23) Учесталост овог типа дијабетеса достиже максимум у детињству и раној младости, те се око 75% случајева јавља пре 30-те године живота, мада се може јавити и касније, а године нису пресудне за настанак оболења. Аутоимуни процес који доводи до појаве ДМ тип 1 почиње много година пре манифестације клиничких знакова, а неопходно је да се запремина  $\beta$  ћелија умањи за 80-90% да би се појавили први симптоми болести. Код ДМ тип 1 нема производње инсулина због аутоимуне деструкције  $\beta$  ћелија панкреаса, помоћу CD4+ и CD8+ Т ћелија и макрофага који се инфилтрирају у Лангерхансова острваца, а све то има за последицу потпуни недостатак инсулина и доживотну зависност од лека. (24) Дијабетес тип 1 је резултат аутоимуне реакције на протеине ћелија Лангерхансових острваца панкреаса, (25) а доказано је да постоји повезаност између ДМ тип 1 и других аутоимуних болести.

Познате су три врсте аутоантитела која су присутна код оболелих:

- 1) Цитоплазматична антитела ћелија Лангерхансових острваца (Islet cell cytoplasmic antibodies - ICCA): Примарна антитела против цитоплазматичних протеина ћелија острваца су пронађена у 90% дијабетичара тип 1. Присуство ICCA је предиктор будућег развоја дијабетес малитуса тип 1.
- 2) Антитела на површини ћелија Лангерхансових острваца (Islet cell surface antibodies - ICSA). Ова врста аутоантитела је описана код чак 80% дијабетичара тип 1, док неки пацијенти са дијабетесом тип 2 такође имају ICSA.
- 3) Специфична антитела за ћелије Лангерхансових острваца: Антитела на декарбоксилазу глутаминске киселине (GAD) су присутна у преко 80% пацијената који имају ДМ тип 1. Анти-инсулинска антитела (Anti insulin antibodies - IAAs) су такође идентификована код пацијената са ДМ тип 1 али и код сродника који су у ризику за развој ДМ тип 1. (26)

Последњих деценија постоји глобални пораст инциденце дијабетеса тип 1 што указије на чињеницу да животна средина делује на генски фактор у еволуцији ДМ тип 1. Као и друге аутоимуне болести специфичне за орган, дијабетес мелитус тип 1 укључује гене хуманог леукоцитног антигена (HLA), а HLA на хромозому 6 је био први локус

који је показао повезаност са овим обољењем. (27) Две комбинације HLA гена или хаплотипова су од посебног значаја DR4-DQ8 и DR3-DQ2 и присутни су код око 90% оболелих, (28) док се трећи хаплотип, DR15-DQ6, може наћи код мање од 1% деце са ДМ тип 1, а налази се код око 20% здраве популације. Генотип који обухвата два наведена хаплотипа доприноси највећем ризику од оболења, а код деце која имају тај генотип, болест се развија врло рано и има велики број компликација. (29)

Крајем прошлог века је доказано да постоји још најмање 15 локуса који су у вези са ДМ тип 1 (30), од којих су идентификована два гена повезана са Т ћелијском активацијом. Сматра се, да се алел за супресију Т ћелијске активације - цитотоксични Т лимфоцитни антиген 4 (CTLA-4), налази на хромозому 2q33 и представља трећи расположиви локус за дијабетес тип 1, а повезан је са повећањем нивоа растворљивог CTLA-419 и учесталости регулаторних Т ћелија. (31) PTPN22, ген који кодира LYP, такође супресор Т ћелијске активације је четврти расположиви локус. Вредно је напоменути да су HLA, CTLA-4 и PTPN22 били укључени у аутоимуне болести штитне жлезде и друге аутоимуне болести, што доводи до закључка да слични биолошки механизми доводе до различитих аутоимуних оболења. (32,33)

Осим генетске предиспозиције, за развој ДМ тип 1 од изузетног значаја је и фактор животне средине, а у прилог томе нам говори чињеница да поједине врсте вируса и инфекција могу имати утицај на настанак ДМ тип 1. Већина студија је потврдила повећање инциденце ДМ тип 1 међу млађом децом, са највећим повећањем у земљама Западне Европе које су раније имале ниску инциденцу. (34) На основу досадашњих студија, закључено је да су ове промене сувише брзе да би могле бити узроковане променама у генотипу и вероватно су резултат промена у околини, а ову тврдњу треба доказати у новим, проспективним студијама.

### 1.3.2 Дијабетес мелитус тип 2

Дијабетес мелитус тип 2 (ДМ тип 2) (раније назван адултни облик - дијабетес независан од инсулина) је заступљен код око 90% оболелих од ДМ у свету и представља једно од најраспрострањенијих оболења. Учесталост ДМ тип 2 варира у

различитим земљама и етичким групама, од највеће код Пима Индијанаца (50,3/1000 становника) до најниже код руралних Африканаца (1,2/1000 становника). И у случају ДМ тип 2, учесталост зависи од генске предиспозиције и фактора животне средине.

Дијабетес мелитус тип 2 настаје када бета ћелије панкреаса више нису у стању да одговоре на захтев организма за инсулин и сматра се да постоје најмање два идентификована патолошка дефекта код пацијената са ДМ тип 2.

Један је умањена способност инсулина да делује на периферна ткива, што се означава као инсулинска резистенција и сматра се да је примарни патолошки процес.

Други се манифестује као дисфункција  $\beta$  ћелија, услед чега је панкреас неспособан да ствара довољно инсулина којим би се компензовала инсулинска резистенција. (35,36) То значи да постоји релативни дефицит инсулина у најранијој фази оболења и апсолутан инсулински дефицит у каснијој фази.

Према томе, поставља се питање да ли дијабетес мелитус тип 2 настаје услед дефекта у излучивању бета ћелија панкреаса, периферне резистенције на инсулин или оба поремећаја истовремено. (25)

Зна се да је ДМ тип 2 крајње хетерогено оболење и да патогенетски механизам није могуће објаснити само на основу једног узрока који доводи од поремећаја у толеранцији на глукозу.

Молекуларни дефекти у инсулинској резистенцији и излучивању инсулина су комбинација спољних и генетских фактора, а крајњи резултат овог поремећаја су дефекти у излучивању инсулина, дејству инсулина, и у хепатичком промету глукозе. (37)

Већина особа оболелих од ДМ тип 2 има изванредан степен инсулинске резистенције, али сама инсулинска резистенција не изазива дијабетес тип 2, који се једино манифестује када истовремено постоји и дефект у излучивању инсулина.

Инсулинска резистенција је заједничка и за неколико других поремећаја, укључујући исхемијска срчана оболења, хипертензију, дислипидемију, централну гојазност и коагулационе дефекте, а скуп ових поремећаја су означени као синдром икс (X).

Доказ генетске компоненте у ДМ тип 2 је мултифакторијалан, а испитиван је код монозиготних и дизиготних парова близанаца када је један од њих оболео од



дијабетеса. Примењено је неколико приступа за идентификацију гена који су укључени у осетљивост за дијабетес мелитус тип 2. (38)

Данас се примењује неколико начина испитивања за генетску предиспозицију ДМ тип 2 тако да се одређује преваленца дијабетеса у раличитим етничким групама, јер се зна да се преваленца ДМ тип 2 разликује међу популацијама, од 1% код Индијанаца у Чилеу до 50% међу Пима Индијанцима у Аризони.

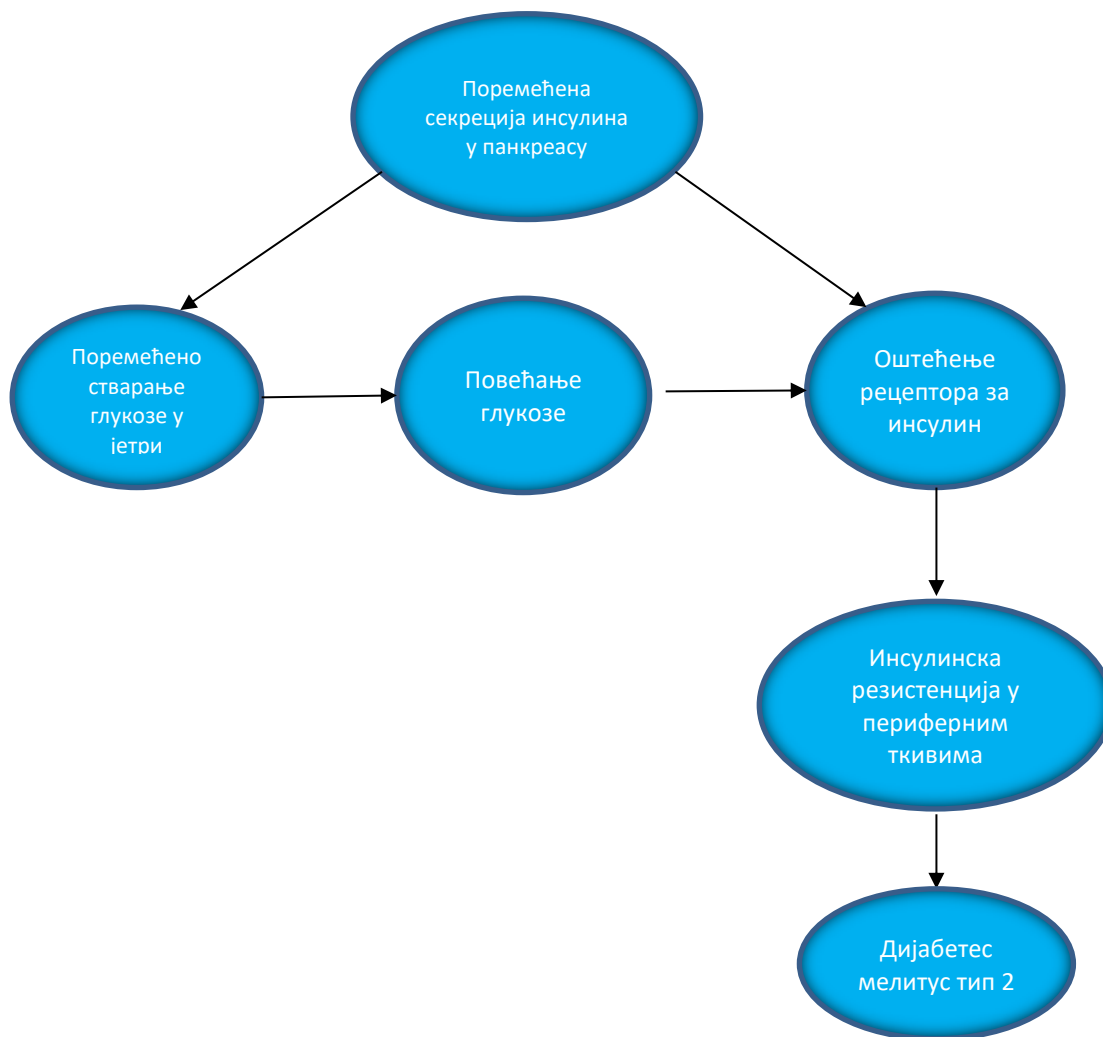
Део посматране етничке варијабилности може се приписати факторима животне средине и културе, међутим, чињеница да се преваленца болести значајно разликује међу етничким групама које деле слично окружење подржава идеју да генетски фактори доприносе предиспозицији за развој болести.

Поред тога, појава болести у оквиру појединих породица је још један од извора доказа за генетску предиспозицију болести. Сматра се да је вероватноћа настанка болести у породици где постоји дијабетес мелитус тип 2 око 3,5 до 4 пута већа него у општој популацији, а и до 6,1 пута већа ако су оболела оба родитеља.

Студије са близанцима су такође један од показатеља постојања генетске предиспозиције ДМ тип 2, јер је у њима доказано да је вероватноћа настанка болести већа код монозиготних у односу на дизиготне близанце, невезано за поднебље живљења. (39).

Фактори исхране и физичка активност несумњиво утичу на прогрес патолошке толеранције глукозе која доводи до појаве дијабетеса, код генетски предиспониране особе. Зна се да постоји блиска веза између дијабетеса и повећане телесне масе, нарочито оне са централном дистрибуцијом, а осим повећане телесне масе и нутрициони фактори утичу на метаболизам глукозе и ризик од настанка ДМ тип 2. (40)

На слици 2 приказан је патогенетски механизам дијабетес мелитуса тип 2.



Слика 2. Патогенеза дијабетес мелитуса тип 2

### 1.3.3 Други специфични типови дијабетеса

Други типови дијабетес мелитуса представљају групу дијабетеса која настаје услед познатих етиолошких фактора а обухватају мали проценат, мање од 10% дијабетеса. У ову групу спадају генски дефекти функције бета ћелија панкреаса (нпр. адултни дијабетес младих или MODY - *engl. maturity-onset diabetes of youth*), затим, секундарно настао дијабетес услед оболења егзокриног панкреаса (цистична фиброза, хронични панкреатитис, карцином панкреаса, хемохроматоза итд). Поред тога,

дијабетес се може развити у неким ендокриним болестима (акромегалија, Кушингов синдром, феохромоцитом и глукагоном), може бити изазван токсинима и лековима (родентицид пириминил, у САД познат под заштићеним именом Vacor). Нејчешћи узрочници међу лековима су: гликокортикоиди, бета блокатори, инхибитори протеазе, нијацин у високим дозама и други. (41)

### 1.3.4 Гестацијски дијабетес мелитус

Гестацијски дијабетес мелитус се јавља код 2-5% свих трудноћа а представља хипергликемију различитог степена, откривену први пут током трудноће, која у већини случајева ишчезава након порођаја. Не искључује се могућност да је хипергликемија постојала и пре трудноће и да ће се задржати и након порођаја. (42) Фактори ризика за настанак гестацијског дијабетес мелитуса су макрозомија, полицистична болест јајника, гојазност, труднице старије од 25 година, перзистентна гликозурија и породична предиспозиција за дијабетес. Ова врста дијабетеса се карактерише појавом интолеранције глукозе или манифестног дијабетеса (тип 1 или тип 2) у току трудноће, и нормализацији толеранције глукозе након порођаја, те је непоходно придржававање препорученог режима исхране, а уколико се ниво гликемије не може контролисати дијететским режимом током трудноће у терапију се уводе препарати инсулина. (43,44)

### 1.4 Клиничка слика и дијагноза дијабетес мелитуса

Како у патофизиолошком механизму, два најраспрострањенија типа дијабетеса се разликују и у клиничкој презентацији. У ДМ тип 1 клиничка слика се креће од потпуно асимптоматског оболења до изражене полиурије, полидипсије и полифагије са губитком у телесној тежини, осећајем умора и честим омаглицама које могу трајати неколико дана до неколико недеља и месеци. Дијабетична кетоацидоза је презентујући симптом у око 10-40% случајева, а може бити и први симптом ДМ тип 1. Такође се може јавити и код пацијената који нередовно узимају, или имају неадекватну инсулинску терапију. Дијабетична кетоацидоза није специфична само за ДМ тип 1, може се јавити и у ДМ тип 2, али знатно ређе. Дијагноза ДМ тип 1 се

поставља на основу налаза гликемије наше  $\geq 7,0$  mmol/l, удружене са типичним симптомима за дијабетес, често кетонуријом, а не тако ретко и кетоацидозом. (45) Према СЗО дијагностички критеријуми за дијабетес су наведени у табели 2, док су у табели 3. наведени дијагностички критеријуми за дијабетес према Америчком удружењу за дијабетес- *American Diabetes Association* (АДА).

Табела 2. Дијагностички критеријуми СЗО за дијабетес и стања хипергликемије

<i>Дијабетес</i>	
Гликемија наше или Плазма глукоза у 120 min. ОГТТ-а *	$\geq 7.0$ mmol/l $\geq 11.1$ mmol/l
<i>Интолеранција на глукозу (IGT; impaired glucose tolerance)</i>	
Гликемија наше и Плазма глукоза у 120 min. ОГТТ-а *	$< 7,0$ mmol/l $\geq 7,8$ i $< 11$ mmol/l
<i>Оштећена гликемија наше (IFG; impaired fasting glucose)</i>	
Гликемија наше и Плазма глукоза у 120 min. ОГТТ-а *	6.1 do 6.9mmol/l $< 7,8$ mmol/l

\*ако плазма глукоза у 120 мин. није одређена, стање може указивати и на дијабетес и на *IGT (Impaired Glucose Tolerance)*

Табела 3. Дијагностички критеријуми за дијабетес према АДА

1. ХБА1Ц $\geq 6.5\%$ или,
2. Гликемија наше $\geq 7,0$ mmol/l (126 mg/dL) или,
3. Гликемија у току ОГТТ-а са 75 g глукозе у 120. минути $\geq 11,19$ mmol/l или
4. Гликемија у било ком случајном узорку крви (без обзира на оброк) $\geq 11,19$ mmol/l уз присуство типичних дијабетесних симптома (полиурија, полидипсија, губитак у телесној тежини).

Код дијабетес мелитуса тип 2 пацијенти могу годинама бити без било какве симптоматологије, тако да се неки од њих први пут могу презентовати појавом класичних симптома микро или макроваскуларних компликација (ангина пекторис, инфаркт миокарда, цереброваскуларни инзулт, полинеуропатске тегобе, сметње са видом). Најчешће присутни симптоми као што је умор, рекурентне кожне инфекције, интермитентна ноктурија могу перзистирати годинама. У случајевима непрепознате хипергликемије може се развити хиперосмоларно стање или кетоацидоза. Дијагноза

дијабетес мелитуса тип 2 се поставља уколико се уз типичне симптоме за дијабетес утврди гликемија наше  $\geq 7,0$  mmol/l, или ако је у било ком узорку серума нађена вредност гликемија  $\geq 11,1$  mmol/l. Последњих деценија је регистрован пораст ДМ тип 2 код деце и адолесцената, посебно оних који су гојазни. (45) Основне разлике и клиничка презентација два типа дијабетеса приказани су у табели 4.

Табела 4. Типови дијабетеса по клиничкој презентацији

Дијабетес	Тип 1	Тип 2
Клиничка презентација	<ul style="list-style-type: none"> <li>• млађи од 20 година</li> <li>• нормално ухрањени</li> <li>• смањен инсулин</li> <li>• Ат против ћелија панкреаса</li> <li>• често кетоацидоза</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• углавном старији од 30 година</li> <li>• гојазни</li> <li>• нормалан или повећан инсулин</li> <li>• нема Ат против ћелија панкреаса</li> <li>• ретко кетоацидоза</li> </ul>
Патогенеза	<ul style="list-style-type: none"> <li>• аутоимуни, имунопатогенетски механизам</li> <li>• озбиљан инсулински дефицит</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• инсулинска резистенција</li> <li>• релативан инсулински дефицит</li> </ul>
Генетика	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50% удруженост код близанаца</li> <li>• повезаност са HLA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 60-80% удруженост код близанаца</li> <li>• нема повезаности са HLA</li> </ul>
Ћелије острваца панкреаса	<ul style="list-style-type: none"> <li>• рани инсулитис</li> <li>• атрофија и фиброза</li> <li>• озбиљна ћелијска деплеција</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• нема раног инсулитиса</li> <li>• фокална атрофија и амилоид и депозити</li> <li>• умерена ћелијска деплеција</li> </ul>

### 1.5 Компликације дијабетес мелитуса

Компликације које настају у дијабетес мелитусу су многобројне а могу се поделити на акутне и хроничне.

#### 1.5.1 Акутне компликације

Акутне компликације дијабетес мелитуса су дијабетесна кетоацидоза, хиперосмоларно хипергликемично стање, хипогликемија и лактатна ацидоза. (46)

#### 1.5.1.1 Дијабетесна кетоацидоза

Дијабетесна кетоацидоза представља акутну, по живот опасну, компликацију која се карактерише хипергликемијом, појавом кетона, дехирдацијом и метаболичком ацидозом. (46,47) Преваленца кетоацидозе представља добар индикатор квалитета лечења, а етиологија дијабетичне кетоацидозе може бити: неадекватна доза инсулина, изостанак давања неке од доза инсулина ( углавном у ДМ тип 1), инфекција ( уринарне инфекције, пнеумонија, сепса), акутни инфаркт миокарда, цереброваскуларни инзулт, трудноћа, опијати и сл. Манифестује се појавом мучнине и повраћања, жеђи, болова у стомаку, појавом тахикардије, тахипнее (Кусмаулово дисање), дехидрације, хипотензије, летаргије, а може настати и кома.

Сличну клиничку презентацију као дијабетесна кетоацидоза има и лактатна ацидоза која се углавном јавља у хоспиталним условима, настаје услед хипоксије, шока и дехидрације, а карактерише се појавом лактата у плазми  $> 5 \text{ mmol/l}$ .

#### 1.5.1.2 Хиперосмоларно хипергликемично стање

Хиперосмоларно хипергликемично стање настаје углавном код старијих пацијената са дијабетес мелитусом тип 2, а манифестује се вишедневном полиуријом, смањеним уносом течности и развојем менталне конфузије до летаргије и коме. (47) Најчешћи знаци су дубока дехидрација, тахикардија, промењен ментални статус, Кусмаулово дисање, без мучнине и повраћања, а лабораторијски се налазе хипергликемија, хиперосмоларност ( $> 350 \text{ mOsm/l}$ ), азотемија.

#### 1.5.1.3 Хипогликемија

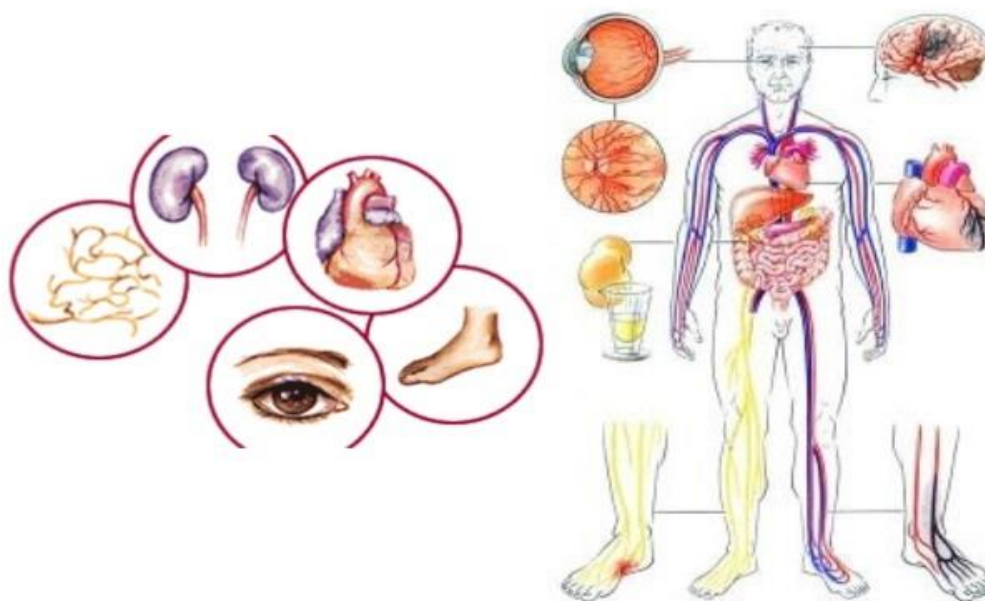
Хипогликемија представља стање у коме је вредност серумске гликемија  $2,5-2,8 \text{ mmol/l}$ , али и вредности ниже од  $3,9 \text{ mmol/l}$  уз пратеће симптоме. (48) Најчешће се манифестује појавом слабости, малаксалости, умора, главобоље, конфузности, палпитација, сметњама у виду, знојењем, узнемиреношћу, а настаје као последица неадекватне дозе, типа или времена давања инсулина; смањеног уноса глукозе (изостављање или неадекватни оброци); повећане потрошње глукозе независне од инсулина (већа физичка активност); смањене ендogene продукције глукозе (алкохол,

лекови), повећане инсулинске сензитивности (физичка активност, боља гликорегулација, губитак телесне масе, лекови) и смањен клиренс инсулина (ренална инсуфицијенција). Клинички се може поделити на четири степена тежине:

- 1- лабораторијска потврда, без субјективних тегоба;
- 2- умерена симптоматологија коју решава болесник узимањем хране;
- 3- озбиљна хипогликемија која захтева помоћ друге особе;
- 4- веома озбиљан поремећај са губитком свести, конвулзијама а некад и леталним исходом.

### 1.5.2 Хроничне компликације

Дијабетес мелитус тип 2 је често асимтоматска болест и у моменту постављања клиничке дијагнозе код великог броја пацијената постоје хроничне компликације које представљају велики проблем у лечењу оболелих од дијабетеса. (49) Независно од типа дијабетеса, хроничне компликације се могу поделити на васкуларне и не васкуларне. (50)



Слика 3. Хроничне компликације дијабетеса

#### 1.5.2.1 Неваскуларне компликације

Неваскуларне компликације су мање истраживане, али нису мање важне у праћењу и лечењу оболелих од дијабетеса. Ове компликације се могу јавити на кожи у облику различитих, хроничних обољења или инфекција коже, затим се могу манифестовати гастроинтестиналном симптоматологијом као и појавом депресије, деменције и сексуалне дисфункције код оболелих. (51–54)

#### 1.5.2.2 Васкуларне компликације

Васкуларне компликације настале услед ДМ могу се поделити на компликације специфичне за дијабетес - микроваскуларне компликације у које спадају ретинопатија, нефропатија и неуропатија и на другој страни су атеросклеротске макроваскуларне компликације где припадају коронарна артеријска болест, болест периферних артерија и цереброваскуларна болест. Дијабетесно стопало представља компликацију ДМ која обухвата и микро и макроваскуларне компликације дијабетеса, а у многим студијама је и описана повезаност између ове две врсте васкуларних компликација. (49,55,56)

##### 1.5.2.2.1 Макроваскуларне компликације

Код макроваскуларних компликација које настају код ДМ главни патолошки механизам је процес атеросклерозе који доводи до нарушавања зида артерија у организму, а настаје као резултат хроничне инфламације и повреде зида артерија у периферном или коронарном васкуларном систему. Као одговор на инфламацију, долази до акумулације ЛДЛ честица у ендотелу зида артерија који доводи до формирања атеросклеротске лезије са фиброзном капом која је даље одговорна за настанак било које врсте инфаркта. (57,58) Дијабетес доводи до макроваскуларних компликација које подразумевају настанак како обољења периферних артерија тако и већу инциденцу кардиоваскуларних догађаја и цереброваскуларних болести. (59,60)



#### 1.5.2.2.2 Микроваскуларне компликације

У склопу дијабетеса су изражене и микроваскуларне компликације које се манифестују дијабетесном неуропатијом, ретинопатијом и нефропатијом.(61)

##### Дијабетесна неуропатија

Оштећење периферног и аутономног нервног система је честа компликација ДМ и представља најчешћу полинеуропатију у западном свету. Према досадашњим резултатима, сматра се да око 10% оболелих од дијабетеса има неуропатију, а уколико се настави досадашњи тренд пораста оболелих од дијабетеса и дужина трајања болести, од ове микроваскуларне компликације ће боловати и до 50% оболелих од дијабетес мелитуса. (62,63) Дијабетесна неуропатија се у зависности од дела нервног система који је захваћен, може класификовати у неколико подгрупа: (64,65)

1. Дистална симетрична полинеуропатија – уједно и најчешћи тип дијабетесне неуропатије и углавном се сматра синонимом за дијабетесну неуропатију. Карактерише је прогресивни губитак дисталног сензибилитета који је у корелацији са губитком сензорних неурона, а у тешким случајевима може доћи и до оштећења моторних неурона. Типичан је губитак сензибилитета по типу „чарапе-рукавице“.(66)
2. Аутономна неуропатија - неуропатија аутономног нервног ситема такође представља релативно честу компликацију ДМ због укључености великог броја органа. Међу проблемима који настају услед ове неуропатије су постурална хипотензија, гастропареза и ентеропатија са опстипацијом или дијареом. (67)
3. Полирадикулопатија – углавном захвата коренове торакалних и лумбалних нерава. Торакална полирадикулопатија се чешће јавља код старијих болесника и може изазвати значајне симптоме. Код пацијената се могу јавити болови у трбуху, понекад у облику траке и врло често остају недијагностиковани.(68) Лумбална полирадикулопатија тј. дијабетесна амиотрофија је најчешћи тип дијабетесне полирадикулопатије и осим лумбосакралних нерава, може захватити и периферне живце. (69) Сматра се да постоји неколико

патофизиолошких механизма али су најзначајнији исхемија и инфламација. Основна карактеристика дијабетесне амиотрофије је изненадна појава болова са слабошћу екстремитета унилатерално уз опште пропадање пацијента, прогредира током неколико месеци и углавном је спонтан, делимичан опоравак. Може се јавити и на другој ноzi, непосредно након појаве симптома или након неколико месеци, а дијгноза се поставља на основу клиничке слике на терену већ постојећег или новооткривеног дијабетес мелитуса. (70)

4. Дијабетична неуропатска кахексија - представља редак али препознатљив синдром који се манифестује дифузном полирадикулопатијом која се надовезује на тешку периферну неуропатију. Овај синдром је повезан са губитком у телесној маси и депресијом, углавном се јавља код особа мушког пола и познат је под називом неуропатска кахексија. (71,72)
5. Мононеуропатије - постоје две врсте мононеуропатије повезане са дијабетесом и то кранијална и периферна мононеуропатија. Кранијална захвата кранијалне нерве који инервишу екстраокуларне мишиће и то III (*oculomotorius*), VI (*abducens*), и IV (*trochlearis*) кранијални нерв. Код ових пацијената је присутна офталмоплегичка бол, птоза капака и диплопија. Белова парализа се чешће јавља код дијабетичара него у здравој популацији. (73) Периферна мононеуропатија најчешће захвата *nervus medianus* на горњим и *nervus peroneus* на доњим екстремитетима где може довести до пада стопала.

#### Дијабетесна ретинопатија

Дијабетесна ретинопатија (ДР), представља главну микроваскуларну компликацију дијабетеса, и водећи узрок губитка вида у високоразвијеним земљама. (74) Сматра се да ће на глобалном нивоу број људи са ДР порасти са 126,6 милиона у 2010. години на 191 милиона до 2030. године, (75) а процењује се да ће број са дијабетесном ретинопатијом опасном по вид повећати са 37,3 милиона на 56,3 милиона, уколико се широм света не предузму хитне акције за повећање свести становништва о потреби за редовним офталмолошким контролама. (76) Резултати добијени у 35 спроведених студија на особама оболелим од дијабетеса су показали да се ДР јавља код око 34,6%,

од тога је пролиферативна ДР заступљена код 7,0%, макуларни едем настао услед дијабетеса код око 6,8% и по вид опасна ДР код око 10,2%. (77)

Патогенеза ДР је мултифакторијална, али је првенствено узрокована метаболичким ефектима хроничне хипергликемије, што доводи до промена на крвним судовима и каснијег оштећења мрежњаче услед исхемије. Лезије које настају у ДР укључују промене у васкуларној пермеабилности, капиларне микроанеуризме, дегенеративне промене капилара и прекомерни настанак нових крвних судова (неоваскуларизацију). Клинички се ДР дели на непролиферативну и пролиферативну. (78,79) У почетним стадијумима хипергликемија доводи до промена у базалној мембрани које даље доприносе променама у интегритету крвних судова у ретини мењајући крвно-ретиналну баријеру и васкуларну пропустљивост. У овом стадијуму непролиферативне ДР већина људи нема никаквих проблема са видом. (80) У пролиферативној ДР дегенерација или оклузија капилара у мрежњачи доводи до погоршања стања које је резултат исхемије, долази до појаве едема макуле што узрокује нова оштећења. Код тежих облика долази до крварења са нарушавањем архитектонике мрежњаче што може довести до аблације ретине. (74)

У дугорочним студијама као што су *Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)* и *United Kingdom Prospective Diabetes Study* доказано је да се адекватном контролом гликемије може смањити инциденца ДР, а самим тим утицати на последице ове микроваскуларне компликације. (81)

### Дијабетесна нефропатија

Дијабетесна нефропатија (ДН) представља једну од најчешћих и најопаснијих микроваскуларних компликација дијабетес мелитуса и водећи је узрок настанка терминалне бубрежне слабости. (82,83) Заступљена је код око 20-40% оболелих од дијабетеса, а манифестује се повећаним излучивањем албумина уз пораст нивоа серумског креатинина и смањење јачине гломерулске филтрације (ЈГФ). (84–86) Због распрострањености, дугогодишње еволуције и високих трошкова лечења дијабетесне нефропатије, неопходно је што раније открити и започети лечење ове компликације. (87,88) Патогенеза ДН је комплексна и није у потпуности разјашњена а њеном настанку доприноси неколико патофизиолошких механизма. (89,90) Сматра се да је

хипергликемија главни окидач који доводи до метаболичких и хемодинамских промена у бубрезима код особа које имају генетску предиспозицију за развој овог оболења. (91) Глукоза и њени метаболити активирају протеин киназу Ц која у даљем току доводи до структурних и функционалних промена у бубрезима, а хипергликемија је одговорна за каскаду штетних ефеката посредованих цитокинима, факторима раста који утичу на оксидативи стрес, липидном пероксидацијом и производњом додатних елемената инфламације. (92,93) Ове промене доводе до исхемије на коју је посебно осетљив *pars recta* проксималних тубула. Дијабетесна нефропатија се развија као последица сложених интеракција између гломерула, тубула, интерстицијума и васкуларних делова бубрега. Истраживања која су испитивала утицај високе концентрације глукозе у урину на ћелије порксималних тубула и фибробласте у интерстицијуму, указују да ова два типа ћелија доприносе директном оштећењу тубулоинтерстицијума и последичном оштећењу гломерула. (94) Између ова два типа ћелија постоје бројне везе које укључују вазоактивне пептиде (ангиотензин 2, ET-1), путеве активације који зависе од глукозе као што је полиолски пут метаболизма глукозе, завршне продукте узнепредовале гликозилације (AGEs), цитокине и TGF- $\beta$ . Ослобођени медијатори доводе до задебљања базалне мембране гломерула, инфилтрације тубула моноцитима/макрофагима и ожиљавања тубулоинтерстицијума. Пролиферација мезангијума и гломерулосклероза се не одвијају увек паралелно, што указује да можда имају различиту патогенезу. (95) Пролиферација мезангијума може бити директна последица хипергликемије због повећаног стварања матрикса или гликозилације протеина матрикса. Са друге стране, гломерулосклероза може бити последица интрагломерулске хипертензије настале услед вазодилатације крвних судова бубрега или услед исхемије због хијалинозе крвних судова. (96–98)

Најранија манифестација дијабетесне нефропатије је гломеруларна хиперфилтрација која настаје као резултат промена на нивоу гломерула, а јачина гломерулске филтрације може бити и до 40% већа од нормале. (89) Након тога долази до задебљања гломеруларне базалне мембране, хипертрофије гломерула и мезангијалног матрикса који доводе до пада јачине гломерулске филтрације, а може се јавити и албуминурија након пет и више година од дијагностиковања ДМ. (93) Појава микроалбуминурије је први манифестни знак дијабетесне нефропатије, може трајати годинама, а као таква

штетно утиче на функцију бубрежних структура. Она даље прогредира до протеинурије, која када се једном јави, води даљем паду ЛГФ. (99) Микроалбуминурија означава повишену уринарну екскрецију албумина у интервалу од 30-300 mg/24h у бар два узастопна узорка урина у периоду од три до шест месеци. (100) Присуство трајне микроалбуминурије представља најранију фазу бубрежног оштећења у дијабетесу, која претходи клинчки манифестној ДН, мада се дијабетесна нефропатија може развити и без присуства микроалбуминурије. (85) Код неких пацијента са дијабетес мелитусом, који имају симптоме и знаке прогресивног смањења бубрежне функције вредности уринарних албумина су биле у границама референтних вредности, што може указати на чињеницу да албуминурија не може бити идеалан маркер за постављање дијагнозе дијабетесне нефропатије. (101–103)

#### 1.6 Дијагноза дијабетесне нефропатије

Дијабетесну нефропатију, која представља најчешћи узрок терминалне бубрежне инсуфицијенције неопходно је открити у што ранијем стадијуму и што пре започети лечење. Да би се то постигло све пацијенте са ДМ треба прегледати бар једном годишње и то након пет година од дијагностиковања дијабетес мелитуса тип 1 и непосредно након постављања дијагнозе код дијабетеса тип 2. Код пацијената са дијабетесом тип 2, њих око 7% (85) у моменту дијагнозе болести већ има микроалбуминурију, (104) док је код оболелих од ДМ тип 1 микроалбуминурија, након пет година присутна код око 18% пацијената, углавном оних који имају лоше регулисану гликемију. (105)

Први корак у скринингу пацијената за дијагнозу албуминурије је мерење концентрације албумина у јутарњем узорку урина (mg/dL) и одређивање нивоа креатинина у урину (g/dL). (106) Лабораторијски резултати презентују албуминурију као милиграм албумина на грам креатинина (албумин/креатинин (mg/g)), а нормалне вредности су до 30 mg/g. Микроалбуминурија је у границама од 30-300 mg албумина/g креатинина, а макроалбуминурија постоји када су вредности веће од 300 mg/g.

Осим анализе урина неопходно је одредити и ниво серумског креатинина због прорачуна ЛГФ, независно од тога да ли постоји и ког обима је микроалбуминурија.

Уколико постоји протеинурија, потребно је искључити и друга оболења бубрега, као што су хронични гломерулонефритиси и исхемијска нефропатија. (104–108)

Новија истраживања показују да се ДН може развити без претходне микроалбуминурије. (109,110) Полазећи од те чињенице, неопходни су нови и поуздани показатељи развоја дијабетесне нефропатије код оболелих од ДМ тип 2. Од посебног значаја, издвојило се неколико уринарних биомаркера и то: од гломеруларних - трансферин, имуноглобулин G, церулоплазмин, колаген тип IV, ламинин, фибронектин, гликозаминогликани, имуноглобулин M, васкуларни ендотелијелни фактор раста/VEGF, а од од тубуларних биомаркера- липокалин са желатиназом неутрофила (NGAL), алфа 1- микроглобулин, молекул оштећења бубрега-1 (KIM-1), N-acetyl- $\beta$ -D глукозаминидаза, цистатин Ц, везујући протеин масних киселина јетре (L-FABP), нефрин и други. (111–114)

#### 1.6.1 Уринарни колаген тип IV у дијагнози дијабетесне нефропатије

Инципијентна дијабетесна нефропатија се карактерише задебљањем гломеруларне базалне мембране и повећањем мезангијалног матрикса који претходе појави микроалбуминурије. (115,116) Главни конституент базалне мембране у гломерулима, тубулима и мезангијалном матриксу је колаген тип IV, протеин молекулске тежине око 540 кДа. (117) С обзиром на молекулску масу, не може се екскретовати преко здравих бубрега, али повишен ниво уринарног колагена IV може бити маркер раног оштећења гломеруларне мембране код оболелих од дијабетес мелитуса. Штавише, излучивање уринарног колагена тип IV је много мање подложно физиолошким променама него излучивање уринарног албумина. (116,118–121)

Према резултатима досадашњих студија, и у мултицентричној Азијској студији која је спроведена на скоро 700 пацијента са ДМ, *Tomino и сар.* су доказали да ниво колагена корелира са албуминуријом, али се могу наћи и повишене вредности овог биомаркера у урину пацијената са ДМ који немају микроалбуминурију, и сразмерне су степену бубрежне лезије. (118,121) Доказано је да се повишене вредности колагена тип IV могу јавити и услед оштећења гломерула код примарних гломерулских оболења, али је однос колаген IV/албумин већи код оболелих од ДМ, што помаже у

диференцијалној дијагнози и може се сврстати у групу биомаркера дијабетесне нефропатије. (122)

Повишен ниво глукозе подстиче синтезу колагена тип IV и може смањити његову разградњу, а услед тога долази до повећаног накупљања колагена у базалној мембрани и мезангијском матриксу бубрега оболелих од дијабетеса. (123) То објашњава чињеницу да је излучивање колагена повећано код особа оболелих од дијабетеса, чак и у случајевима када немају микроалбуминурију из чега се намеће закључак да се уринарни колаген тип IV може користити као рани предиктор дијабетесне нефропатије. (124–126) Такође је поменуто да је излучивање колагена тип IV веће код гломерулских оболења друге етиологије у односу на здраву контролу, али у поређењу са примарним гломерулопатијама нађено је да је однос колаген тип IV/албумин значајно већи код ДН и то се може искористити као дијагностички критеријум за дијагнозу почетне дијабетесне нефропатије. У проспективној студији коју су на 94 пацијента спровели *Iijima* и сар. након годину дана, 25 % нормоалбуминуричних пацијената са претходно повећеним нивоом колагена тип IV развило је микроалбуминурију, а 75% су остали нормоалбуминурични. Пацијенти који су остали нормоалбуминурични су иницијално имали ниже нивое уринарног колагена тип IV, док су пацијенти који су развили микроалбуминурију имали додатно повећање у вредностима колагена тип IV, на крају периода праћења. (127) На основу досадашњих резултата, дошло се до закључка да је излучивање колагена тип IV код пацијената са ДМ повезано са дужином трајања болести и са нивоом серумског холестерола, обрнуто пропорционално нивоу серумског креатинина, а није нађена повезаност између нивоа уринарног колагена тип IV и развоја дијабетесне ретинопатије. (124,128)

### 1.6.2 Уринарни трансферин у дијагнози дијабетесне нефропатије

Трансферин је протеин плазме, нешто веће молекулске масе од албумина (76,5 *kDa*) а због свог негативног наелектрисања лакше се филтрира кроз гломеруларну мембрану. (129,130)

Он је главни протеин који везује гвожђе у серуму, и као такав представља транспортер јона гвожђа у организму, док је уринарни трансферин показатељ оштећења гломеруларне мембране. (101,131) Концентрација уринарног трансферина је повећана код пацијената са дијабетес мелитусом, у поређењу са здравом контролом, чак и код оних који немају микроалбуминурију, а трансферинурија корелира са уринарном екскрецијом албумина и повећава се паралелно са албуминуријом. (132–134)

С обзиром да је код пацијената са дијабетесом већа вероватноћа да се развије трансферинурија него албуминурија и због тога што је однос албумин/трансферин знатно мањи код нормоалбуминуричних и микролабуминуричних у поређењу са макроалбуминуричним пацијентима, дошло се до закључка да је уринарни трансферин осетљивији маркер гломеруларног оштећења и предиктор развоја дијабетесне нефропатије. (135–137)

У студији спроведеној током двогодишњег праћења пацијената са ДМ доказано је да повећање уринарног трансферина претходи развоју микроалбуминурије код нормоалбуминуричних пацијента, независно од старости пацијента, дужине трајања дијабетеса, крвног притиска, гликозилираног хемоглобина (ХбА1Ц) и липидног статуса, мада се сматра да адекватна контрола гликемије, код новодијагностикованих пацијената са ДМ, може смањити ниво уринарне екскреције трансферина. (138,139)

У групи пацијената који већ имају албуминурију, излучивање уринарног трансферина има линеарну везу са излучивањем уринарног албумина, а повећана трансферинурија је пронађена код 95% микроалбуминурних пацијената и код свих пацијената (100%) са макроалбуминуријом. (140) Такође је утврђено да трансферинурија доводи до развоја микроалбуминурије у току петогодишњег праћења нормолабуминуричних пацијената, и да представља маркер дијабетичних микроваскуларних компликација, тј. да је већа екскреција трансферина код особа код којих постоји дијабетесна ретинопатија. (137,141,142) Узимајући у обзир све напред наведено може се закључити да трансферинурија може послужити као сензитиван индикатор раних микроваскуларних компликација дијабетес мелитуса и повећане васкуларне пропустљивости.

*Hellemons* и сар. су процењивали валидност биомаркера за рану дијагнозу и праћење ДН и дошли су до закључка да је трансферин имао највећу предиктивну вредност. (142)



Разлог томе је највероватније у функцији трансферина, јер је он екстрацелуларни, антиоксидативни молекул и смањење његове концентрације довешће до оксидативног дисбаланса, што доводи до настанка компликација као што је дијабетесна нефропатија.(143)

У том контексту, трансферин се сматра корисним маркером за процену настанка и праћења оштећења гломерула код дијабетес мелитуса, а његово излучивање је повезано са раним стадијумом ДН.

### 1.6.3 Везујући протеин масних киселина јетре L-FABP у дијагнози дијабетесне нефропатије

Везујући протеин масних киселина јетре (енг. скр. L-FABP - *Liver-type Fatty Acid-Binding Protein*) је протеин молекулске масе 14 kDa који се екскретује у хепатоцитима и проксималним тубулима бубрега, а повишене концентрације у урину указују на тубулско оштећење. (144) Иако његова улога није у потпуности разјашњена, верује се да у бубрегу има заштитну функцију и представља ендогени антиоксиданс који спречава тубулоинтерстицијско оштећење. (144)

Повећана уринарна екскреција L-FABP регистрована је и код пацијената са хроничним оболењем бубрега, а повећано излучивање се повезује са структуралним и функционалним оштећењем тубула. Ови подаци су потврђени имунохистохемијским бојењем узорака након биопсије бубрега код пацијената који су имали нефротски синдром услед оболења као што су болест минималних промена, лупус нефритис или дијабетес мелитус. (145,146) Повећано излучивање протеина преко гломеруларне мембране, код ових болести доводи до повећаног притиска на проксималне тубуле и узрокује излучивање L-FABP преко тубула, а повећана концентрација уринарног L-FABP представља показатељ тубуларног оштећења и може послужити као користан маркер тубулоинтерстицијског оштећења. (147)

Новија истраживања су показала да је уринарни L-FABP повишен код оболелих од дијабетес мелитуса, пре стандардних гломеруларних биомаркера и да његова концентрација корелира са тежином дијабетесне нефропатије. (148,149) Ниво уринарног L-FABP код пацијената са дијабетесом типа 2 такође, корелира са стопом излучивања албумина, клиренсом креатинина и нивоом хемоглобина, што потврђује

да L-FABP може бити нови биомаркер инципијетне дијабетесне нефропатије. (150) Из досадашњих истраживања је закључено да ниво L-FABP у серуму не утиче на излучивање, што указује на чињеницу да је L-FABP измерен у урину резултат губитка преко ћелија тубула. Концентрација излученог L-FABP се повећава са погоршањем реналне функције и није у корелацији са излучивањем протеина. (151) У проспективној студији *Nielsena* и сар. која је укључила 165 нормоалбуминуричних болесника са дијабетесом типа 1, концентрација уринарног L-FABP је била предиктор за развој микро и макроалбуминурије. (152)

У другој великој студији у коју је било укључено преко 100 болесника са дијабетесом типа 2, *Kamijo-Iketori* и сар. дошли су до закључка да је повишен ниво уринарног L-FABP био повезан настанком и порастом албуминурије, прогресијом ДН и појавом хроничне бубрежне слабости. (148) Једна од последњих студија коју су спровели *Chou* и сар. дошли су до закључка да је стопа излучивања L-FABP код пацијената са дијабетес мелитусом тип 2 била повезана са екскрецијом албумина али не и са прогресијом бубрежне слабости. (153)

Наведени подаци указују на чињеницу да се уринарни L-FABP може користити као рани биомаркер ДН код дијабетеса типа 2, али су за даље праћење неопходна додатна истраживања.

## 1.7 Лечење

Терапија дијабетеса подразумева контролу гликемије како би се самањили симптоми и спречиле компликације уз што мање хипогликемијских инцидената. Гликемију током дана треба одржавати између вредности од 4,4 до 6,7 mmol/L (80–120 mg/dl), а пре спавања те вредности треба да буду између 5,6 и 7,8 mmol/L (100–140 mg/dl), што се спроводи самоконтролом. Пожељне вредности ХБА1Ц су < 7%. Ове вредности ХБА1Ц су прилагођене болесницима код којих није препоручљива строга контрола гликемије (нпр. старије особе, болесници с кратким очекиваним преживљавањем, пацијенти с узастопним хипогликемијама, посебно уколико нису свесни хипогликемија, као нпр. мала деца). (154) У типу 2 дијабетеса пожељна је стриктнија контрола гликемије са циљним вредностима ХБА1Ц  $\leq 6,5\%$  за пацијенте са краћим

трајањем болести, без кардио-васкуларних оболења, код којих је могуће достићи циљне гликемије без хипогликемијских епизода. (155) Кључни елементи терапије код свих болесника са дијабетес мелитусом су добра едукација, саветовање о дијети и редовној физичкој активности и праћење гликорегулације.(156,157) Из наведеног произилази да у терапији учествује, осим медикаментног и немедикаментни вид терапије. Немедикаментна терапија подразумева хигијенско-дијететски режим исхране, одређивање укупног уноса калорија, односа енергетских материја и распореда оброка, затим одређен степен физичке активности који је такође контролисан. Осим овога у терапији се користи и медикаментозна терапија која у зависности од типа дијабетеса и гликорегулације може бити применом пероралних хипогликемика или инсулина.

#### 1.7.1 Терапијски приступи у лечењу дијабетес мелитуса тип 1

Медикаментна терапија у типу 1 дијабетеса се састоји искључиво од терапије инсулином и може се примењивати на два начина:

- (а) интензивирана конвенционална терапија (ИКИТ) – углавном подразумева три и више, по правилу 4 дневне дозе инсулина, и
- (б) континуирана субкутана инсулинска инфузија (КСИИ) уз помоћ спољне портабилне инсулинске пумпе. (158)

У терапији ДМ тип 1 се користи и трансплантација ендокриног панкреаса, као трансплантација целог или сегмента панкреаса или острваца ендокриног панкреаса али се још увек не уводи у ширу клиничку праксу терапије дијабетеса тип 1.

#### 1.7.2 Терапијски приступи у лечењу дијабетес мелитуса тип 2

За разлику од болесника са дијабетес мелитусом тип 1 који у терапији болести захтевају инсулин, код болесника са дијабетес мелитусом тип 2 и благо повишеним вредностима гликемије, покушава се лечење са повећањем физичке активности уз додаток једног пероралног препарата. Уколико ове мере нису довољне уводи се и други перорални препарат или/и инсулин, уколико се ни са два препарата не постигну

задовољавајући циљеви за гликорегулацију. (159) Инсулин је код дијабетес мелитуса тип 2, као први терапијски избор, индикован само код трудница и уколико је прва манифестација болести акутна метаболичка декомпензација, као што је дијабетична кетоацидоза, или хиперосмоларно хипергликемично стање. (160) Осим терапије изразито је важна едукација болесника и развијање свести о редовним контролама, као и спречавању настанка компликација ДМ.

### 1.7.3 Терапија компликација

У лечењу и праћењу пацијената оболелих од ДМ теба регулисати вредности гликемије тако да се компликације јављају што ређе. Уколико се и поред свих мера превенције развију компликације, у зависности од типа компликација ДМ приступа се и лечењу. Код акутних компликација што је дијабетесна кетоацидоза, терапијски приступ подразумева: добру интравенску рехидрацију, надокнаду електролита и апликацију инсулина. Сматра се да је адекватна рехидратација пацијената и надокнада електролита од виталног значаја у дијабетесној кетоацидоза. Надокнада течности и електролита мора да се врши лагано, у дужем временском периоду, јер циљ терапије није само постићи нормогликемију, него успоставити електролитни баланс у организму, без последица по живот.

Лактатна ацидоза такође представља једну од акутних компликација ДМ а праћена је порастом нивоа лактата више од 5 mmol/L. Лечење лактатне ацидозе у дијабетесу се заснива на адекватној интравенској надокнади бикарбоната до нормализације рН крви.

У терапији хипогликемија, у зависности од степена, користи се надокнада глукозе у било ком облику.

Хроничне компликације дијабетеса су дуготрајне, прогресивне и животно угрожавајуће, а да би се оне одложиле неопходна је добра гликемијска контрола и редовне годишње контроле. Дијабетесна полинеуропатија је честа компликација ДМ тип 1 и 2 и јавља се код око 50% пацијената са ДМ, старијих од 60 година. Присутни су скоро сви наведени типови полинеуропатије, а основни циљ у лечењу дијабетесне полинеуропатије је смањење бола, тако да се препоручује примена лекова за

ублажавање специфичних симптома дисталне и аутономне полинеуропатије. Најчешће се примењују антидепресиви, укуључујући и трицикличне антидепресиве, антиконвулзиви, а повремено и опијатни аналгетици. (62, 161)

Дијабетесна ретинопатија представља најчешћи узрок слепила код радно способног становништва старости од 20-65 година. Међутим, задовољавајућом гликорегулацијом и редовним контролама, може се спречити или бар одложити код великог броја пацијаната оболелих од ДМ. Фактори ризика за настанак оболења ретине код дијабетес мелитуса су: лоша контрола гликемије, повећан крвни притисак, дужина трајања дијабетеса, микроалбуминурија и протеинурија, повећани триглицериди и анемијски синдром. Сматра се да повишен холестерол нема утицај на настанак и прогресију ретинопатије, него је задужен за појаву макуларних ексудата и едема. Да би се ове компликације одложиле неопходно је оптимизовати контролу гликемије, крвног притиска, липидног статуса и редовно вршити контролне прегледе да би се на време предузеле хируршке процедуре.

Дијабетесна нефропатија је врло значајна хронична компликација дијабетеса и представља један од водећих узрока терминалне бубрежне инсуфицијенције, као и смртности у овој фази бубрежног оболења. (86) У основи, дијабетесна нефропатија је гломерулско обољење које се испољава у оба типа дијабетеса и у току развоја пролази кроз пет основних фаза.

Табела 5. Фазе развоја дијабетесне нефропатије

- |   |
|---|
| <ol style="list-style-type: none"><li>1. Фаза гломерулске хиперфилтрација</li><li>2. Фаза нормоалбуминурије</li><li>3. Фаза инципијентне нефропатије (микроалбуминурија, 30-300 mg/24h)</li><li>4. Фаза манифестне протеинурије</li><li>5. Фаза бубрежне инсуфицијенције.</li></ol> |
|---|

Детаљнија проучавања ових фаза су показала да су прве три фазе болести клинички неманифестне а да се тек у четвртој фази појављује протеинурија као знак манифестне нефропатије. Такође, студије су показале да се овај развој може пратити у клиничким условима, одређивањем уринарне екскреције албумина (УЕА) и мерењем артеријског притиска. Применом метаболичке и антихипертензивне интервенције у циљу

постизања оптималне гликорегулације и циљних вредности артеријског притиска, може се успорити прогресија или чак зауставити развој болести али само у прве три фазе развоја овог оболења. Након утврђивања постојања инципијентне нефропатије, у ових пацијената је неопходно посебно праћење не само албуминурије, односно параметара бубрежне функције, него и артеријског притиска као значајног фактора који фаворизује прогресију болести. Терапија у фази инципијентне нефропатије, се своди на контролу артеријског притиска (< 130/80 mmHg) и стриктне контроле гликорегулације (успостављање циљних вредности гликемије и ХБА1Ц у задовољавајућем опсегу). (162) У табелама 6. и 7. су дати терапијски алгоритми за дијабетесну нефропатију.

Табела 6. Терапија инципијентне нефропатије

1. Стриктна контрола артеријског притиска < 130/80mmHg (АЦЕ инхибитори, затим диуретици Хенлеове петље, антагонисти калцијумских канала, блокатори алфа адренергијских рецептора или др.)
2. Стриктна контрола гликорегулације
  - ДМ тип 1: интензивирана инсулинска терапија
  - ДМ тип 2: интензивирана терапија: орални агенси, орални агенси + инсулин, монотерапија инсулином, интензивирана инсулинска терапија

Табела 7. Терапија манифестне нефропатије

1. контрола артеријског притиска
2. контрола гликорегулације
3. отклањање поремећаја нивоа липопротеина
4. отклањање анемије
5. отклањање инфекције
6. редукција уноса протеина (< 0.8 g/kg ТТ)
7. рана примена терапије замене бубрега

У фази манифестне нефропатије, контрола артеријског притиска сразмерна степену очуване бубрежне функције има највећи значај, док нешто мањи значај има успостављање оптималне гликорегулације а повољан ефекат се може постићи отклањањем поремећаја нивоа липопротеина, анемије, инфекције, редукцијом уноса протеина, као и ранијом применом терапије замене бубрега.

## 2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

На основу података изнетих у уводу, постављене су следеће радне хипотезе:

- Концентрација колагена тип IV, трансферина и L-FABP у урину пацијената са дијабетес мелитусом тип 2 корелира са дужином трајања болести и индексом телесне масе, а независна је од гликорегулације
- Повишене концентрације колагена тип IV, трансферина и L-FABP у урину пацијената са дијабетес мелитусом тип 2 се детектују пре појаве микроалбуминурије
- Колаген тип IV, трансферин и L-FABP могу бити сензитивни и специфични биомаркери инципијентне дијабетесне нефропатије

Ради провере радне хипотезе, поставили смо следеће циљеве истраживања:

- Анализирати пацијенте према полу, годинама старости, дужини трајања ДМ, индексу телесне масе (БМИ) и терапијском модалитету
- Одредити нивое колагена тип IV, трансферина и L-FABP у првом јутарњем и 24-часовном узорку урина пацијената са ДМ и корелисати са вредностима микроалбуминурије
- Корелисати ниво колагена тип IV, трансферина и L-FABP са дужином трајања дијабетеса и гликорегулацијом исказано преко ХБА1Ц
- Испитати да ли ниво колагена тип IV, трансферина и L-FABP корелише са развојем дијабетесне ретинопатије и који од ових биомаркера је најспецифичнији за постојање ретинопатије
- Одредити сензитивност и специфичност уринарних биомаркера за рано постављање дијагнозе ДН.



### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

#### 3.1 Подаци о испитаницима и анализираним узорцима

##### 3.1.1 Клиничке карактеристике групе оболелих

Истраживањем је обухваћено 80 пацијента са постављеном дијагнозом дијабетес мелитуса тип 2 најмање годину дана пре првог прегледа. Пацијенти су подељени у две групе, прва група они који су имали нормалну екскрецију албумина до 30 mg/дан и друга група су били микроалбуминурични, а њихова уринарна екскреција албумина је била у распону од 30-300 mg/дан. Није било статистички значајне разлике између група према полу, годинама живота и бубрежној функцији.

Током истраживања код свих испитаника оболелих од дијабетес мелитуса тип 2 одређено је следеће:

- Основни подаци о пацијентима: пол, животна доб, телесна маса, телесна висина и индекс телесне масе (енгл. скр. *BMI-Body Mass Index*). Индекс телесне масе је одређен према формули: телесна тежина / (телесна висина)<sup>2</sup> и изражено у  $kg/m^2$ . Пацијенти су према вредности *BMI* подељени у 3 групе јер није било потхрањених испитаника.
  1. нормално ухрањени ( $BMI$  18,5-24,9  $kg/m^2$ ),
  2. умерено гојазни ( $BMI$  25-29,9  $kg/m^2$ )
  3. гојазни ( $BMI \geq 30$   $kg/m^2$ ).
- Анамнестички и подаци на првом прегледу, о постојању акутних или хроничних бубрежних болести, артеријске хипертензије, малигних болести, навика у пушењу и постојању породичног оптерећења за дијабетес мелитус.
- Узорак крви за одређивање основног хематолошког и биохемијског профила: комплетна крвна слика, уреа, креатинин, гликемија, ХБА1Ц, албумини, липидни статус, калијум, натријум, калцијум.

- Ултразвучни преглед абдомена ради утврђивања морфолошких карактеристика бубрега и искључивање калкулозе и хипофункције или атрофије једног бубрега.
- Офталмолошки преглед ради верификовања дијабетесне ретинопатије и типа промена, уколико постоје.
- Одређен је клиренс креатинина применом *CKD-EPI* формуле:  $(GFR = 141 \times \min(S_{cr}/\kappa, 1)^\alpha \times \max(S_{cr}/\kappa, 1)^{-1.209} \times 0.993 \text{ ж. доб} \times 1.018$  [ако је особа женског пола]) и изражен у  $ml/min/1,73 m^2$ . (163)
- Узет је узорак првог јутарњег урина и 24 – часовног урина и у року од 4 сата од тренутка узимања замрзнут на  $-80^\circ C$  ради одређивања концентрације, креатинина, колагена тип IV, трансферина и L-FABP
- Узет узорак 24-часовног урина, у два наврата у року од 6 месеци, ради одређивања албуминурије и одмах анализиран у биохемијској лабораторији

Укључујући критеријуми за испитивање били су:

1. старији од 18 година
2. дужина трајања ДМ најмање једну годину
3. потписан формулар информисаног пристанка

Искључујући критеријуми за испитивање су били:

1. клиренс креатинина мањи од  $60 ml/min/1,73 m^2$  израчунати применом *CKD-EPI* формуле
2. податак да се пацијент лечи или је раније лечен од неког бубрежног оболења
3. уринарне инфекције у последње 4 недеље пре испитивања
4. физичка активност 72 сата пре испитивања
5. трудноћа
6. нерегулисан крвни притисак (ТА више од 160/90 mmHg) 72 сата пре испитивања

7. примена лекова и супстанци које могу утицати на испитиване параметре (SGLT-2 инхибитори, контрастна средства у последњих 10 дана, нефротоксични лекови)
8. системске болести везивног ткива
9. све малигне болести изузев базоцелуларног карцинома коже
10. повреда протокола студије.

### 3.1.2 Клиничке карактеристике контролне групе

Контролну групу чинило је само 10 одраслих, здравих особа, који су потписали информисани пристанак за учешће у студији. Како од стране произвођача реагенаса нису дефинисане граничне вредности биомаркера у урину, него само најнижа детектабилна доза, контролна група нам је служила да се одреди ниво реагенса код здравих да бисмо апроксимативно знали најмање дозе испитиваних маркера у урину здраве популације.

Од свих особа узет је један узорак крви за одређивање крвне слике, урее, креатинина, гликемије, ХБА1Ц, албумина, калијума, натријума, калцијума, липидног статуса и један узорак 24-часовног урина и првог јутарњег урина за одређивање биомаркера, албуминурије и креатинина.

### 3.2 Одређивање концентрације колагена тип IV у урину

За одређивање концентрације колагена тип IV, код свих пацијената је узет узорак првог јутарњег урина, и 24-часовног урина сакупљеног претходног дана. Да би се одстранио талог, узорци су центрифугирани на 1000 g у трајању од 20 минута. Течни део је одливен у епендорфе запремине 1,5 ml и до момента анализе замрзнут на -80°C. Концентрација колагена тип IV у урину одређена је применом *ELISA* комерцијалног имуноензимског теста (*ELISA, Elabsience Biotechnology Co., Ltd*). Добијене вредности су изражене у апсолутној концентрацији (ng/ml) и коригованој према концентрацији креатинина у датом узорку урина и изражене у ng/mgU<sub>Cr</sub>. Концентрација креатинина у урину је одређена модификованом *Jaffe* методом (Cockcroft DW).

Тест за одређивање колагена тип IV се заснива на квантитативној сендвич ензим имуноесеј техници. У тесту су коришћене полистиренске плоче са 96 бунарчића. Дно сваког бунарчића је обложено моноклонским антителима специфичним за колаген тип IV. Узорци су додати у сваки бунарчић и уколико је колаген тип IV присутан, везивао се за антитело претходно обложеног бунарчића. Након испирања, у сваки простор микроплоче додат је коњугат кога су чинила поликлонска антитела везана за пероксидазу рена специфичну према колагену тип IV. Поступак испирања је поновљен и додат је супстрат. Ради квантификације колагена додат је коњугат (поликлонско антитело везано за пероксидазу рена – HRP), а након одређеног инкубационог периода је дошло до реакције између колагена и коњугата и промене боје. Реакција је завршена додавањем сумпорне киселине, као раствора за стопирање при чему је дошло до појаве жуте боје. Интензитет боје је био пропорционалан количини везаног колагена, а одређен је спектрофотометријски на таласној дужини од  $450 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$ . Минимална доза колагена која се може детектовати у урину овом методом износи  $0,78\text{-}50 \text{ ng/ml}$ . Концентрација колагена тип IV у сваком узорку исказана је у апсолутној концентрацији  $\text{ng/ml}$  и коригованој концентрацији према вредности креатинина у датом узорку урина и исказана у  $\mu\text{g/gCr}$ . Концентрација креатинина у урину је одређена модификованом *Jaffe* методом.

### 3.3 Одређивање концентрације трансферина у урину

Као и за одређивање концентрације колагена, анализа за уринарни трансферин је рађена на предходно узетим узорцима (24h урин и први јутарњи урин) који су до момента анализе бити замрзнути на  $-80^\circ\text{C}$ . Трансферин је одређен применом *ELISA* комерцијалног имуноензимског теста (*ELISA, Elabsience Biotechnology Co.,Ltd*). Тест је заснован на квантитативној сендвич ензим имуноесеј техници. У тесту су коришћене полистиренске плоче са 96 бунарчића. Дно сваког бунарчића обложено је антителима специфичним за трансферин. У сваки бунарчић микроплоче обложен биотин-коњугованим поликлонским антителима специфичним за трансферин и Авидином који је коњугован са пероксидазом рена, додат је узорак урина. Слободне компоненте су испране. Присуство трансферина у узорку урина изазвало је промену

боје. Коњугат је извршио и визуелизацију присутног трансферина настанком плаве боје која је након додавања сумпорне киселине, као раствора за заустављање процеса прешла у жуту боју. Интензитет жуте, измерен спектрофотометријски на таласној дужини од  $450\text{nm} \pm 2\text{nm}$ , је директно пропорционалан количини везаног трансферина. Минимална детектабилна доза трансферина овом методом је око  $1,56 \text{ ng/mL}$ . Концентрација трансферина у сваком узорку исказана је у апсолутној концентрацији, у  $\text{ng/mL}$  и коригованој концентрацији према вредности креатинина у датом узорку урина, у  $\mu\text{g/gCr}$ .

### 3.4 Одређивање концентрације L-FABP у урину

Одређивање L-FABP је као и остали биомаркери, рађено из претходно узетих узорака првог јутарњег и 24-часовног урина који су до момента анализе бити замрзнути на  $-80^\circ\text{C}$ . L-FABP је одређен применом ELISA комерцијалног имуноензимског теста (*ELISA, Elabsience Biotechnology Co. Ltd*) и изражен у  $\text{ng/mL}$ . Тест се заснива на квантитативној сендвич ензим имуноесеј техници. Коришћене су полистиренске плоче са 96 бунарчића који су обложени моноклонским антителима специфичним за L-FABP.

Након уклањања невезаних протеина испирањем, додат је коњугат (поликлонска антитела везана за пероксидазу рена) специфичан према L-FABP, а потом извршено још једно испирање. Након одређеног инкубационог периода је дошло до реакције између L-FABP и коњугата и промене боје. Реакција је завршена додавањем сумпорне киселине, као раствора за заустављање процеса и појавом жуте боје. Интензитет боје је пропорционалан количини везаног колагена, а одређује се спектрофотометријски на таласној дужини од  $450\text{nm} \pm 2\text{nm}$  у трајању од 10 минута. Минимална концентрација L-FABP која се може детектовати у урину применом овог теста износи  $3.75 \text{ ng/mL}$ . Концентрација L-FABP у сваком узорку исказана је у апсолутној конентрацији ( $\text{ng/mL}$ ) и коригованој концентрацији према вредности креатинина у датом узорку урина и исказана у  $\mu\text{g/gCr}$ . Концентрација креатинина у урину је одређена модификованом *Jaffe* методом.

### 3.5 Одређивање крвне слике и биохемијских параметара крви

#### Крвна слика

Параметри крвне слике су анализирани из вакутајнера са љубичастом бојом чепца (пуна крв), који као атикоагуланс садрже К2ЕДТА (1,8 мг К2ЕДТА по *ml* крви). Крвна слика је одређена методом проточне цитометрије (*flow cytometry*) за ћелијске елементе, док је хемоглобин одређен фотометријски. Испитивање је вршено на хематолошком бројачу *Advia 120*, произвођача *Siemens*.

Референтна вредност хемоглобина за жене је износила: 115-165 *mg/dl* и за мушкарце: 130-180 *mg/dl*. Под анемијским синдромом се подразумевала свака вредност хемоглобина мања од 115 *mg/dl* за жене, тј мања од 130 *mg/dl* за мушкарце.

Уреа, креатинин, гликемија, ХБА1Ц, албумин, калијум, натријум, калцијум холестерол ХДЛ холестерол, ЛДЛ холестерол и триглицериди су анализирани из серума, након центрифугирања узорка пуне крви.

#### Уреа

Квантитативно одређивање урее је вршено спектрофотометријском УВ методом са уреазом и глутамат-дехидрогеназом, на апарату *Dimension RxL Max*, произвођача *Simenes Health Care Diagnostics, Erlangen, Germany*. Референтне вредности износе од 2,5 до 7,5 *mmol/L*.

#### Креатинин

Вредности креатинина у серуму пацијената су одређиване модификованом *Jaffe* методом, на апарату *Dimension RxL Max*, произвођача *Simenes Health Care Diagnostics, Erlangen, Germany*. Референтне вредности су различите у зависности од пола и износе 44 до 88  $\mu\text{mol/L}$  код жена и 53 до 106  $\mu\text{mol/L}$  код мушкараца.

#### Гликемија

Базална концентрација глукозе у серуму одређивана је након најмање 8 сати гладовања. Метода је адаптација хексокиназе-глукозо-6-фосфат дехидрогеназног метода. Ендпоинт бихроматска спектрофотометрија на 340 $\text{nm}$  и 383 $\text{nm}$ . Анализа је

рађена коришћењем аутоанализатора *Dimesion RxL Max* произвођача *Simenes Health Care Diagnostics, Erlangen, Germany*. Референтне вредности су у опсегу од 4,1 до 5,9 *mmol/L*.

#### Гликозилирани хемоглобин (ХБА1Ц)

Гликозилирани хемоглобин је анализиран из епрувете за крвну слику, у којој је као антикоагуланс присутан К2ЕДТА (1,8 мг К2ЕДТА по *ml* крви). Мере се ХБА1Ц и хемоглибин. Мерење ХБА1Ц се заснива на принципу турбидиметријског инхибиционог имуноодређивања (ТINIA), а мерење укупног хемоглобина се заснива на модификацији алкалне хематин реакције. Мерење је вршено на апарату *Dimesion RxL Max* произвођача *Simenes Health Care Diagnostics, Erlangen, Germany*. Овом техником се одређује ХБА1Ц и укупни хемоглобин, у сваком узорку, а након тога се ХБА1Ц представља или као проценат укупног хемоглобина (%) или као *mmol/mol* укупног хемоглобина. Референтне вредности изражене у процентима и износе од 4,0-6,0% или 20-42 *mmol/mol* хемоглобина.

#### Албумин

Анализа албумина у серуму испитиваних група извођена је спектрофотометријски са бром-крезол љубичастим, на апарату *Dimesion RxL Max* произвођача *Simenes Health Care Diagnostics, Erlangen, Germany*. Референтне вредности износе 32-50 *g/L*.

#### Калијум

Анализа концентрације калијума у серуму испитиваних група урађена је методом индиректне потенциометрије, на апарату *Dimesion RxL Max* произвођача *Simenes Health Care Diagnostics, Erlangen, Germany*. Референтне вредности су од 3,5 до 5,1 *mmol/L*.

#### Калцијум

Одређивање концентрације калцијума у серуму испитиваних пацијената је вршено спектрофотометријски са о-крезолфталеином, на апарату *Dimesion RxL Max* произвођача *Simenes Health Care Diagnostics, Erlangen, Germany*. Референтне вредности су од 2,15 до 2,55 *mmol/L*.

#### Холестерол

Одређивање нивоа холестерола у у серуму испитиваних пацијената је вршено спектрофотометријски на апарату *Dimesion RxL Max* произвођача *Simenes Health Care Diagnostics, Erlangen, Germany*.

Вредности су изражене у *mmol/L* а препоручене референтне вредности су мање од 5,2, гранично ризичне вредности холестерола су од 5,2 до 6,2 *mmol/L*, док су ризичне вредности преко 6,2 *mmol/L*

#### ХДЛ холестерол

Фракција доброг холестерола се одређује као и укупан холестерол из серума, спектрофотометријски, на апарату *Dimesion RxL Max* произвођача *Simenes Health Care Diagnostics, Erlangen, Germany*.

Вредности су изражене у *mmol/L* а препоручене референтне вредности су веће од 1,3*mmol/L*, гранично ризичне вредности ХДЛ холестерола су од 1,0 до 1,3*mmol/L*, а ризичне вредности су мање од 1,0*mmol/L*

#### ЛДЛ холестерол

За разлику од укупног холестерола и холестерола високе густине липопротеина (ХДЛ), вредности за ЛДЛ су добијене прорачуном на апарату *Dimesion RxL Max* произвођача *Simenes Health Care Diagnostics, Erlangen, Germany* из добијених вредности два наведена холестерола за одређеног пацијентана.

Препоручене вредности за ЛДЛ су мање од 3,5*mmol/L*, од 3,5 до 4,1*mmol/L*, су гранично ризичне вредности ЛДЛ холестерола, док вредности веће од 4,1*mmol/L*, представљају ризичне вредности.

#### Триглицериди

Одређивање нивоа триглицерида у серуму је вршено спектрофотометријски на апарату *Dimesion RxL Max* произвођача *Simenes Health Care Diagnostics, Erlangen, Germany*. Пожељне вредности износе мање од 1,7*mmol/L*, гранично ризичне вредности триглицерида су од 1,7 до 2,29*mmol/L*, а ризичне вредности триглицерида су преко 2,3*mmol/L*



### Микроалбуминурија

Микроалбуминурија је рађена на апарату *Nephelometer BNII*, некадашњи произвођач *Dade Behring*. Метода је имунохемијска, стварају се имуни комплекси са одговарајућим антителима. Мерење је нефелометријско, а мери се интензитет расуте светлости који је пропорционалан концентрацији одговарајућег протеина у узорку. Референтне вредности су од 0,00 до 30,00 *mg/L*, а укупна микроалбуминурија се израчунава према дневној диурези.

### Ехотомографија абдомена

На ултразвучном апарату *Toshiba Aplio 300 ultrasound imaging system*, вршен је морфолошки преглед бубрега.

### 3.6 Статистичка обрада података

У статистичкој обради нумерички подаци су презентовани као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација (SD) или као медијана са интерквartilним опсегом (IQR) у зависности од нормалности расподеле података. Категоријалне варијабле су приказане у виду апсолутних бројева са процентима. У зависности од нормалности расподеле, која је проверена Kolmogorov-Smirnov тестом, за поређење континуираних варијабли коришћена је параметарска једнофакторска нумеричка анализа варијансе (ANOVA) и Студентов *t*-тест за независне узорке (у зависности од броја поређених група), уколико су вредности континуалних варијабли у нормалној расподели, или применом Mann–Whitney *U* теста или Kruskal-Wallis непараметријске ANOVA-е уколико вредности континуалних варијабли нису у нормалној расподели. За испитивање повезаности континуалних варијабли је коришћена Pearson's и Spearman's  $\rho$  корелациона анализа, а јачина корелације је утврђена на основи Кохенових критеријума према којима се региструје слаба корелација уколико износи мање од 0,29, у распону од 0,30 до 0,49 је средње јака корелација, а изузетно јака корелација постоји уколико је вредност коефицијента корелације већи од 0,50.

За утврђивање сензитивности и специфичности испитиваних биомаркера као и њихове статистичке значајности и дијагностике ефикасности као и утврђивања

дијагностичког потенцијала уринарног колагена тип IV, трансферина и L-FABP коришћена је методологија ROC криве (енгл. скр. *Receiver-Operating-characteristic Curve*). За одређивање површине испод *ROC* криве и одговарајуће 95% интервале поверења ( $\pm 95\%$  CI, engl. Confidence Interval), коришћен је *DeLong* метод. За најбољу граничну вредност (P/N ratio, cut-off скор), тј. вредност са значајним дијагностичким потенцијалом изабрана је вредност за коју је постигнута максимална сензитивност и специфичност за одређени биомаркер. У свим статистичким тестовима, вредност вероватноће  $p < 0.05$  је сматрана значајном, а добијени резултати истраживања су приказани табеларно (MS Word 2016) и графички (MS Excel 2016). Сви статистички прорачуни су урађени помоћу комерцијалног програма SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 24.0.

## 4. РЕЗУЛТАТИ

### 4.1 Опште карактеристике испитаника

Спроведеним испитивањем било је обухваћено 80 пацијената оболелих од дијабетес мелитуса тип 2 који су били подељени у две групе, а само ради одређивања концентрације уринарних биомаркера укључено је 10 здравих испитаника.

У табели број 8 су приказани дескриптивни подаци клиничких карактеристика испитиваних група.

Табела 8. Дескриптивни подаци клиничких карактеристика испитиваних група

Карактеристике	Укупно (N=80)	Албум.<30mg/24h (N=47)	Албум.≥30mg/24h (N=33)	Здрави (N=10)
	$\bar{x}\pm SD$	$\bar{x}\pm SD$	$\bar{x}\pm SD$	$\bar{x}\pm SD$
Пол (М/Ж)	44/36	27/20	17/16	5/5
Старост (године)	59,85±8,87	60,49±8,73	58,94±9,13	55±10,59
Креатинин у серуму ( $\mu\text{mol/L}$ )	75,38±15,04	76,64±15,97	73,58±13,64	73,60±7,60
ЈГФ ( $\text{mL/min /1,73m}^2$ )	86,86±14,18	85,78±13,55	88,39±15,12	92,84±9,06

Група која је имала манифестну албуминурију већу од 30 mg/24h, се сматрала групом оболелих јер у овој групи испитаника већ постоје, до сада познати и прихваћени први знаци манифестне дијабетесне нефропатије. Ову групу чинило је 33 пацијента (41,25%) од чега је било 17 (51,52%) особа мушког пола и 16 пацијената (48,48%) женског пола, просечне старости 58,94±9,13, и распоном од 42 до 73 године. У групи здравих је било 47 (58,75%) пацијената од чега је било 27 (57,45%) пацијената мушког пола и 20 (42,55%) пацијената женског пола, просечне старости 60,49±8,73 година, са распоном од 38 до 72 године. Групу здравих испитаника, који нису имали дијабетес и било које друго, хронично обољење је чинило 10 испитаника, подједнаког броја мушкараца и жена, просечне старости 55±10,59 година са распоном од 40-73 године. Групе су биле хомогене по полу, старости и бубрежној функцији исказаној преко концентрације серумског креатинина и јачине гломерулске филтрације

Просечна животна доб испитаника је била  $59,85 \pm 8,87$  година, са најмлађим пацијентом који је имао 38 и најстаријим од 73 године, док је медијана износила 60,5 година. По старосној категорији, млађих од 55 година било је 27 (33,75%), старијих од 55 година било је 53 (66,25%) пацијента, док се највећи број испитаника (43,8%) налазило у групи од 61-70 година.

Старосна структура је приказана на графикану 1.



Графикон 1. Старосна структура болесника

Када се, осим дескриптивних карактеристика, у испитиваној групи додају и навике у пушењу, вредности крвног притиска, индекс телесне масе и микролабумниурија, добијамо дескриптивно-епидемиолошке податке испитаника који су приказани у табели 9.

Табела 9. Дескриптивно-епидемиолошке карактеристике оболелих од дијабетес мелитуса тип 2, према вредности албуминурије

Карактеристике	Албум. $\geq$ 30mg/24h (N=33)	Албум.<30mg/24h (N=47)	Укупно (N=80)	P
<b>Пол</b>				0,276
Жене	16 (36.59%)	20 (36.59%)	36 (55%)	
Мушкарци	17 (63.41%)	27 (63.41%)	44 (45%)	
<b>Старост</b>				0,449
Средња вредност $\pm$ SD	58,94 $\pm$ 9,13	60,49 $\pm$ 8,73	59,85 $\pm$ 8,871	
Медијана (опсег)	60 (38-73)	54 (38-73)	60 (38-73)	
<b>Старост-категије</b>				
<55 година	12 (36,36%)	15 (31,91%)	27 (33,75%)	
>55 година	21 (63,64%)	32 (68,09%)	53 (66,25%)	
<b>БМИ</b>				0,106
Средња вредност $\pm$ SD	28,38 $\pm$ 5,31	26,64 $\pm$ 3,56	27,36 $\pm$ 4,42	
<b>БМИ-категије</b>				
18.5-24.9	9 (27,27%)	16 (34,04%)	25 (31,25%)	
25-29.9	14 (42,43%)	22 (46,81%)	36 (45%)	
$\geq$ 30	10 (30,30%)	9 (19,15%)	19 (23,75%)	
<b>Пушачи</b>	13 (39,39%)	26 (55,32%)	39 (48,75 %)	
<b>Систолни притисак</b>				0,411
Средња вредност $\pm$ SD	136,21 $\pm$ 15,71	133,47 $\pm$ 12,87	134,6 $\pm$ 14,08	
Медијана (опсег)	130 (110-180)	130 (110-160)	130 (110-180)	
<b>Дијастолни притисак</b>				0,389
Средња вредност $\pm$ SD	82,42 $\pm$ 7,72	80,96 $\pm$ 7,42	81,5 $\pm$ 7,53	
Медијана (опсег)	80 (60-100)	80 (65-100)	80 (60-100)	
<b>Дужина трајања ДМ</b>				0,942
Средња вредност $\pm$ SD	13,21 $\pm$ 7,73	13,34 $\pm$ 7,74	13,29 $\pm$ 7,69	
Медијана (опсег)	12 (3-32)	13 (1-30)	12 (1-32)	
<b>Микроалбуминурија</b>				0,001
Средња вредност $\pm$ SD	67,75 $\pm$ 52,90	21,24 $\pm$ 3,72	40,42 $\pm$ 40,89	
Медијана (опсег)	47,0 (30,0-250)	21,84(10,48-29,9)	25,0(10,5-250)	
<b>Укупно</b>	33 (100%)	47 (100%)	80 (100%)	

У популацији од 80 испитиваних болесника није било потхрањених. Вредност БМИ се кретала од 20,31 до 43,20  $kg/m^2$  са просечном вредности од 27,36  $kg/m^2$ .

Број пацијената чија је телесна тежина била у опсегу од 18,50 до 24,90  $kg/m^2$  био је укупно 25 (31,25%) од чега је 9 пацијента било у групи микроалбуминуричних (11,25%) од укупног броја испитаника, а њих 16 (34,04%) тј, 20% од укупног броја је било у групи нормоалбуминуричних.

Највећи број пацијената се налазио у групи која је имала прекомерну телесну тежину са БМИ 25-29,90  $kg/m^2$ , где се налазило 22 испитаника (46,81%) од броја нормоалбуминуричних тј. 27,5% од укупног броја пацијената и 14 (42,43%) испитаника са микролабуминуријом тј. 17,50% пацијената од укупног броја.

Гојазно је било 19 (23,75%) пацијената, од чега је 9 (19,15%) било нормоалбуминурично, тј. 11,25% од укупног броја, док је 10 (30,30%) гојазних пацијената било у групи који су били нормоалбуминурични, што је 12,5% од укупног броја испитаника.

Што се тиче навика у пушењу, било је 39 (48,75%) пушача, од чега је у групи микроалбуминуричних било 13 (39,39%), а у групи нормоалбуминуричних је било 26 (55,32%) пацијената. Непушачи су били заступљени са 41 (51,25%) од укупног броја испитаника.

Вредности систолног притиска су се кретале од 110-180 mmHg, а дијастолног од 60-100 mmHg, без значајних разлика по групама.

Дужина трајања дијабетеса се такође није разликовала у испитиваним групама, али је за вредност микролабуминурије постојала статистички значајна разлика између групе која је имала микроалбуминурију и нормоалбуминуричних пацијената ( $p < 0,001$ ).

## 4.1.1 Биохемијски параметри крви

Табела 10. Дескриптивни подаци испитиваних биохемијских параметара

Карактеристике	Албум. ≥30mg/24h	Албум. <30mg/24h	Укупно	p
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	
Број еритроцита $\times 10^{12}$	4,68±0,35	4,58±0,42	4,62±0,40	0,265
Конц. хемоглобина (mg/dl)	136,24±9,22	131,70±22,49	133,58±18,28	0,216
Уреа	5,98±1,29	6,13±1,67	6,07±1,52	0,656
Креатинин	73,57±13,64	76,64±15,97	73,37±14,18	0,360
Гликемија	10,33±3,38	8,50±2,95	9,25±3,24	0,150
ХБА1Ц	8,06±1,45	7,25±1,15	7,59±1,34	0,090
Холестерол	4,99±0,95	4,91±1,08	4,94±1,02	0,707
ХДЛ холестерол	1,29±0,28	1,32±0,34	1,30±0,32	0,701
ЛДЛ холестерол	2,92±0,88	2,78±0,88	2,83±0,87	0,514
Триглицериди	2,04±1,84	1,79±0,92	1,89±1,37	0,477

## 4.2 Уринарна концентрација колагена тип IV

У обе групе оболелих од дијабетеса, групи са нормалним уринарним албуминима и групи микроалбуминуричних одређена је апсолутна концентрација колагена тип IV (*ng/ml*) у првом јутарњем и у 24h урину, а њихове вредности приказане су у табели бр.11.

Табела 11. Апсолутне вредности концентрација уринарног колагена тип IV (*ng/ml*) у првом јутарњем и 24-часовном урину.

Концентрација колагена тип IV ( <i>ng/ml</i> )	Албум. ≥30mg/24h (N=33)	Албум. <30mg/24h (N=47)	Pearson's r	p
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$		
	Медијана (опсег)	Медијана (опсег)		
Колаген тип IV у 24h урину	0,636±0,49 1,00 (0,00-1,00)	0,362±0,27 0,41 (0,00-1,00)	0,244	0,002
Колаген тип IV у јутарњем урину	0,969±0,17 1,00 (0,00-1,00)	0,548±0,29 0,53 (0,00-1,00)	0,384	<0,001

Из табеле 11 се види да су вредности колагена тип IV код пацијената чије је излучивање албумина било веће од 30 *mg/24h* биле статистички значајно веће у

поређењу са групом пацијената код којих су вредности микролабуминурије биле у референтном опсегу.

Просечне вредности колагена тип IV у обе групе оболелих су биле значајно веће од вредности измерених у здравој популацији где је средња вредност овог биомаркера била  $0,22 \pm 0,12$  за концентрацију колагена у 24-часовном урину и  $0,22 \pm 1,21 \text{ ng/ml}$ , колико је била концентрација колагена у првом јутарњем урину.

Поред апсолутне, одређена и концентрација уринарног колагена коригована према концентрацији креатинина у узорку урина и изражена у  $\mu\text{g/gCr}$ . Вредности коригованих концентрација колагена су одређене у односу на вредности у првом јутарњем и 24-часовном урину, а резултати су приказани у табели 12.

Табела 12. Кориговане концентрације уринарног колагена тип IV ( $\mu\text{g/gCr}$ ) у првом јутарњем и у 24-часовном узорку урина.

Концентрација колагена тип IV ( $\mu\text{g/gCr}$ ).	Албум $\geq 30\text{mg}/24\text{h}$ (N=33)	Албум $< 30\text{mg}/24\text{h}$ (N=47)	Pearson's <i>r</i>	<i>p</i>
	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$		
	Медијана (опсег)	Медијана (опсег)		
Колаген тип IV у 24h урина	$1,17 \pm 0,50$ 1,00 (0,00-1,00)	$0,813 \pm 0,33$ 0,81 (0,16-1,41)	0,082	0,004
Колаген тип IV у јутарњем урину	$1,508 \pm 0,68$ 1,39 (0,48-4,08)	$0,956 \pm 0,42$ 0,88 (0,189-2,28)	0,088	<0,001

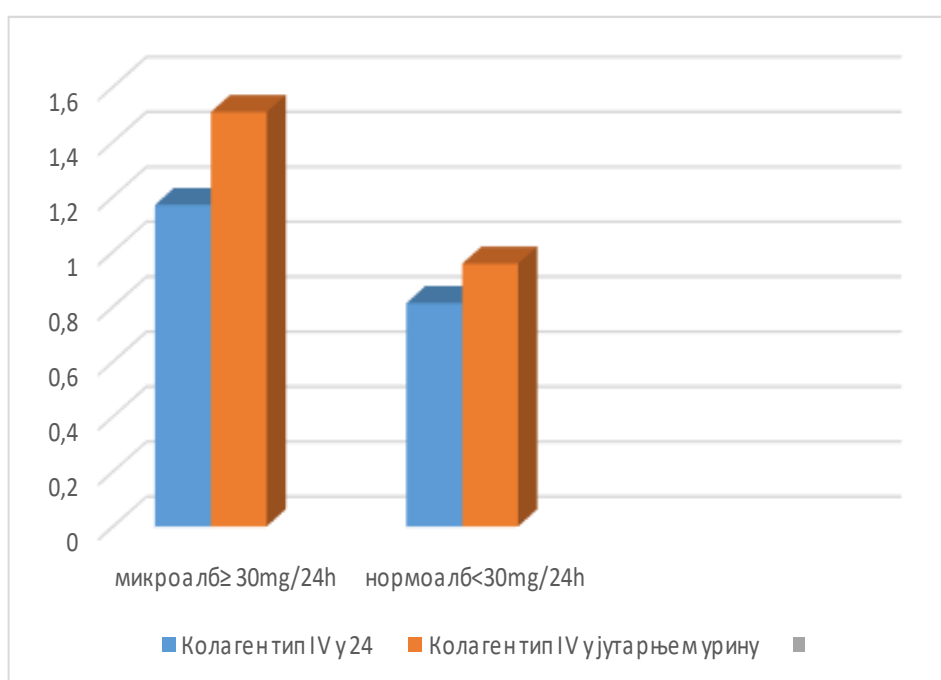
И у коригованим, као и у апсолутним вредностима уринарног колагена, нађена је статистички значајна разлика између група које су имале микроалбуминурију и оних који нису,  $p < 0,001$ .

Коригована вредност колагена тип IV у јутарњем урину код пацијената који су имали микролабуминурију је износила  $1,508 \pm 0,68 \mu\text{g/gCr}$ , са медијаном од 1,39 и опсегом од 0,48 до 4,08, односно  $0,956 \pm 0,42 \mu\text{g/gCr}$  са медијаном 0,88 и опсегом од 0,189 до 2,28, код пацијената који нису имали микроалбуминурију.



Када се посматрају кориговане вредности колагена тип IV у узорку 24-часовног урина код пацијената који су имали микроалбуминурију просечна вредност је износила  $1,17 \pm 0,50 \mu\text{g/gCr}$ , са медијаном од 1,00 и опсегом од 0,00 до 1,00, односно  $0,813 \pm 0,33 \mu\text{g/gCr}$  са медијаном 0,81 и опсегом од 0,16 до 1,41, код пацијената који нису имали микроалбуминурију.

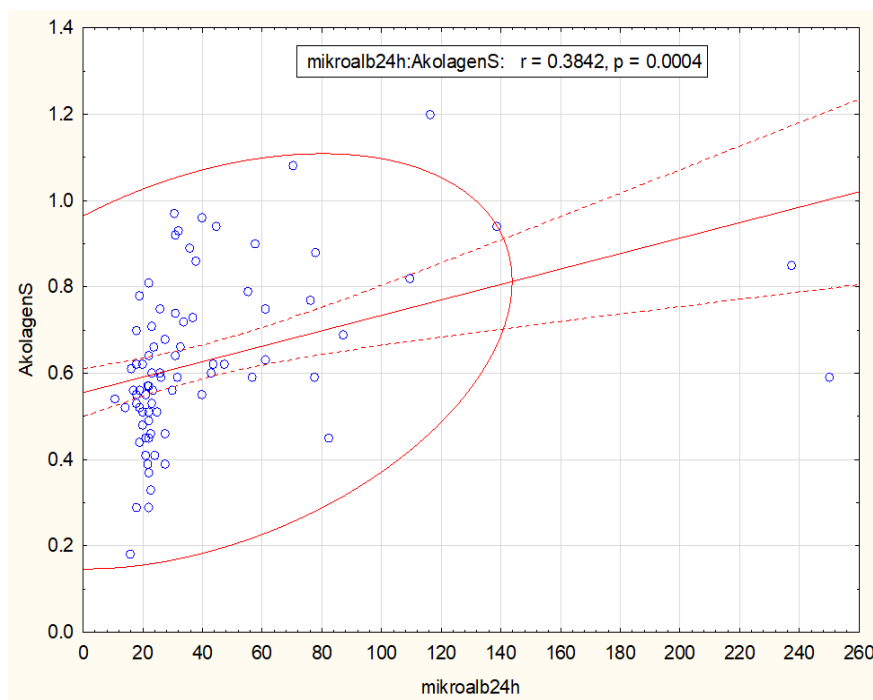
Просечне кориговане вредности уринарног колагена у првом јутарњем и у 24-часовном урину, у односу на микроалбуминурију су приказане на графикону 2.



Графикон 2. Кориговане вредности уринарног колагена тип IV у првом јутарњем и 24-часовном урину, према вредностима микроалбуминурије

Поређењем, апсолутних и коригованих вредности колагена тип IV према микроалбуминурији, у јутарњем и 24- часовном урину добијени су приближно слични резултати, тако да је корелација израчуната за апсолутне вредности јутарњег урина.

Корелација између апсолутне вредности колагена тип IV у првом јутарњем урину и микролабуминурије са *Pearson's* коефицијентом корелације  $r$  0,384 и  $p < 0,001$  је приказана на графикону 3.



Графикон 3. Корелација апсолутне вредности колагена тип IV у првом јутарњем урину са микролабуминуријом

Имајући у виду чињеницу да дужина болести и гликорегулација утичу на појаву компликација, имали смо за циљ да испитамо да ли године дијабетеса и вредност ХБА1Ц утичу на излучивање колагена тип IV.

Према дужини трајања болести пацијенти су подељени у четири групе. У првој групи је било 14 (17,50%) пацијената који су имали дијабетес до 5 година, друга група је чинила испитанике са дужином трајања дијабетеса од 6 до 10 година где се налазило 22 (27,50%) пацијента, у трећој групи је било 18 (22,50%) пацијената који су имали дијабетес од 11 до 15 година, а у четвртој групи 26 (32,50%) пацијената код којих је дужина болести била преко 15 година.

Апсолутне вредности колагена тип IV према дужини трајања дијабетеса су приказане у табели 13.

Табела 13. Апсолутне вредности колагена тип IV (*ng/ml*) према дужини трајања дијабетеса

Концентрација Колагена тип IV ( <i>ng/ml</i> )	Дужина трајања дијабетеса				<i>p</i>
	1-5 год. (N=14)	6-10 год. (N=22)	11-15 год. (N=18)	>15 год (N=26)	
	$\bar{x}\pm SD$	$\bar{x}\pm SD$	$\bar{x}\pm SD$	$\bar{x}\pm SD$	
Колаген у јутарњем урину	0,66±0,20	0,62±0,22	0,63±0,16	0,62±0,18	0,93
Колаген у 24h урину	0,50±0,17	0,50±0,17	0,52±0,12	0,54±0,21	0,82

Анализом утицаја дужине трајања дијабетеса на излучивање колагена тип IV у испитиваној популацији, применом *Anova* закључили смо да не постоји статистички значајна разлика у концентрацији колагена код испитиваних група, тј. да дужина трајања болести нема утицаја на концентрацију излученог колагена. (вредност *p*- 0,82 у 24-часовном урину и *p*- 0,93 у узорку првог јутарњег урина).

Када су вредности уринарног колагена тип IV кориговане према вредностма креатинина добијене су сличне вредности, а резултати су приказани у табели 14.

Табела 14. Кориговане вредности колагена тип IV ( $\mu g/gCr$ ) према дужини трајања дијабетеса

Концентрација Колагена тип IV ( $\mu g/gCr$ )	Дужина трајања дијабетеса				<i>p</i>
	1-5 год. (N=14)	6-10 год. (N=22)	11-15 год. (N=18)	>15 год (N=26)	
	$\bar{x}\pm SD$	$\bar{x}\pm SD$	$\bar{x}\pm SD$	$\bar{x}\pm SD$	
Колаген у јутарњем урину	1,26±0,69	1,03±0,57	1,16±0,35	1,29±0,72	0,50
Колаген у 24h урину	0,93±0,52	0,83±0,42	0,99±0,40	1,07±0,46	0,30

Осим дужине трајања болести, анализирали смо и утицај гликорегулације исказано преко ХБА1Ц на концентрацију уринарног колагена. С обзиром да су испитаници били са дијабетесом тип 2, као граничну вредност прихватљиве гликорегулације одредили смо вредност од 7,0%, а у зависности од просечног нивоа ХБА1Ц све

пацијенте смо поделили у две групе. Број пацијената који су имали ХбА1Ц  $\leq 7,0\%$  био је 43 (53,75%), а 37 пацијената (46,25%) је имало ХбА1Ц  $> 7,0\%$ . Међу пацијентима који су имали задовољавајућу гликорегулацију било је 27 (62,80%) пацијената који су били нормоалбуминурични, док је 16 (37,20%) имало микроалбуминурију. У групи пацијената који су имали лошу гликорегулацију, са ХбА1Ц  $> 7,0\%$  било је 20 (54,05%) пацијената који нису имали микроалбуминурију, док је 17 (45,95%) је било у групи микроалбуминуричних. Апсолутне вредности колагена у односу на ниво ХбА1Ц приказане су у табели 15, док су кориговане вредности за колаген тип IV и ниво ХбА1Ц приказане у табели 16.

Табела 15. Гликорегулација и апсолутне вредности колагена тип IV (*ng/ml*)

Концентрација Колагена тип IV ( <i>ng/ml</i> )	Гликорегулација ХбА1Ц		<i>p</i>
	$\leq 7,0\%$ (N=43)	$> 7,0\%$ (N=37)	
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	
Колаген у јутарњем урину	0,62 $\pm$ 0,21	0,64 $\pm$ 0,17	0,49
Колаген у 24 урину	0,48 $\pm$ 0,17	0,56 $\pm$ 0,18	0,34

Табела 16. Гликорегулација и кориговане вредности колагена тип IV ( $\mu\text{g/gCr}$ )

Концентрација Колагена тип IV ( $\mu\text{g/gCr}$ )	Гликорегулација- ХбА1Ц		<i>p</i>
	$\leq 7,0\%$ (N=43)	$> 7,0\%$ (N=37)	
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	
Колаген у јутарњем урину	1,20 $\pm$ 0,65	1,17 $\pm$ 0,56	0,82
Колаген у 24 урину	0,93 $\pm$ 0,45	1,00 $\pm$ 0,44	0,58

Анализом табела где су приказани резултати који пореде групе према нивоу ХбА1Ц, независно од тога да ли се пореди апсолутна вредност колагена тип IV или коригована према креатинину, може се закључити да не постоји статистички значајна разлика (вредности *p* од 0,34-0,82) између група, тј да гликорегулација нема утицаја на излучивање колагена тип IV.

Анализом ухрањености и индекса телесне масе (БМИ) желели смо да испитамо да ли ухрањеност болесника има утицај на излучивање уринарног колагена тип IV, па су према БМИ пацијенти подељени у три групе, с обзиром да није било потхрањених. У групи нормално ухрањених, који су имали БМИ од 18,5 до 24,9  $kg/m^2$ , било је 25 (31,25%) пацијената, у другој групи пацијената са прекомерном телесном масом и БМИ од 25 до 29,9  $kg/m^2$  је био највећи број 36 (45%) пацијената, док је само 19 (23,75%) пацијената било у групи гојазних са БМИ већим од 30  $kg/m^2$ .

У табели 17 су приказане апсолутне вредности колагена у поређењу са вредностма БМИ.

Табела 17. Апсолутне вредности колагена тип IV ( $ng/ml$ ) и БМИ.

Концентрација Колагена тип IV ( $ng/ml$ )	БМИ ( $kg/m^2$ )			<i>p</i>
	18,5-24,9 (N=25)	25-29,9 (N=36)	>30 (N=19)	
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	
Колаген у јутарњем урину	0,57±0,15	0,65±0,20	0,65±0,20	0,24
Колаген у 24h урину	0,50±0,14	0,51±0,20	0,54±0,17	0,76

Вредности колагена у три испитиване групе према индексу телесне масе нису показале статистичку значајност, а вредност *p* је износила 0,24 и 0,76.

Сличне вредности су добијене и анализом коригованих вредности колагена, тј није нађена статистички значајна разлика у вредностима колагена између три групе испитаника поређених према БМИ.

У табели 18 су приказани добијени резултати средњих вредности концентрације колагена кориговане према креатинину и статистичка значајност у све три испитиване групе пацијената према БМИ.

Табела 18. Кориговане вредности колагена тип IV ( $\mu\text{g/gCr}$ ) и БМИ

Концентрација Колагена тип IV ( $\mu\text{g/gCr}$ )	БМИ ( $\text{kg/m}^2$ )			<i>p</i>
	18,5-24,9. (N=25)	25-29,9 (N=36)	>30 (N=19)	
	$\bar{x}\pm\text{SD}$	$\bar{x}\pm\text{SD}$	$\bar{x}\pm\text{SD}$	
Колаген у јутарњем урину	1,13 $\pm$ 0,44	1,30 $\pm$ 0,71	1,03 $\pm$ 0,55	0,26
Колаген у 24h урину	0,98 $\pm$ 0,40	1,02 $\pm$ 0,52	0,83 $\pm$ 0,35	0,35

Осим наведених параметара, од значаја за наше истраживање је било да утврдимо да ли постоји повезаност између концентрације колагена тип IV и дијабетесне ретинопатије, као друге најчешће хроничне компликације дијабетес мелитуса.

Између две групе пацијената, оних који су имали ретинопатију и без дијабетесне ретинопатије, анализирали смо да ли старост пацијента, БМИ, гликорегулација, дужина трајања дијабетеса, микроалбуминурија и концентрације уринарног колагена у апсолутним и коригованим вредностима имају утицаја на појаву дијабетесне ретинопатије код пацијената у испитиваној популацији.

У групи пацијената који су имали доказану ретинопатију било је 24 (30%), а у групи без ретинопатије 56 (70%) испитаника. Међу пацијентима који су имали ретинопатију, а имали и микроалбуминурију било је 12 (36,36%) пацијената од укупно 33 испитаника који су имали микроалбуминурију, тј 15% од укупног броја од 80 испитаника. Од укупног броја од 47 испитаника који су имали нормално излучивање албумина, њих 12 (25,53%) је имало ретинопатију, док је без ретинопатије било 35 (74,47%) испитаника који нису имали албуминурију, што је 43,75% од укупног броја испитаника.

Резултати који приказују повезаност ретинопатије са годинама пацијента, БМИ, гликорегулацијом, трајањем дијабетеса, микроалбуминуријом и концентрацијом уринарног колагена тип IV у апсолутним и коригованим вредностима, су приказани у табели 19.

Табела 19. Дијабетесна ретинопатија, дескриптивне карактеристике испитаника, микроалбуминурија и концентрација колагена тип IV.

Карактеристике	са ретинопатијом	без ретинопатије	<i>p</i>
	(N=24)	(N=56)	
	$\bar{x}\pm SD$	$\bar{x}\pm SD$	
Старост (године)	62,66±8,07	58,64±8,98	0,540
БМИ ( $kg/m^2$ )	26,52±3,12	27,71±4,85	0,196
ХбА1Ц (%)	7,49±1,36	7,62±1,34	0,690
Трајање дијабетеса (године)	19,958±7,351	10,42±5,87	<0,001
Микроалбуминурија ( $mg/24h$ )	55,50±64,67	33,95±22,60	<0,001
Колаген тип IV ( $ng/ml$ ) у 24h	0,58±0,20	0,49±0,16	0,450
Кориговани колаген тип IV 24h ( $\mu g/gCr$ )	1,04±0,43	0,93±0,46	0,590
Колаген тип IV у јутарњем урину ( $ng/ml$ )	0,66±0,17	0,61±0,20	0,971
Кориговани колаген тип IV у јутарњем урину ( $\mu g/gCr$ )	1,21±0,46	1,18±0,66	0,336

Из резултата приказаних у табели 19 може се закључити да, између две испитиване групе пацијената, са ретинопатијом и без, у погледу старости, индекса телесне масе, гликорегилације и концентрације уринарног колагена тип IV не постоји статистички значајна разлика (вредности *p* су биле од 0,196 до 0,971).

Статистички значајна разлика између поређених група нађена је у дужини трајања дијабетеса тип 2 и микролабуминурији,  $p < 0,001$ .

#### 4.3 Уринарна концентрација трансферина

У обе групе оболелих од дијабетеса одређена је апсолутна концентрација трансферина ( $ng/ml$ ) у првом јутарњем и у 24h урину, а њихове вредности приказане су у табели бр. 20.

Табела 20. Концентрације уринарног трансферина у апсолутним вредностима (*ng/ml*) према албуминурији.

Концентрација трансферина ( <i>ng/ml</i> )	Албум $\geq$ 30mg/24h	Албум $<$ 30mg/24h	Pearson's	
	(N=33)	(N=47)	<i>r</i>	<i>p</i>
	$\bar{x}\pm$ SD	$\bar{x}\pm$ SD		
	Медијана (опсег)	Медијана (опсег)		
Трансферин у 24h урину	50,82 $\pm$ 37,96 37,52 (5,34-167,25)	13,36 $\pm$ 20,70 3,26 (1,16-92,13)	0,531	<0,001
Трансферин у јутарњем урину	45,51 $\pm$ 28,13 35,60(12,31-101,83)	14,83 $\pm$ 18,51 8,32 (1,28-98,98)	0,456	<0,001

Из табеле 20 се може закључити да су измерене вредности трансферина у групи микроалбуминуричних статистички значајно веће ( $p < 0,001$ ) у поређењу са групом пацијената који нису имали микроалбуминурију. Просечне измерене вредности трансферина у обе групе оболелих су биле значајно веће од вредности измерених у здравој популацији што је износило 4,12 $\pm$ 1,45 за концентрацију трансферина у 24h урину и 5,18 $\pm$ 2,41 *ng/ml* у првом јутарњем урину.

Поред апсолутне, одређена и концентрација уринарног трансферина коригована према концентрацији креатинина у узорку урина и изражена у  $\mu\text{g/gCr}$ . Вредности коригованих концентрација трансферина су одређене у односу на вредности у првом јутарњем и 24-часовном урину, а резултати су приказани у табели бр. 21.

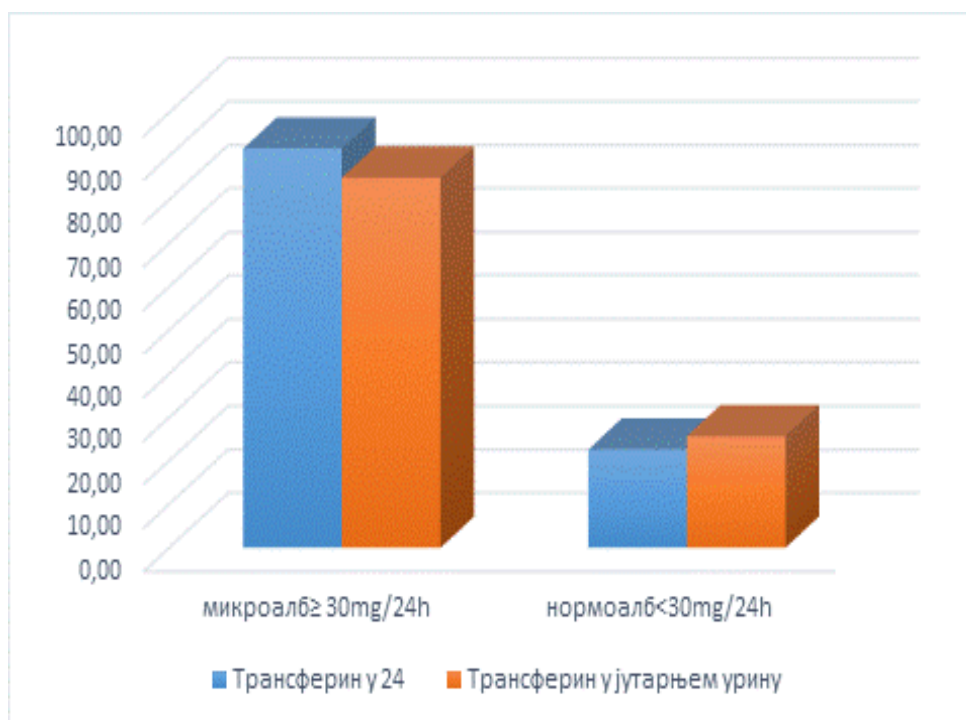
Табела 21. Кориговане концентрације уринарног трансферина ( $\mu\text{g/gCr}$ ) у првом јутарњем и у 24-часовном узорку урина.

Коригована конц. трансферина ( $\mu\text{g/gCr}$ )	Албум $\geq$ 30mg/24h	Албум $<$ 30mg/24h	Pearson's	
	(N=33)	(N=47)	<i>r</i>	<i>p</i>
	$\bar{x}\pm$ SD	$\bar{x}\pm$ SD		
	Медијана (опсег)	Медијана (опсег)		
Трансферин у 24h урину	91,76 $\pm$ 68,45 71,3 (14,04-317,27)	22,56 $\pm$ 31,46 6,57(1,10-147,57)	0,489	<0,001
Трансферин у јутарњем урину	85,07 $\pm$ 56,54 64,14(23,02-196,99)	25,63 $\pm$ 29,85 13,49 (2,11-119,37)	0,354	<0,001

И у коригованим, као и у апсолутним вредностима уринарног трансферина, нађена је статистички значаја разлика између група које су имале микроалбуминурију и оних код којих је излучивање албумина било у рерифтном опсегу, са  $p < 0,001$ .



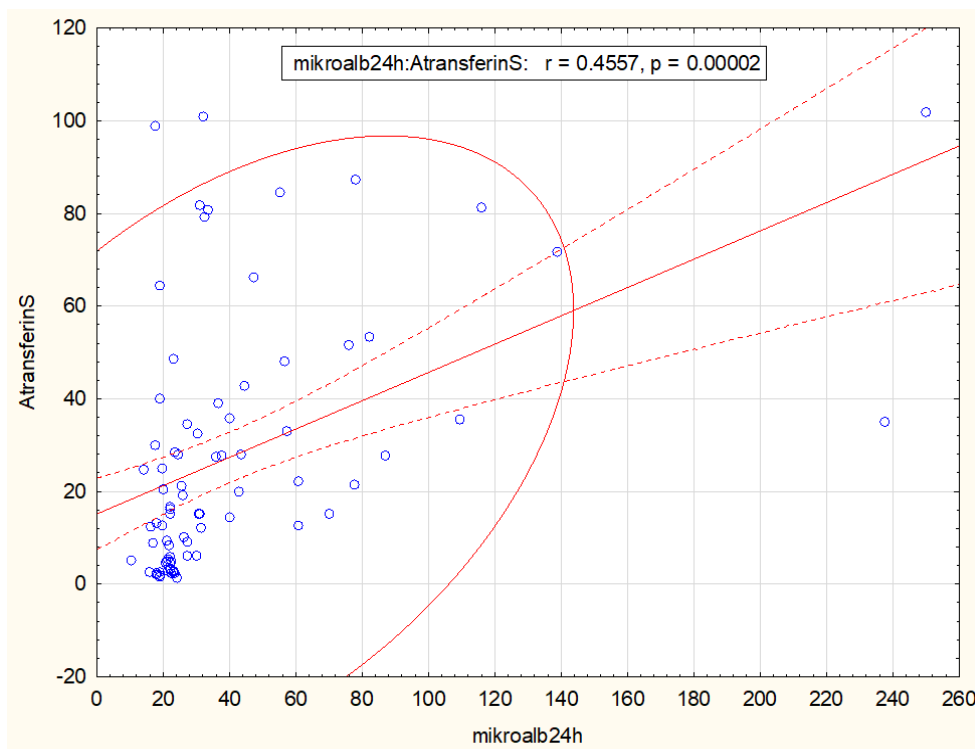
Просечне кориговане вредности уринарног трансферина у првом јутарњем урину и у 24 часовном урину, у односу на микроалбуминурију су приказане на графикону 4.



Графикон 4. Кориговане вредности уринарног трансферина према вредностима микроалбуминурије.

У табелама испред приказане су апсолутне вредности уринарног трансферина и вредности кориговане према креатинину у првом јутањем и 24-часовном урину. Извршена је корелација између концентрације трансферина у сваком узорку урина према микролабуминурији и закључено је да постоји статистички значајна корелација између нивоа трансферина и микроалбуминурије.

Корелација апсолутне вредности трансферина у првом јутарњем урину (АтрансферинС) и микроалбуминурије са вредности Pearson's коефицијента  $r = -0,4557$  и  $p < 0,001$  приказана је на графикону 5.



Графикон 5. Корелација апсолутне вредности трансферина у првом јутарњем урину са микролабуминуријом .

Од интереса за наше истраживање било је одредити нивое уринарног трансферина према дужини трајања дијабетеса, тако да су испитаници подељени у четири раније поменуте групе. У првој групи пацијенти са дијабетесом до 5 година; друга група од 6 до 10 година, трећу групу је чинило 18 (22,5%) пацијената који су имали дијабетес од 11 до 15 година и у четвртој групи је било 26 (32,5%) пацијената код којих је дужина болести била преко 15 година. Добијени резултати су приказани у табели 22.

Табела 22. Вредности трансферина у 24 часовном и јутарњем урину према дужини трајања дијабетеса

Концентрација трансферина (ng/ml)	Дужина трајања дијабетеса				p
	1-5 год. (N=14)	6-10 год. (N=22)	11-15 год. (N=18)	>15 год (N=26)	
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	
Трансферин у јутарњем урину	30,04±28,69	27,34±27,78	26,38±30,99	27,01±25,28	0,98
Трансферин у 24h урину	26,77±36,07	25,28±29,41	27,21±27,62	34,01±41,91	0,83

На основу приказаних резултата се може закључити да није постојала статистички значајна разлика између вредности трансферина када се одреде у односу на дужину трајања дијабетеса, што нас наводи на закључак да дужина болести не утиче на излучивање трансферина.

Поред апсолутних, испитане су и кориговане концентрације трансферина у узорку 24-часовног и првог јутарњег урина. Добијене вредности и статистичка значајност су у потпуности биле упоредиве са апсолутним вредностима концентрације трансферина, тј није постојала статистичка значајност у концентрацији уринарног трансферина и дужини трајања дијабетеса а резултати и њихове вредности су приказане у табели бр 23.

Табела 23. Кориговане вредности трансферина у 24 часовном и јутарњем урину према дужини трајања дијабетеса

Коригована конц. трансферина ( $\mu\text{g/gCr}$ )	Дужина трајања дијабетеса				p
	1-5 год. (N=14)	6-10 год. (N=22)	11-15 год. (N=18)	>15 год (N=26)	
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	
Трансферин у јутарњем урину	55,34±55,22	45,53±51,38	45,88±54,16	54,21±51,09	0,90
Трансферин у 24h Урину	45,27±50,32	41,69±50,57	45,19±40,90	66,30±81,05	0,49

Због значаја гликозилираног хемоглобина у дугорочној гликорегулацији, у нашем истраживању смо желели да утврдимо да ли постоји повезаност у нивоу уринарног трансферина и степену гликорегулације. У зависности од просечног нивоа ХбА1Ц све пацијенте смо поделили у две групе са граничном вредности прихватљиве гликорегулације од 7,0%. Број пацијената који је имао ХбА1Ц  $\leq 7,0\%$  био је 43 (53,75%), а 37 пацијената (46,25%) је имао ХбА1Ц  $> 7,0\%$ . Апсолутне и кориговане вредности трансферина у односу на ниво ХбА1Ц приказане су у табелама 24 и 25.

Табела 24. Повезаност гликорегулације исказане преко ХбА1Ц и апсолутних вредности трансферина у првом јутарњем и 24-часовном урину.

Концентрација трансферина (ng/ml)	Гликорегулација ХбА1Ц		<i>p</i>
	$\leq 7,0\%$	$> 7,0\%$	
	(N=43)	(N=37)	
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	
Трансферин у јутарњем урину	29,74 $\pm$ 31,48	24,89 $\pm$ 21,88	0,419
Трансферин у 24 урину	30,37 $\pm$ 37,86	27,00 $\pm$ 30,10	0,659

Табела 25. Кориговане вредности трансферина у првом јутарњем и 24-часовном урину у поређењу са ХбА1Ц

Коригована конц. трансферина ( $\mu\text{g/gCr}$ )	Гликорегулација ХбА1Ц		<i>p</i>
	$\leq 7,0\%$	$> 7,0\%$	
	(N=43)	(N=37)	
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	
Кориговани трансферин у јутарњем урину	52,83 $\pm$ 54,60	47,03 $\pm$ 48,75	0,617
Кориговани Трансферин у 24	53,12 $\pm$ 65,61	48,75 $\pm$ 54,56	0,746

Из приказаних табела се може закључити да између испитиваних група у вредности трансферина према нивоу ХбА1Ц, не постоји статистички значајна разлика, тј.

излучивање трансферина је независно од гликорегулације. Вредности  $p$  0,419 и  $p$  0,659, за апсолутне вредности трансферина, односно  $p$  0,617 и  $p$  0,746 код коригованих вредности.

Као и за концентрацију уринарног колагена, циљ нашег истраживања је био да испитамо да ли индекс телесна масе утиче и на излучивање уринарног трансферина, па су према БМИ пацијенти подељени у три групе. У групи нормално ухрањених било је 25 (31,25%) пацијената, у групи са прекомерном телесном масом је било 36 (45%) пацијената, а 19 (23,75%) је било у групи гојазних. Просечне вредности трансферина у наведене три групе испитаника, поређене према БМИ за апсолутне и кориговане вредности трансферина су приказане у табелама 26. и 27.

Табела 26. Апсолутне концентрације уринарног трансферина ( $ng/ml$ ) и БМИ

Концентрација трансферина ( $ng/ml$ )		БМИ ( $kg/m^2$ )			$p$
		18,5-24,9. (N=25)	25-29,9 (N=36)	>30 (N=19)	
		$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	
Трансферин јутарњем урину	у	22,39±24,43	31,83±32,91	25,98±17,84	0,40
Трансферин 24h урину	у	29,23±37,67	28,37±37,49	29,10±23,32	0,99

Табела 27. Кориговане вредности трансферина ( $\mu g/gCr$ ) у поређењу са БМИ

Концентрација трансферина ( $\mu g/gCr$ )		БМИ ( $kg/m^2$ )			$p$
		18,5-24,9. (N=25)	25-29,9 (N=36)	>30 (N=19)	
		$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	
Трансферин јутарњем урину	у	43,17±48,98	58,63±59,21	43,26±38,53	0,42
Трансферин у 24h урину	у	56,34±71,05	51,01±64,91	44,38±31,78	0,81

Анализом приказаних резултата се може закључити да између поређених група пацијената према вредностима БМИ не постоји статистички значајна разлика у излучивању трансферина ( $p$  од 0,40 до 0,99).

Осим испитивања за потенцијалне ране биомаркере дијабетесне нефропатије, испитивали смо и повезаност излучивања трансферина са присуством дијабетесне ретинопатије. Пацијенти су на основу офталмолошког налаза и постављања дијагнозе ретинопатије подељени у две групе. У првој групи испитаника, који су имали ретинопатију било је 24 (30%) пацијената, а у другој групи, без ретинопатије било је 56 (70%) испитаника. Резултати анализе према апсолутним вредностима трансферина су приказани у табели 28, а у табели 29 су приказане кориговане вредности трансферина код пацијената са ДР и без.

Табела 28. Дијабетесна ретинопатија и апсолутне вредности уринарног трансферина

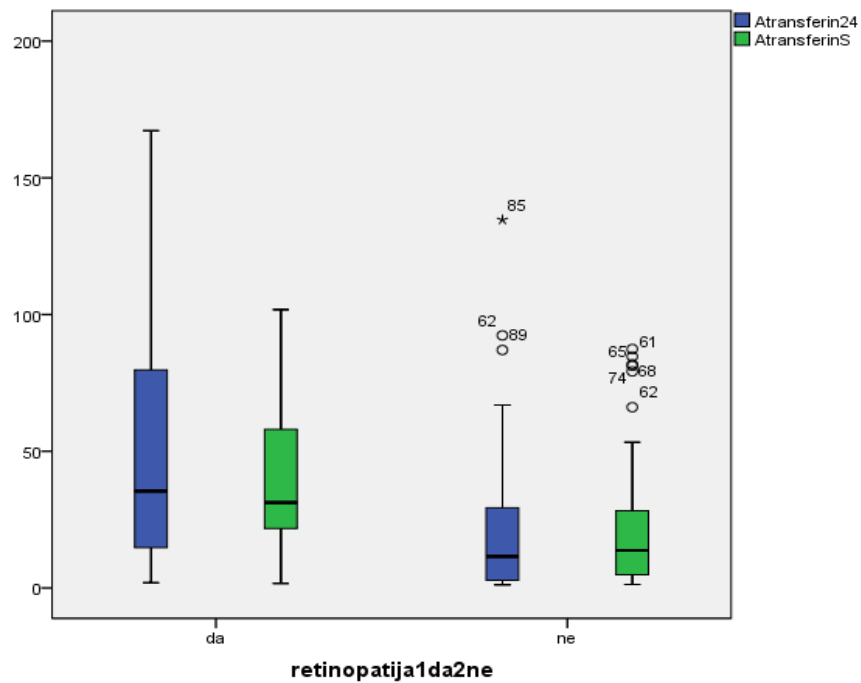
Концентрација трансферина ( $ng/ml$ )	Са ретинопатијом (N=24)	Без ретинопатије (N=56)	$p$
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	
Трансферин у јутарњем урину	40,2±30,73	22,04±24,15	0,014
Трансферин у 24h урину	47,06±42,76	20,99±26,82	0,003

Табела 29. Дијабетесна ретинопатија и кориговане вредностима уринарног трансферина

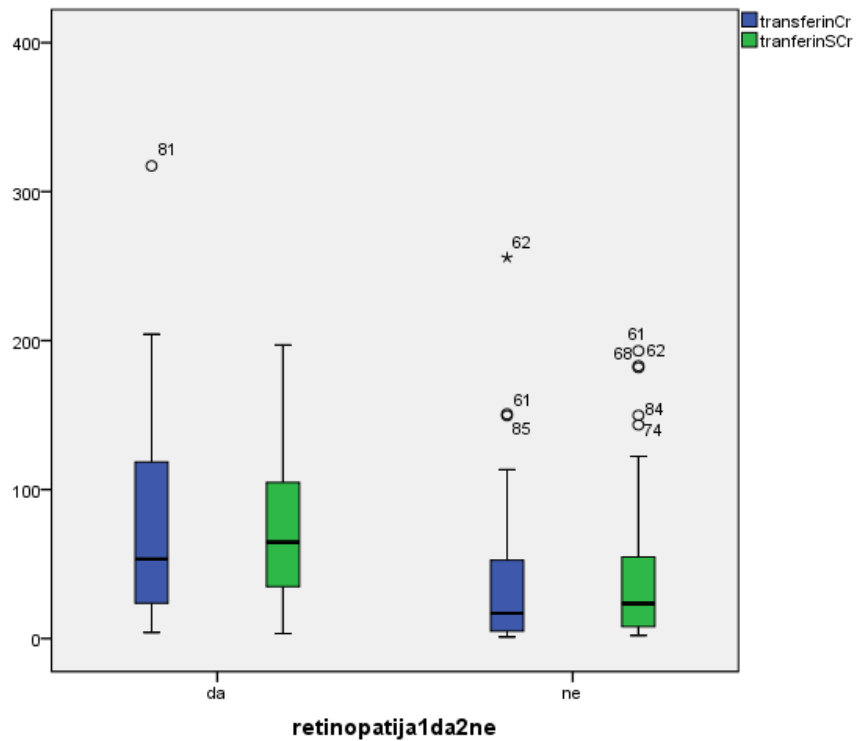
Коригована конц. трансферина ( $\mu g/gCr$ )	Са ретинопатијом (N=24)	Без ретинопатије (N=56)	$p$
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	
Трансферин у јутарњем урину	70,43±52,63	41,46±49,36	0,027
Трансферин у 24h урину	81,38±75,52	38,15±47,80	0,008

На графикону 6 приказана је корелација дијабетесне ретинопатије са апсолутним вредностима уринарног трансферина, а на графикону 7 представљене су кориговане

вредности трансферина према креатинину, у корелацији са дијабетесном ретинопатијом.



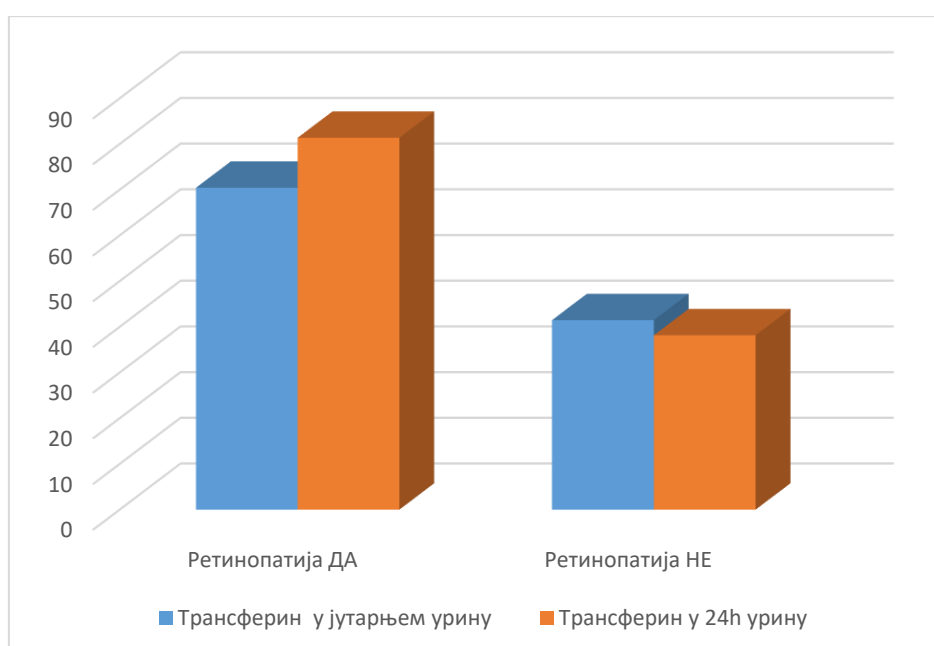
Графикон 6. Апсолутне вредности уринарног трансферина према ретинопатији



Графикон 7. Кориговане вредности уринарног трансферина према ретинопатији

С обзиром на добијене резултате у нашој испитиваној популацији, може се закључити да постоји статистичка значајност у концентрацији трансферина код пацијената који су имали и оних који нису имали ретинопатију. Вредности  $p$  су износиле од 0,003 до 0,027 што представља статистички значајан резултат и може се рећи да је дијабетесна ретинопатија повезана са концентрацијом излученог трансферина  $p < 0,05$ .

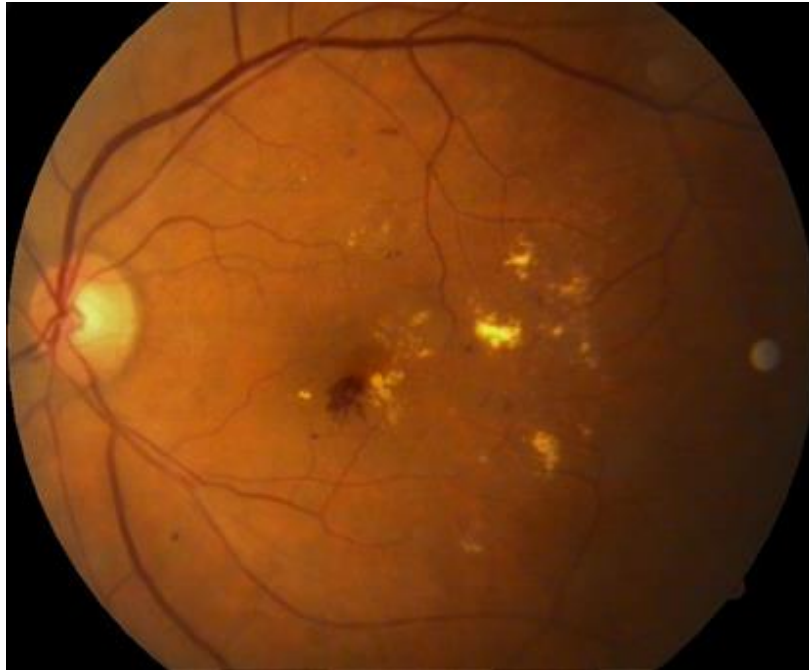
Средње вредности коригованих концентрација трансферина код пацијената са дијабетесном ретинопатијом и без, приказане су на графикону 6.



Графикон 8. Кориговане вредности уринарног трансферина према ретинопатији

Од укупног броја пацијената који су имали ретинопатију њих 7 (29,17%) је имало пролиферативну, док је 17 (70,83%) имало непролиферативну дијабетесну ретинопатију. На слици 4 је приказан је налаз на очном дну код пацијента са непролиферативном дијабетесном ретинопатијом, а на слици 5 је очно дно код пацијента са пролиферативном ДР.





Слика 4. Непролиферативна дијабетесна ретинопатија са дијабетесном макулопатијом (мрљасте интратретиалне хеморагије и микроанеуризме дифузно по очном дну, и ексудати у макули) (лево око)



Слика 5. Проллиферативна дијабетесна ретинопатија (неоваскуларизација са диска-НВД) (лево око)

## 4.4 Уринарна концентрација L-FABP

Осим два наведена, код наших испитаника анализирана је и апсолутна концентрација везујућег протеина масних киселина јетре ( L-FABP) (*ng/ml*) у првом јутарњем и у 24h урину, а добијене вредности приказане су у табели 30.

Табела 30. Концентрације уринарног L-FABP (*ng/ml*) према албуминурији.

Концентрација L-FABP ( <i>ng/ml</i> )	Албум.≥30mg/24h	Албум.<30mg/24h	<i>p</i>
	(N=33)	(N=47)	
	$\bar{x}\pm SD$ Медијана (опсег)	$\bar{x}\pm SD$ Медијана (опсег)	
L-FABP у 24h урину	525,03±215,32 575,32 (101,75-952,82)	253,61±255,85 273,18 (2,82-788,98)	<0,001
L-FABP у јутарњем урину	480,15±297,95 331,38 (82,15-989,49)	228,08±199,66 137,79 (1,53-655,81)	<0,001

Из табеле 30 се може закључити да су измерене вредности L-FABP у групи пацијената који нису имали микролабуминурију статистички значајно мање ( $p < 0,001$ ) у поређењу са групом пацијената који су имали микроалбуминурију. Просечне измерене вредности L-FABP у урину, у обе групе оболелих су биле значајно веће од вредности које смо добили анализом у здравој популацији, а износиле су  $58,96\pm 26,03$  за концентрацију L-FABP у 24-часовном урину и  $55,92\pm 30,81$  *ng/ml* у првом јутарњем урину.

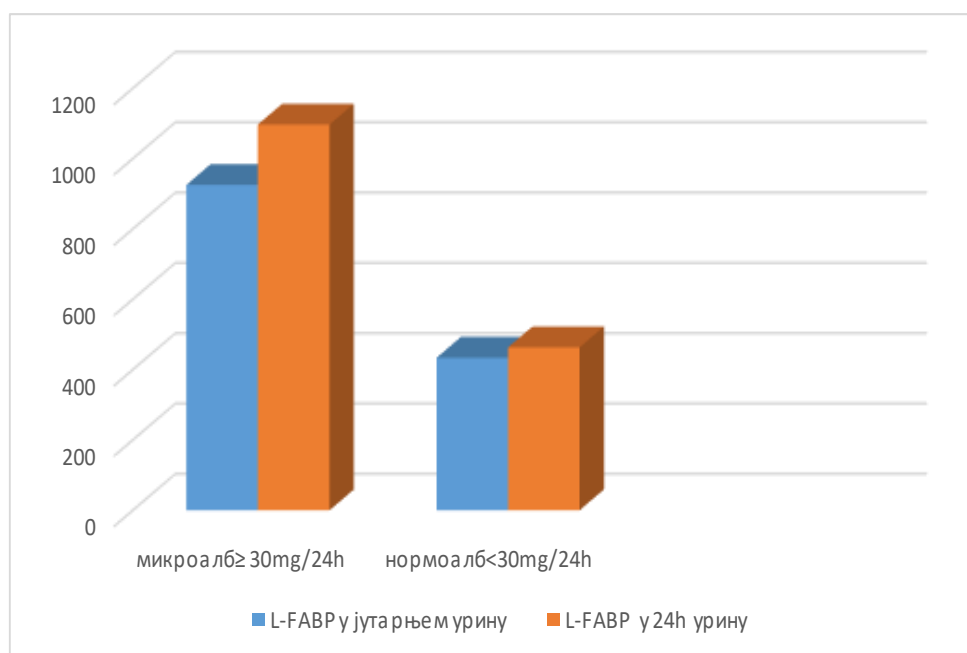
Поред апсолутне, одређена је и концентрација L-FABP коригована према концентрацији креатинина у узорку урина и изражена у  $\mu g/gCr$ . Вредности коригованих концентрација L-FABP су одређене у односу на вредности у првом јутарњем и 24-часовном урину, а резултати су приказани у табели 31.

Табела 31. Кориговане концентрације уринарног L-FABP

Коригована конц. L-FABP ( $\mu\text{g/gCr}$ )	Албум. $\geq 30\text{mg}/24\text{h}$	Албум. $< 30\text{mg}/24\text{h}$	<i>P</i>
	(N=33)	(N=47)	
	$\bar{x}\pm\text{SD}$	$\bar{x}\pm\text{SD}$	
	Медијана (опсег)	Медијана (опсег)	
L-FABP у 24h урину	1096,90 $\pm$ 650,52 1043,94(64,58-2673,11)	463,46 $\pm$ 440,0 360,77 (5,68-1498,62)	<0,001
L-FABP у јутарњем урину	925,45 $\pm$ 600,37 903,39 (102,33-2256,99)	433,79 $\pm$ 431,39 282,09 (3,08-1811,17)	<0,001

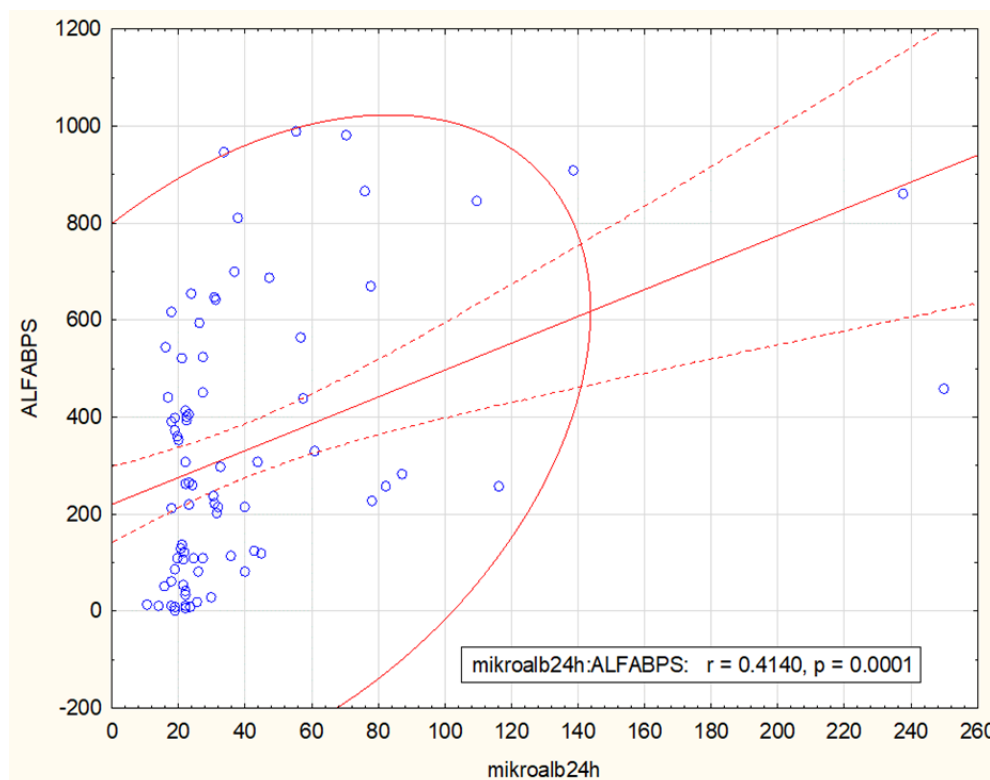
И у апсолутним и у коригованим вредностима уринарног L-FABP нађена је статистички значаја разлика између група које су имале микроалбуминурију и оних код којих је излучивање албумина било у ререфнтном опсегу; примена *t* теста са  $p < 0,001$ .

Просечне кориговане вредности уринарног L-FABP у првом јутарњем урину и у 24 часовном урину, у односу на микроалбуминурију су приказане на графикону 9.



Графикон 9. Кориговане вредности уринарног L-FABP према вредностима микроалбуминурије

Извршена је корелација између концентрације L-FABP у узорцима 24-часовног и првог јутарњег урина према вредностима микролабуминурије и закључено је да постоји статистички значајна корелација између нивоа L-FABP и микроалбуминурије. Корелација апсолутне вредности L-FABP у првом јутарњем урину и микроалбуминурије са вредности *Pearson's* коефицијента  $r=0,4140$  и  $p<0,001$  приказана је на графикону бр. 10.



Графикон 10. Корелација апсолутне вредности L-FABP у првом јутарњем урину са микролабуминуријом .

Као и за напред наведене биомаркере, од интереса за наше истраживање било је одредити нивое уринарног L-FABP према дужини трајања дијабетеса, а испитаници су, како је раније описано, подељени у четири групе. У првој групи су пацијенти са дијабетесом до 5 година; друга група од 6 до 10 година, у трећој су били са дијабетесним стажом од 11 до 15 година и у четвртој пацијенти који су имали дијабетес преко 15 година. Добијени резултати су приказани у табели 32.

Табела 32. Апсолутне вредности L-FABP у 24 часовном и јутарњем урину према дужини трајања дијабетеса

Концентрација L-FABP (ng/ml)	Дужина трајања дијабетеса				P
	1-5 год. (N=14)	6-10 год. (N=22)	11-15 год. (N=18)	>15 год (N=26)	
	$\bar{x}\pm SD$	$\bar{x}\pm SD$	$\bar{x}\pm SD$	$\bar{x}\pm SD$	
L-FABP у јутарњем урину	309,69±274,43	288,34±246,85	379,36±310,89	348,39±276,28	0,73
L-FABP у 24h урину	356,08±208,86	317,85±250,30	427,34±262,05	368,28±289,27	0,62

На основу приказаних резултата се може закључити да није постојала статистички значајна разлика између вредности L-FABP у односу на дужину трајања дијабетеса.

Осим апсолутних испитане су и кориговане концентрације L-FABP у узорку 24-часовног и првог јутарњег урина. Добијене вредности и статистичка значајност су биле сличне са апсолутним вредностима концентрације L-FABP, тј није постојала статистичка значајност у концентрацији коригованог L-FABP према креатинину и дужини трајања дијабетеса, а резултати су приказани у табели 33.

Табела 33. Кориговане вредности L-FABP у 24 часовном и јутарњем урину према дужини трајања дијабетеса

Коригована конц. L-FABP ( $\mu\text{g/gCr}$ )	Дужина трајања дијабетеса				P
	1-5 год. (N=14)	6-10 год. (N=22)	11-15 год. (N=18)	>15 год (N=26)	
	$\bar{x}\pm SD$	$\bar{x}\pm SD$	$\bar{x}\pm SD$	$\bar{x}\pm SD$	
L-FABP у јутарњем урину	683,16±723,45	528,49±518,96	668,25±515,29	681,09±545,92	0,77
L-FABP у 24h урину	739,98±621,91	594,14±554,21	794,51±506,31	778,79±744,30	0,70

Због значаја ХБА1Ц и праћења адекватности гликорегулације, у нашој студији смо желели да утврдимо да ли постоји повезаност између излучивања L-FABP и нивоа гликозилираног хемоглобина. У зависности од просечног ХБА1Ц пацијенти су били подељени у две групе. У првој групи са  $\text{ХБА1Ц} \leq 7,0\%$  било је 43 (53,75%) испитаника,

а 37 пацијената (46,25%) је имало ХбА1Ц > 7,0%. Апсолутне и кориговане вредности L-FABP поређене са вредностима ХбА1Ц приказане су у табелама 34. и 35.

Табела 34. Апсолутне вредности L-FABP и ХбА1Ц

Концентрација L-FABP (ng/ml)	Гликорегулација ХбА1Ц		<i>p</i>
	≤7,0%	>7,0%	
	(N=43) $\bar{x} \pm SD$	(N=37) $\bar{x} \pm SD$	
L-FABP у јутарњем урину	380,66±255,15	275,57±286,38	0,090
L-FABP у 24 урину	428,80±259,98	292,08±238,73	0,061

Табела 35. Кориговане вредности L-FABP у првом јутарњем и 24-часовном урину поређене са ХбА1Ц

Коригована конц. L-FABP ( $\mu\text{g/gCr}$ )	Гликорегулација ХбА1Ц		<i>p</i>
	≤7,0%	>7,0%	
	(N=43) $\bar{x} \pm SD$	(N=37) $\bar{x} \pm SD$	
Кориговани L-FABP у јутарњем урину	712,63±485,51	548,243±631,51	0,201
Кориговани L-FABP у 24	841,75±598,78	588,80±621,31	0,069

Из приказаних табела се може закључити да између испитиваних група у вредности L-FABP према нивоу ХбА1Ц, не постоји статистички значајна разлика, тј излучивање L-FABP је независно од гликорегулације. Вредности *p* 0,090 и *p* 0,61, за апсолутне вредности L-FABP, односно *p* 0,069 и *p* 0,202 за кориговане вредности.

Као и за концентрацију уринарног колагена и трансферина, и за L-FABP смо имали циљ да испитамо да ли индекс телесне масе утиче и на излучивање уринарног L-FABP па су према БМИ пацијенти подељени у три групе.

У групи нормално ухрањених било је 25 (31,25%) пацијената, у групи са БМИ од 25-29,9  $kg/m^2$  било је 36 (45%) пацијената, а 19 (23,75%) било у групи гојазних. Просечне вредности L-FABP у ове три групе испитаника, према БМИ за апсолутне вредности L-FABP су приказане у табели бр.36.

Табела 36. Апсолутне концентрације уринарног L-FABP ( $ng/ml$ ) и БМИ

Концентрација L-FABP ( $ng/ml$ )	БМИ ( $kg/m^2$ )			<i>p</i>
	18,5-24,9 (N=25)	25-29,9 (N=36)	>30 (N=19)	
	$\bar{x}\pm SD$	$\bar{x}\pm SD$	$\bar{x}\pm SD$	
L-FABP у јутарњем урину	362,97±221,66	319,80±297,32	314,59±297,96	0,79
L-FABP у 24h урину	375,42±191,94	359,23±279,28	364,63±302,25	0,97

Кориговањем добијених вредности уринарног L-FABP према креатинину су добијене вредности које су приказане у табели бр.37.

Табела 37. Кориговане вредности L-FABP ( $\mu g/gC_r$ ) у поређењу са БМИ

Концентрација L-FABP ( $\mu g/gC_r$ )	БМИ ( $kg/m^2$ )			<i>p</i>
	18,5-24,9. (N=25)	25-29,9 (N=36)	>30 (N=19)	
	$\bar{x}\pm SD$	$\bar{x}\pm SD$	$\bar{x}\pm SD$	
L-FABP у јутарњем урину	713,14±491,84	661,43±645,51	488,85±459,95	0,40
L-FABP у 24h урину	755,48±485,30	763,45±723,85	611,03±573,18	0,66

Анализом резултата приказаних у табелама 36 и 37 се може закључити да између поређених група, према БМИ не постоји статистички значајна разлика у излучивању L-FABP (*p* од 0,40 до 0,97)

Осим испитивања за потенцијалне ране биомаркере дијабетесне нефропатије, испитивали смо и повезаност излучивања L-FABP са присуством дијабетесне

ретинопатије. Испитаници су били подељени у две групе, у првој групи испитаника, који су имали ретинопатију било је 24 (30%) пацијената, од којих је 7 пацијената имало пролиферативну ретинопатију. У другој групи, без ретинопатије било је 56 (70%) испитаника.

Резултати анализе према апсолутним вредностима L-FABP су приказани у табели 38. а у табели 39 су приказане кориговане вредности L-FABP.

Табела 38. Дијабетесна ретинопатија и апсолутне вредности уринарног L-FABP

Концентрација L-FABP (ng/ml)	Са ретинопатијом	Без ретинопатије	<i>p</i>
	(N=24)	(N=56)	
	$\bar{x}\pm SD$	$\bar{x}\pm SD$	
L-FABP у јутарњем урину	417,78±294,25	295,32±258,07	0,47
L-FABP у 24h урина	399,26±257,66	351,13±259,24	0,74

Табела 39. Дијабетесна ретинопатија у поређењу са коригованим вредностима уринарног трансферина

Коригована конц. L-FABP ( $\mu\text{g/gCr}$ )	Са ретинопатијом	Без ретинопатије	<i>p</i>
	(N=24)	(N=56)	
	$\bar{x}\pm SD$	$\bar{x}\pm SD$	
L-FABP у јутарњем урина	722,47±510,87	599,80±580,37	0,41
L-FABP у 24h урина	715,75±505,25	728,62±665,43	0,30

Анализом добијених резултата у којима се врши поређење излучивања L-FABP и дијабетесна ретинопатије није нађена статистички значајна повезаност између вредности L-FABP и постојања ретинопатије.



#### 4.5 Дијагностички потенцијал колагена тип IV, трансферина и L-FABP за дијагозу дијабетесне нефропатије.

##### 4.5.1 Дијагностички потенцијал колагена тип IV

Од интереса за ово истраживање било је испитивање дијагностичког потенцијала колагена тип IV за рану дијагнозу дијабетесне нефропатије. Анализирани су апсолутне вредности колагена и вредности кориговане према креатинину.

Резултати статистичке анализе за колаген тип IV у апсолутним и коригованим вредностима су приказани у табели бр.40.

Табела 40. Дијагностички потенцијал уринарне концентрације колагена за постојање дијабетесне нефропатије.

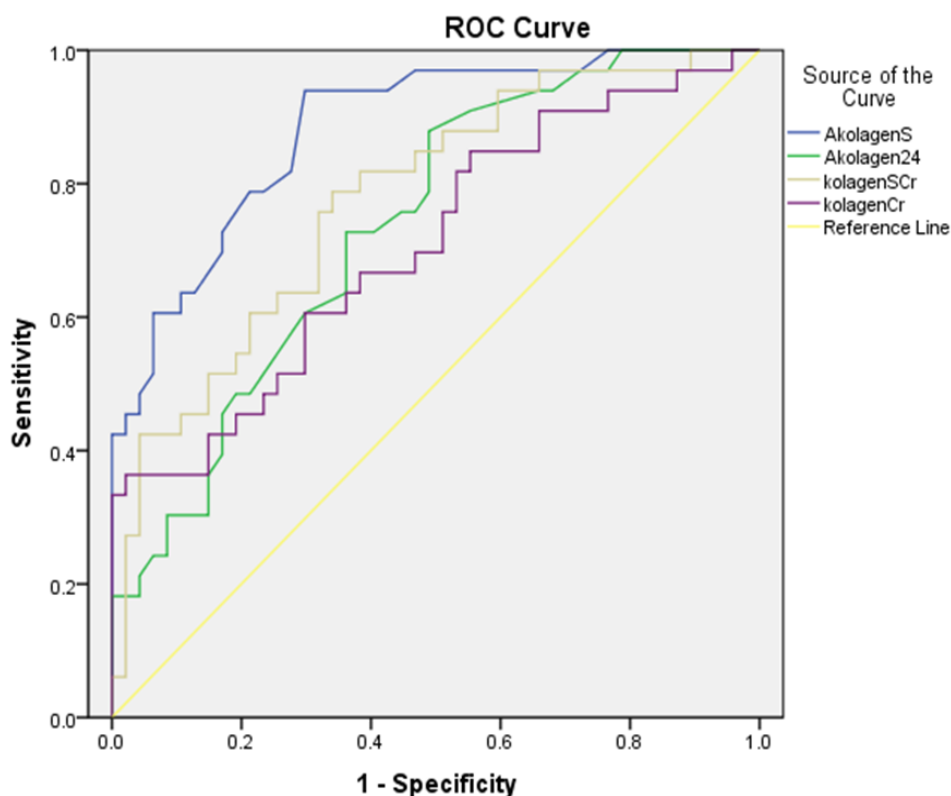
Параметар	AUC ROC* са 95% CI*
Колаген у јутарњем урину ( <i>ng/ml</i> )	90,4% (84,2%-96,5%)
Колаген у 24h урину ( <i>ng/ml</i> )	78,3% (69,0%-87,5%)
Коригован колаген у јутарњем урину ( $\mu\text{g/gCr}$ )	81,4% (72,6%- 90,3%)
Коригован колаген у 24h урину ( $\mu\text{g/gCr}$ )	75,2% (64,9% - 85,6%)

\*Area Under the Curve ROC (по методи DeLong-a)

\*Confidence Interval (интервал поузданости)

Као што се може видети из табеле 40 колаген тип IV, у апсолутним вредностима и вредностима коригованим према креатинину, има статистички значајан дијагностички потенцијал за дијабетесну нефропатију, пре појаве микроалбуминурије. Највећи дијагностички потенцијал за вредности колагена је забележен код апсолутних вредности колагена тип IV у јутарњем урину, са површином испод ROC криве од 90,4% уз интервал поузданости од 84,2 до 96,5%.

Графички приказ добијених вредности за уринарни колаген тип IV се може видети на графикону 11.



Графикон 11. ROC криве за апсолутне и кориговане вредности колагена тип IV

У табели 41 су представљене најбоље граничне вредности (*p/n cut off point*) за све четири анализиране вредности колагена тип IV за присуство дијабетесне нефропатије уз припадајућу сензитивност и специфичност са CI од 95%.

Табела 41. Најбоље граничне вредности колагена тип IV

Параметар	Најбоља гранична вредност*	Сензитивност (95%CI)	Специфичност (95%CI)
Колаген у јутарњем урину ( <i>ng/ml</i> )	0,630	72,7 %	83,0%
Колаген у 24h урину ( <i>ng/ml</i> )	0,500	66,7%	63,8%
Коригован колагена у јутарњем урину ( $\mu\text{g/gCr}$ )	1,119	69,7%	68,1%
Коригован колаген у 24h урину ( $\mu\text{g/gCr}$ )	0,948	63,6%	63,8%

\* Вредност за коју је постигнута максимална сензитивност и специфичност

Као што се види из табеле 41 иницијална некоригована вредност колагена тип IV у јутарњем урину, за коју је постигнута максимална сензитивност 72,7% и

специфичност 83% износи 0,630 *ng/ml*. Иницијална некоригована вредност колагена тип IV у 24-часовном урину, где је сензитивност 66,7% и специфичност 63,8% износи 0,500 *ng/ml*. За кориговане вредности колагена у јутарњем урину најбоља гранична вредност је 1,119  $\mu\text{g/gCr}$  уз сензитивност од 69,7% и специфичност од 68,1%, а за 24-часовни урин ова вредност износи 0,948  $\mu\text{g/gCr}$ , при чему је сензитивност 63,6% и специфичност 63,8%.

#### 4.5.2 Дијагностички потенцијал уринарног трансферина

Осим колагена тип IV, испитивали смо и дијагностички потенцијал уринарног трансферина за рану дијагнозу дијабетесне нефропатије. Анализиране су како апсолутне тако и вредности трансферина кориговане према креатинину, а резултати статистичке анализе су приказани у табели 42.

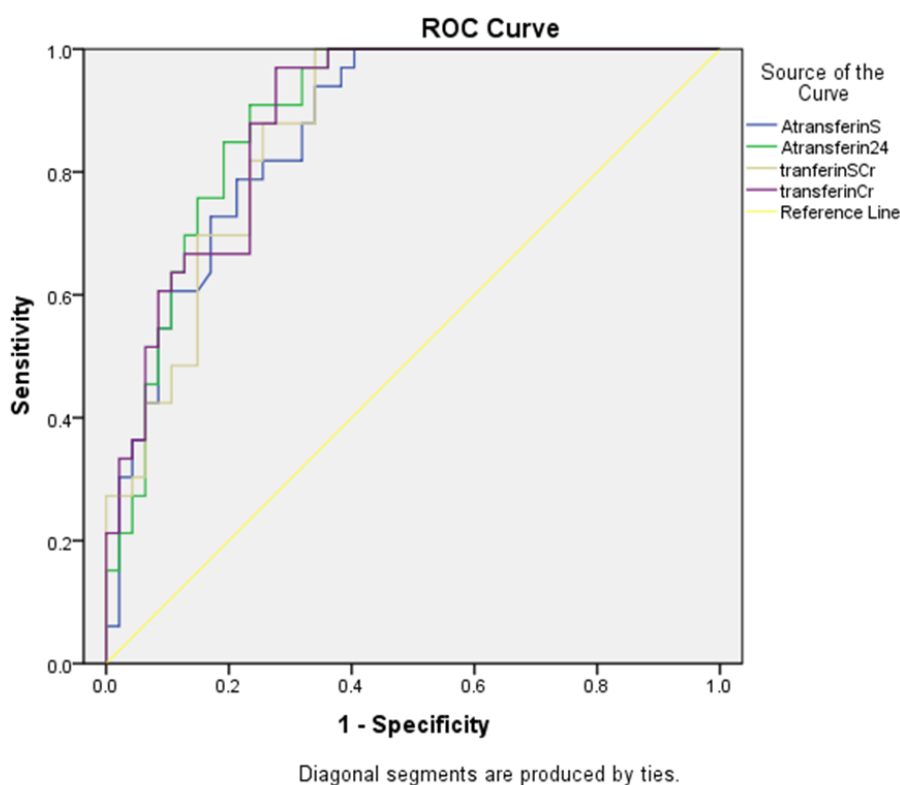
Табела 42. Дијагностички потенцијал уринарне концентрације трансферина за постојање дијабетесне нефропатије

Параметар	AUC ROC* са 95% CI*
Трансферин у јутарњем урину ( <i>ng/ml</i> )	86,7% (79,0%-94,3%)
Трансферин у 24h урину ( <i>ng/ml</i> )	88,8% (81,8%-95,9%)
Коригован трансферин у јутарњем урину ( $\mu\text{g/gCr}$ )	86,8% (79,2%- 94,4%)
Коригован трансферин у 24h урину ( $\mu\text{g/gCr}$ )	88,6% (81,6% - 95,6%)

\*Area Under the Curve ROC (по методи DeLong-a)

\*Confidence Inetrval (интервал поузданости)

У табели 42 се може видети да вредности трансферина, у јутарњем и 24 часовном урину, у апсолутним вредностима, а и коригован према креатинину, има стаистички значајан дијагностички потенцијал за рану дијагнозу дијабетесне нефропатије, са приближно истим резултатима за све вредности. Вредности AUC ROC су се кретале од 86,7% за некоригован трансферин до 88,8% за некоригован трансферин у 24-часовном урину. Графички приказ је представљен на графикону 12.



Графикон 12. ROC криве за апсолутне и кориговане вредности трансферина

Најбоље граничне вредности за испитиване вредности трансферина са припадајућом сензитивности и специфичности уз интервал поверења од 95% су приказане у табели 43.

Табела 43. Најбоље граничне вредности трансферина

Параметар	Најбоља гранична вредност*	Сензитивност (95%CI)	Специфичност (95%CI)
Трансферин у јутарњем урину (ng/ml)	21,62	78,8 %	78,7%
Трансферин у 24h урину (ng/ml)	22,32	81,8%	80,9%
Коригован трансферин у јутарњем урину ( $\mu\text{g/gCr}$ )	40,21	75,8%	76,6%
Коригован трансферин у 24h урину ( $\mu\text{g/gCr}$ )	41,57	78,8%	76,6%

\* Вредност за коју је постигнута максимална сензитивност и специфичност

У табели 43 приказане су иницијалне вредности трансферина у јутарњем и 24-часовном урину у апсолутним и коригованим вредностима. Иницијална вредност трансферина у јутарњем урину за који је постигнута максимална сензитивност 78,8% и специфичност 78,7% износи 21,62 *ng/ml*, а апсолутна вредност трансферина у 24-часовном урину, где је сензитивност 81,8% и специфичност 80,9% износи 22,32 *ng/ml*. За кориговане вредности трансферина у јутарњем урину најбоља гранична вредност је 40,21  $\mu\text{g/gCr}$  уз сензитивност од 75,8% и специфичност од 76,6%, док за 24-часовни урин најбоља гранична вредност коригованог трансферина износи 41,57  $\mu\text{g/gCr}$ , при чему је сензитивност 78,8% и специфичност 76,6%.

#### 4.5.3 Дијагностички потенцијал уринарног L-FABP

Као и за претходна два, имали смо за циљ да испитамо дијагностички потенцијал уринарног L-FABP за дијагнозу дијабетесне нефропатије. Анализирани су апсолутне вредности и вредности L-FABP кориговане према креатинину, а добијени резултати статистичке анализе за L-FABP у апсолутним и коригованим вредностима су приказани у табели бр.44.

Табела 44. Дијагностички потенцијал уринарне концентрације L-FABP за постојање дијабетесне нефропатије

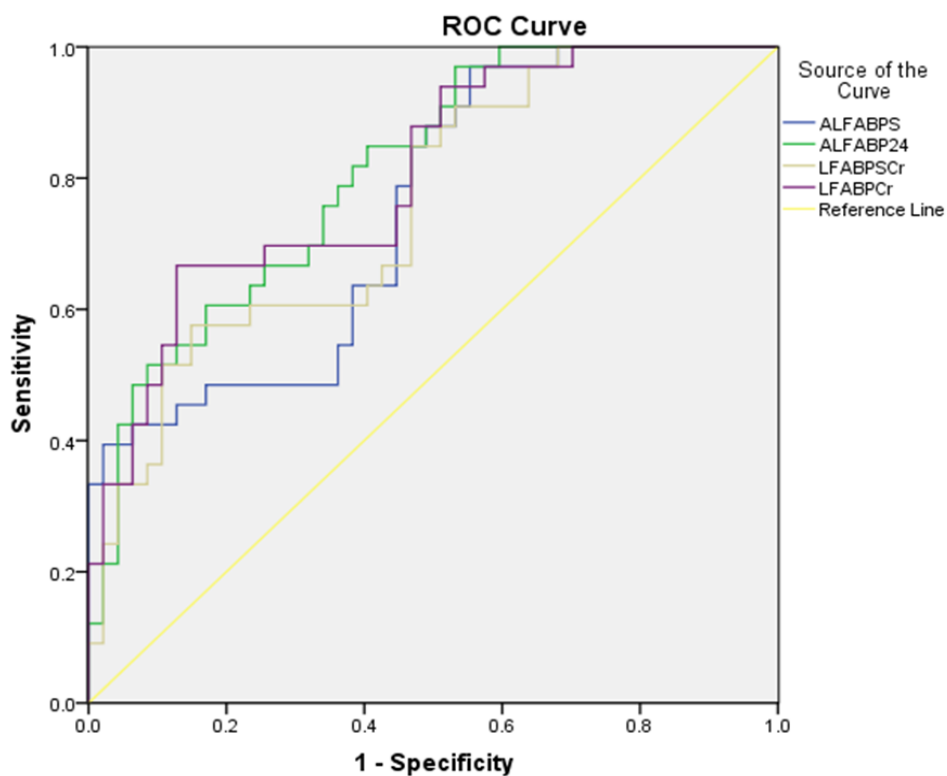
Параметар	AUC ROC* са 95% CI*
L-FABP у јутарњем урину ( <i>ng/ml</i> )	75,0% (64,3%-85,6,3%)
L-FABP у 24h урину ( <i>ng/ml</i> )	80,8% (0,71%-90,1%)
Коригован L-FABP у јутарњем урину ( $\mu\text{g/gCr}$ )	75,7% (65,2% - 86,2%)
Коригован L-FABP у 24h урину ( $\mu\text{g/gCr}$ )	80,3% (70,7% - 89,9%)

\*Area Under the Curve ROC (по методи DeLong-a)

\*Confidence Interval (интервал поузданости)

У табели 44 се може видети да L-FABP , у јутарњем и 24 часовном урину, у апсолутним вредностима и вредностима коригованим према креатинину, има статистички значајан дијагностички потенцијал за рану дијагнозу дијабетесне нефропатије. Највећи дијагностички потенцијал је регистрован код апсолутних и

коригованих вредности L-FABP у 24 часовом урину (ALFABP24 и LFABPCr) а добијене вредности L-FABP су приказане и графички, на графикону бр. 13.



Графикон 13. ROC криве за апсолутне и кориговане вредности L-FABP

Најбоље граничне вредности за L-FABP, тј. вредности у којима је постигнута највећа сензитивност и специфичност са интервалом поверења од 95% су представљене у табели 45.

Табела 45. Најбоље граничне вредности L-FABP

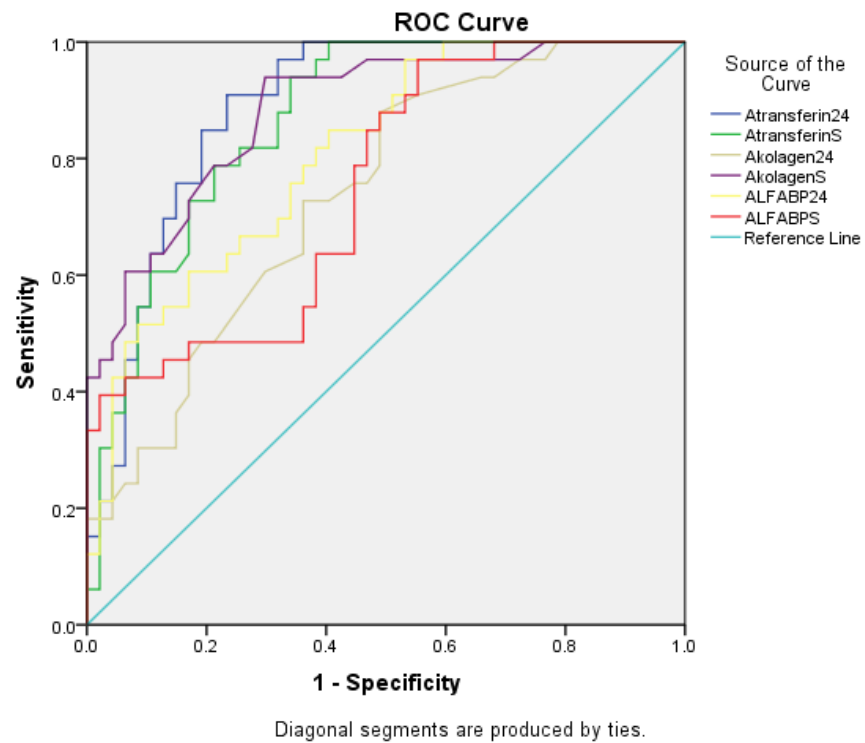
Параметар	Најбоља гранична вредност*	Сензитивност (95%CI)	Специфичност (95%CI)
L-FABP у јутарњем урину ( <i>ng/ml</i> )	281,96	63,6%	61,7%
L-FABP у 24h урину ( <i>ng/ml</i> )	366,12	69,7%	68,1%
Коригован L-FABP у јутарњем урину ( $\mu\text{g/gCr}$ )	508,89	60,6%	61,7%
Коригован L-FABP у 24h урину ( $\mu\text{g/gCr}$ )	738,17	69,7%	70,2%

\* Вредност за коју је постигнута максимална сензитивност и специфичност

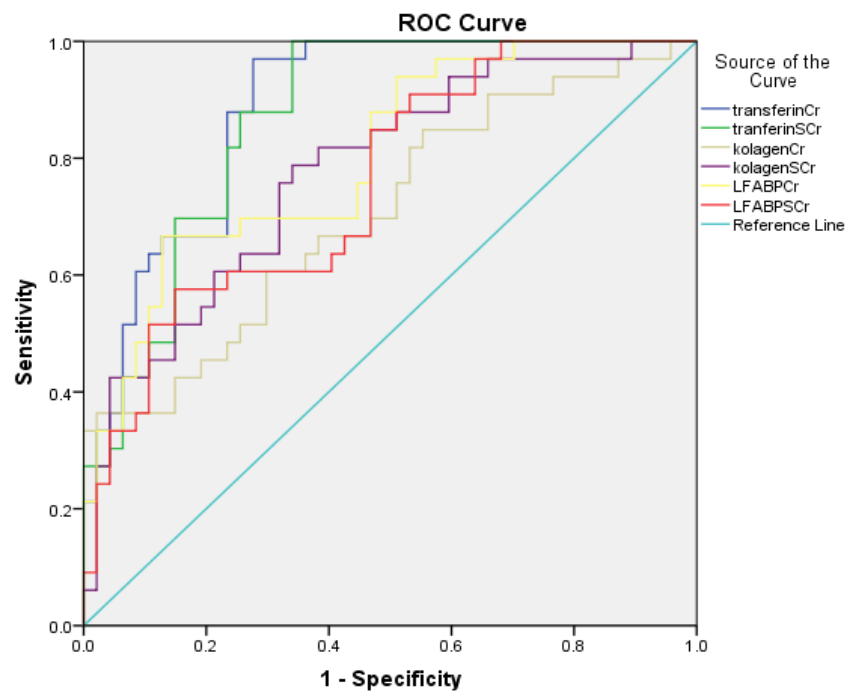
Као што се види из табеле 45 иницијалне вредности L-FABP у јутарњем урину у некоригованим вредностима су 281,96 *ng/ml* са сензитивношћу од 63,6% и специфичношћу 61,7%, док су вредности L-FABP у 24 часовном урину 366,12 *ng/ml* уз максималну сензитивност 69,7% и специфичност од 68,1%. За кориговане вредности L-FABP у јутарњем урину најбоља гранична вредност је била 508,89  $\mu\text{g/gCr}$  уз сензитивност од 60,6% и специфичност од 61,7%, док за 24-часовни урин најбоља гранична вредност коригованог L-FABP износила 738,17  $\mu\text{g/gCr}$ , а сензитивност је била 69,7% и специфичност 70,2%.

Поређењем свих биомаркера у апсолутним вредностима добијена је збирна ROC крива где је вредност некоригованог трансферина у 24 часовном урину имала највећу сензитивност од 81,8% и специфичност од 80,9%, док је најлошија од апсолутних вредности била вредност L-FABP у јутарњем урину чија је сензитивност износила 63,6% и специфичност 61,7%.

На графикону 14. су приказане добијене апсолутне вредности наведених биомаркера.



Графикон 14. ROC криве за апсолутне вредности колегена тип IV, трансферина и L-FABP у јутарњем (S) и 24 часовном (24) урину



Графикон 15. ROC криве за кориговане вредности колегена тип IV, трансферина и L-FABP у јутарњем (SCr) и 24 часовном (Cr) урину



На графикону 15 су приказане добијене кориговане вредности колегена тип IV, трансферина и L-FABP у јутарњем и 24 часовном урину.

Када се пореде кориговане вредности наведених уринарних биомеркера у добијеној збирној ROC криви се може закључити да је вредност коригованог трансферина у 24 часовном урину имала највећу сензитивност од 78,8% и специфичност од 76,6%, док је најмању сензитивност са вредношћу од 60,6% и специфичност од 61,7% имао кориговани L-FABP у јутарњем урину.

## 5. ДИСКУСИЈА

Дијабетес мелитус представља једно од најзаступљенијих хроничних оболења у свету, а преваленца се рапидно повећава током последњих деценија. Према процени Светске Здравствене Организације број људи који болују од дијабетеса је око 415 милиона, а сматра се да ће, уколико се настави досадашњи тренд пораста оболевања, до 2040. године у свету број оболелих од дијабетеса износити око 642 милиона са преваленцом од око 10 %. (16) Пораст броја оболелих од дијабетеса је углавном на рачун дијабетес мелитуса тип 2, који је заступљен код око 90% оболелих, а с обзиром на старост пацијената који болују од дијабетеса тип 2 као последица се јавља повећање коморбидитета насталих услед овог хроничног оболења. (17) Компликације које се јављају као последица ДМ представљају велики проблем у лечењу пацијената оболелих од дијабетеса, а најчешћи тип хроничних компликација су микроваскуларне компликације у које спадају дијабетесна нефропатија, ретинопатија и неуропатија. Дијабетесна нефропатија (ДН) је у развијеним земљама водећи узрок хроничне болести бубрега и терминалне бубрежне инсуфицијенције, а како хронична болест бубрега има дуг и прогресиван ток са великим бројем коморбидитета и високу цену лечења, неопходно је што раније поставити дијагнозу дијабетесне нефропатије. (164) Најранији и још увек прихваћени први показатељ ДН је микролабуминурија, која се дефинише као излучивање албумина у дози 30-300 *mg*/дан, упркос чињеници да је њена специфичност и сензитивност за рану детекцију нефропатије ограничена. Неусклађеност између албуминурије и пада јачине гломерулске филтрације (ЈГФ) је пресудна за клинички значај албуминурије, јер неће сви оболели од дијабетеса са присутном дијабетесном болешћу бубрега (ДКД) и смањеном ЈГФ имати регистровану албуминурију. *Perkins* и сар. су описали бубрежну болест са падом ЈГФ < 60 *mL/min/1,73 m<sup>2</sup>*, без претходне појаве албуминурије, код пацијената са ДМ тип 1, (110) док су *Chen* и сар. у свом истраживању поредили неколико студија од 1977. године до данас и доказали за један део болесника са дијабетес мелитусом без албуминурије, има развијену прогресивну хроничну болест бубрега. (165) У различитим клиничким студијама, број оболелих од дијабетеса са неалбуминуричним оболењем бубрега се кретао од 21,8% у студији *Boronat* и сар.(103) до 56.6%, у студији

*Renno* и сар.(102) Пошто новија истраживања показују да се ДН може развити без претходне микроалбуминурије (166), неопходни су нам нови и поуздани показатељи развоја ДН код оболелих од дијабетес мелитуса. Последњих деценија се истражује велики број уринарних биомаркера међу којима су од гломеруларних присутни трансферин, церулоплазмин, ламинин, колаген тип IV, гликозаминогликани, фибронектин и други. Од тубуларних су истраживани протеин 1 оштећења бубрега (KIM-1), везујући протеин масних киселина јетре (L-FABP), липокалин повезан на неутрофилном гелатиназом (NGAL), Н-ацетил-бета-гликозаминидаза (NAG), цистатин Ц и други. Такође су присутни биомаркери оксидативног стреса као што је 8-охо-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) и инфламаторни биомаркери међу којима су фактор туморске некрозе алфа (TNF)-α и оросомукоид. Од најновијих уринарних биомаркера који су у почетној фази истраживања описани су: везујући протеин 4 за ретинол, (RBP4), везујући протеин витамина Д, хем оксигеназа-1, периостин, микро RNA, адипокинезин алфа -2 гликопротеин и други. По својој сензитивности и специфичности су се издвојили колаген тип IV и трансферин од гломеруларних и KIM-1, L-FABP и NGAL од тубуларних биомаркера.

### 5.1 Клиничке карактеристике оболелих од дијабетес мелитуса тип 2

Дијабетес мелитус тип 2 је хронично оболење које се углавном јавља код особа старијих од 30 година, мада су у последње време дијагностиковани облици дијабетес мелитуса тип 2 код деце. (167) Период дијагностиковања болести је различит, али с обзиром на неспецифичну симптоматологију болест се може открити и у периоду већ развијених хроничних компликација. У нашој испитиваној популацији просечна животна доб у време постављања дијагнозе оболења је била 46,56 година, при чему је најмлађи пацијент у моменту дијагнозе имао 22 године, а најстарији 65 година. Већину пацијената, 25 (31,25%) су чиниле особе које су имале између 41 и 50 година у тренутку постављања дијагнозе дијабетеса тип 2, док је приближно исти број испитаника у тренутку дијагнозе болести имао од 31 до 40 година, њих 19 (23,75%), и од 51 до 60 година, 21 болесник (26,25%). Само пет испитаника (6,25%) је имало испод 30 година у тренутку дијагнозе оболења, а 10 (12,5%) је било старије од 61 године.

*Richelle* и сарадници су у својој студији праћења, а користећи резултате National Health and Nutrition Examination Survey доказали су да су просечне године за постављање дијагнозе дијабетеса тип 2 смањене са 52 године, колико је било у периоду 1988 до 1994. године, на 46 година, колико је регистровано у периоду од 1999 до 2000 године. Овакви резултати се приписују промени критеријума за дијагнозу дијабетеса и ранијем откривању болести услед чешћих контрола. (168) У анализи *Songa* и сарадника у студији пресека на популацији од 2733 испитаника са дијабетес мелитусом тип 2, код њих 527 је дијагноза оболења постављена пре 40. године живота, а у тренутку анализе дужина трајања болести је слично као и у нашој студији била мање од 10, до више од 20 година. (169)

Добијени резултати по питању старости пацијената у време дијагностиковања дијабетеса у нашој испитиваној групи су подударни са резултатима досадашњих студија. Просечна старост болесника у нашој студији је била 59,85 година при чему је најмлађи испитаник имао 38, а најстарији 73 године. Од укупног броја испитаника, њих 53 (66,25%) је било старије од 55 година, а осталих 27 пацијената (33,75%) су били млађи од 55 година. Анализирана популација оболелих од дијабетеса је имала нешто више особа мушког пола 44 (55%) док је 36 (45%) испитаника било женског пола, са односом 1,22:1 у корист особа мушког, што је у складу са полном структуром у раније описаним истраживањима. (170)

Дужина трајања дијабетеса, као и период постављања дијагнозе болести, представља значајан фактор у праћењу и лечењу оболелих пацијената као и у настанку хроничних компликација укључујући и дијабетесну нефропатију. *Zoungas* и сарадници у својој студији која је укључила 215 центара из 20 земаља, на 11.140 пацијената са ДМ тип 2 су анализирали повезаност између старости пацијената у моменту дијагнозе оболења, дужине трајања болести и настанка васкуларних компликација. Резултати су показали да је просечна старост пацијената била  $65.8 \pm 6.4$  година, а да је дијагноза дијабетеса постављена у  $57.8 \pm 8.7$  година. Просечно трајање болести је било  $7.9 \pm 6.4$  године, а број пацијената код којих је дијабетес трајао мање од 5 година износио је 43%. Код 27% пацијената дужина трајања болести је била од 6 до 10 година, 18% је имало дијабетес између 11 и 15 година, док је само 12% испитаника било са дужином трајања болести више од 15 година. Сматра се да се за сваких пет година трајања дијабетеса повећава ризик од настанка макровакуларних компликација и смртог исхода за 13%,

односно 15%, у зависности старости пацијента, а повећање овог типа ризика за 49% и 78% у зависности од година постављања дијагнозе оболења. Ова разлика се објашњава чињеницом да старост пацијента има много већи утицај на ризик од макроваскуларних компликација него године откривања дијабетеса, па и дужина трајања дијабетеса има мањи утицај на наведене ризике, него сама старост пацијента. Старост оболелих, године дијагнозе дијабетеса и дужина трајања болести су независно повезани са ризиком од макроваскуларних компликација и смрти. Када се говори о развоју микроваскуларних компликација, сматра се да се задовољавајућом гликорегулацијом, дугорочно смањује ризик од ових компликација неvezано за старост пацијената. Трајање дијабетеса је повезано са ризиком од развоја микроваскуларних компликација а овај утицај дужине трајања дијабетеса је већи код млађих него код старијих пацијената.(171) Резултати у нашој популацији су показали да је просечна дужина трајања дијабетеса износила  $13,29 \pm 7,69$  година при чему је најмања дужина трајања болести износила једну годину, а највише 32 године. За разлику од већег броја досадашњих студија, у нашој групи испитаника који су имали дијабетес до 5 година било је 14 (17,5%) болесника, у групи од 6 до 10 година је било 22 (27,5%) испитаника, у трећој групи су били пацијенти са дужином трајања болести од 11 до 15 година, а њих је било 18 (22,5%), док је највећи број испитаника, 26 (32,5%) било у групи која је имала дијабетес преко 15 година. Напоменули смо значај гликорегулације за развој микроваскуларних компликација, а ХБА1Ц представља важан индикатор дуготрајне контроле гликемије са способношћу да се одржава кумулативна историја гликемије у претходна два до три месеца. Он, не само да пружа поуздану меру хроничне хипергликемије, него се и повезује са ризиком дуготрајних, хроничних компликација дијабетеса. Повишени ХБА1Ц се такође сматра независним фактором ризика за настанак микро и макроваскуларних компликација код особа које болују од ДМ. *Vaag* је у Стено 2 студији која је обухватила 160 пацијената у Данској, оболелих од дијабетеса тип 2 закључио да унапређење контроле гликемије код ових пацијената може бити важније од лечења хипертензије и дислипидемије за превенцију како микроваскуларних, тако и макроваскуларних компликација.(172) У раду *Sherwani* и сарадника описан је значај гликорегулације у дијагнози и праћењу оболелих од дијабетес мелитуса тип 2 као и преваленца дијабетеса широм света. (173) Резултати нашег испитивања су показали да је просечна вредност ХБА1Ц  $7,59 \pm 1,34\%$

и није постојала статистички значајна разлика између нивоа ХБА1Ц код пацијаната који су имали регистроване микроваскуларне компликације, њих 33 (41,25%) са микролабуминуријом и пацијаната који су били без хроничних компликација дијабетеса.

Дијабетес мелитус је широко распрострањен у свету, углавном у развијенијим земљама, али је преваленца у сталном порасту широм света, а нарочито у неразвијеним земљама и земљама у развоју укључујући и земље у Азији и Африци за које се сматра да ће имати највећи број оболелих до 2030 године. (11) Повећање инциденце дијабетеса је повезано са начином живота и исхране, мањом физичком активношћу и повећаним уносом високоенергетске хране уз последичну гојазност, што представља један од најзначајнијих фактора ризика за развој дијабетеса. Резултати досадашњих испитивања су показали да гојазност представља значајан независни фактор ризика за развој дијабетеса, а повезана је и са степеном гликорегулације и настанком компликација. *Menke* и сарадници су у својој студији пресека која је обухватила 23.932 учесника старости од 20 до 74 године, а користећи резултате из пет NHANES (*National Health and Nutrition Examination Surveys*) студија у периоду од 1976 до 2010 године, дошли до закључка да је преваленца дијабетеса порасла са 4,7 на 11,2% код мушког пола и од 5,7 на 8,7% у женској популацији, али су након прилагођавања према годинама, раси и индексу телесне масе резултати показали да је преваленца дијабетеса код мушкараца повећана са 6,2 на 9,6% док код жена није било промене 7,6 на 7,5%. БМИ је имао највећи утицај на промену преваленце у испитиваним групама. (174) У нашем истраживању просечна вредност БМИ је била  $27,36 \pm 4,42 \text{ kg/m}^2$  тј. највећи број испитаника је био у групи гојазних. Нормално ухрањених, са БМИ од 18,5 до  $24,9 \text{ kg/m}^2$  било је 25 (31,25%) пацијената док су остали, њих 45 (68,75%) били са прекомерном телесном масом, од тога је 36 пацијената (45%) било у групи са БМИ од 25 до  $29,9 \text{ kg/m}^2$ , а 19 (23,75%) пацијената је било са БМИ преко  $30 \text{ kg/m}^2$ . *Gabriela Mut-Vitcu* и сарадници су у свом истраживању које је обухватило 662 пацијента са дијабетесом од чега је било 580 оболелих од ДМ тип 2 пронашли повезаност између БМИ и гликорегулације Пацијенти који су имали БМИ  $>25 \text{ kg/m}^2$  имали су и веће вредности ХБА1Ц, тј. лошију гликорегулацију. (175) За разлику од њих, у нашој испитиваној популацији није добијена корелација између гликорегулације и БМИ, ( $p=0,759$ ). *Ganz* и сарадници су у проспективној студији од

25.241 пацијента са ДМ тип 2 у периоду праћења од јануара 2004. до октобра 2011. године и 50.482 здраве контроле доказали да постоји повезаност између БМИ и развоја дијабетеса тип 2, а слични резултати су добијени и у нашој студији пресека. (176)

Осим индекса телесне масе, на појаву дијабетеса, а нарочито његових хроничних компликација могу утицати и навике у пушењу. Постоји пуно доказа да пушење повећава ризик од дијабетеса, а највећи број кохортних студија је спроведен у Кореји и Јапану, мада нису занемарљиве и студије о повезаности навика у пушењу и дијабетеса. *Cho* и сарадници су у четворогодишњој студији праћења на 4.041 испитаника мушког пола у руралним и урбаним срединама у Кореји установили да су пушачи имали значајно повећан ризик од дијабетеса типа 2, а ризик се повећао са бројем цигарета који су конзумирали. (177) Слични резултати су добијени и у другим проспективним студијама. У нашој студији је било 39 (48,75 %) пушача, а 41 (51,25%) су били непушачи. Што се тиче микроваскуларних компликација у смислу дијабетесне нефропатије која је дијагностикована појавом микроалбуминурије, од 80 наших испитаника, њих 33 је имало микроалбуминурију, од којих је било само 13 (16,25%) пушача што се разликује од резултата *Yeom* и сарадника који је спровео истраживање са пушачима оболелим од ДМ тип 2 и од 629 пацијаната, њих 213 (33,9%) било са манифестном ДН у смислу микролабуминурије. (178) Закључак да је хипертензија присутна код више од 50% пацијената са ДМ је потврђен у већем броју клиничких студија, а у познатој студији за преваленцу кардиоваскуларног ризика, која се спроводи у Хонг Конгу, дошло се до закључка да само 42% пацијената са дијабетесом има нормалне вредности артеријског притиска и да 52% људи који имају хипертензију има нормалне вредности гликемије. (179) До сличних резултата се дошло и у популацији САД где је хипертензија описана код око 30 % пацијената са ДМ тип 1 и код 50-80% пацијената са дијабетес мелитусом тип 2. Такође се дошло до закључка да се ДМ тип 2 у САД јавља 2-2,5 пута чешће код пацијената који имају хипертензију у односу на здраву популацију. (180) Удруженост хипертензије и ДМ значајно доприноси развоју микро и макроваскуларних компликација дијабетеса, а самим тим се повећава и ризик од кардиоваскуларних и цереброваскуларних оболења. Мета анализа која је обухватила 102 проспективне клиничке студије спроведена на 698.782 пацијената је потврдила ове закључке. (181) У нашој групи испитаника, код већине

оболелих, укупно 66 (82,50%) је била присутна артеријска хипертензија ( $TA > 135/85$  mmHg), са максималним вредностима систолног притиска од 180 mmHg и дијастолног притиска од 100 mmHg, при некој од контрола, али када није вршено узорковање.

## 5.2 Уринарне концентрације колагена тип IV код оболелих од дијабетеса тип 2 и повезаност са дијабетском нефропатијом

Дијабетесна нефропатија представља једну од најважнијих микроваскуларних компликација ДМ, а морфолошки је карактерише задебљање гломеруларне базалне мембране (ГБМ) и повећање мезангијалног матрикса, што претходи појави микроалбинурије (116). Главни конституент базалне мембране у гломерулима је колаген тип IV, протеин молекулске масе 540 kDa који се екскретује уколико постоји оштећење базалне мембране и може бити уринарни маркер раног оштећења гломеруларне мембране код оболелих од ДМ. (118) Повишене вредности уринарног колагена тип IV се могу јавити и услед оштећења ГБМ код примарних гломерулопатија али је однос колаген тип IV/албумин већи код оболелих од дијабетеса што има диференцијално - дијагностички значај и може сврстати колаген тип IV у групу биомаркера дијабетесне нефропатије. (122) Повишене вредности серумске глукозе које су присутне код особа оболелих од дијабетеса подстичу синтезу, а могу утицати и на смањење разградње колагена тип IV што доводи до накупљања колагена тип IV у ГМБ и мезангијском матриксу оболелих. Последишно, долази до повећаног излучивања колагена и у случајевима када није присутна микроалбинурија што би сврстало колаген тип IV у ране биомаркере дијабетесне нефропатије. (124,125) Већи број досадшњих студија је показао повећано излучивање колагена тип IV код пацијената са ДМ независно од микроалбинурије. (119–122,124) У нашој студији је од 80 испитаника, њих 33 (41,25%) имало регистровану микроалбинурију чија је просечна вредност износила  $67,75 \pm 52,90$  mg/24h док је у групи нормоалбуминуричних било 47 (58,75%) са просечном вредности албуминурије од  $21,24 \pm 3,72$  mg/24h. Између ове две групе испитаника је постојала статистички значајна разлика у погледу излучивања албумина ( $p < 0,001$ ). Према вредности албуминурије смо вршили мерење уринарне концентрације колагена тип IV у првом



јутарњем и у 24-часовном урину, где смо добили статистички значајну разлику у нивоу колагена у јутарњем урину (*Pearson's r*-0,244;  $p < 0,002$ ), а сличне резултате смо добили и за вредности колагена у 24- часовном урину где је просечна концентрација колагена код микроалбуминуричних износила 0,969 *ng/ml*, док је код пацијената који су били нормоалбуминурични просечно излучивање колагена износило 0,548 *ng/ml*, са *Pearson's r*-0,384;  $p < 0,001$ , што указује на статистички значајну разлику између испитиваних група. Добијени резултати су подударни са резултатима мултицентричне студије *Tomina* и сар. где је испитивано 698 оболелих од дијабетеса од којих је 264 било нормоалбуминурично, док су остали били са различитим степеном албуминурије и 191 здравих особа. Степен излучивања колагена је био у корелацији са албуминуријом и степеном бубрежног оштећења. (182) Сличне резултате је објавио и *Araki* са сар. анализирајући групу од 254 оболела од дијабетеса од којих је 185 било нормоалбуминурично а 69 је имало микроалбуминурију. (121) Осим апсолутних вредности колагена, слични резултати су добијени и у коригованим вредностима према креатинину исказаним у  $\mu\text{g/gCr}$ . *Pearson's* коефицијент корелације за кориговане вредности колагена у јутарњем урину је износио  $r$ -0,088 и  $p < 0,001$ , а код 24-часовног урина  $r$ -0,082 и  $p < 0,004$ , што указује да постоји статистички значајна разлика у концентрацији колагена у ове две групе испитаника, при чему су концентрације уринарног колагена углавном више код пацијената који су имали већу албуминурију. *Mahendran* и сар. су у својој студији на 150 пацијената оболелих од ДМ тип 2 показали да је концентрација колагена тип IV значајно већа код нормоалбуминуричних пацијената у односу на здраву контролу, и да се повећава са настанком и повећањем албуминурије. (118) Исти аутор, у другој студији на 50 оболелих од дијабетеса тип 2 чија је дужина болести износила више од пет година, а старост испитиване популације од 35 до 60 година, је дошао до закључка да је ниво уринарног и плазма колагена повећан и код нормоалбуминуричних пацијената и да би колаген тип IV могао бити рани маркер ДН. (183) У истраживању *Sthaneshwar* и сар. добијени су слични резултати на основу којих се уринарни колаген тип IV може сврстати у ране предикторе развоја дијабетесне нефропатије. (184) Анализом резултата добијених у нашој студији извели смо исте закључке. Имајући у виду чињеницу да дужина болести и гликорегулација утичу на појаву компликација, имали смо за циљ да испитамо да ли године дијабетеса и вредност

ХБА1Ц утичу на излучивање колагена тип IV. Према дужини трајања болести пацијенти су подељени у четири групе (до 5 година, од 6-10 година, од 11-15 и више од 15 година), а анализом утицаја дужине трајања дијабетеса на излучивање колагена тип IV у испитиваној популацији, закључили смо да не постоји статистички значајна разлика у концентрацији колагена, код испитиваних група, тј. да дужина трајања болести нема утицаја на концентрацију излученог колагена. (вредност  $p=0,82$  за јутарњи урин, и  $p=0,93$  за концентрације у 24-часовном урину). Слични резултати су добијени и за повезаност између дужине трајања болести и кориговане вредности колагена према креатинину. У студији *Sthaneshwar* и сар. није нађена статистички значајна разлика у резултатима који су поредили пацијенте према дужини оболења и нивоу ХБА1Ц. (184) *Inoue* и сар. су код особа оболелих од ДМ тип 2 испитивали концентрацију колагена тип IV у урину, кориговану према креатинину и дошли до закључка да ХБА1Ц утиче на излучивање колагена, тј. да је концентрација колагена у урину била значајно мања код пацијената са добром метаболичком контролом (ХБА1Ц<8,0%). (185) У нашој студији, независно од тога да ли се пореди апсолутна вредност колагена тип IV или коригована према креатинину, није постојала статистички значајна разлика ( $p$  од 0,34 до 0,82) између поређених група, тј. гликорегулација није имала утицаја на излучивање колагена тип IV.

Од интереса за наше истраживање било је да утврдимо да ли ухрањеност болесника и БМИ имају утицај на излучивање уринарног колагена тип IV, а резултати до којих смо дошли указују на чињеницу да вредности колагена у три испитиване групе, према индексу телесне масе нису показале статистичку значајност ( $p=0,24$  и 0,76), за апсолутне вредности. Сличне вредности су добијене и анализом коригованих вредности колагена, тј. није нађена статистички значајна разлика у вредностима колагена између три групе испитаника поређених према БМИ, а до таквих резултата су у својим истраживањима дошли *Inoue* и сарадници.

Осим наведених параметара, од значаја за наше истраживање је било да утврдимо да ли постоји повезаност између концентрације колагена тип IV и дијабетесне ретинопатије, као друге најчешће хроничне компликације дијабетес мелитуса. Између две групе пацијената, оних који су имали ретинопатију и без дијабетесне ретинопатије, анализирали смо да ли старост пацијента, БМИ, гликорегулација, дужина трајања дијабетеса, микроалбуминурија и концентрације уринарног колагена

у апсолутним и коригованим вредностима имају утицаја на појаву дијабетесне ретинопатије код пацијената у испитиваној популацији. Као и у студији *Vani* и сар. и другим досадашњим студијама, резултати у нашем испитивању наводе на закључак да, између две испитиване групе пацијената, са ретинопатијом и без, у погледу старости, индекса телесне масе, гликорегулације и концентрације уринарног колагена тип IV не постоји статистички значајна разлика ( $p$  од 0,196 до 0,971), без обзира да ли је анализа вршена према апсолутним или коригованим вредностима колагена тип IV. Узимајући у обзир досадашња испитивања, ни за један од наведених начина анализе концентрација колагена тип IV се не може рећи да је идеалан. При тумачењу апсолутних концентрација неког од уринарних биомаркера, олигурија ће довести до повећања, полиурија ће узроковати смањење апсолутних концентрација биомаркера, уколико су стопе продукције и екскреције непромењене. Кориговање концентрације уринарног биомаркера према концентрацији креатинина у урину узима у обзир разлике у волумену излученог урина. Међутим, при кориговању ових вредности мора се узети у обзир стопа екскреције креатинина од стране бубрега. При томе, вредности уринарне екскреције креатинина могу варирати код исте особе на дневном нивоу, при чему је вредност серумског креатинина стабилна. Понављаним одређивањем концентрације креатинина у 24 сата скупљеном волумену урина, утврђено је да је интра-индивидуални коефицијент варијације износио 10,5 до 14,4 %. (186) Остале студије су такође указале на дневне варијације у екскрецији креатинина у урину, као и варијабилност у екскрецији од часа до часа. (187,188)

Закључак досадашњих испитивања би био да апсолутне концентрације уринарног биомаркера могу бити нереалне због разлике у волумену излученог урина, док концентрације кориговане према концентрацији уринарног креатинина могу бити нереалне због разлике у стопи екскреције креатинина. Одређивање концентрације уринарног биомаркера који показује стабилност у концентрацији током периода прикупљања од 24 сата, као што је доказано за колаген тип IV, обезбеђује најбољу процену стопе екскреције биомаркера и вероватно најбољи начин за поређење његове концентрације између различитих особа. Међутим, постоје озбиљна практична ограничења за прикупљање 24-часовног урина, посебно у амбулантним условима. Закључак *Waikar* и сар. је да би истраживачи требало приликом тумачења нормализованих тј. коригованих вредности уринарних биомаркера да узму у обзир

разлике у стопи екскреције креатинина у урину. Заправо, у неким случајевима нормализација може лажно повећати дијагностички значај биомаркера, а некритичко прихватање таквих вредности довести до погрешних закључака.(189)

Поређењем апсолутних и коригованих концентрација колагена тип IV у нашој студији, показали смо да обе вредности имају дијагностички значај за рану дијагнозу ДН, тј. обе вредности су, без разлике биле статистички значајно више код пацијената који су имали микролабуминурију.

### 5.3 Уринарне концентрације трансферина код оболелих од дијабетеса тип 2 и повезаност са дијабетсном нефропатијом

Трансферин је протеин плазме, нешто веће молекулске масе од албумина (76,5 kDa) и представља главни транспортер гвожђа у организму, а уринарни трансферин је показатељ оштећења гломеруларне мембране. (101) Концентрација уринарног трансферина је повећана код пацијената са дијабетес мелитусом, у поређењу са здравом контролом, чак и код оних који немају микроалбуминурију, а трансферинурија корелише са уринарном екскрецијом албумина и повећава се паралелно са албуминуријом. (132,133). Пацијенти са ДМ имају повећано излучивање трансферина пре појаве албуминурије, а однос албумин/трансферин значајно је мањи код нормоалбуминуричних и микролабуминуричних у односу на макроалбуминуричне пацијенте, чиме се уринарни трансферин може сврстати у групу сензитивних биомаркера гломеруларног оштећења код оболелих од ДМ. (133,190)

У нашој студији смо поређењем апсолутних вредности уринарног трансферина добили статистички значајну разлику између две групе пацијената са ДМ тип 2. У групи која је имала микролабуминурију просечна вредност трансферина у апсолутним вредностима је била значајно већа у односу на групу пацијената који нису имали албуминурију, а *Pearson's* коефицијент је  $r=0,531$  за трансферин у 24 часовном урину и  $r=0,456$  за јутарњи урин, уз статистичку значајност  $p<0,001$ . Поред апсолутне, одређена је и концентрација уринарног трансферина коригована према концентрацији креатинина у узорку урина и изражена у  $\mu\text{g/gCr}$ . *Pearson's* коефицијент корелације за кориговане вредности трансферина у јутарњем урину је износио  $r=0,354$  и  $p<0,001$ ,

док је код 24-часовног урина  $r=0,489$  и  $p<0,001$ , а добијени резултат указује да постоји статистички значајна разлика у концентрацији трансферина код две групе испитаника у односу на микролабуминурију. Просечне концентрације уринарног трансферина су биле више код пацијената који су имали већу албуминурију. *Kazumi* и сар. су у проспективној студији током две године пратили 77 пацијената са дијабетесом, а у испитивање су били укључени пацијенти без албуминурије, са манифестном микроалбуминуријом и са трансферинуријом. У њиховој групи од 16 пацијената који су иницијално имали трансферинурију, 31% је развило микролабуминурију, тако да је закључак аутора био да екскреција трансферина може бити предиктивни фактор за развој микроалбуминурије код нормоалбуминуричних пацијената са ДМ тип 2. (130) *Kanauchi* и сар. су у својој студији на 60 пацијената оболелих од ДМ тип 2, такође показали да постоји значајна корелација између уринарне екскреције трансферина и албуминурије и да је концентрација трансферина значајно већа код макроалбуминуричних у односу на микроалбуминуричне и нормоалбуминуричне. (191)

У истраживању *Narita* и сар. у популацији пацијената са ДМ тип 2 у студији пресека са 61 нормоалбуминуричним пацијентом и 17 здравих контрола нађене су повишене вредности уринарног трансферина код оболелих у односу на здраву популацију. У другој проспективној студији у трајању од пет година, од 140 пацијента студију је завршило 117 иницијално нормоалбуминуричних који су имали повишене вредности трансферина. Око 15% ових пацијената, који су на почетку имали највише вредности уринарног трансферина је на крају периода праћења имало микроалбуминурију. (129,137) Анализом добијених резултата у нашем истраживању, независно да ли се ради о апсолутним или коригованим вредностима трансферина, у поређењу са степеном микроалбуминурије, дошли смо до сличних закључака.

Осим поређења концентрације уринарног трансферина са микролабуминуријом имали смо за циљ да испитамо да ли године дијабетеса утичу на излучивање овог биомаркера. Анализом резултата у нашој популацији оболелих није нађена статистички значајна разлика између дужине трајања болести и концентрације уринарног трансферина, како у апсолутним тако и у коригованим вредностима. (вредност  $p=0,98$  за јутарњи урин, и  $p=0,83$  за концентрације трансферина у 24-часовном урину у апсолутним вредностима, а  $p=0,90$  за јутарњи урин, и  $p=0,49$  за

кориговане концентрације трансферина). *O'Donnell* и сар. су у свом истраживању дошли до истог закључка, тј. није нађена корелација између екскреције трансферина и дужине трајања болести код пацијената са ДМ. (138) Сличне резултате су приказали *Cheung* и сар. у свом раду у ком су анализирали 157 пацијената оболелих од ДМ тип 2 и 53 здраве контроле. (192) За разлику од ових резултата, *Zhou* и сар. су у резултатима свог истраживања на групи од 61 пацијента оболелог од ДМ 2 и 40 здравих контрола описали да постоји корелација између нивоа уринарног трансферина и дужине трајања болести. (133)

Ниво гликорегулације је такође значајан код пацијената са ДМ, а у студији *O'Donnell* и сар. је нађена статистички значајна корелација између нивоа ХБА1Ц и уринарног трансферина, а статистичку значајност гликорегулације је описао и *Zhou* и сар. (133,138) Супротне резултате, су добили *Cheung* и сар. као и *Kazumi* и сар који су описали да не постоји корелација између нивоа трансферина и вредности ХБА1Ц, а наши резултати су упоредиви са резултатима ове две студије.(192,193) У нашој студији, независно од тога да ли је вршено поређење апсолутних вредности трансферина или коригованих према креатинину, није постојала статистички значајна разлика ( $p=0,419$  за јутарњи и  $p=0,659$  за 24-часовни урин у апсолутним вредностима, односно  $p=0,617$  и  $p=0,746$  за кориговане вредности трансферина) између поређених група, тј ниво ХБА1Ц није имао утицај на излучивање трансферина.

У нашем истраживању смо вршили анализу утицаја ухрањености болесника и БМИ на излучивање трансферина. Добијени резултати нису показали статистичку значајност, тј није нађена значајна разлика у концентрацији уринарног трансферина између група пацијената према БМИ, независно да ли се ради о апсолутним или коригованим вредностима према креатинину. Сличне резултате је добио и *Al-Rubeaan* и сар. у својој студији пресека на 467 пацијената оболелих од дијабетеса тип 2. (140) Осим наведених параметара и њиховог утицаја на излучивање трансферина код особа оболелих од дијабетеса тип 2, за нашу студију је било од значаја да утврдимо да ли постоји повезаност између уринарних концентрација трансферина и дијабетесне ретинопатије, као друге најчешће микроваскуларне компликације дијабетес мелитуса. Анализирајући уринарну концентрацију трансферина у групи испитаника која је имала ретинопатију нађене су значајно више вредности овог биомаркера у односу на групу испитаника који нису имали ову микровакуларну компликацију ( $p$  од 0,003 до

0,014). Закључак до ког смо дошли у нашем истраживању корелише са резултатима *C. K. Cheung* и сар. који су у својој студији са 157 пацијената оболелих од ДМ тип 2, закључили да су вредности уринарног трансферина статистички значајно веће код пацијената код којих је потврђено постојање дијабетесне ретинопатије. (192) *Gluhovschi* и сар. су такође описали повезаност између уринарне концентрације трансферина и дијабетесне ретинопатије. (194) У студији која је укључивала 61 нормоалбуминуричног пацијената са ДМ тип 2 и 17 здравих контрола, а коју су спровели *Narita* и сар. дошли су до закључка да постоји позитивна корелација између нивоа уринарног трансферина и дијабетесне ретинопатије. (129)

#### 5.4 Уринарне концентрације везујућег протеина масних киселина јетре (L-FABP) код оболелих од дијабетеса тип 2

Везујући протеин масних киселина јетре ( L-FABP - Liver-type fatty acid-binding protein) је протеин молекулске масе  $14kDa$  који се екскретије у хепатоцитима и проксималним тубулима бубрега, а повишене концентрације овог биомаркера у урину могу бити први знак развоја и прогресије дијабетесне нефропатије. Већи број студија је показао да је повишен ниво L-FABP у корелацији са постојањем албуминурије, и представља маркер тубуларног оштећења код оболелих од ДМ тип 2. (195) Иако његова улога није у потпуности разјашњена, верује се да L-FABP у бубрегу има заштитну функцију и представља ендогени антиоксиданс који спречава тубулоинерстицијско оштећење. (144)

Новија истраживања су показала да је уринарни L-FABP повишен код оболелих од дијабетес мелитуса, пре стандардних гломеруларних биомаркера и да његова концентрација корелира са тежином дијабетесне нефропатије. (148,149) Осим тога, закључено је да ниво L-FABP у серуму не утиче на излучивање, што указује на чињеницу да је L-FABP измерен у урину резултат губитка преко ћелија тубула. Концентрација излученог L-FABP се повећава са погоршањем реналне функције, а нађена је већа стопа кардио-васкуларних догађаја код пацијената са дијабетесом тип 2 који су имали манифестну дијабетесну нефропатију и повишене вредности овог биомаркера. (151,196)

Наведени подаци су били разлог због којег смо се определили да анализирамо овај биомаркер у нашој студији која је укључила 80 пацијената оболелих од дијабетеса мелитуса тип 2. Као и за претходна два биомаркера параметар за груписање пацијената је била албуминурија на основу које су подељени у две групе, без албуминурије и са албуминуријом. Анализирајући вредности уринарног L-FABP, између ове две групе испитаника у првом јутарњем и 24 часовном урину дошли смо до закључка да постоји значајна разлика између поређених група ( $r=0,430$  и  $r=0,439$  за апсолутне, односно  $r=0,440$  и  $r=0,441$ , за кориговане вредности уз  $p<0,001$  у свим поређеним групама). У нумеричким вредностима L-FABP у групи која је имала микролабуминурију је износила  $525,03\pm 215,32$  ng/ml, за 24 часовни урин и  $480,15\pm 297,95$  ng/ml, за први јутарњи урин, док су вредности у групи без микролабуминурије износиле  $253,61\pm 255,85$  ng/ml, за 24 часовни и  $228,08\pm 199,16$  ng/ml, за јутарњи урин. Када смо добијене вредности L-FABP кориговали према креатинину добили смо резултате који такође говоре у прилог значајности разлике у концентрацији L-FABP код микроалбуминуричних и код нормаалбуминуричних пацијената ( $p<0,001$ ). Сличне резултате је у својој студији пресека на 65 пацијената и 13 здравих контрола су добили и *Viswanathan* и сар. који су закључили да су вредности L-FABP у урину здравих испитаника биле немерљиве и описали су да је концентрација уринарног L-FABP била већа код пацијената који су имали макроалбуминурију у поређењу са групом која је имала микролабуминурију и оних који су били нормаалбуминурични. (195) *Kamijo-Ikemori* и сар. у студији пресека на 140 пацијената и 412 контрола испитивао је концентрације L-FABP, а потом је наставио праћење 104 пацијента у трајању од 4 године. Резултати ове студије су такође показали значајну разлику у концентрацији уринарног L-FABP између посматраних група, при чему је повећање концентрације L-FABP било повезано са повећањем албуминурије. Ови резултати су потврђени и током њихове студије праћења, где су код 59 пацијената који за четири године нису имали манифестне знаке дијабетесне нефропатије, нађене повишене вредности уринарног L-FABP. (148)

*Panduru* и сар. су дошли до истих резултата код пацијената са дијабетесом тип 1, где је L-FABP је био независни предиктор развоја и прогресије ДН у свим фазама, што овај биомаркер може сврстати у маркере ДН независно од типа дијабетеса. (147) У студији која је спроведена у Јапану на 356 пацијената са дијабетесом тип 2, од којих



је 216 било нормоалбуминурично *Suzuki* и сар. су описали значајну корелацију између албуминурије и уринарног L-FABP, тј концентрације биомаркера су биле веће код пацијената са већим степеном албуминурије, а осим тога је нађена и повезаност између стадијума ДН и уринарног L-FABP. (197)

Као и за напред наведене биомаркере, од интереса за наше истраживање било је одредити нивое уринарног L-FABP према дужини трајања дијабетеса, а испитаници су, били подељени у четири групе (трајање болести до 5 година, од 6-10 година, од 11-15 и више од 15 година). Анализом утицаја дужине трајања дијабетеса на излучивање L-FABP нисмо нашли статистички значајну разлику између испитиваних група. У апсолутним вредностима L-FABP се кретао од 288,32 до 379,36 *ng/ml* уз *p*-0,73 за јутарњи урин, и од 317,85 до 427,34 *ng/ml*, а *p*-0,62 за концентрације L-FABP у 24-часовном урину. Средње концентрације L-FABP кориговане према креатинину су износиле од 528,49 до 683,16 *μg/gCr*, и *p*-0,77 у јутарњем урину, и од 594,14 до 794,51 *μg/gCr* уз *p*-0,70 у 24-часовном урину. Из добијених резултата смо закључили да дужина трајања болести нема утицај на излучивање L-FABP. *Kamijo-Ikemori* и сар. су у свом истраживању, дошли до истих резултата. *Panduru* и сар. су у својој студији пратили 2454 пацијената у трајању од 5,8 година, при чему је 1549 било нормоалбуминурично, 334 са микроалбуминуријом, 363 са макроалбуминуријом и 208 здравих контрола и дошли до истих закључака. (147,148)

Степен гликорегулације и вредност ХбА1Ц су значајни фактори за настанак компликација дијабетеса, а самим тим нам је био циљ да одредимо да ли ХбА1Ц утиче на концентрацију излученог L-FABP код оболелих од ДМ тип 2 у нашој популацији. У раније поменутој студији коју су спровели *Viswanathan* и сар. на 65 пацијената и 13 контрола није нађена повезаност између ХбА1Ц и концентрације излученог L-FABP. (195) Резултати које смо добили у нашем испитивању такође говоре у прилог чињенице да гликорегулација нема утицај на концентрацију уринарног L-FABP. Испитивани пацијенти су према нивоу ХбА1Ц били подељени у две групе где је граница за прихватљиву вредност ХбА1Ц била 7,0%, а независно од тога да ли се пореде апсолутне вредности L-FABP или вредности кориговане према креатинину, није постојала значајна разлика између поређених група, тј. гликорегулација није утицала на излучени L-FABP (вредност *p* од 0,09 до 0,202). *Hiroyuki* и сар. су у анализи коју су започели са 788 пацијената, и након шест месеци, завршили са 666 пацијената,

дошли до резултата који повезују ХБА1Ц и концентрацију излученог L-FABP, тј. да су вредности L-FABP биле веће код пацијената који су имали веће вредности ХБА1Ц, тј. лошију гликорегулацију. (198)

Анализом наших пацијената према БМИ (три групе, до  $24,9 \text{ kg/m}^2$ , од  $25\text{-}29,9 \text{ kg/m}^2$  и преко  $30 \text{ kg/m}^2$ ) дошли смо до закључка да не постоји статистички значајна разлика у концентрацији L-FABP између три групе испитаника према вредности БМИ. За апсолутне и кориговане вредности L-FABP вредности  $p$  су се кретале од 0,40 до 0,97. Као и у већем броју студија у студији *Fiseha* и сар. није нађена повезаност између БМИ и концентрације L-FABP. (199)

Дијабетесна ретинопатија представља, другу хроничну микроваскуларну компликацију дијабетеса за чији настанак је одговорно више фактора, а ми смо имали за циљ да прикажемо да ли постоји поветаност између новог L-FABP и присутне ретинопатије код наших испитаника. Што се тиче овог биомаркера, добијени резултати су слични резултатима које смо добили анализом уринарних концентрација колагена тип IV, тј између две групе пацијената подељене према ретинопатији, није постојала статистички значајна разлика (вредност  $p$  од 0,30 до 0,74), без обзира да ли је анализа L-FABP вршена према апсолутним или коригованим вредностима. За разлику од нас *Ito* и сар. су у свом истраживању нашли веће концентрације L-FABP код пацијената са ретинопатијом, у односу на оне који нису имали ретинопатију, али није наведен степен статистичке значајности. (198)

#### 5.5 Дијагностички потенцијал уринарних концентрација колагена тип IV, трансферина и L-FABP за дијабетесну нефропатију

Након појединачног испитивања уринарних биомаркера у раној дијагнози ДН, на крају смо имали за циљ да одредимо њихов дијагностички потенцијал. За испитивање дијагностичког потенцијала апсолутних и коригованих вредности колагена тип IV, трансферина и L-FABP за дијабетесну нефропатију, одредили смо површину испод ROC криве, са интервалом поузданости (Confidence Interval – CI) 95%. На основу површине испод ROC криве за апсолутне вредности колагена тип IV у јутарњем урину добили смо да је дијагностички потенцијал износио 0,90 (0,84-0,96),

док је за 24-часовни урин био 0,78 (0,69-0,87), а за кориговане вредности колагена колагена тип IV, дијагностички потенцијал је био 0,81 (0,73-0,90) за први јутарњи урин и 0,75 (0,65-0,86) за кориговане вредности 24-часовног урина. Осим дијагностичког потенцијала испитиване су и дискриминационе вредности за ДН. Апсолутна вредности колагена тип IV у јутарњем урину, за коју је постигнута максимална сензитивност (72,7%) и специфичност (83%) је износила 0,630 *ng/ml*, док је за 24-часовни урин максимална сензитивност (66,7%) и специфичност (63,8%) постигнута при концентрацији 0,500 *ng/ml*. За кориговане вредности јутарњег урина при вредности од 1,119  $\mu\text{g/gCr}$  је постигнута сензитивност (66,7%) и специфичност (68,1%) а за 24-часовни урин максимална сензитивност (63,6%) и специфичност (63,8%) је постигнута при концентрацији од 0,948  $\mu\text{g/gCr}$ . Из добијених резултата можемо закључити да само вредност колагена у првом јутарњем урину, у апсолутним вредностима има високу специфичност док све остале вредности, тј. апсолутне вредности у 24-часовном урину и обе кориговане вредности имају умерену сензитивност.

У нашој студији смо спровели испитивање дијагностичког потенцијала уринарног трансферина за дијабетесну нефропатију, у апсолутним и коригованим вредностима. На основу површине испод *ROC* криве добили смо дијагностички потенцијал за апсолутне вредности трансферина у јутарњем урину који је износио 0,87 (0,79-0,94), и 0,88 (0,82-0,96) у 24-часовном урину. За кориговане вредности је био 0,87 (0,79-0,94) за јутарњи урин и 0,89 (0,82-0,95) за 24-часовни урин. Вредности дијагностичког потенцијала трансферина за дијабетесну нефропатију су биле значајне, при чему је апсолутна вредности трансферина у првом јутарњем урину имала најбољи дијагностички потенцијал. Испитивањем дискриминационих вредности за уринарни трансферин код особа оболелих од дијабетеса, у нашој студији смо добили да је најбоља гранична вредност за коју је постигнута сензитивност (78,8%) и специфичност (78,7%), за апсолутне вредностим трансферина у јутарњем урину износила 21,62 *ng/ml*, а за 24 часовни урин 22,32 *ng/ml* са сензитивношћу (81,8%) и специфичношћу (80,9%). За кориговане вредности трансферина у јутарњем урину максимална сензитивност (75,5%) и специфичност (76,6%) се постижу при концентрацији трансферина од 40,21  $\mu\text{g/gCr}$ , док је у 24-часовном урину најбоља гранична вредност од 41,57  $\mu\text{g/gCr}$  уз сензитивност (78,8%) и специфичност (76,6%).

Из резултата добијених у нашој студији изводи се закључак да само трансферин у апсолутним вредностима за 24-часовни урин има високу сензитивност и специфичност, док су остали резултати у групи умерене сензитивности и специфичности. *Al-Rubeaan* и сар. су у својој студији вршили испитивање дијагностичког потенцијала за 22 биомаркера међу којима је био и трансферин, а сензитивност који су добили је 70,2%, уз специфичност од 83%, што је слично нашим резултатима. (140)

Испитивањем дијагностичког потенцијала L-FABP за ДН, за апсолутне вредности у јутарњем урину смо добили површину испод *ROC* криве од 0,75 (0,64-0,86) а у 24-часовном је 0,81 (0,71-0,90). Кориговане вредности су биле сличне, са површином испод *ROC* криве од 0,76 (0,65 -86) за јутарњи урин, док су у 24- часовном урину вредности испод испод *ROC* криве биле, 0,80 (0,70-0,89,9). За разлику од трансферина најбољи дијагностички потенцијал је нађен код апсолутних вредности у 24-часовом урину.

Анализом дискриминационих вредности за апсолутне вредности L-FABP у првом јутарњем урину, за коју је постигнута максимална сензитивност (63,6%) и специфичност (61,7%) је износила 281,96 *ng/ml*, док је за 24- часовни урин максимална сензитивност (69,7%) и специфичност (68,1%) постигнута при концентрацији 366,12 *ng/ml*. За кориговане вредности јутарњег урина максимална сензитивност (60,6%) и специфичност (61,7%) постигнути су при концентрацији 508,89  $\mu\text{g/gCr}$  за први јутарњи урин, док је 24-часовни урин максимална сензитивност (69,76%) и специфичност (70,2%) постигнута при концентрацији од 738,17  $\mu\text{g/gCr}$ . Из добијених резултата можемо закључити да вредности L-FABP у свим анализираним вредностима имају умерену сензитивност и специфичност. У нама доступним студијама, није било резултата о дијагностичком потенцијалу L-FABP.

Поређењем свих биомаркера у апсолутним вредностима добијена је висока сензитивност и специфичност код апсолутних вредности трансферина у 24 часовном, док су остали биомаркери у својим апсолутним и коригованим вредностима имали умерену сензитивности и прецифичност.

## 6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу добијених резултата може се закључити следеће:

1. На основу повишених концентрација испитиваних уринарних биомаркера може се поставити дијагноза дијабетесне нефропатије, пре појаве микроалбуминурије.
2. Концентрација уринарног колегена тип IV, трансферина и L-FABP је повећана код особа оболелих од дијабетеса, и концентрације ових биомаркера у урину пацијената корелирају са појавом и степеном албуминурије.
3. Дужина трајања болести, индекс телесне масе и гликорегулација не утичу на уринарне концентрације колегена тип IV, трансферина и L-FABP
4. Концентрација трансферина је виша код пацијената који имају дијабетесну ретинопатију, за разлику од колегена тип IV и L-FABP чије концентрације нису повезане са појавом ретинопатије
5. Поређењем концентрација уринарног колегена тип IV, трансферина и L-FABP у узорцима јутарњег и 24-часовног урина, у апсолутним и коригованим вредностима није показана статистички значајна разлика, тако да се за испитивања може користити узорак јутарњег урина.
6. Уринарни трансферин је показао највећу сензитивност и специфичност за дијагнозу дијабетесне нефропатије, а с обзиром да су вредности трансферина у корелацији са појавом дијабетесне ретинопатије, може се сматрати биомаркером микроваскулатних компликација дијабетес мелитуса.

**7. ЛИТЕРАТУРА**

1. Lakhtakia R. The History of Diabetes Mellitus. Sultan Qaboos Univ Med J. 2013 Aug 25;13(3):368–70.
2. Ahmed AM. History of Diabetes Mellitus. Saudi Med J. 2002;23(4):373–8.
3. White JR. A Brief History of the Development of Diabetes Medications. Diabetes Spectr. 2014;27(2):82–6.
4. Barnett DM and LPK. The History of Diabetes. In: Kahn, C.R., G.C. Weir, G.L. King, A.M. Jacobson ACM and RJS, editor. Joslin's Diabetes Mellitus. 14th ed. Boston; 2005. p. 3–15.
5. MacCracken J HD. From ants to analogues. Puzzles and promises in diabetes management. Postgrad Med. 1997;101(4):138–50.
6. Sakula A. Paul Langerhans (1847-1888): a centenary tribute. J R Soc Med. 1988;81(7):414–5.
7. Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA. Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. Can Med Assoc J. 1922;12(3):141–6.
8. Bell GI, Pictet RL, Rutter WJ, Cordell B, Tischer E, Goodman HM. Sequence of the human insulin gene. Nature. 1980 Mar;284(5751):26–32.
9. Amitani M, Asakawa A, Amitani H, Inui A. The role of leptin in the control of insulin-glucose axis. Front Neurosci. 2013;7:51.
10. Entmacher PS, Marks HH. Diabetes in 1964: A World Survey. Diabetes. 1965;14(4):212–23.
11. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global Prevalence of Diabetes. Diabetes Care. 2004;27(5):1047–53.
12. WHO. Global report on diabetes. 2016.
13. Agardh E, Allebeck P, Hallqvist J, Moradi T, Sidorchuk A. Type 2 diabetes incidence and socio-economic position: a systematic review and meta-analysis. Int J Epidemiol. 2011;40(3):804–18.
14. Tamayo T, Rosenbauer J, Wild SH, Spijkerman AMW, Baan C, Forouhi NG, et al. Diabetes in Europe: An update. Diabetes Res Clin Pract. 2014;103(2):206–17.
15. Lalić NM, Zamaklar M, Pudar G, Kocić R, Antić S, Pešić M SE et al. . Nac vodič dobre Klin prakse DIABETES Mellit. 2012;
16. International Diabetes Federation (IDF). IDF Diabetes Atlas 7th edition. idf.org. 2015.
17. Tuttle KR, Bakris GL, Bilous RW, Chiang JL, de Boer IH, Goldstein-Fuchs J, et al. Diabetic Kidney Disease: A Report From an ADA Consensus Conference. Diabetes Care. 2014 Oct 10;37(10):2864–83.

18. Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, Linnenkamp U, Guariguata L, Cho NH, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017;128:40–50.
19. Siddiqui AA, Siddiqui SA, , Suhail Ahmad SS, Ahsan I, Sahu K. Diabetes: Mechanism, Pathophysiology and Management-A Review. *Int J Drug Dev Res.* 2013;5(2):1–23.
20. Association AD. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 2010;33(Suppl 1):S62–9.
21. Gillespie KM. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. *C Can Med Assoc J.* 2006;175(2):165–70.
22. WHO Expert Committee on Definition. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. 1999;Geneva:1-59.
23. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. *Lancet.* 2000;355:873–6.
24. Foulis AK, McGill M FM. Insulinitis in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in man — macrophages, lymphocytes, and interferon-gamma containing cells. *J Pathol.* 1991;165(2):97–103.
25. Richard I. G. Holt. DIGAMI-2 –the Optimal Management of Hyperglycaemia RemainsControversial. *Diabetes, Obes Metab.* 2004;7(1):110–6.
26. Ozougwu JC, Obimba KC, Belonwu CD, and Unakalamba CB. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J Physiol Pathophysiol.* 2013;4(4):46–57.
27. Nerup J, Platz P, Andersen OO, Christy M, Lyngsoe J, Poulsen JE, Ryder LP, Nielsen LS, Thomsen M SA. HL-A antigens and diabetes mellitus. *Lancet.* 1974;2(7885):864–6.
28. Devendra D, Eisenbarth GS. 17. Immunologic endocrine disorders. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(2):S624–36.
29. Caillat-Zucman S, Garchon HJ, Timsit J, Assan R, Boitard C, Djilali-Saiah I, et al. Age-dependent HLA genetic heterogeneity of type 1 insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1992 Dec;90(6):2242–50.
30. Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, MacMurray J, Meloni GF, Lucarelli P, Pellicchia M, Eisenbarth GS, Comings D MT. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet.* 2004;36(4):337–8.
31. Atabani SF, Thio CL, Divanovic S, Trompette A, Belkaid Y, Thomas DL KC. Association of CTLA4 polymorphism with regulatory T cell frequency. *Eur J Immunol.* 2005;35(7):2157–62.
32. Thio CL, Mosbrugger TL, Kaslow RA, Karp CL, Strathdee SA, Vlahov D, et al. Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 Gene and Recovery from Hepatitis B Virus Infection. *J Virol.* 2004;78(20):11258–62.

33. Gregersen PK. Gaining insight into PTPN22 and autoimmunity. *Nat Genet.* 2005 Dec;37(12):1300–2.
34. Weets I, De Leeuw IH, Du Caju MVL, Rooman R, Keymeulen B, Mathieu C, et al. The Incidence of Type 1 Diabetes in the Age Group 0–39 Years Has Not Increased in Antwerp (Belgium) Between 1989 and 2000. *Diabetes Care.* 2002;25(5):840–6.
35. Taylor R. Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Diabetes.* 2012;61(4):778–9.
36. Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet.* 2014;383(9922):1068–83.
37. Morino K, Petersen KF, Sono S, Choi CS, Samuel VT, Lin A, et al. Regulation of Mitochondrial Biogenesis by Lipoprotein Lipase in Muscle of Insulin-Resistant Offspring of Parents With Type 2 Diabetes. *Diabetes.* 2012;61(4):877–87.
38. Elbein SC. The Genetics of Human Noninsulin-Dependent (Type 2) Diabetes Mellitus. *Am Soc Nutr Sci.* 1997;127(9):1891–6.
39. Das SK, Elbein SC. The Genetic Basis of Type 2 Diabetes. *Cellscience.* 2006;2(4):100–31.
40. Stephenson E.J. Smiles W. Hawley J.A. The Relationship between Exercise, Nutrition and Type 2 Diabetes. In: *Diabetes and Physical Activity.* 2014. p. 1–10.
41. Baynest HW. Classification, Pathophysiology, Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *Diabetes Metab.* 2015;6(5):1–9.
42. Lapolla A, Dalfrà MG, Ragazzi E, De Cata AP, Fedele D. New International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups (IADPSG) recommendations for diagnosing gestational diabetes compared with former criteria: a retrospective study on pregnancy outcome. *Diabet Med.* 2011;28(9):1074–7.
43. Gilmartin A “Bird” H, Ural SH, Repke JT. Gestational Diabetes Mellitus. *Rev Obstet Gynecol.* 2008;1(3):129–34.
44. Al-Azemi N, Diejomaoh MF, Angelaki E, Mohammed AT. Clinical presentation and management of diabetes mellitus in pregnancy. *Int J Womens Health.* 2014;6:1–10.
45. Association AD. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care.* 2016;39(1):13–22.
46. Brownlee M. The Pathobiology of Diabetic Complications. *Diabetes.* 2005;54(6):1615–25.
47. Brajendra Kumar Tripathi AKS. Diabetes mellitus: Complications and therapeutics. *Med Sci Monit.* 2006;12(7):130–47.
48. Pinhas-Hamiel O, Zeitler P. Acute and chronic complications of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *Lancet.* 2007;369(9575):1823–31.
49. Krentz AJ, Clough G, Byrne CD. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Diabetes, Obes Metab.* 2007;9(6):781–91.



50. Nathan DM. Long-Term Complications of Diabetes Mellitus. *N Engl J Med.* 1993;328(23):1676–85.
51. Duff M, Demidova O, Blackburn S, Shubrook J. Cutaneous Manifestations of Diabetes Mellitus. *Clin Diabetes.* 2015 Jan;33(1):40–8.
52. Chan JCN, So W, Ma RCW, Tong PCY, Wong R, Yang X. The Complexity of Vascular and Non-Vascular Complications of Diabetes: The Hong Kong Diabetes Registry. *Curr Cardiovasc Risk Rep.* 2011;5(3):230–9.
53. Cukierman T, Gerstein HC, Williamson JD. Cognitive decline and dementia in diabetes—systematic overview of prospective observational studies. *Diabetologia.* 2005;48(12):2460–9.
54. Nouwen A, Nefs G, Caramlau I, Connock M, Winkley K, Lloyd CE, et al. Prevalence of Depression in Individuals With Impaired Glucose Metabolism or Undiagnosed Diabetes: A systematic review and meta-analysis of the European Depression in Diabetes (EDID) Research Consortium. *Diabetes Care.* 2011;34(3):752–62.
55. Rosolová H, Petrlová B, Simon J, Sifalda P, Sípová I SF. Macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes patients. *Vnitr Lek.* 2008;54(3):229–37.
56. Ban CR, Twigg SM. Fibrosis in diabetes complications: Pathogenic mechanisms and circulating and urinary markers. *Vasc Health Risk Manag.* 2008;4(3):575–96.
57. Boyle PJ. Diabetes Mellitus and Macrovascular Disease: Mechanisms and Mediators. *Am J Med.* 2007;120(9):S12–7.
58. Joshua A. Beckman, MD, MS; Mark A. Creager, MD; Peter Libby M. Diabetes and Atherosclerosis Epidemiology, Pathophysiology, and Management. *JAMA.* 2001;278(19):2570–81.
59. Avogaro A, Giorda C, Maggini M, Mannucci E, Raschetti R, Lombardo F, et al. Incidence of Coronary Heart Disease in Type 2 Diabetic Men and Women. *Diabetes Care.* 2007;30(5):1241–7.
60. Laing SP, Swerdlow AJ, Carpenter LM, Slater SD, Burden AC, Botha JL, et al. Mortality From Cerebrovascular Disease in a Cohort of 23 000 Patients With Insulin-Treated Diabetes. *Stroke.* 2003;34(2):418–21.
61. John M. Lachin, Saul Genuth, David M. Nathan, Bernard Zinman and BNR. Effect of Glycemic Exposure on the Risk of Microvascular Complications in the Diabetes Control and Complications Trial—Revisited. *Diabetes.* 2008;57:995–1001.
62. Boulton AJM, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R, et al. Diabetic Neuropathies. *Diabetes Care.* 2005;28(4):956–62.
63. Tracy JA, Dyck PJB. The Spectrum of Diabetic Neuropathies. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 2008;19(1):1–26.

64. Reed C, Hong J, Novick D, Lenox-Smith A, Happich M. Incidence of diabetic peripheral neuropathic pain in primary care – a retrospective cohort study using the United Kingdom General Practice Research Database. *Pragmatic Obs Res.* 2013;4:27–37.
65. Edwards JL, Vincent A, Cheng T, Feldman EL. Diabetic Neuropathy: Mechanisms to Management. *Pharmacol Ther.* 2008;120(1):1–34.
66. Callaghan BC, Price RS, Feldman EL. Diagnostic and Therapeutic Advances: Distal Symmetric Polyneuropathy. *JAMA.* 2015;314(20):2172–81.
67. Vinik AI, Maser RE, Mitchell BD, Freeman R. Diabetic Autonomic Neuropathy. *Diabetes Care.* 2003;26(5):1553–79.
68. Longstreth GF. Diabetic thoracic polyradiculopathy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2005;19(2):275–81.
69. Howard W, Sander SC. Diabetic Amyotrophy: Current Concepts. *Semin Neurol.* 1996;16(2):173–8.
70. Tracy JA, Engelstad JK, Dyck PJB. Microvasculitis in Diabetic Lumbosacral Radiculoplexus Neuropathy. *J Clin Neuromuscul Dis.* 2009;11(1):44–8.
71. Grewal J, Bril V, Lewis GF, Perkins BA. Objective Evidence for the Reversibility of Nerve Injury in Diabetic Neuropathic Cachexia. *Diabetes Care.* 2006;29(2):473P–474.
72. JM N. Diabetic neuropathic cachexia: a rare manifestation of diabetic neuropathy. *SMJ.* 2009;102(3):327–9.
73. P PECKET AS. Concurrent Bell's palsy and diabetes mellitus: a diabetic mononeuropathy? *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1982;45:652–5.
74. Stitt AW, Lois N, Medina RJ, Adamson P, Curtis TM. Advances in our understanding of diabetic retinopathy. *Clin Sci.* 2013;125(1):1–17.
75. Tarr JM, Kaul K, Wolanska K, Kohner EM CR. Retinopathy in diabetes. *Adv Exp Med Biol.* 2012;771:88–106.
76. Zheng Y, He M, Congdon N. The worldwide epidemic of diabetic retinopathy. *Indian J Ophthalmol.* 2012;60(5):428–31.
77. Yau JWY, Rogers SL, Kawasaki R, Lamoureux EL, Kowalski JW, Bek T, et al. Global Prevalence and Major Risk Factors of Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care.* 2012;35(3):556–64.
78. Frank RN. Diabetic Retinopathy. *N Engl J Med.* 2004;350(1):48–58.
79. Koo BK. Determinants of the Risk of Diabetic Kidney Disease and Diabetic Retinopathy Independent of Glucose Exposure. *Diabetes Metab J.* 2016;40(6):444–6.
80. Kollias AN, Ulbig MW. Diabetic Retinopathy: Early Diagnosis and Effective Treatment. *Dtsch Arztebl Int.* 2010;107(5):75–84.

81. King P, Peacock I, Donnelly R. The UK Prospective Diabetes Study (UKPDS): clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes. *Br J Clin Pharmacol.* 1999;48(5):643–8.
82. (NGC) NGC. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. 2013.
83. Rahimi Z, Abdi H, Tanhapoor M, Rahimi Z, Vaisi-Raygani A, Nomani H. ACE I/D and MMP-7 A-181G variants and the risk of end stage renal disease. *Mol Biol Res Commun.* 2017;6(1):41–4.
84. Gross JL, de Azevedo MJ, Silveiro SP, Canani LH, Caramori ML, Zelmanovitz T. Diabetic Nephropathy: Diagnosis, Prevention, and Treatment. *Diabetes Care.* 2004;28(1):164–76.
85. Nephropathy in Diabetes. *Diabetes Care.* 2003 Dec 23;27(suppl 1):s79 LP-s83.
86. KDOQI Clinical Practice Guideline for Diabetes and CKD: 2012 Update. *Am J Kidney Dis.* 2017;60(5):850–86.
87. Wada J, Makino H. Historical chronology of basic and clinical research in diabetic nephropathy and contributions of Japanese scientists. *Clin Exp Nephrol.* 2009;13(5):405–14.
88. AS L, Coresh J, Balk E, Al E. National kidney foundation practice guidelines for chronic kidney disease: Evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med.* 2003;139(2):137–47.
89. Reeves WB, Rawal BB, Abdel-Rahman EM, Awad AS. Therapeutic Modalities in Diabetic Nephropathy: Future Approaches. *Open J Nephrol.* 2012 Jun 25;2(2):5–18.
90. Pecoits-Filho R, Abensur H, Betônico CCR, Machado AD, Parente EB, Queiroz M, et al. Interactions between kidney disease and diabetes: dangerous liaisons. *Diabetol Metab Syndr.* 2016;8(1):50.
91. Ziyadeh FN. Mediators of Diabetic Renal Disease: The Case for TGF- $\beta$  as the Major Mediator. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(1 suppl):S55–7.
92. Jerums G, Premaratne E, Panagiotopoulos S, Clarke S, Power DA, MacIsaac RJ. New and old markers of progression of diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017 Jul 31;82:S30–7.
93. Dronavalli S, Duka I, Bakris GL. The pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Clin Pr End Met.* 2008 Aug;4(8):444–52.
94. Wolf G. New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from haemodynamics to molecular pathology. *Eur J Clin Invest.* 2004;34(12):785–96.
95. Mason RM, Wahab NA. Extracellular Matrix Metabolism in Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2003 May 1;14(5):1358–73.
96. Fioretto P, Mauer M. Histopathology of Diabetic Nephropathy. *Semin Nephrol.* 2007;27(2):195–207.
97. Iseki K, Ikemiya Y, Iseki C, Takishita S. Proteinuria and the risk of developing end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2003;63(4):1468–74.

98. Iseki K, Kinjo K, Iseki C, Takishita S. Relationship between predicted creatinine clearance and proteinuria and the risk of developing ESRD in Okinawa, Japan. *Am J Kidney Dis.* 2004;44(5):806–14.
99. Steinke JM, Sinaiko AR, Kramer MS, Suissa S, Chavers BM, Mauer M. The Early Natural History of Nephropathy in Type 1 Diabetes. *Diabetes.* 2005 Jun 27;54(7):2164 LP-2171.
100. Ritz E. Albuminuria and Vascular Damage — The Vicious Twins. *N Engl J Med.* 2003;348(23):2349–52.
101. Matheson A, Willcox MDP, Flanagan J, Walsh BJ. Urinary biomarkers involved in type 2 diabetes: a review. *Diabetes Metab Res Rev.* 2010;26(3):150–71.
102. Penno G, Solini A, Bonora E, Fondelli C, Orsi E, Zerbini G, et al. Clinical significance of nonalbuminuric renal impairment in type 2 diabetes. *J Hypertens.* 2011;29(9):1802–9.
103. Boronat M, García-Cantón C, Quevedo V, Lorenzo DL, López-Ríos L, Batista F, et al. Non-albuminuric renal disease among subjects with advanced stages of chronic kidney failure related to type 2 diabetes mellitus. *Ren Fail.* 2014;36(2):166–70.
104. Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, Bilous RW, Cull CA, Holman RR, et al. Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: The United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney Int.* 2017;63(1):225–32.
105. O'Connor AS, Schelling JR. Diabetes and the Kidney. *Am J Kidney Dis.* 2017;46(4):766–73.
106. Jafar TH, Chaturvedi N, Hatcher J, Levey AS. Use of albumin creatinine ratio and urine albumin concentration as a screening test for albuminuria in an Indo-Asian population. *Nephrol Dial Transplant.* 2007;22(8):2194–200.
107. Sohn TS. Diabetic Nephropathy and Glomerular Filtration Rate. *Korean Diabetes J.* 2008;32(3):182–4.
108. Eknoyan G, Hostetter T, Bakris GL, Hebert L, Levey AS, Parving H-H, et al. Proteinuria and other markers of chronic kidney disease: a position statement of the national kidney foundation (NKF) and the national institute of diabetes and digestive and kidney diseases (NIDDK) 1. *Am J Kidney Dis.* 2017;42(4):617–22.
109. Dwyer JP, Parving H-H, Hunsicker LG, Ravid M, Remuzzi G, Lewis JB, et al. Renal Dysfunction in the Presence of Normoalbuminuria in Type 2 Diabetes: Results from the DEMAND Study. *Cardiorenal Med.* 2012;2(1):1–10.
110. Perkins BA, Ficociello LH, Roshan B, Warram JH, Krolewski AS. In patients with type 1 diabetes and new-onset microalbuminuria the development of advanced chronic kidney disease may not require progression to proteinuria. *Kidney Int.* 2010;77(1):57–64.
111. Nielsen SE, Reinhard H, Zdunek D, Hess G, Gutiérrez OM, Wolf M, et al. Tubular markers are associated with decline in kidney function in proteinuric type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017;97(1):71–6.

112. Moresco RN, Sangoi MB, De Carvalho JAM, Tatsch E, Bochi G V. Diabetic nephropathy: Traditional to proteomic markers. *Clin Chim Acta*. 2013;421:17–30.
113. Lee S-Y, Choi ME. Urinary biomarkers for early diabetic nephropathy: Beyond albuminuria. *Pediatr Nephrol*. 2015;30(7):1063–75.
114. Fu W, Xiong S, Fang Y, Wen S, Chen M, Deng R, et al. Urinary tubular biomarkers in short-term type 2 diabetes mellitus patients: a cross-sectional study. *Endocrine*. 2012;41(1):82–8.
115. Moriya T, Tanaka K, Moriya R. Glomerular structural changes and structural-functional relationships at early stage of diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic patients. *Med Electron Microsc*. 2000;33(3):115–22.
116. Satchell SC, Tooke JE. What is the mechanism of microalbuminuria in diabetes: a role for the glomerular endothelium? *Diabetologia*. 2008;51(5):714–25.
117. Zeisberg M, Bonner G, Maeshima Y, Colorado P, Müller GA, Strutz F, et al. Renal Fibrosis. *Am J Pathol*. 2001;159(4):1313–21.
118. Mahendran KB, Bhaskar MV, Santha K, Inmozhi R, Perumal KK. Plasma and Urinary Type IV Collagen Levels for Early Detection of Nephropathy in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2016;10(4):492–8.
119. Kotajima N, Kimura T, Kanda T, Obata K, Kuwabara A, Fukumura Y, et al. Type IV collagen as an early marker for diabetic nephropathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Diabetes Complications*. 2000;14(1):13–7.
120. Cohen MP, Lautenslager GT, Shearman CW. Increased Collagen IV Excretion in Diabetes. *Diabetes Care*. 2001;24(5):914 LP-918.
121. Araki S, Haneda M, Koya D, Isshiki K, Kume S, Sugimoto T, et al. Association Between Urinary Type IV Collagen Level and Deterioration of Renal Function in Type 2 Diabetic Patients Without Overt Proteinuria. *Diabetes Care*. 2010;33(8):1805–10.
122. Katavetin P, Katavetin P, Susantitaphong P, Townamchai N, Tiranathanagul K, Tungsanga K, et al. Urinary type IV collagen excretion predicts subsequent declining renal function in type 2 diabetic patients with proteinuria. *Diabetes Res Clin Pract*. 2017;89(2):33–5.
123. ZIYADEH FN. Renal tubular basement membrane and collagen type IV in diabetes mellitus. *Kidney Int*. 1993;43:114–20.
124. Banu N, Hara H, Okamura M, Egusa G, Yamakido M. Urinary excretion of type IV collagen and laminin in the evaluation of nephropathy in NIDDM: comparison with urinary albumin and markers of tubular dysfunction and/or damage. *Diabetes Res Clin Pract*. 2017;29(1):57–67.
125. Pavai STHANESHWAR MBBS, MD and \*Siew-Pheng CHAN MBBS F. Urinary type IV collagen levels in diabetes mellitus. *Malaysian J Pathol*. 2010;32(1):43–7.
126. Viswanathan AC-B and G. Urinary Markers of Glomerular Injury in Diabetic Nephropathy. *Int J Nephrol*. 2012;2012:11.

127. Iijima T, Suzuki S, Sekizuka K, Hishiki T, Yagame M, Jinde K, Saotome N, Suzuki D, Sakai H TY. Follow-up study on urinary type IV collagen in patients with early stage diabetic nephropathy. *J Clin Lab Anal.* 1998;12(6):378–82.
128. Haiyashi Y, Makino H, Ota Z. Serum and Urinary Concentrations of Type IV Collagen and Laminin as a Marker of Microangiopathy in Diabetes. *Diabet Med.* 1992;9(4):366–70.
129. Narita T, Sasaki H, Hosoba M, Miura T, Yoshioka N, Morii T, et al. Parallel Increase in Urinary Excretion Rates of Immunoglobulin G, Ceruloplasmin, Transferrin, and Orosomucoid in Normoalbuminuric Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Care.* 2004;27(5):1176 LP-1181.
130. Kazumi T, Hozumi T, Ishida Y, Ikeda Y, Kishi K, Hayakawa M, et al. Increased urinary transferrin excretion predicts microalbuminuria in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 1999;22(7):1176–80.
131. Hong CY, Chia KS. Markers of Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Complications.* 2017 Aug 2;12(1):43–60.
132. T. Narita , M. Hosoba , T. Miura , H. Sasaki , T. Morii , H. Fujita , M. Kakei SI. Low Dose of Losartan Decreased Urinary Excretions of IgG, Transferrin, and Ceruloplasmin without Reducing Albuminuria in Normoalbuminuric Type 2 Diabetic Patients. *Horm Metab Res.* 2008;40(4):292–5.
133. Zhou Y, Zhang X WJ. Clinical significance of microtransferrinuria in diabetic patients. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* 1997;36(3):165–8.
134. Kordonouri O, Jörres A, Müller C, Enders I, Gahl GM, Weber B. Quantitative assessment of urinary protein and enzyme excretion—a diagnostic programme for the detection of renal involvement in type I diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest.* 1992;52(8):781–90.
135. Kanauchi M, Akai Y, Hashimoto T. Transferrinuria in type 2 diabetic patients with early nephropathy and tubulointerstitial injury. *Eur J Intern Med.* 2002;13(3):190–3.
136. Konen J, Shihabi Z, Newman J. The Association of Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus and Hypertension With Urinary Excretion of Albumin and Transferrin. *Am J Kidney Dis.* 2017;22(6):791–7.
137. Narita T, Hosoba M, Kakei M, Ito S. Increased Urinary Excretions of Immunoglobulin G, Ceruloplasmin, and Transferrin Predict Development of Microalbuminuria in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 2005;29(1):142–4.
138. O'Donnell MJ, Watson J, Martin P, Chapman C, Barnett AH. Transferrinuria in Type 2 Diabetes: The Effect of Glycaemic Control. *Ann Clin Biochem.* 1991;28(2):174–8.
139. Currie G, McKay G, Delles C. Biomarkers in diabetic nephropathy: Present and future. *World J Diabetes.* 2014;5(6):763–76.

140. Al-Rubeaan K, Siddiqui K, Al-Ghonaim MA, Youssef AM, Al-Sharqawi AH, AlNaqeb D. Assessment of the diagnostic value of different biomarkers in relation to various stages of diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients. *Sci Rep.* 2017;7(1):2684.
141. Sasaki A, Oikawa S, Toyota T. Microalbuminuria is closely related to diabetic macroangiopathy. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017;44(1):35–40.
142. Hellemons ME, Kerschbaum J, Bakker SJL, Neuwirt H, Mayer B, Mayer G, et al. Validity of biomarkers predicting onset or progression of nephropathy in patients with Type 2 diabetes: a systematic review. *Diabet Med.* 2012;29(5):567–77.
143. Memişoğulları R, Bakan E. Levels of ceruloplasmin, transferrin, and lipid peroxidation in the serum of patients with Type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications.* 2017;18(4):193–7.
144. Kamijo A, Sugaya T, Hikawa A, Okada M, Okumura F, Yamanouchi M, et al. Urinary Excretion of Fatty Acid-Binding Protein Reflects Stress Overload on the Proximal Tubules. *Am J Pathol.* 2004 Oct 21;165(4):1243–55.
145. Tanaka T, Doi K, Maeda-Mamiya R, Negishi K, Portilla D, Sugaya T, et al. Urinary L-Type Fatty Acid-Binding Protein Can Reflect Renal Tubulointerstitial Injury. *Am J Pathol.* 2009 Apr 7;174(4):1203–11.
146. Yokoyama T, Kamijo-Ikemori A, Sugaya T, Hoshino S, Yasuda T, Kimura K. Urinary Excretion of Liver Type Fatty Acid Binding Protein Accurately Reflects the Degree of Tubulointerstitial Damage. *Am J Pathol.* 2009;174(6):2096–106.
147. Panduru NM, Forsblom C, Saraheimo M, Thorn L, Bierhaus A, Humpert PM, et al. Urinary Liver-Type Fatty Acid–Binding Protein and Progression of Diabetic Nephropathy in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care.* 2013;36(7):2077–83.
148. Kamijo-Ikemori A, Sugaya T, Yasuda T, Kawata T, Ota A, Tatsunami S, et al. Clinical Significance of Urinary Liver-Type Fatty Acid–Binding Protein in Diabetic Nephropathy of Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Care.* 2011;34(3):691–6.
149. Nielsen SE, Sugaya T, Tarnow L, Lajer M, Schjoedt KJ, Astrup AS, et al. Tubular and Glomerular Injury in Diabetes and the Impact of ACE Inhibition. *Diabetes Care.* 2009;32(9):1684–8.
150. Von Eynatten M, Baumann M, Heemann U, Zdunek D, Hess G, Nawroth PP, et al. Urinary L-FABP and anaemia: distinct roles of urinary markers in type 2 diabetes. *Eur J Clin Invest.* 2010;40(2):95–102.
151. Devarajan P. The Use of Targeted Biomarkers for Chronic Kidney Disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2010;17(6):469–79.
152. Nielsen SE, Sugaya T, Hovind P, Baba T, Parving H-H, Rossing P. Urinary Liver-Type Fatty Acid-Binding Protein Predicts Progression to Nephropathy in Type 1 Diabetic Patients. *Diabetes Care.* 2010;33(6):1320–4.
153. Conway BR, Manoharan D, Manoharan D, Jenks S, Dear JW, McLachlan S, et al. Measuring urinary tubular biomarkers in type 2 diabetes does not add prognostic value beyond established risk factors. *Kidney Int.* 2017;82(7):812–8.

154. Sacks DB. Correlation between Hemoglobin A1c (HbA1c) and Average Blood Glucose: Can HbA1c Be Reported as Estimated Blood Glucose Concentration? *J diabetes Sci Technol*. 2007;1(6):801–3.
155. Yeh HC, Brown TT, Maruthur N, Ranasinghe P, Berger Z, Suh YD, Wilson LM, Haberl EB, Brick J, Bass EB GS. Comparative effectiveness and safety of methods of insulin delivery and glucose monitoring for diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2012;157(5):336–47.
156. Moghissi ES, Korytkowski MT, DiNardo M, Einhorn D, Hellman R, Hirsch IB, et al. American Association of Clinical Endocrinologists and American Diabetes Association Consensus Statement on Inpatient Glycemic Control. *Diabetes Care*. 2009;32(6):1119–31.
157. Duke S-AS, Colagiuri S, Colagiuri R. Individual patient education for people with type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009;(1).
158. Heller S, Buse J, Fisher M, Garg S, Marre M, Merker L, et al. Insulin degludec, an ultra-longacting basal insulin, versus insulin glargine in basal-bolus treatment with mealtime insulin aspart in type 1 diabetes (BEGIN Basal-Bolus Type 1): a phase 3, randomised, open-label, treat-to-target non-inferiority trial. *Lancet*. 2012;379(9825):1489–97.
159. Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R, et al. Medical Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Consensus Algorithm for the Initiation and Adjustment of Therapy: A consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care*. 2009;32(1):193–203.
160. Mannucci E, Monami M, Marchionni N. Short-acting insulin analogues vs. regular human insulin in type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes, Obes Metab*. 2009;11(1):53–9.
161. Pop-Busui R, Boulton AJM, Feldman EL, Bril V, Freeman R, Malik RA, et al. Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2016;40(1):136 LP-154.
162. Kim Y, Park CW. New therapeutic agents in diabetic nephropathy. *Korean J Intern Med*. 2017 Jan 1;32(1):11–25.
163. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang Y (Lucy), Castro AF, Feldman HI, et al. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann Intern Med*. 2009 May;150(9):604–12.
164. Lim AKH. Diabetic nephropathy – complications and treatment. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2014;7:361–81.
165. Chen C, Wang C, Hu C, Han Y, Zhao L, Zhu X, et al. Normoalbuminuric diabetic kidney disease. *Front Med*. 2017;
166. Robles NR, Villa J, Hernandez Gallego R. Non-Proteinuric Diabetic Nephropathy. *J Clin Med*. 2015;4(9):1761–73.
167. Olokoba AB, Obateru OA, Olokoba LB. Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends. *Oman Med J*. 2012;27(4):269–73.



168. Koopman RJ, Mainous AG, Diaz VA, Geesey ME. Changes in Age at Diagnosis of Type 2 Diabetes Mellitus in the United States, 1988 to 2000. *Ann Fam Med.* 2005;3(1):60–3.
169. Song SH, Hardisty CA. Early onset type 2 diabetes mellitus: a harbinger for complications in later years—clinical observation from a secondary care cohort. *QJM An Int J Med.* 2009;102(11):799–806.
170. Kautzky-Willer A, Harreiter J, Pacini G. Sex and Gender Differences in Risk, Pathophysiology and Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *Endocr Rev.* 2016;37(3):278–316.
171. Zoungas S, Woodward M, Li Q, Cooper ME, Hamet P, Harrap S, et al. Impact of age, age at diagnosis and duration of diabetes on the risk of macrovascular and microvascular complications and death in type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2014;57(12):2465–74.
172. Vaag AA. Glycemic control and prevention of microvascular and macrovascular disease in the Steno 2 study. *Endocr Pract.* 2006;12(1):89–92.
173. Sherwani SI, Khan HA, Ekhzaimy A, Masood A, Sakharkar MK. Significance of HbA1c Test in Diagnosis and Prognosis of Diabetic Patients. *Biomark Insights.* 2016;11:95–104.
174. Menke A, KF R, Fradkin J, YJ C, CC C. Associations between trends in race/ethnicity, aging, and body mass index with diabetes prevalence in the united states: A series of cross-sectional studies. *Ann Intern Med.* 2014;161(5):328–35.
175. Iuliana-Claudia H, Svetlana M, Laura G, Dan G. Body Mass Index and Glycaemic Control in Patients with Diabetes Mellitus: A Case-Control Study. Vol. 24 (2), *Romanian Journal of Diabetes Nutrition and Metabolic Diseases.* 2017. p. 119–25.
176. Ganz ML, Wintfeld N, Li Q, Alas V, Langer J, Hammer M. The association of body mass index with the risk of type 2 diabetes: a case–control study nested in an electronic health records system in the United States. *Diabetol Metab Syndr.* 2014;6(1):50.
177. Cho NH, Chan JCN, Jang HC, Lim S, Kim HL, Choi SH. Cigarette smoking is an independent risk factor for type 2 diabetes: a four-year community-based prospective study. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2009;71(5):679–85.
178. Yeom H, Lee JH, Kim HC, Suh I. The Association Between Smoking Tobacco After a Diagnosis of Diabetes and the Prevalence of Diabetic Nephropathy in the Korean Male Population. *J Prev Med Public Heal.* 2016;49(2):108–17.
179. Bernard MY Cheung, CH Cheng, CP Lau, Chris KY Wong, ; Ronald CW Ma, Daniel WS Chu, Duncan HK Ho, Kathy LF Lee HT. 2016 Consensus statement on prevention of atherosclerotic cardiovascular disease in the Hong Kong population. *Hong Kong Med J.* 2017;23(2):191–201.
180. Landsberg L MM. Diabetes and hypertension: pathogenesis, prevention and treatment. *Clin Exp Hypertens.* 2004;26(7–8):621–8.

181. Collaboration TERF. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet*. 2010;375(9733):2215–22.
182. Tomino Y1, Suzuki S, Azushima C, Shou I, Iijima T, Yagame M, Wang LN, Chen HC, Lai KN, Tan SY KM. Asian multicenter trials on urinary type IV collagen in patients with diabetic nephropathy. *J Clin Lab Anal*. 2001;15(4):188–92.
183. Mahendran. K B, Sethupathy.S, .K. P, Inmozhi.R, K B, K S. Association of Urinary and Plasma Type IV Collagen Levels with Albumin Creatinine Ratio in Type 2 Diabetic Patients. *IOSR J Dent Med Sci*. 2015;14(4):50–4.
184. Sthaneshwar P CS. Urinary type IV collagen levels in diabetes mellitus. *Malays J Pathol*. 2010;32(1):43–7.
185. Inoue M, Oishi C, Shimajiri Y, Furuta M, Ueyama M ST. Clinical usefulness of measurement of urine type IV collagen for detection of early phase of nephropathy in type 2 diabetic patients. *Rinsho Byori*. 2008;56(7):564–9.
186. Ranjana Singh, RK Singh, A A Mahdi, SP Saxena, G Cornélissen FH. Circadian periodicity of urinary volume, creatinine and 5-hydroxyindole acetic acid excretion in healthy Indians. *Life Sci*. 2000;66(3):209–214.
187. Greenberg GN LR. Urinary creatinine excretion is not stable: a new method for assessing urinary toxic substance concentrations. *J Occup Med*. 1989;31(10):832–8.
188. Curtis G FM. Creatinine excretion: diurnal variation and variability of whole and part-day measures. A methodologic issue in psychoendocrine research. *Psychosom Med*. 1970;(32):337–.
189. Waikar SS, Sabbiseti VS, Bonventre J V. Normalization of urinary biomarkers to creatinine during changes in glomerular filtration rate. *Kidney Int*. 2010;78(5):486–94.
190. Viswanathan AC-B and G. Urinary Markers of Glomerular Injury in Diabetic Nephropathy. *Int J Nephrol* vol 2012, Artic ID 146987, 11 pages, 2012. 2012;2012:Article ID 146987 11.
191. Kanauchi M, Nishioka H, Hashimoto T DK. Diagnostic significance of urinary transferrin in diabetic nephropathy. *Nihon Jinzo Gakkai Shi*. 1995;37(11):649–54.
192. C. K. Cheung, C. S. Cockram, V. T. F. Yeung and RS. Urinary excretion of transferrin by non-insulindependent diabetics: a marker for early complications? *Clin Chem*. 1989;35(8):1672–4.
193. AbrahamCohen-Bucay and Gautham Viswanathan. UrinaryMarkers of Glomerular Injury in Diabetic Nephropathy. *Int J Nephrol* Vol 2012, Artic ID 146987, 11 pages. 2012;2012:Article ID 146987, 11 pages.
194. Gluhovschi C, Gluhovschi G, Petrica L, Timar R, Velciov S, Ionita I, et al. Urinary Biomarkers in the Assessment of Early Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Res*. 2016;2016:4626125.

195. Viswanathan V, Sivakumar S, Sekar V, Umapathy D, Kumpatla S. Clinical significance of urinary liver-type fatty acid binding protein at various stages of nephropathy. *Indian J Nephrol.* 2015;25(5):269–73.
196. Araki S, Haneda M, Koya D, Sugaya T, Isshiki K, Kume S, et al. Predictive Effects of Urinary Liver-Type Fatty Acid–Binding Protein for Deteriorating Renal Function and Incidence of Cardiovascular Disease in Type 2 Diabetic Patients Without Advanced Nephropathy. *Diabetes Care.* 2013;36(5):1248–53.
197. Suzuki K, Babazono T, Murata H, Iwamoto Y. Clinical Significance of Urinary Liver-Type Fatty Acid–Binding Protein in Patients With Diabetic Nephropathy. *Diabetes Care.* 2005;28(8):2038 LP-2039.
198. Ito H, Yamashita H, Nakashima M, Takaki A, Yukawa C, Matsumoto S, et al. Current Metabolic Status Affects Urinary Liver-Type Fatty-Acid Binding Protein in Normoalbuminuric Patients With Type 2 Diabetes. *J Clin Med Res.* 2017;9(4):366–73.
199. Fiseha T, Tamir Z. Urinary Markers of Tubular Injury in Early Diabetic Nephropathy. *Int J Nephrol.* 2016;2016:4647685.

## Биографија

Бранкица Терзић је рођена 13.03.1970. године у Лозници, где је завршила основу школу и гимназију, а Медицински факултет Универзитета у Београду завршила је 1996. године са просечном оценом 8,20 (осам и 20/100) током студирања и оценом 10 (десет) на дипломском испиту. У периоду 1996-1998. године била је на магистарским студијама на Медицинском факултету Универзитета у Београду из области пулмологије.

Специјализацију из интерне медицине је уписала 2008. године на ВМА, а јуна 2003. године положила специјалистички испит са одличним успехом.

У периоду 2003. до 2004. године је била запослена као интерниста у поликлиници „Визим“, а од 2004. до 2007. године је радила на имплементацији нових дијализних процедура и аферезних поступака, као и дијализе јетре у компанији „Medicon“. Октобра месеца 2007. године је била на челу тима који је први пут на овим просторима увео у примену албуминску дијализу јетре у УДК „Тиршова“. У периоду 2007. до 2010. године је била медицински директор и интерниста у Специјалној болници за хемодијализу „Medicon“, а непресушна жеља за клиничким радом је 2010. године довела у Клинику за нефрологију ВМА где је и тренутно запослена.

Школаске 2011/2012. год. је уписала докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, на предмету експериментална и клиничка интерна медицина, модул нефрологија и положила све, програмом студија предвиђене испите укључујући и усмани докторски испит, који је положила априла 2013. године са оценом девет. Субспецијалистички испит из нефрологије је положила 2016. године

Члан је научно-истраживачког тима у НИ пројекту у ВМА „Исхрана, нутритивни статус, кардиоваскуларни коморбидитет и квалитет живота код пацијената са Биогпредијализном хроничном бубрежном инсуфицијенцијом и на хемодијализи“, МФВМА/8/15-17, чији је руководилац проф. др Славица Рађен.

Члан је нефролошке секције СЛД, Удружења нефролога Србије и Европског удружења за нефрологију, дијализу и трансплантацију. Говори Енглески језик.

Аутор је и коаутор већег броја стручних радова.

## Библиографија

- **Terzić B**, Stanojević I, Radojičić Z, Resan M, Petrović D, Maksić Dj, Djekić J, Ristić P, Milica P, Mijušković M; Urinary transferrin as an early biomarker of diabetic nephropathy: *Vojnosanitetski pregled* (2017); Online First September, 2017. UDC: DOI: <https://doi.org/10.2298/VSP170808138T> (IF 0,367)
- **Terzić B**, Spasic M, Djuric P, Vasiljevic V, Radjen S, Mijuskovic M, Retroperitoneal fibrosis and constrictive pericarditis-IgG4 related diseases: A case report: *Experimental and Therapeutic Medicine* 2017; 13 (6): 3603-3606 (IF 1,261)
- **Terzić B**, Maksić Đ, Škuletić V, Pilčević D, Mijušković M, Čukić Z, Obrenčević K, Petrović M, Tadić-Pilčević J, Petrović M. Myeloma multiplex with pulmonary dissemination. *Vojnosanit Pregl* 2014; 71(6): 596–9. (IF 0,292)
- Mijušković M, Milović N, Kovačević B, Jovanović D, Ignjatović Lj, **Terzić B**, et al. Acquiredcysticdiseaseandrenal cell carcinomain hemodialysis patients-a case report on three patients. *Vojnosanit Pregl* 2015; 72 (10): 932-6. (IF 0,355)
- Mijušković M, Stanojević I, Milović N, Cerović S, Petrović D, Jovanović D, Aleksić P, Kovačević B, Andjelić T, **Terzić B**, Djukić M, Vojvodić D . Urinary KIM-1 and AQP-1 in patients with clear renal cell carcinoma: Potential noninvasive biomarkers .*Vojnosanit Pregl* 2016; 73(3): 266–272. (IF 0,367)
- Dinić ŽM, Zečević R, Hajduković Z, Mijušković M, Đjurić P, Jović Z, Grdinić A, Petrović M, **Terzić B**, Pejović J, Kandolf Sekulović L. Psoriasis is the independent factor for early atherosclerosis: A prospective study of cardiometabolic risk profile . *Vojnosanit Pregl* 2016; 73(12): 1094–1101. (IF 0,367)
- Petrović M, Grdinić A, Bokonjić D, Rabrenović V, Antić S, **Terzić B**, Stamenković D, Stajić D, Petrović D, Ignjatović LJ, Pejović J, Jovanović D. Blood concentrations of B-type natriuretic peptide and N-terminal prohormone B-type natriuretic peptide as markers of left ventricle diastolic function in patients with chronic renal failure. *Vojnosanit Pregl* 2017; 74(6): 550–555. (IF 0,367)
- Mijušković M, Vavić N, Rusović S, Ignjatović Lj, Obrenčević K, Radojević M, Kovačević Z, Čukić Z, Petrović M, Pilčević D, Pilčević Tadić J, **Terzić B**. Percutaneous transluminal renal angioplasty application effect on renal function in patients with renal artery stenosis – a case report on 4 patients *Vojnosanit Pregl* 2013; 70 (4): 411-6. (IF 0,269)

- Rađen S, Ristić-Medić D, **Terzić B**, Đurović B, Mijušković M. Protein-energy wasting in maintenance hemodialysis patients - etiology and diagnosis. *Vojnosanitetski pregljed* (2016); Online First November, 2016 UDC: DOI: <https://doi.org/10.2298/VSP160902352R> (IF 0,367)
- Dragović T, Mijušković M, **Terzić B**, Ristić Medić D, Hajduković Z, Radjen S; Serum C- reactive protein and nutritional parameter in hemodialysis *Vojnosanitetski pregljed* (2017); Online First October, 2017. UDC: DOI: <https://doi.org/10.2298/VSP160912155D> (IF 0,367)
- Mijuskovic M, Stanojevic I, Milovic N, Cerovic S, Petrovic D, Maksic Dj, Kovacevic B, Andjelic T, Aleksic P, **Terzic B**, Djukic M, Vojvodic D. Tissue and urinary KIM-1 relate to tumor characteristics in patients with clear renal cell carcinoma *Int Urol Nephrol* (2018) 50:63–70 <https://doi.org/10.1007/s11255-017-1724-6> (IF 1.564)

# ПРИЛОГ

## КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

### УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

### ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

**Редни број – РБ:**

**Идентификациони број – ИБР:**

**Тип документације – ТД:** Монографска публикација

**Тип записа – ТЗ:** Текстуални штампани материјал

**Врста рада – ВР:** Докторска дисертација

**Аутор – АУ:** Бранкица Терзић

**Ментор/коментор – МН:** доц. др Мирјана Мијушковић

**Наслов рада – НР:** Значај концентрација колагена тип IV, трансферина и везујућег протеина масних киселина јетре у урину за рано откривање дијабетесне нефропатије

**Језик публикације – ЈП:** српски/ћирилица

**Језик извода – ЈИ:** српски/енглески

**Земља публикавања – ЗП:** Република Србија

**Уже географско подручје – УГП:** Шумадијски округ

**Година – ГО:** 2018. година

**Издавач – ИЗ:** Ауторски репринт

**Место и адреса – МС:** 34 000 Крагујевац, Светозара Марковића 69, Република Србија

**Физичи опис рада – ФО:** 116 страна, 45 табела, 15 графика и 5 слика

**Научна област – УДК:** Медицина

**Научна дисциплина – ДИ:** Клиничка и експериментална интерна медицина

**Предметна одредница/кључне речи – ПО:** дијабетес мелитус, микроалбуминурија, биомаркер, колаген тип IV, трансферин, L-FABP.

**Чува се – ЧУ:** У библиотеци Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

**Важна напомена – ВН:**

**Извод – ИД:** Дијабетесна нефропатија представља један од водећих узрока хроничне бубрежне болести и терминалне бубрежне инсуфицијенције. Заступљена је код 20-40% пацијената са дијабетес мелитусом, а као први знак дијабетесне нефропатије још увек се сматра микролабуминурија. Мала сензитивност и специфичност микроалбуминурије су довели до испитивања нових уринарних биомаркера који би могли бити рани показатељи постојања дијабетесне нефропатије. Ова студија је спроведена да би се утврдило да ли уринарни биомаркери као што су колаген тип IV, трансферин и L-FABP могу бити рани маркери дијабетесне нефропатије.

У студију је било укључено 80 пацијената оболелих од дијабетес мелитуса, подељених у две групе: група 1- нормоалбуминурични пацијенти (екскреција албумина до 30mg/dan), група 2- микроалбуминурични (екскреција албумина од 30-300mg/dan) и 10 здравих контрола. Од 80 пацијента, 44 (55%) су били мушког, а 36 (45%) женског пола; њих 47 (58.75%) није имало микроалбуминурију, док је 33 (41,25%) имало повећано излучивање албумина. Просечна старост испитаника је била 59,85 година. Током испитивања нађено је да су концентрације уринарних биомаркера значајно веће код пацијената са микроалбуминуријом у поређењу са пацијентима који су нормоалбуминурични и са здравом контролом. Није било статистички значајне разлике у нивоу уринарних биомаркера у поређењу са гликорегулацијом, индексом телесне масе и дужином трајања дијабетеса.

Резултати ове студије су показали да колаген тип IV, трансферин и L-FABP у 24 часовбом и првом јутарњем урину, представљају сензитивне и специфичне тестове за рану дијагнозу дијабетесне нефропатије. Међу њима, највећу сензитивност и специфичност је показао уринарни трансферин, а доказано је да постоји веза између концентрације уринарног трансферина и дијабетесне ретинопатије.

**Датум прихватања теме од стране ННВ – ДП:** 05.04.2017.

**Датум одбране – ДО:**

**Чланови комисије – КО:**

1. **Проф. Др Дејан Петровић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, председник;
2. **Проф. Др Снежана Живанчевић Симоновић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан;
3. **Проф. Др Александар Ђукић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан;
4. **Проф. Др Данило Војводић**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан
5. **Проф. Др Тамара Драговић**, ванредни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан.



## KEY WORDS DOCUMENTATION

### UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC

**Accession number – ANO:**

**Identification number – INO:**

**Documentation type – DT:** Monographic publication

**Type of record – TR:** Textual printed material

**Contents code – CC:** Ph. D. Thesis

**Author – AU:** Brankica Terzic

**Menthor/co-mentor – MN:** Assistant professor Mirjana Mijuskovic, M.D. Ph.D.

**Title – TI:** Significance of collagen type IV, transferrin and liver fatty acid binding protein in urine for early detection of diabetic nephropathy

**Language of text – LT:** Serbian / Cyrillic

**Language of abstract:** Serbian / English

**Country of publication – CP:** Republic of Serbia

**Locality of publication – LP:** Sumadija Administrative District

**Publication year – PY:** 2018

**Publisher – PU:** Author reprint

**Publication place – PP:** 34 000 Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Republic of Serbia

**Physical description – PD:** 116 pages, 45 tables, 15 graphics, 5 images

**Scientific field – SF:** Medicine

**Scientific discipline – SD:** Experimental and clinical medicine

**Subject/key words – SKW:** diabetes mellitus, mikroalbuminuria, biomarker, collagen type IV, transferrin, L-FABP.

**UDC**

**Holding data:** Library of Faculty of medical sciences, University of Kragujevac, Republic of Serbia

**Note – N:**

**Abstract – AB:** Diabetic nephropathy is one of the leading cause of chronic kidney disease and end-stage renal disease. It occurs in 20-40% patients with diabetes mellitus, and microalbuminuria is still considered as the first sign of diabetic nephropathy. Low sensitivity and specificity of microalbuminuria leads to more sensitive biomarkers that may be used to detect diabetic nephropathy at an earlier stage with higher accuracy. This study was carried out to determine whether urinary biomarkers such as collagen type IV, transferrin and L-FABP can serve as an indicator of diabetic nephropathy.

The study included 80 diabetic adult patients who were classified into two groups: group 1 - normoalbuminuric patients (albumin excretion up to 30 mg/d), group 2 – microalbuminuric patients (albumin excretion from 30-300 mg/d) and 10 healthy controls. In our group, 44 (55%) patients were male and 36 (45%) female, mean age  $59.85 \pm 8.87$  years. Prevalence of microalbuminuria was 41.25% (33 patients) and 58.75% were normoalbuminuric (47 patients). During the trial, urinary biomarker concentrations were found to be significantly higher in patients with microalbuminuria compared with patients who were normoalbuminuric. There was no statistically significant difference in the level of urinary biomarkers compared to glycoregulation, body weight index, and duration of diabetes.

The results of this study have shown that collagen type IV, transferrin and L-FABP in 24 hours and the first morning urine are sensitive and specific tests for early diagnosis of diabetic nephropathy. Among them, the greatest sensitivity and specificity was shown by urinary transferrin. Although there was a correlation between urinary transferrin concentration and diabetic retinopathy.

**Key words:** Diabetes mellitus, microalbuminuria, biomarker, collagen type IV, transferrin, L-FABP

**Accepted by the Scientific Board on – ASB:** 5th April 2017.

**Defended on – DE:**

**Thesis defended board (Degree/name/surname/title/faculty) – DB:**

- 1. Assistant Professor, Dejan Petrovic, M.D, Ph.D,** Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Chairman;
- 2. Full Professor, Snezana Zivancevic Simonovic, M.D, Ph.D,** Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, member;
- 3. Full Professor, Aleksandar Djukic, M.D, Ph.D,** Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, member;
- 4. Full Professor, Danilo Vojvodic, M.D, Ph.D,** Military Medical Academy, University of Defence, Belgrade, member;
- 5. Assistant Professor, Tamara Dragovic, M.D, Ph.D,** Military Medical Academy, University of Defence, Belgrade, member;

**Образац 1**

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Бранкица Терзић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Значај концентрација колагена тип IV, трансферина и везујућег протеина масних киселина јетре у урину за рано откривање дијабетесне нефропатије

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Београду, 10.1.2018. године,

  
потпис аутора

Образац 2

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Бранкица Терзић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Значај концентрација колагена тип IV, трансферина и везујућег протеина масних киселина јетре у урину за рано откривање дијабетесне нефропатије

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

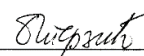
не дозвољавам<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У Београду \_\_\_\_\_, 10.1.2018. године,



\_\_\_\_\_  
потпис аутора

---

<sup>2</sup> Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>



**VOJNOSANITETSKI PREGLED**

VOJNOMEDICINSKA AKADEMIJA

Crnotravska 17, 11 000 **Beograd, Srbija**

Tel/faks: +381 11 2669689

[vsp@vma.mod.gov.rs](mailto:vsp@vma.mod.gov.rs)

### ACCEPTED MANUSCRIPT

Accepted manuscripts are the articles in press that have been peer reviewed and accepted for publication by the Editorial Board of the *Vojnosanitetski Pregled*. They have not yet been copy edited and/or formatted in the publication house style, and the text could still be changed before final publication.

Although accepted manuscripts do not yet have all bibliographic details available, they can already be cited using the year of online publication and the DOI, as follows: article title, the author(s), publication (year), the DOI.

Please cite this article: **URINARY TRANSFERRIN AS AN EARLY BIOMARKER OF DIABETIC NEPHROPATHY**

**URINARNI TRANSFERRIN KAO RANI MARKER DIJABETESNE NEFROPATIJE**

Authors: Brankica Terzić<sup>\*</sup>, Ivan Stanojević<sup>†‡</sup>, Zoran Radojičić<sup>§</sup>, Mirko Resan<sup>||</sup>, Dejan Petrović<sup>¶</sup>, Djoko Maksić<sup>\*\*</sup>, Jelena Djekić<sup>\*\*</sup>, Petar Ristić<sup>\*\*\*</sup>, Milica Petrović<sup>\*</sup>, Mirjana Mijušković<sup>†‡</sup>; *Vojnosanitetski pregled* (2017); Online First September, 2017.

UDC:

DOI: <https://doi.org/10.2298/VSP170808138T>

When the final article is assigned to volumes/issues of the Journal, the Article in Press version will be removed and the final version appear in the associated published volumes/issues of the Journal. The date the article was made available online first will be carried over.

**URINARY TRANSFERRIN AS AN EARLY BIOMARKER OF DIABETIC NEPHROPATHY.**

**Urinarni transferrin kao rani marker dijabetesne nefropatije**

**Brankica Terzić\***, Ivan Stanojević†‡, Zoran Radojičić§, Mirko Resan||, Dejan Petrović¶, Djoko Maksić\*\*‡, Jelena Djekić\*\*, Petar Ristić\*\*‡, Milica Petrović\*, Mirjana Mijušković\*‡

\*Clinic of Nephrology, † Institute for Medical Research, \*\*Clinic of Endocrinology, ||, Clinic of Ophthalmology, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia; ‡Faculty of Medicine of the Military Medical Academy, University of Defence, Belgrade, Serbia; §Faculty of Organizational Sciences, Laboratory for Statistic, University of Belgrade, Serbia ; ¶Clinic of Urology, Nephrology and Dialysis, Clinical Center of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia;

Corresponding autor : Brankica Terzić Klinika za nefrologiju VMA.

e-mail: brankica.terzic@gmail.com

phone number: +381658018426

fix: +381113608622

## Abstract

Uvod /Cilj: Dijabetesna nefropatija predstavlja jedan od vodećih uzroka hronične bubrežne bolesti i terminalne bubrežne insuficijencije. Zastupljena je kod 20-40% pacijenta sa dijabetes melitusom, a kao prvi znak dijabetesne nefropatije još uvek se smatra mikroalbuminurija. Niska senzitivnost i specifičnost mikroalbuminurije su doveli do ispitivanja novih urinarnih biomarkera koji bi mogli biti rani pokazatelji postojanja dijabetesne nefropatije. Ova studija je sprovedena da bi se utvrdilo da li urinarni transferin može biti rani marker dijabetesne nefropatije

Metode: U našu studiju je bilo uključeno 80 pacijenata sa tipom 2 dijabetesa, podeljenih u dve grupe: grupa 1- normoalbuminurični pacijenti (ekskrecija albumina do 30 mg/dan), grupa 2- mikroalbuminurični (ekskrecija albumina od 30-300mg/dan) i 10 zdravih kontrola. Svi pacijenti su bili stariji od 18 godina, imaju dijabetes melitus duže od jedne godine i jačinu glomerulske filtracije veću od 60ml/min/1.73m<sup>2</sup>. Svim pacijentima je određivan nivo serumskog kreatinina, glikozilovanog hemoglobina i transferina u urinu. Koncentracija transferina je analizirana u 24h uzorku urina i u prvom jutarnjem urinu. Urinarni transferin je određen primenom visoko senzitivnog ELISA kita.

Rezultati: Koncentracija urinarnog transferina je bila značajno veća kod pacijenata koji su imali mikroalbuminuriju u poredjenju sa pacijentima koji su bili normoalbuminurični i zdravim kontrolama a Pearson's koeficijent korelacije je  $r=0.584$  ( $p<0.001$ ). Nismo dobili povezanost između nivoa urinarnog transferina i glikoregulacije kao ni nivoa transferina i dužine trajanja dijabetesa.

Zaključak: Rezultati ove studije pokazuju da bi urinarni transferin mogao biti rani marker dijabetesne nefropatije

Ključne reči: Dijabetes melitus, mikroalbuminurija, biomarker, transferin



## Abstract

**Background/Aim:** Diabetic nephropathy is one of the leading cause of chronic kidney disease and end-stage renal disease. It occurs in 20-40% patients with diabetes mellitus, and microalbuminuria is still considered as the first sign of diabetic nephropathy. Low sensitivity and specificity of microalbuminuria leads to more sensitive biomarkers that may be used to detect diabetic nephropathy at an earlier stage with higher accuracy. This study was carried out to determine whether urinary transferrin can serve as an indicator of diabetic nephropathy.

**Methods:** Our study included 80 type 2 diabetic patients who were classified into two groups: group 1 - normoalbuminuric patients (albumin excretion up to 30 mg/d), group 2 - microalbuminuric patients (albumin excretion from 30 – 300 mg/d. ), and 10 healthy control. All patients were older than 18, with diabetic disease more than one year, glomerular filtration rate more than 60ml/min/1.73m<sup>2</sup>. Serum creatinine, glycosylated hemoglobin (HbA1c), and concentration of transferrin in the 24h urine samples as well as in spot urine were measured. The urinary concentrations of transferrin were measured using a highly sensitive one-step sandwich enzyme immunoassay kit.

**Results:** Urinary transferrin was significantly higher in microalbuminuric patients than in the normoalbuminuric and healthy control subject. By comparing these groups according to urinary transferrin concentration we found statistically significant positive correlation  $r=0.584$  ( $p<0.001$ ). There was no correlation between level of urinary transferrin and glycoregulation, and no correlation was found between transferrin and duration of diabetes.

**Conclusions:** The results from this study provide the evidence that urinary transferrin could be used as an early marker of diabetic nephropathy.

**Key words:** Diabetes mellitus, microalbuminuria, biomarker, transferrin

## Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a chronic disease whose incidence and prevalence show a steady increase. According to the International Diabetes Federation about 415 million people suffer from diabetes around the world, and it is estimated that by 2040 the number of people with diabetes will be around 642 million, with prevalence of 10%. (1) An increasing number of diabetic patients, mostly with type 2 diabetes (90%) is associated with enhanced rate of diabetic complications, including diabetic kidney disease. (2) Diabetes is considered as the leading cause of chronic kidney disease (CKD) and end stage renal disease (ESRD). Costs of care for patients with diabetic kidney disease (DKD) are extremely high, especially after they enter ESRD, and it is necessary to establish the diagnosis of diabetic nephropathy as soon as possible. (3,4) Microalbuminuria is generally considered as the earliest non-invasive marker of kidney damage and it was described for the first time in 1960s.(5) Microalbuminuria (MA) is defined as persistent elevation of albumin in the urine, of 30-300 mg/day, and it is generally considered as the earliest non-invasive marker for the development of diabetic nephropathy (DN), even though the specificity and sensitivity of microalbuminuria are limited. (6,7) Some patients with diabetes mellitus progress to diabetic nephropathy (DN) even if urinary albumin levels are in the normal range, indicating that albuminuria is not the perfect marker for the early detection of DN. (8,9) Recent studies have shown that some relevant biomarkers associated with diabetic nephropathy have been found and they potentially could be used to predict DN or progression of the disease. (10) Several different markers of tubular and glomerular damage have been investigated to discover DN in its early phase, and to start therapy as soon as possible. (11)

Urinary transferrin is considered as an early marker of glomerular injury in diabetic patients. It is a protein, slightly higher molecular weight than albumin (76.5kDa). Due to its low molecular weight and its less ionic load it filters easily through the glomerular membrane. (12) Some previous studies have shown that increased urinary transferrin excretion can be reported before microalbuminuria in normoalbuminuric patients with DM type 2. Because of that, urinary transferrin is considered as a more sensitive marker of glomerular damage in diabetic patients. (13) Excretion of transferrin was not associated

with glycemic control (hemoglobin A1c), but some studies have shown that urinary transferrin concentration was higher in patients with diabetic retinopathy. (14) The aim of this study was to determine if urinary transferrin can be classified into a group of early biomarkers of diabetic nephropathy.

## Method

This cross-sectional prospective observational study was carried out between September 2015 and December 2016, to investigate the correlation between microalbuminuria and urinary transferrin in diabetic nephropathy. Study was approved by the Ethical Committee of the Military Medical Academy, Belgrade, Serbia and written informed consent was taken from all the patients. Eighty patients with type 2 diabetes mellitus with disease duration one year or more, estimated glomerular filtration rates more than  $60\text{ml/min}/1.73\text{m}^2$ , and without albuminuria were included in the study. Patients with overt albuminuria ( $>300\text{ mg/day}$ ), previous renal diseases, urinary tract infection in the last 4 weeks, the use of nephrotoxic drugs, systemic disease, malignant diseases except of basocellular skin carcinoma were excluded.

The selected patients were studied in detail with history and physical examination, including ultrasonography of the kidney. Age, gender, duration of diabetes mellitus, weight, height, blood pressure and smoking habit were noted too. Body mass index (BMI) was calculated according to formula based on the height and weight measurements of the patients. Blood samples were taken after overnight fasting, at least 8 hours, and the following parameters were analyzed: serum level of glycaemia, urea, creatinine, glycated hemoglobin (HbA1C). Glomerular filtration rate (GFR) was calculated based on CKD- EPI formula.  $(\text{GFR} = 141 \times \min(\text{Scr}/\kappa, 1) \alpha \times \max(\text{Scr}/\kappa, 1) - 1.209 \times 0.993 \text{ years} \times 1.018 [\text{for women}] = \text{ml/min}/1.73 \text{ m}^2)$ . (15) Transferrin concentration (ng/ml) and transferrin to creatinine ratio (mg/g of creatinine) were determined in a spot morning urine sample, and albuminuria ( $30\text{mg/day}$  or greater) measured in a 24h urine collected on the subsequent day. All samples of urine were immediately processed within four hours of collection to ensure optimal protein stability. Urine was centrifuged ( $1000\times g$ , 20 min), then dividing into 1.5 mL aliquots and frozen at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis. The levels of urinary transferrin were

determined by commercially available ELISA kits from Elabscience Biotechnology Co., Ltd. Minimum and detectable dose for urinary transferrin was 1.56 ng/mL.

## Statistics

Statistical analyses were performed using Statistical Package for the Social Science (SPSS) version 19.0. Basic descriptive statistical parameters were presented by measures of central tendency (mean and median), a measure of variability (standard deviation and variation interval) and were expressed in percentages. To compare continuous variables Student's t-test was used for independent samples or Mann Whitney test, depending on the normality of distribution, which was checked by Kolmogorov-Smirnov test. For comparison of frequencies for categorical variables,  $\chi^2$ -test was used. Statistical hypothesis was tested at 0.05 level of significance, and probability (p) value less than 0.05 was regarded as statistically significant.

## Results

Our study included 80 type 2 diabetic patients, 44 (55%) males and 36 (45%) females, mean age  $59.85 \pm 8.87$  years, (range 38-73 years). Prevalence of microalbuminuria was 41.25% (33 patients) and 58.75% were normoalbuminuric (47 patients). Among the patients with microalbuminuria 17 were males (51.52%) and 16 were females (48.48%). The average duration of diabetes was  $13.29 \pm 7.69$  years, and the average estimated GFR was  $86.86 \pm 14.18$ . There were no significant differences in baseline clinical characteristics between examined groups. (Table 1)

Urinary transferrin concentration in spot samples and urinary transferrin concentrations in 24h urine samples showed significant linear correlation, therefore, we used results from spot urine samples for further analyses.

The mean concentration of urinary transferrin in microalbuminuric patients was  $85.07 \pm 56.54 \mu\text{g/gC}_r$ , and for normoalbuminuric patients it was  $25.63 \pm 29.85 \mu\text{g/gC}_r$ . We

found statistically significant correlation in the transferrin concentration between these two groups. ( Table 2) Correlation analysis for concentration of urinary transferrin with independent variables is shown in the table 3. Among all variables, we found significant correlation only with microalbuminuria. (Table 3)

Diabetic retinopathy was found in 24 (30%) patients. Those patients had significantly higher urinary transferrin levels, albumin excretion and duration of diabetes.

Sensitivity and specificity of urinary transferrin concentrations expressed as an area under the ROC curve (AUC), and It was 87.1%, with the sensitivity 81,8%, and specificity 80,9% ( 95% confidence interval (CI) – from 0.796 up to 0.945;  $p < 0.001$ ). (Figure 1)

## Discussion

Albuminuria is considered as a marker of kidney (glomerular) damage, and the first clinical indicator of diabetic nephropathy presence. (16) Even today it is a clinically useful tool for predicting prognosis and for monitoring response to therapy.(11) Discordance between the presence of albuminuria and the decline in renal function is crucial point of clinically significance of albuminuria. The presence of albuminuria is not mandatory in all patients with reduced GFR. *Perkins et al* reported the development of advanced CKD (GFR < 60 mL/ min per 1.73 m<sup>2</sup>) without concomitant progression of albuminuria in type 1 diabetic patients. (9) *Chen et al* compared several studies from 1977 to the present and shown that a portion of diabetic patients with normoalbuminuria have progressive decline in renal function, referred to nonalbuminuric diabetic nephropathy. (17) In diferent studies the number of nonalbuminuric diabetic kidney disease was from 21.8% reported by *Boronat et al* (18) to 56.6% reported in 2014 by *Penno. et al.*(19) Nonalbuminuric renal impairment was not associated with HbA1c and retinopathy, but some study found that gender is correlated with nonalbuminuric renal impairment. That's why we need a new biomarker with higher sensitivity and specificity for an earlier detection of diabetic nephropathy and more accurate prediction of the progression to ESRD. Therefore, we analyzed urinary transferrin as a biomarker of glomerular injury implicated in early diabetic nepropathy, nonalbuminuric diabetic patients.

The results of our study showed that increased urinary excretions of transferrin was higher in patients with microalbuminuria than in normoalbuminuric type 2 diabetic patients. We

found statistically significant correlation between concentration of urinary transferrin and microalbuminuria. This is in accordance with the results obtained by *Narita et al* who reported that increased urinary transferrin found in diabetic patients independently of microalbuminuria could also predict development of microalbuminuria in normoalbuminuric DM2 patients. (13) In 24 months follow-up study with type 2 diabetic patients, *Kazumi et al* found that 31% of patients who had transferrinuria at baseline subsequently developed microalbuminuria, compared with 7% of patients without transferrin excretion. They conclude that in patients with type 2 diabetes without microalbuminuria, increased urinary transferrin excretion may predict the development of microalbuminuria.(20) The same results found *Kanauchi et al* in the group of 60 type 2 diabetic patients. They presented a significant correlation between the urinary excretion of transferrin and albumin. Their findings indicate that urinary transferrin may be useful in detecting diabetic nephropathy at an early stage.(21) *Al-Rubeaan et al* described similar results in a cross-sectional study in the group of 467 type 2 diabetic patients.(22)

Similarly to our results, *O'Donnell et al* found no correlation between urinary transferrin levels and glycemic control in the group of 40 type 2 diabetic patients at first day of diagnosis disease and after 6 and 12 weeks of treatment. Urinary excretion rates of transferrin were measured, and they showed that urinary transferrin was not correlated with glycemic control.(23) We found no correlation between urinary transferrin levels and duration of diabetes, as well.

Several studies found relationship between excretion of urinary albumin and diabetic retinopathy, and one of the famous is the Japanese study of *Moriya et al*, which included 2205 diabetic type 2 patients aged 40-70. (24). We found similar results. Patients with retinopathy had significantly higher values of urinary transferrin excretion as well as higher levels of microalbuminuria.

Our sensitivity and specificity analysis of urinary transferrin excretion showed that it could be more sensitive indicator of early glomerular damage in diabetes mellitus than microalbuminuria.

## Conclusion

In summary, urinary transferrin was significantly increased in type 2 diabetic patients with microalbuminuria. It was independent of diabetes duration and glycemic control

coregulation. According to our results, the level of urinary transferrin excretion could be used as an early biomarker of diabetic nephropathy.

## REFERENCES

1. International Diabetes Federation (IDF). IDF Diabetes Atlas 7th edition. [idf.org](http://idf.org). 2015.
2. Tuttle KR, Bakris GL, Bilous RW, Chiang JL, de Boer IH, Goldstein-Fuchs J, et al. Diabetic Kidney Disease: A Report From an ADA Consensus Conference. *Diabetes Care*. 2014 Oct 10;37(10):2864–83.
3. Saran R, Li Y, Robinson B, Abbott KC, Agodoa LYC, Ayanian J, et al. US Renal Data System 2015 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *Am J Kidney Dis*. 2017 Aug 8;67(3):A7–8.
4. Kramer A, Pippias M, Stel VS, Bonthuis M, Abad Diez JM, Afentakis N, et al. Renal replacement therapy in Europe: a summary of the 2013 ERA-EDTA Registry Annual Report with a focus on diabetes mellitus. *Clin Kidney J*. 2016 Jun;9(3):457–69.
5. Loeffler I. Pathophysiology of Diabetic Nephropathy. In: *Diabetes and Kidney Disease*. Wiley-Blackwell; 2013. p. 45–61.
6. Dragović T. Microalbuminuria in Diabetes: Definition, Identification Techniques, and the Significance of Early Recognition. *Vojn Pregl*. 2006;63(12):1027–32.
7. J R. Measurement of microalbuminuria – what the nephrologist should know. *Nephrol Dial Transpl*. 2006;21(3):573–6.
8. Dwyer JP, Parving H-H, Hunsicker LG, Ravid M, Remuzzi G, Lewis JB, et al. Renal Dysfunction in the Presence of Normoalbuminuria in Type 2 Diabetes: Results from the DEMAND Study. *Cardiorenal Med*. 2012;2(1):1–10.
9. Perkins BA, Ficociello LH, Roshan B, Warram JH, Krolewski AS. In patients with type 1 diabetes and new-onset microalbuminuria the development of advanced chronic kidney disease may not require progression to proteinuria. *Kidney Int*. 2010;77(1):57–64.

10. Moresco RN, Sangoi MB, De Carvalho JAM, Tatsch E, Bochi G V. Diabetic nephropathy: Traditional to proteomic markers. *Clin Chim Acta*. 2013;421:17–30.
11. Dragović T, Ajdinovic BZ. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism could influence renoprotective response to losartan treatment in type 1 diabetic patients with high urinary albumin excretion rate. *Vojnosanit Pregl*. 2010;67(4):273–8.
12. McCormick CP, Konen JC SZ. Microtransferrinuria and microalbuminuria. I. In the diabetic human. *Clin Physiol Biochem*. 1990;8(2):53–8.
13. Narita T, Hosoba M, Kakei M, Ito S. Increased Urinary Excretions of Immunoglobulin G, Ceruloplasmin, and Transferrin Predict Development of Microalbuminuria in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2005;29(1):142–4.
14. Hellemons ME, Kerschbaum J, Bakker SJL, Neuwirt H, Mayer B, Mayer G, et al. Validity of biomarkers predicting onset or progression of nephropathy in patients with Type 2 diabetes: a systematic review. *Diabet Med*. 2012 May 1;29(5):567–77.
15. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang Y (Lucy), Castro AF, Feldman HI, et al. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann Intern Med*. 2009 May;150(9):604–12.
16. Bakris GL, Molitch M. Microalbuminuria as a Risk Predictor in Diabetes: The Continuing Saga. *Diabetes Care*. 2014;37(3):867–75.
17. Chen C, Wang C, Hu C, Han Y, Zhao L, Zhu X, et al. Normoalbuminuric diabetic kidney disease. *Front Med*. 2017;
18. Boronat M, García-Cantón C, Quevedo V, Lorenzo DL, López-Ríos L, Batista F, et al. Non-albuminuric renal disease among subjects with advanced stages of chronic kidney failure related to type 2 diabetes mellitus. *Ren Fail*. 2014;36(2):166–70.
19. Penno G, Solini A, Bonora E, Fondelli C, Orsi E, Zerbini G, et al. Clinical significance of nonalbuminuric renal impairment in type 2 diabetes. *J Hypertens*. 2011;29(9):1802–9.
20. Kazumi T, Hozumi T, Ishida Y, Ikeda Y, Kishi K, Hayakawa M, et al. Increased urinary transferrin excretion predicts microalbuminuria in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 1999;22(7):1176–80.
21. Kanauchi M, Nishioka H, Hashimoto T DK. Diagnostic significance of urinary transferrin in diabetic nephropathy. *Nihon Jinzo Gakkai Shi*. 1995;37(11):649–54.



22. Al-Rubeaan K, Siddiqui K, Al-Ghonaim MA, Youssef AM, Al-Sharqawi AH, AlNaqeb D. Assessment of the diagnostic value of different biomarkers in relation to various stages of diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients. *Sci Rep.* 2017;7(1):2684.
23. O'Donnell MJ, Watson J, Martin P, Chapman C, Barnett AH. Transferrinuria in Type 2 Diabetes: The Effect of Glycaemic Control. *Ann Clin Biochem.* 1991;28(2):174–8.
24. Moriya T, Tanaka S, Kawasaki R, Ohashi Y, Akanuma Y, Yamada N, et al. Diabetic Retinopathy and Microalbuminuria Can Predict Macroalbuminuria and Renal Function Decline in Japanese Type 2 Diabetic Patients: Japan Diabetes Complications Study. *Diabetes Care.* 2013;36(9):2803–9.

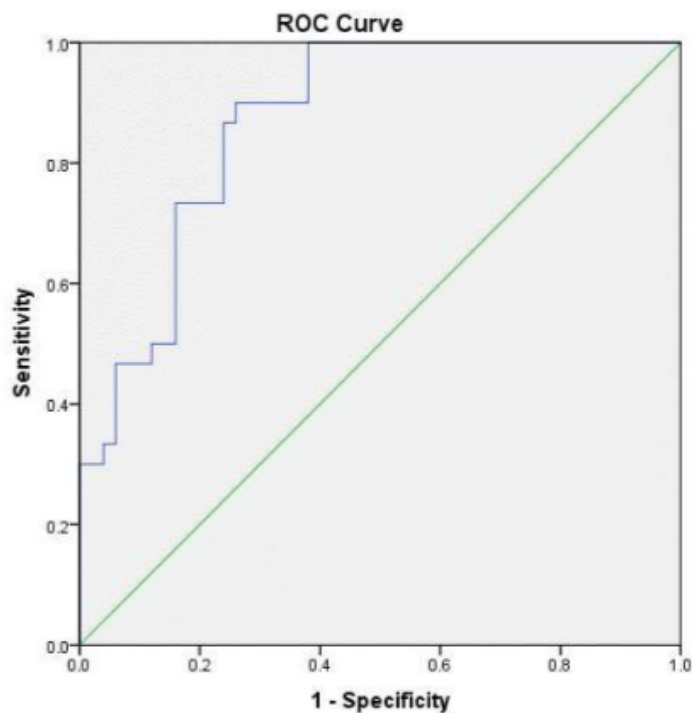


Table 1

Baseline clinical characteristics of 80 type 2 diabetic patients according to levels of urinary albumin

Characteristic of the patients	All Patients (n=80)	Normoalbuminuric (n=47)	Microalbuminuric (n=33)	Healthy (n=10)	p
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	
Gender (M/F)	44/36	27/20	17/16	5/5	0.276
Age (Years)	59.85±8.871	60.49±8.73	58.94±9.13	54±10.59	0.014
Duration of DM (Years)	13.29±7.69	13.34±7.74	13.21±7.73	n/a	0.942
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	27.36±4.42	26.64±3.56	28.38±5.31	25.73±4.77	0.325
Current smoker (%)	39 (48,8 %)	26 (55,3%)	13 (39,4%)	3 (30%)	
Systolic BP (mmHg)	134.60±14.08	133.47±12.87	136.21±15.71	122±17.02	0.411
Diastolic BP (mmHg)	81.56±7.53	80.96±7.42	82.42±7.72	75.5±10.39	0.389
Serum Creatinine(μmol/L)	75.38±15.04	76.64±15.97	73.58±13.64	73.6±7.6	0.360
GFR (mL/min /1,73m <sup>2</sup> )	86.86±14.18	85.78±13.55	88.39±15.12	92.84±9.06	0.430
HbA1C (%)	7.59±1.34	7.25±1.15	8.07±1.45	4.93±0.3	0.074

All data are expressed as means ± SD except smoking habit. DM – diabetes mellitus; BMI – body mass index; HbA1c – hemoglobin A1c; GFR – glomerular filtration rate

Table 2

## Correlation of transferinuria and microalbuminuria

Transferin concentration ( $\mu\text{g/gC}_r$ )	Microalbuminuric $\geq 30\text{mg}/24\text{h}$ (n=33)	Normoalbuminuric $< 30\text{mg}/24\text{h}$ (n=47)	Pearson's	
	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$	<i>r</i>	<b>p</b>
Transferin concentration 4h urine	91,76 $\pm$ 68,45	22,56 $\pm$ 31,46	0,489	<0,001
Transferin concentration 4h urine	85,07 $\pm$ 56,54	25,63 $\pm$ 29,85	0,354	<0,001

Pearson's test, *r* – correlation coefficient;  $\bar{x}$  – mean; SD – standard deviation

Table 3

## Correlation of transferinuria with independent variables

Variable	All patients (n=80)	Pearson's r
	$\bar{x}\pm SD$	
Age (years)	59.85±8.87	0.003
BMI ( kg/m <sup>2</sup> )	27.3±4.42	0.053
HbA1C (%)	7.59±1.34	0.132
Duration of DM (Years)	13.29± 7.69	0.127
Microalbuminuria	40.42±40.89	0.584

Pearson's test,  $r$  – correlation coefficient;  $\bar{x}$  – mean; SD – standard deviation

Received on August 08, 2017.  
 Revised on September 14, 2017.  
 Accepted on September 15, 2017.  
 Online First September, 2017.