



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Маријана Д. Петровић

**Утицај супституције витамина D на концентрацију VEGF-A у крви и
TGF- β ₁ и нефрина у урину код болесника са дијабетес мелитусом тип 2**

Докторска дисертација

Ментор: др сци. мед. Тамара Драговић, ванредни професор

Крагујевац, 2019. год.

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>	
Име и презиме: Маријана Д. Петровић	
Датум и место рођења: 27.11.1974. године у Власеници	
Садашње запослење: лекар субспецијалиста - нефролог у Клиници за нефрологију Војномедицинске академије у Београду	
<i>II Докторска дисертација</i>	
Наслов: Утицај супституције витамина D на концентрацију VEGF-A у крви и TGF- β 1 и нефрина у урину код болесника са дијабетес мелитусом тип 2	
Број страница: 156	
Број слика: 4	
Број библиографских података: 154	
Установа и место где је рад израђен: Војномедицинска академија, Београд, Србија	
Научна област (УДК): Медицина (Клиничка и експериментална медицина)	
Ментор: др сци.мед. Тамара Драговић, ванредни професор	
<i>III Оцена и одбрана</i>	
Датум пријаве теме: 30.03.2016. године	
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: одлука бр. IV-03-1071/14 од 15.11.2016. године	
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:	
1. Проф. др Ђоко Максић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Интерна медицина, председник	
2. Проф. др Дејан Петровић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан	
3. Проф. др Снежана Живанчевић Симоновић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, 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 Гордана Радосављевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан	
3. Доц. др Мирјана Мијушковић, доцент Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан	
Датум одбране дисертације:	

Сажетак

Увод/Циљ: Недостатак витамина *D* је често присутан код пацијената са дијабетес мелитусом тип 2 и може бити фактор ризика за бржу прогресију дијабетесне нефропатије и већу инциденцу кардиоваскуларних догађаја. Циљ наше студије је био да се испита утицај надокнаде витамина *D* на параметре гликорегулације, инфламације, липидног статуса, албуминурију и биомаркере оштећења бубрежног ткива – нефрин, *VEGF-A* и *TGF-β₁* код пацијената са дијабетес мелитусом тип 2 и недостатком витамина *D*.

Метод: У проспективну, кохортну студију смо укључили 90 пацијената са дијабетес мелитусом тип 2 и недостатком (инсуфицијенција/дефицијенција) витамина *D*; од тога је 30 пацијената имало нормалну албуминурију, 30 микроалбуминурију и 30 макроалбуминурију. Спроведена је шестомесечна надокнада витамина *D* холекалциферол капима: током прва 2 месеца са 20000 *IJ* два пута недељно, а затим је код пацијената код којих је ниво витамина *D* остао снижен настављено са истом дозом још 4 месеца. Код пацијената код којих се ниво витамина *D* нормализовао, настављено са 5000 *IJ* два пута недељно. На почетку и на крају испитивања мерен је у крви ниво албумина, хемоглобина, серумског гвожђа, урее, креатинина, јутарње гликемије, гликозилираног хемоглобина, калцијума, фосфора, укупног холестерола, триглицерида, Ц-реактивног протеина, интактног паратиреоидног хормона, а из урина је праћена 24-часовна протеинурија, албумин/креатинин однос и клиренс креатинина. Биомаркери су праћени и у урину и у крви. Вредности калцијума, фосфора и витамина *D* су проверене и два месеца након започињања супституције због евентуалне корекције дозе холекалциферола. Анализирани су резултати и на основу нивоа витамина *D* на почетку и на крају студије, као и на основу пушачког статуса оболелих.

Резултати: Најнижи ниво витамина *D* пре терапије имали су пацијенти у групи са макроалбуминуријом, док је на крају испитивања статистички значајно повишен ниво витамина *D* у све три групе. Након шестомесечне примене витамина *D*, постигнуто је статистички значајно снижење нивоа албумин/креатинин односа, 24-часовне протеинурије, укупног холестерола, триглицерида, хемоглобина А1ц и *VEGF-A* у урину у све три испитиване групе, Ц-реактивног протеина у групи са нормоалбуминуријом и микроалбуминуријом, нефрина у урину у групи са микроалбуминуријом и *TGF-β₁* у урину у групи са макроалбуминуријом.

Закључак: Надокнада витамина *D* високим дозама холекалциферола код пацијената са ДМ тип 2 (са или без албуминурије) снижава Ц-реактивни протеин, хемоглобин А1ц, укупни холестерол, триглицериде у крви и албумин/креатинин однос, 24-часовну протеинурију, *VEGF-A*, *TGF-β₁* и нефрин у урину .

Кључне речи: дијабетес мелитус тип 2, дијабетесна нефропатија, Хемоглобин А1ц, Ц-реактивни протеин, холестерол, триглицериди, витамин *D*, албумин/креатинин однос, холекалциферол, нефрин, *VEGF-A* и *TGF-β₁*.

Abstract

Background/Aim: Vitamin D insufficiency/deficiency is often present in patients with Type-2 diabetes mellitus and could present a risk factor for rapid progression of diabetic nephropathy and higher incidence of cardiovascular events. The aim of this study was to examine the influence of vitamin D supplementation on glucoregulation, inflammation, cholesterol, triglycerides, albuminuria and biomarkers of renal injury – nephrin, VEGF-A and TGF- β_1 in patients with Type-2 diabetes mellitus and vitamin D insufficiency/deficiency.

Methods: We included 90 patients with Type-2 diabetes mellitus and vitamin D insufficiency/deficiency in this prospective, cohort study. Patients are divided in 3 equal groups: 30 patients with normal albuminuria, 30 with microalbuminuria and 30 with macroalbuminuria. Therapy included 6 months of supplementation with cholecalciferol drops: first 2 months with 20000 IU twice weekly, than if vitamin D level remained below normal range, we proceeded with same dose next 4 months. If the level of vitamin D normalized, we proceeded with 5000 IU twice weekly. At the beginning and at the end of the study we measured levels of albumin, hemoglobin, serum iron, urea, creatinine, fasting blood glucose, hemoglobin A1c, calcium, phosphorus, total cholesterol, triglycerides, C-reactive protein, intact parathyroid hormone, and urine analysis: 24-hour urine protein, albumin/creatinine ratio and creatinine clearance. Biomarkers are measured in serum and urine. Levels of calcium, phosphorus and vitamin D are also checked 2 months after beginning of therapy due to possible correction of cholecalciferol dose. Results are analysed according to the vitamin D level at the beginning and at the end of the study, and also according to the smoking habits of the patients.

Results: The lowest level of vitamin D, before therapy, is found in patients with macroalbuminuria, while at the end of the study we found significantly higher level of vitamin D in all three groups. After 6 months of therapy we found significant decrease of 24-hour urine protein, total cholesterol, triglycerides, hemoglobin A1c and VEGF-A in urine, in all three groups, and C-reactive protein in patients with normal albuminuria and microalbuminuria, nephrin in urine in patients with microalbuminuria and TGF- β_1 in urine in patients with macroalbuminuria.

Conclusion: vitamin D supplementation with high-dose cholecalciferol in patients with Type-2 diabetes mellitus (with or without albuminuria) decreases C-reactive protein, hemoglobin A1c, total cholesterol, triglycerides in serum, and albumin/creatinine ratio, 24-hour urine protein, VEGF-A, TGF- β_1 and nephrin in urine.

Keywords: Type-2 diabetes mellitus, diabetic nephropathy, hemoglobin A1c, C-reactive protein, cholesterol, triglycerides, vitamin D, albumin/creatinine ratio, cholecalciferol, nephrin, VEGF-A, TGF- β_1 .

Захвалница

На почетку се захваљујем мом супругу Станку, на његовој неизмерној помоћи и подршци, без њега овај рад ни у једном смислу не би био изводљив.

Неизмерну захвалност дугујем сестри Мирјани Зоњић из Одељења за хемодијализу, Клинике за нефрологију ВМА, хвала за сав труд, пријатељску и стручну подршку. Такође се захваљујем сестрама Драгани Стојановској, Сањи Стојиљковић, Милицы Спасеновић као и свим осталим сестрама одељења за хемодијализу и Клинике за нефрологију ВМА које су помогле током мог рада.

Велику захвалност дугујем проф. др Данилу Војводићу који ми је својим стручним и пријатељским саветима био од велике помоћи, такође се захваљујем на труду техничару Верици Смиљанић из Лабораторије за клиничку и експерименталну имунологију ВМА.

Посебно се захваљујем научном сараднику др сци. мед. Немањи Ранчићу на стрпљењу и свим стручним и пријатељским саветима.

Неизмерно хвала мом ментору и пријатељу проф. др Тамари Драговић, која је све ове године веровала у мене и моје идеје.

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

Захваљујем се својим колегама Немањи Ненезићу и Дејану Маринковићу, као и сестри Валентини Матић из Клинике за ендокринологију ВМА на њиховом труду и помоћи током мог рада.

Велику захвалност на сарадњи дугујем колегиницама мр биохемије Татјани Ђурашиновић и дипломираном фармацеуту-медицинском биохемичару Тамари Анђелић из Института за медицинску биохемију ВМА, као и научном сараднику др Бојани Цикоти – Алексић из Института за медицинска истраживања ВМА.

На крају хвала мојим родитељима Нади и Драги, хвала мојој сестри Катарини и њеној Елени на несебичној љубави, подршци и вери у мене током свих ових година.

Такође се захваљујем још једном члану моје породице Катарини Обренчевић, која је заједно са мном прошла све успоне и падове током израде ове дисертације.

Посебна захвалност упућена је мојој ћерки Катарини, мојој највећој инспирацији, која се засигурно највише радује завршетку мамине докторске дисертације.

САДРЖАЈ

1. УВОД	10
1.1 Историјат	10
1.2. Епидемиологија	11
1.3. Класификација дијабетес мелитуса и дијагностички критеријуми	13
1.3.1. Дијагностички критеријуми	15
1.4. Етиопатагонеза	16
1.4.1. Етиопатагонеза дијабетес мелитуса тип 1	16
1.4.2. Етиопатагонеза дијабетес мелитуса тип 2	17
1.4.3. Етиопатагонеза других специфичних типова дијабетеса	19
1.4.4. Етиопатагонеза гестациског дијабетеса	20
1.5. Клиничка слика	20
1.6. Компликације дијабетес мелитуса	21
1.6.1. Акутне компликације	21
1.6.2. Хроничне компликације	21
1.6.2.1. Неваскуларне компликације	21
1.6.2.2. Васкуларне компликације	22
1.6.2.2.1. Макроваскуларне компликације	22
1.6.2.2.2. Микроваскуларне компликације	23
1.6.2.2.2.1. Дијабетесна нефропатија	23
1.6.2.2.2.1.1. Патофизиолошки механизми у дијабетесној нефропатији	24
1.6.2.2.2.1.2. Структурне промене у бубрезима у склопу дијабетесне нефропатије	30
1.6.2.2.2.1.3. Дијагноза дијабетесне нефропатије	37
1.6.2.2.2.1.4. Нови биомаркери оштећења бубрега у склопу дијабетес мелитуса и дијабетесне нефропатије	39
1.7. Лечење и превенција дијабетес мелитуса	43
1.7.1. Немедикаментна терапија	43
1.7.2. Медикаментна терапија	44
1.7.3. Терапија компликација	44
1.7.3.1. Терапија и превенција хроничних компликација	44
1.8. Витамин D	46
1.8.1. Историјат	46
1.8.2. Хемијска структура витамина D и његова синтеза	47
1.8.3. Фармакокинетика витамина D	48
1.8.3.1. Апсорпција и дистрибуција витамина D	48
1.8.3.2. Метаболизам витамина D	49
1.8.4. Дистрибуција витамина D у односу на пол, старосну доб и географско подручје	50
1.8.5. Физиолошки ефекти витамина D	51
1.8.5.1. Улога витамина D у превенцији и лечењу дијабетес мелитуса	52
1.8.6. Препоруке за превенцију и лечење недостатка витамина D	54
2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ	57
2.1. Хипотезе студије	57
2.2. Циљеви студије	57

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	58
3.1. Врста студије	58
3.2. Популација која је анализирана	58
3.3. Узорковање	58
3.4. Варијабле које су мерене	59
3.4.1. Хематолошке и биохемијске анализе	60
3.5. Терапијски протокол	64
3.6. Статистичка обрада података	65
4. РЕЗУЛТАТИ	66
4.1. Социодемографске и антропометријске карактеристике пацијената	66
4.2. Анализа резултата пре употребе витамина D и након шестомесечне примене витамина D	68
4.3. Основни биохемијски параметри	69
4.4. Параметри инфламације и гликорегулације	72
4.5. Калцијум, фосфор и iPTH	76
4.6. Параметри липидног статуса	77
4.7. UACR и 24-часовна протеинурија	79
4.8. Корелација нивоа витамина D у крви и укупног холестерол, триглицерида, UACR и 24-часовне протеинурије	81
4.9. Биомаркери у серуму и урину	85
4.9.1. Концентрација нефрина у крви и урину	85
4.9.2. Концентрација TGF β ₁ у урину и крви	86
4.9.3. Концентрација VEGF-A у урину и крви	88
4.10. Анализе резултата у односу на ниво витамина D у крви на почетку студије	91
4.10.1. Параметри инфламације и гликорегулације у односу на ниво витамина D у крви на почетку студије	91
4.10.2. Азотне материје и клиренс креатинина у односу на ниво витамина D у крви на почетку студије	92
4.10.3. Липидни статус у односу на ниво витамина D у крви на почетку студије	93
4.10.4. Вредност 24-часовне протеинурије и UACR у односу на ниво витамина D у крви на почетку студије	94
4.10.5. Нефрин у односу на ниво витамина D у крви на почетку студије	95
4.10.6. TGF β ₁ у односу на ниво витамина D у крви на почетку студије	95
4.10.7. VEGF-A у односу на ниво витамина D у крви на почетку студије	96
4.11. Анализа резултата у односу на ниво витамина D у крви на крају студије	97
4.11.1. Параметри инфламације и гликорегулације у односу на ниво витамина D у крви на крају студије	98
4.11.2. Азотне материје и клиренс креатинина у односу на ниво витамина D у крви на крају студије	99
4.11.3. Липидни статус у односу на ниво витамина D у крви на крају студије	100
4.11.4. Вредност 24-часовне протеинурије и UACR у односу на ниво витамина D у крви на крају студије	101
4.11.5. Нефрин у урину и крви у односу на ниво витамина D у крви на крају студије ...	102

4.11.6. TGFβ ₁ у урину и крви у односу на ниво витамина D у крви на крају студије	103
4.11.7. VEGF-A у урину и крви у односу на ниво витамина D у крви на крају студије..	104
4.12. Анализа резултата у односу на пушачки статус пацијената	105
4.12.1. Социодемографске и антропометријске карактеристике пацијената у односу на пушачки статус	106
4.12.2. Концентрација витамина D у односу на пушаки статус пацијената	108
4.12.3. Основни биохемијски параметри у односу на пушаки статус пацијената	109
4.12.4. Параметри инфламације и гликорегулације у односу на пушаки статус пацијената	111
4.12.5. Липидни статус у односу на пушаки статус пацијената	112
4.12.6. UACR и 24-часовна протеинурија у односу на пушаки статус пацијената	114
4.12.7. Нефрин у урину и крви у односу на пушаки статус пацијената	118
4.12.8. TGFβ ₁ у урину и крви у односу на пушаки статус пацијената	119
4.12.9. VEGF-A у урину и крви у односу на пушаки статус пацијената	120
5. ДИСКУСИЈА	122
5.1. Социодемографске и антропометријске карактеристике наших пацијената	124
5.2. Анализа резултата пре и након шестомесечне примене витамина D	125
5.3. Анализе резултата у односу на ниво витамина D у крви на почетку испитивања...	131
5.4. Анализа резултата у односу на ниво витамина D у крви на крају испитивања	133
5.5. Анализа резултата у односу на пушачки статус пацијената	135
6. ЗАКЉУЧЦИ	141
7. ЛИТЕРАТУРА	143
БИОГРАФИЈА АУТОРА	154
БИБЛИОГРАФИЈА РАДОВА	155
8. ПРИЛОЗИ	
Кључна документацијска информатика	
Key Words Documentation	
Образац 1	
Образац 2	
Радови који су били услов за пријаву завршене докторске дисертације	

1. УВОД

1.1. Историјат

Дијабетес мелитус (ДМ) је болест савременог доба, и тренутно представља један од водећих здравствених проблема у свету. ДМ је као болест, односно као скуп симптома, без јасне патогенезе први пут описан још пре око 3500 година, од стране древних Египћана (1). Еберс папирус за који се претпоставља да датира из 1550. године пре нове ере, пронађен је 1862. године у једном гробу у региону Тхебес јужно од Египта, и назван је по египтологу *Geary Ebers*-у који га је пронашао. На овом папирусу налазе се описи различитих болести, а међу њима је описано и обољење са полиуријским синдромом, претпоставља се да се опис односи на ДМ (1). Грчки лекар *Araetus of Cappodocia* (81-138 AD) је дао детаљнији опис “полиуричног обољења” – које је назвао „*diabetes*“ (што на грчком језику значи сифон). Оболели су имали кратак животни век (1).

Много касније персијски лекар *Avicenna* (960-1037) у својој књизи „*Canon of Medicine*“ прецизно описује клиничке карактеристике и неке компликације дијабетеса као што су периферна неуропатија, гангрена и еректилна дисфункција (2).

Савремена историја дијабетеса почиње са радовима енглеског лекара *Thomas Willis-a* (1621-1675), који је потврдио изјаве индијских лекара од пре 1000 година, да је урин оболелих од дијабетеса слadak, како он наводи "дивно слadak, као да је прожет медом или шећером“. Додао је дотадашњем називу „*diabetes*“ још и латинску реч „*mellitus*“, која буквално значи “sladak као мед“, тако да болест добија данашњи назив „*diabetes mellitus*“ (3). Отприлике читав век касније, ливерпулски доктор *Mathew Dobson* (1735-1784) је 1776. потврдио присуство шећера у крви и урину код оболелих од „*diabete mellitus*“. Међутим *Mathew* није могао да објасни одакле шећер у урину, тврдио је да није произведен у бубрегу (1).

Claude Bernard је 1857. године открио и објаснио процес синтезе гликогена у јетри (3). Деведесет година касније 1947. године *Gerty and Cori* су открили како се гликоген под дејством ензима фосфорилазе претвара у глукозу и за то добили Нобелову награду (3).

У даљем истраживању значајну улогу има рад Немачког студента *Paul Langerhans-a*, који је 1869. године идентификовао две врсте ћелија у панкреасу од којих су ћелије које луче инсулин по њему назване „*Langerhans острва*“ (4). Једно од највећих открића у историји медицине је изолација инсулина 1921. године, *Fredrick Grant Banting* и његов помоћник *Charles Herbert Best* из Торонта, су успели да лигирају панкреасни канал код пса, и коначно су доказали да недостатак инсулина узрокује дијабетес. За ово научно откриће

1923. године добили су Нобелову награду за физиологију и медицину (5,6). Инсулин је у јануару 1922. године први пут клинички примењен код човека, заправо код 14-годишњег дечака по имену *Leonard Thombson* из Торонта (7).

Roger Hinsworth 1935. године је на основу различитог одговора на инсулинску терапију потврдио да постоје две врсте дијабетеса: "инсулин-зависан" (тип 1) и "инсулин-независан" (тип 2) (1). Почетком педесетих година прошлог века за лечење дијабетеса произведени су први перорални хипогликемици – препарати сулфонилуреа, а затим наредних деценија и друге врсте ових лекова (8). Високо пречишћени инсулин, идентичан човековом ендегеном инсулину, уведен је у употребу 70-их година прошлог века (9).

Напредовањем науке уведени су и нови модалитети лечења, од 1966. године у циљу лечења дијабетес мелитуса тип 1 (ДМ тип 1) ради се трансплантација панкреаса, а на још увек спорадичном нивоу у лечењу дијабетеса се примењује генска терапија лептином и инсулином (10).

1.2. Епидемиологија

Дијабетес мелитус је хронично метаболичко обољење које представља један од водећих здравствених проблема у свету. Број новооболелих је у сталном порасту, не само у развијеним земљама Западне Европе и Америке, већ и у земљама са убрзаним развојем. Чак 80% од укупног броја оболелих од ДМ живи у земљама са ниским или средњим бруто националним дохотком, у којима је нагла урбанизација и нагла промена стила живота допринела порасту инциденције гојазности и ДМ. То су земље Блиског и Далеког Истока, Полинезија, југоисточна Азија и Северна Африка (11).

У свету је 2015. регистровано 415 милиона оболелих од ДМ, а за 2040. процењено је да ће број оболелих, износити 642 милиона (11). Глобална преваленца ДМ код одраслих се значајно повећава током последњих деценија, тако је 2015. године процењена преваленца од 8,8%, а претпоставља се да ће 2040. износити 10.4% (12). Већ 2015. године, процењено је да више од 700 милиона одраслих људи широм света има дијабетес мелитус или интолеранцију на глукозу, а да је код скоро половине од тих болесника обољење још увек препознато (11,12). Висок проценат недијагностикованог ДМ код одраслих имамо у Африци, око 66.7% од укупног процењеног броја у региону, затим око 50% у Југоисточној Азији и Западном Пацифичком региону (12). Разлог за овако велики број пацијената са недијагностикованим ДМ у овим земљама лежи у лошем здравственом систему, без редовних превентивних прегледа, а просвећеност становништва је на ниском нивоу (12,13).

Процент недијагностикованог ДМ у развијеним земљама је значајно нижи, тако у Северној Америци, Карибској регији, Канади износи 21.4% (12).

Процењује се да ће 2040. једна од десет одраслих особа боловати од ДМ. Највећа промена у тој преваленци је повећање броја оболелих у животној доби преко 65 година, што је и логична последица продужетка животног века становништва. То се односи на земље Западне Европе и Северне Америке, где поред продужетка животног века имамо и глобални пораст гојазности што снажно утиче на преваленцу обољевања од ДМ типа 2 (12,13).

Заступљеност ДМ између полова је приближно једнака. У животној доби од 30-69 година, преваленца је нешто виша код мушкараца, а након 69. године преваленца постаје виша код жена, што је повезано и са нешто дужим животним веком жена (13).

Око 87-91% оболелих од ДМ има ДМ тип 2, што је подстакнуто и растућом епидемијом гојазности у целом свету (14). Учесталост ДМ тип 2 варира у различитим земљама и етничким групама, од највеће код Пима Индијанаца (50,3/1000 становника) до најниже код руралних Африканаца (1,2/1000 становника). Учесталост зависи од генске предиспозиције и фактора животне средине. Фактори ризика за развој ДМ тип 2 су гојазност, позитивна породична анамнеза, припадност одређеним етничким групама, женски пол, ниска телесна тежина на рођењу, прекомерна тежина у адолесцентском периоду, гестацијски дијабетес мајке током трудноће повећава ризик новорођенчета да у каснијем периоду развије ДМ. Региструје се пораст новооткривених случајева ДМ тип 2 у све млађој популацији (13,14).

У порасту је и број оболелих о ДМ тип 1, а доња старосна граница се све више спушта, тако да се процењује да ће број новооткривених случајева у европској популацији деце млађе од пет година бити дуплиран у периоду од 2005. до 2020. године. 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 (12,14,15). Фактори ризика за настанак ДМ ти 1 су: генетска предиспозиција, вирусне инфекције, нарочито ентеровирусне инфекције, имунизација (само код генетских предиспонираних), исхрана, посебно излагање крављем млеку у раном животном добу, виши социоекономски статус, гојазност, недостатак витамина Д, перинатални фактори као што су старост мајке, историја прееклампсије и неонатална жутица. Супротно од ДМ тип 2, ниска тежина на рођењу смањује ризик од развоја ДМ тип 1 (15).

Колико ДМ представља велики здравствени проблем говори и податак да је у 2015. око пет милион смртних случајева настало као последица ДМ. Чак 72.7% умрлих је било малђе од 60 година (12,16). Трошкови лечења су веома високи, процењује се да је 2015.

године широм света за лечење оболелих од ДМ потрошено чак 673 милијарде америчких долара, што представља билзу 12% од укупног светског здравственог фонда (12,17). У Великој Британији, 80% од укупних трошкова за лечење ДМ се троши на лечење компликација у склопу ДМ (11,18).

Сматра се да нешто више од трећине оболелих од ДМ развије дијабетесну болест бубрега. Преваленца дијабетесне болести бубрега је различита у зависности од критеријума који се користе за постављање њене дијагнозе. Уколико се користе критеријуми које дефинише Национална фондација за бубреге (National Kidney Foundation) преваленца износи 39.6%, а ако се користе критеријуми који узимају у обзир јачину гломерулске филтрације - *Glomerular filtration rate (GFR)* и албуминурије преваленца дијабетесне болести бубрега износи 38% (19). Дијабетесна болест бубрега или дијабетесна нефропатија (ДН) је и даље водећи узрок терминалне бубрежне инсуфицијенције (ТБИ) у свету (11,19).

Тренутно у свету највише оболелих од ДМ има у Кини, близу 98 милиона, а тренд пораста броја оболелих је и даље присутан (11). Индија је до скоро имала највиши број оболелих од ДМ, а сада је на другом месту са око 62 милиона оболелих, што је више од 7,1% одрасле популације Индије (11,12) Трећа земља у свету по заступљености ДМ су Сједињене Америчке Државе где преко 30,3 милиона становника има ДМ што је око 9,4% од укупне популације (20). У Европи, од ДМ болује око 60 милиона људи, са преваленцом од око 8,5%, с тим што је преваленца у европским земљама различита и креће се од 2,4% у Молдавији, до 14,9% у Турској (11).

Према процени Института за јавно здравље Србије, у Републици Србији без Косова и Метохије 2013. године боловало је приближно 710 000 особа од оба типа дијабетеса – око 12,4% одраслог становништва, што одговара компаративној преваленци од око 9,9%. Према тој преваленци Србија се налази на незавидној трећој позицији у Европи (21).

1.3. Класификација дијабетес мелитуса и дијагностички критеријуми

Стари термини и класификација ДМ на инсулин зависни дијабетес (*insulin-dependent diabetes mellitus-IDDМ*) и инсулин независни дијабетес (*Non insulin-dependent diabetes mellitus-NIDDМ*) који су предложени од стране Светске здравствене организације (СЗО) 1980. и 1985. године више нису актуелни. Нова класификација ДМ се заснива на етиолошкој класификацији, којом су раздвојени типови дијабетеса према патогенетским механизмима настанка у 4 основне категорије: Тип 1, Тип 2, "други специфични типови" и гестацијски дијабетес (11,22).

Етиолошка класификација дијабетеса

I. Тип 1 дијабетеса

(основни патогенетски механизам је деструкција бета ћелија која води потпуном недостатку инсулинске секреције)

- а. Посредован имунолошким процесом
- Б. Идиопатски

II. Тип 2 дијабетеса (може се рангирати од доминантне инсулинске резистенције до доминантног дефицита секреције инсулина који је удружен са инсулинском резистенцијом)

III. Други специфични типови дијабетеса

A. Генетски дефицити функције β ћелија услед мутација на гену за:

1. Хромозом 12, хепатоцитни нуклеарни транскрипциони фактор1 (HNF1 α ; MODY-3)
2. Хромозом 7, глукокиназу (MODY 2)
3. Хромозом 20, HNF 4 α (MODY 3)
4. Хромозом 13, инсулин промотор фактор-1 (IPF-1; MODY 4)
5. Хромозом 17, HNF 1 β (MODY 5)
6. Хромозом 2, Неуро D1 (MODY 6)
7. Митохондријалну ДНА

Б. Генетски условљени дефект у дејству инсулин:

1. Тип А инсулинска резистенција
2. *Leprechaunism*
3. *Rabson Mendenhall* синдром
4. Липоатрофични дијабетес
5. Остали

Ц. Дијабетес мелитус услед болести егзокриног панкреаса:

1. Панкреатитис
2. Траума/панкреатектомија
3. Неоплазије
4. Цистична фиброза
5. Хемохроматоза
6. Фиброкалкулозна панкреатопатија
7. Остали

Д. Дијабетес мелитус у оквиру ендокриних болести:

1. Акромегалија
2. Кушингов синдром
3. Глукагоном
4. Феохромоцитом
5. Хипертиреоза
6. Соматостатином
7. Алдостеронома
8. Остали

Е. Дијабетес мелитус индукован лековима или хемикалијама:

1. Вакор
2. Пентамидин
3. Никотинска киселина
4. Глукокортикостероиди и тиреоидни хормони
6. Орални контрацептиви
7. Инхибитори ХИВ протеаза
8. Антихипертензивни лекови (Диазоксид, β адренергички агонисти, тиазиди)
9. Долантин
10. γ Интерферон, калцинеурински инхибитори - *tacrolimus* , (*sirolimus* и *cyclosporine* у значајно мањој мери)

Ф. Дијабетес мелитус индукован инфекцијама:

1. Конгенитална рубела, 2. Инфекције проузроковане цитомегаловирусом, 3. Остали

Г. Ретки облици имунолошки посредованог дијабетес мелитуса:

1. "Stiff man sindrom"
2. Антитела на инсулински рецептор
3. Остали

Х. Друге наследне болести у склопу којих се може јавити дијабетес мелитус:

1. Downov синдром
2. Klinefelterov синдром
3. Turnerov синдром
4. Wolframov синдром
5. Friedreich атаксија
6. Huntington хореа
7. Laurence-Moon-Biedlov синдром
8. Миотична дистрофија
9. Порфирија
10. Prader-Willi синдром
11. Остали

IV. Гестациски дијабетес

1.3.1. Дијагностички критеријуми

За постављање дијагнозе ДМ у употреби су дијагностички критеријуми Светске здравствене организације - *World Health Organization (WHO)*, у којима је мерило гликорегулације гликемија наше и тест оптерећења глукозом (ОГТТ). Према препорукама *WHO* ради одређивања стања глукозне толеранције ОГТТ је потребно применити код особа са гликемијом наше између 6.1–6.9 mmol/L (23). Табела 1.

Табела 1. Дијагностички критеријуми *WHO* за дијабетес и стања хипергликемије

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

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

Поред наведених критеријума актуелни су и Дијагностички критеријуми за дијабетес према Америчкој асоцијацији за дијабетес - *American Diabetes Association (ADA)* који су наведени у табели 2. Међународни експертски комитет састављен од *ADA*, Европске

асоцијације за студије у дијабетесу - *European Association for the Study of Diabetes (EASD)* и Међународне дијабетесне федерације - *International Diabetes Federation (IDF)*, издао је консензус препорука и поред ОГТТ уврстио и гликозилирани хемоглобин - *Hemoglobin A1c (HbA1c)* као критеријум и за постављање дијагнозе дијабетеса. *HbA1c* одражава просечну вредност гликемије у плазми током претходна 2–3 месеца у једном мерењу, које може бити спроведено било када у току дана и не захтева посебне припреме укључујући и стање гладовања (24).

Табела 2. Дијагностички критеријуми за дијабетес према *ADA*

<i>Дијабетес</i>
1. ХbA1c \geq 6.5% или,
2. Гликемија наште \geq 7,0 mmol/l (126 mg/dL) или
3. Гликемија у току ОГТТ-а са 75 g глюкозе 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).

1.4. Етиопатогенеза дијабетес мелитуса

Дијабетес мелитус тип 1 и дијабетес мелитус тип 2 су два различита обољења. У циљу што јаснијег разграничења ова два ентитета у наредном тексту ће бити изнета етиопатогенеза обадва обољења.

1.4.1. Етиопатогенеза дијабетес мелитуса тип 1

Дијабетес мелитус тип 1 (ДМ тип 1) представља аутоимуно оштећење бета ћелија Лангерхансових острваца са последичним смањењем секреције инсулина. Предпоставља се да један или више фактора из спољне средине код генетских предиспонираних особа покреће аутоимуни процес, који обично траје и неколико година, пре него што се постави дијагноза, током овог периода пацијент је нормогликемичан. Предуслов да се хипергликемија испољи је оштећење више од 80% бета ћелија Лангерхансових острваца. Оштећења су иреверзибилна тако да долази до трајног недостатка инсулина (25).

Генетској предиспозицији највише доприносе полиморфизми гена у склопу *HLA* II класе - *The human leukocyte antigen (HLA)* и полиморфизми гена ван *HLA* II класе. Две комбинације хуманог леукоцитног антигена *HLA* гена или хаплотипова су од посебног

значаја *DR4-DQ8* и *DR3-DQ2* и присутни су код око 90% оболелих (26). Генотип који обухвата обадва наведена хаплотипа носи већи ризик од обољевања, а код деце која имају тај генотип, болест се развија врло рано и има велики број компликација. За трећи хаплотип, *DR15-DQ6*, сматра се да има протективну улогу, тј. налази се код око 20% здраве популације, а код мање од 1% деце са овим хаплотипом се развије ДМ тип 1 (26). Распрострањеност ових гена варира од етничке припадности и објашњава у великој мјери зашто је ДМ типа 1 релативно уобичајен у Скандинавији и Сардинији, али неуобичајен у Кини (14).

Од гена ван *HLA* важни су полиморфизми гена који утичу на активност Т ћелија, пре свега ген за супресију Т ћелијске активације - цитотоксични Т лимфоцитни антиген 4 - *Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4 (CTLA-4)* који се налази на хромозому *2q33* и *PTPN22* ген који кодира *LYP*, такође супресор Т ћелијске активације (27).

У основи ДМ тип 1 је аутоимуна реакције на аутоантигене, односно протеине ћелија Лангерхансових острваца панкреаса. Код оболелих од ДМ тип 1 могу се идентификовати следећа аутоантитела (28,29):

- 1) Аутоантитела на ћелије острвца - *Islet cell autoantibodies (ICA)*: примарна антитела на цитоплазматске протеине ћелија острваца, идентификују се код 85% новооболелих од ДМ тип 1, и предиктор су развоја ДМ тип 1 (28,29).
- 2) Аутоантитела на инсулин - *Insulin autoantibodies (IAA)*, су често прва аутоантитела која се могу идентификовати (28,29).
- 3) Аутоантитела на ензим декарбоксилазу глутаминске киселине - *Glutamic acid decarboxylase antibodies (GADA)*, присутна су код око 70% пацијената у време постављања дијагнозе (28,29).
- 4) Аутоантитела на *IA-2* и *IA-2 β* , ова аутоантитела су у време постављања дијагнозе пронађена у серуму код око 58% пацијената. Обично се појављују касније у односу на аутоантитела на инсулина и *GAD* (28,29).
- 5) Аутоантитело на цинк транспортер - 8 (*ZnT-8*) присутна су код 60% до 80% пацијената са де ново дијагностификованим ДМ тип 1. Око 26% оболелих од ДМ тип 1 са негативним антителима (*IAA*, *GADA*, *ICA*, *IA-2*) имају *ZnT-8* аутоантитела (28,29).

Поред генетске предиспозиције неходно је присуство фактора који покрећу аутоимуни процес. Сматра се да улогу покретача најчешће играју фактори спољне средине, и та улога се приписује разним вирусним и другим инфекцијама. Од вируса најчешће се помиње *Coxsackie virus*, *Epstein-Barr virus*, *mumps*, *cytomegalovirus*. или више врста енетровируса (25,30).

1.4.2. Етиопатогенеза дијабетес мелитуса тип 2

ДМ тип 2 настаје када бета ћелије панкреаса више нису у могућности да задовоље потребе организма за инсулином. Сматра се да су два патолошка процеса одговорна за настанак ДМ тип 2 (31). Примарни патолошки процес је инсулинска резистенција, односно смањена осетљивост периферних ткива на инсулин. Други процес представља дисфункција β ћелија, које у почетку у циљу компензације инсулинске резистенције појачано луче инсулин, али временом њихови капацитети се троше и долази до недостатка инсулина. Инсулинска резистенција је обично присутна неколико година пре постављања дијагнозе ДМ тип 2 (31).

Као и код ДМ тип 1 за испољавање ДМ тип 2 важна је комбинација генетских и фактора спољне средине. У прилог томе говоре резултати испитивања у које су укључене нормогликемичне особа чији су родитељи имали ДМ тип 2, утврђено је да је њихова осетљивост на инсулин иста као код здравих особа које немају позитивну породичну анамнезу за ДМ тип 2 (односи се на најближе сроднике), ако су њихове телесне масе близу идеалних вредности, међутим са повећањем степена гојазности имамо прогресивно смањење инсулинске сензитивности само код особа са позитивном породичном анамнезом. 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 (31,32).

Од генетских фактора најзначајнији су гени који су одговорни за синтезу инсулина и ембриогенезу панкреаса: *transcription factor 7-like 2 gene (TCF7L2)* и локуси *SLC30A8*, *HHEX/IDE*, и *KCNJ11* (33).

Од фактора спољашње средине истиче се седентарни начин живота уз конзумирање брзе хране, што у последње време доводи до епидемије гојазности (31). Код гојазних особа ниво слободних масних киселина у крви је повишен, а висока концентрација слободних масних киселина у плазми инхибира секрецију инсулина и инхибира инсулином стимулирано преузимање глукозе од стране ћелија. Такође код гојазних пацјената су нивои адипонектина и лептина који се синтетишу у масном ткиву снижени, а њихови ниски нивои се повезују са повећањем инсулинске резистенције и хиперинсулинемијом. Такође исхрана са високим садржајем масти утиче на промене у функцији транспортера глукозе 2 -*Glucose transporter 2 (GLUT-2)* који је одговоран за улазак глукозе из крви у ћелије (32,34).

У условима нормогликемије инсулин настаје из проинсулина и секретује се у циркулацију. Од укупне количине излученог инсулина око 10% - 15% чини проинсулин – неактивна форма инсулина. Међутим у условима инсулинске резистенције проценат

излученог проинсулина износи и до 40%. Предпоставља се да је проценат проинсулина повећан зато што је обрада инсулина у бета ћелијама поремећена или услед повећаних потреба за инсулином нема довољно времена за правилно сазревање гранула тако да ослобађају више проинсулина (32).

У етиопатогенези ДМ тип 2 одређену улогу има и амилин. Амилин (амилоид полипептид) се налази у секреторним гранулама бета ћелија панкреаса и косекретује се са инсулином. Примећено је да се код болесника с ДМ тип 2 амилин појачано таложи у ткиву панкреаса, односно бета ћелијама што доводи до њиховог оштећења услед отварања калцијумских канала на површини ћелијске мембране и уласка калцијума у ћелије. Такође повећане концентрације амилина смањују преузимање глукозе од стране периферних ткива што погоршава већ присутну инсулинску резистенцију. Интезивирање инсулинске резистенције уз оштећене бета ћелија додатно отежава гликорегулацију и доприноси напредовању промена у склопу ДМ. Депои амилина верификовани су код пацијената са ДМ тип 2 и у ткиву бубрега, али не код свих. Присуство депоа се повезују са прогресивнијом формом ДМ тип 2, односно бржим испољавањем дијабетесне нефропатије са обимнијим променама у гломерулу и тубулоинтерстицијском простору. (35).

У последње време инфламација се издваја као један од најважнијих фактора у патогенези ДМ тип 2. Појачана секреција проинфламаторних цитокина, фактор некрозе тумора алфа - *Tumor necrosis factor- α (TNF- α)*, инхибитор активатора плазминогена 1 - *Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)*, интерлеукина 6 - *Interleukin 6 (IL-6)*, интерлеукина 12 - *Interleukin 12 (IL-12)*, интерлеукина 18 - *Interleukin 18 (IL-18)*, интерлеукина 1β - *Interleukin 1β (IL- 1β)*, је доказана код оболелих од ДМ тип 2, као и повишен ниво Ц реактивног протеина - *C-reactive protein (CRP)*. Потврђено је и да адипокини који се ослобађају из масних ћелија стимулишу запаљенску реакцију, и тиме потенцирају инсулинску резистенцију (32,36).

1.4.3. Етиопатогенеза других специфичних типова дијабетеса

Други типови ДМ представљају групу дијабетеса која настаје у склопу других обољења а не услед примарног оштећења бета ћелија Лангерхансових острваца. Ова група чини мање од 10% од укупног броја оболелих од ДМ. У претходно наведеној етиолошкој класификацији ДМ детаљно смо навели у склопу којих других стања се може испољити ДМ (32).

1.4.4. Етиопатогенеза гестацијског дијабетес мелитуса

Гестацијски ДМ представља хипергликемију различитог степена, откривену први пут током трудноће, која у већини случајева ишчезава након порођаја. Јавља се код 2-5% свих трудноћа. Не искључује се могућност да је хипергликемија постојала и пре трудноће и да ће се задржати и након порођаја (37). Тестирање за гестацијски дијабетес се спроводи између 24-28 гестацијске недеље, а тестирање након порођаја у циљу провере гликорегулације у периоду од 4-12 постпорођајне недеље. 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 (37).

1.5. Клиничка слика

Клиничка презентација ДМ тип 1 и тип 2 може се значајно разликовати. У ДМ тип 1 клиничка слика се креће од потпуно асимптоматског оболења до изражене полидипсије, полиурије и полифагије са губитком у телесној тежини, осећајем умора, што може трајати неколико дана до неколико недеља и месеци. Код чак 40% деце старости до 3 године, ДМ тип 1 се дијагностикује у стању дијабетичне кетоацидозе. (32,27).

Код ДМ тип 2 пацијенти могу годинама бити без било какве симптоматологије, тако да је код неких од њих у тренутку постваљања дијагнозе већ дошло до развоја хроничних компликација, најчешће микро или макроваскуларних компликација (исхемијска болест срца, цереброваскуларни инзулт, полинеуропатија, ретинопатија, нефропатија) (32,38). Најчешће присутни симптоми као што је умор, парестезије доњих екстремитета, гљивичне инфекције, нарочито баланитис код мушкараца и вагиналне инфекција код жена, сметње са видом, интермитентна ноктурија, полидипсија и полифагија могу перзистирати годинама. У случајевима дуготрајно непрепознате хипергликемије може се развити хиперосмоларно стање или кетоацидоза, истина значајно ређе у односу на ДМ тип 1 (38).

Основне разлике у патогенези, клиничкој слици, генетској основи и променама у ћелијама панкреаса између ДМ тип 1 и тип 2 наведене су у табели 3.

Табела 3. Основне разлике између ДМ тип 1 и тип 2

Дијабетес	Тип 1	Тип 2
Клиничка презентација	млађи од 20 година нормално ухрањени снижена секреција инсулина <i>At</i> против ћелија панкреаса честа кетоацидоза	углавном старији од 30 година гојазни нормална или повећана секреција инсулина нема <i>At</i> против ћелија панкреаса ретка кетоацидоза
Патогенеза	аутоимуни, имунопатогенетски механизам озбиљан инсулински дефицит	инсулинска резистенција релативан инсулински дефицит
Генетика	50% удруженост код близанаца повезаност са HLA	60-80% удруженост код близанаца нема повезаности са HLA
Ћелије острваца панкреаса	рани инсулитис атрофија и фиброза озбиљна ћелијска деплеција	нема раног инсулитиса фокална атрофија и депозити амилоида умерена ћелијска деплеција

1.6 Компликације дијабетес мелитуса

Компликације које настају у току развоја ДМ тип 1 и тип 2 деле се на акутне и хроничне.

1.6.1 Акутне компликације

Акутне компликације дијабетес мелитуса су дијабетесна кетоацидоза, хиперосмоларно хипергликемично стање, хипогликемија и лактатна ацидоза (22,39).

1.6.2. Хроничне компликације

Независно од типа дијабетеса, хроничне компликације се могу поделити на васкуларне и не васкуларне (39).

1.6.2.1. Неваскуларне компликације

У не васкуларне компликације ДМ убрајају се: учестале инфекције (у склопу ДМ постоји општа склоност ка инфекцијама), као што су акутни циститис, акутни и хронични пијелонефритис, папиларна некроза, перинефритички апсцес, инфекције респираторног и

гастротракта, гљивичне мукокутане инфекције, поремећаји у склопу гастро тракта (учестало повраћање, дијареје), затим депресија и деменција код оболелих се такође повезује са ДМ (40,41).

1.6.2.2. Васкуларне компликације

Васкуларне компликације настале у склопу ДМ могу се поделити на - макроваскуларне атеросклеротске компликације, где спадају коронарна артеријска болест, болест периферних артерија и цереброваскуларна болест и микроваскуларне компликације у које спадају нефропатија, ретинопатија, и неуропатија. Према истраживањима *Krentz-a* и сарадника и *Al-Wakeel-a* и сарадника микроваскуларне и макроваскуларне компликације се развијају симултано, док *Matheus u Gomes* тврде супротно (42,43,44).

1.6.2.2.1. Макроваскуларне компликације

Основни патогенестки процес који је одговоран за настанак макроваскуларних компликација у склопу ДМ је убрзана атеросклероза (40). Услед инсулинске резистенције и последичне хипергликемије активирају се хронични инфламаторни процеси, интензивира се производња завршних продуката гликозилације - *advanced glycation end-products (AGEs)* и повећава митохондријална продукција слободних кисеоничних радикала - *Reactive oxygen species (ROS)*, који пак блокирају два кључна антиатеросклеротска ензима, ендотелијалну азот оксид синтетазу - *Endothelial nitric oxide synthase (eNOS)* и простациклин синтетазу. У процес инфламације су укључени бројни хемокини међу којима се издваја моноцитни хемоатрактантни протеин-1 - *Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)*, који игра важну улогу у развоју раних атеросклеротских промена. *MCP-1* поспешује трансформацију моноцита у макрофаге који затим инфилтрирају зид крвног суда, стимулише продукцију цитокина, *IL- 6, TNF- α*, затим потенцирају пролиферацију глатке мускулатуре и појачано депоновање колагена. Услед наведених промена нарушава се нормална структура зида крвног суда, као и ендотелна функција што доводи до стварања атеросклеротских плакова, повећава се склоност ка коагулацији, појачава се агрегабилност тромбоцита, а услед повећаног нивоа *PAI-1* нарушава се процес тромболизе (40,45,46).

1.6.2.2.2. Микроваскуларне компликације

Микроваскуларне компликације настају услед промена на ситним крвним судовима као што су артериоле, капилари и венуле, а они су одговорни за контролу пермеабилности крвних судова, мишићног тонуса који прилагођава проток крви метаболичким потребама ткива. ДМ изазива патогномоничне промене у малим крвним судовима, захватајући базалну мембрану артериола у гломерулу, ретини, миокарду, кожи и мишићима, доводећи до њеног задебљања (40).

С обзиром да се у нашем истраживању акценат ставља на оштећење бубрега у склопу ДМ тип 2, детаљно ће бити описана етиопатогенеза дијабетесне нефропатије.

1.6.2.2.2.1. Дијабетесна нефропатија

Дијабетесна нефропатија (ДН) је хронична микроваскуларна компликација ДМ, која се испољава као клинички синдром који карактерише перзистентна албуминурија (вредност албумин/креатинин односа - $UACR > 300 \text{ mg/g}$), хипертензија, стално прогресивно снижење јачине гломерулске филтрације (GFR) и пораст учесталости кардиоваскуларних догађаја и кардиоваскуларних догађаја са смртним исходом (31). У току развоја ДН разликујемо 5 развојних фаза: 1. Фаза гломерулске хиперфилтрација, 2. Фаза нормоалбуминурије, 3. Фаза инципијентне нефропатије (микроалбуминурија, $30\text{-}300 \text{ mg/24h}$), 4. Фаза манифестне нефропатије (макроалбуминурија $> 300 \text{ mg/24h}$, 5. Фаза бубрежне инсуфицијенције (47,48). Појава микроалбуминурије је први манифестни знак ДН, може трајати годинама, а као таква штетно утиче на функцију бубрежних структура. Микроалбуминурија означава повишену уринарну екскрецију албумина у интервалу од $30\text{-}300 \text{ mg/24h}$ у бар два узастопна узорка урина у периоду од три до шест месеци. Микроалбуминурија се може израчунавати и из јутарњег спот узорка урина када се израчунава као албумин/креатинин однос у урину - *Urine Albumin-to-Creatinine Ratio (UACR)* и износи у интервалу од $30\text{-}300 \text{ mg/g}$ (49). Ових пет фаза у склопу развоја ДН су јасно раздвојене код ДМ тип 1, док код ДМ тип 2 већ у фази постављања дијагнозе микроалбуминурија може бити присутна, због дугог немог присуства хипергликемије. Промене у склопу прве три фазе су реверзибилне, нарочито код пацијената са ДМ тип 2 (48). Јапански аутори забележили су регресију микроалбуминурије код чак 50% праћених болесника (50). Регресија је како код јапанских тако и код других аутора била у позитивној корелацији са вредностима $HbA1c$, систолним крвним притиском и трајањем микроалбуминурије (50,51). Микроалбуминурија даље прогредира ка макроалбуминурији (албуминурија $> 300 \text{ mg/24h}$ или $UACR > 300 \text{ mg/g}$) или ка

макропротеинурији (протеинурија > 500 mg/24h), која када се једном јави, води даљем паду *GFR* (48, 52, 53).

Промене које се дешавају на нивоу бубрега у склопу ДМ у последње време се означавају као дијабетесна болест бубрега, међутим ми ћемо у даљем тексту ипак корисити стари термина - дијабетесна нефропатије који је и даље у употреби у стручној литератури. ДН се испољава код око 40% пацијената са ДМ тип 1 и код око 20% пацијената са ДМ тип 2. Водећи је узрок терминалне бубрежне слабости у свету (31).

1.6.2.2.1.1. Патофизиолошки механизми у дијабетесној нефропатији

Два главна фактора ризика за развој ДН су лоша гликорегулација и дужина трајања ДМ (31,53). Механизми којима хипергликемија изазива ДН су комплексни и многобројни, међу њима се као главни издвајају: поремећај реналне хемодинамике, поремећен метаболизам глукозе, исхемија, појачан оксидативни стрес, инфламација и појачана активност ренин ангиотензин система - *Renin-angiotensin system (RAS)* на нивоу бубрега (52).

У условима нормалне гликорегулације 90% глукозе која је филтрирана у гломерулима се реапсорбује у *S1* сегменту проксималног тубула преко *SGLT2* рецептора на четкастом епителу, а само 10% преко *SGLT1* рецептора који се налазе у каснијим деловима проксималних тубула (54). У условима хипергликемије услед велике количине глукозе која се филтрира у гломерулу и покушаја проксималног тубула да реапсорбује ту глукозу, долази до хипертрофије проксималног тубула. Апсорпција глукозе и натријумхлорида преко *SGLT2* рецептора је повезана, па услед хипертрофије проксималног тубула и појачане реапсорпције глукозе појачана је и реапсорпција натријумхлорида, због тога мања количина натријумхлорида стиже у дистални тубул што макула денса препознаје као снижену *GFR* и услед тога смањује тубулогломеруслку повратну спрегу - *tubuloglomerular feedback (TGF)* (47,54). *TGF* је механизам којим макула денса контролише вазоконстрикцију аферентне артериоле отпуштањем аденозина, и других сигналних молекула. Блокирањем *TGF* долази до вазодилатације аферентне артериоле посредством вазоактивних медијатора као што су инсулину сличан фактор раста 1 - *insulin-like growth factor 1 (IGF-1)*, азот моноксид - *nitric oxide (NO)*, простагландини, глукагон (53,54). Истовремено услед појачаног локалног дејства ангиотензина II у условима хипергликемије имамо појачану вазоконстрикцију еферентне артериоле и последични поремећај ауторегулације са развојем интрагломерулске хипертензије. Тако у дијабетесној болести бубрега имамао испољен „натријум парадокс“, што је у исхрани рестрикција натријум хлорида већа то мања количина натријум хлорида

стиже у дистални тубул и *GFR* се повећава. *GFR* може бити повећана и до 40% у односу на нормалне вредности (54). У условима нормогликемије осцилације у системском перфузионом притиску се не преносе на интрагломерулски притисак због строге ауторегулације, али с обзиром да је код ДМ ауторегулација компромитована, системски перфузиони притисак се слободно преноси на капиларну гломерулску мрежу (47,54).

Функционалне промене у протоку крви и гломерулском притиску провоцирају настанак структурних промена. Повећан интрагломерулски притисак механичким путем оштећује ендотелну површину гломерулских капилара, ремети нормалну структуру гломерулске баријере, индукује експресију цитокина и фактора раста који изазивају појачану синтезу колагена, фибронектина, ламинина и слично (52). Хиперфилтрација је удружена са гломеруломегалијом и увећањем бубрега. Гломеруларно увећање настаје услед повећања броја капиларних петљи са последичним повећањем филтрационе површине и умножавањем мезангијалног матрикса (52). Поред гломерула промене захватају и тубуларне ћелије у смислу пролиферације и повећања целуларне величине. Механизми којим повећана концентрација глукозе у крви изазива хипертрофију подразумевају стимулацију и појачану експресију више фактора раста на нивоу бубрега, укључујући *IGF-1*, епидермални фактор раста, тромбоцитни фактор раста *Platelet-derived growth factor (PDGF)*, васкуларни ендотелни фактор раста - *Vascular endothelial growth factor (VEGF)* и трансформишући фактор раста бета1 - *Transforming growth factor beta 1 (TGF-β1)* (52,55). У наредном делу биће детаљно описани главни патогенетски механизми у ДН.

Улога протеин киназе Ц

Један од главних нежељених ефеката хипергликемије јесте појачана активација протеин киназе Ц - *protein kinase C (PKC)* (56). *PKC* је ензим из породице серин-треонин киназа који регулишу различите васкуларне функције укључујући контрактилност, проток крви, ћелијску пролиферацију и васкуларну пермеабилност. Активност *PKC* код болесника са ДМ је посебно повећана на површини ћелија ретине, аорте, срца и гломерулских ћелија укључујући подоците, предпоставља се због појачане де ново синтезе диацилглицерола који је главни ендогени активатор *PKC* (56). Постоји више изоформи *PKC*, али се сматра да је за патогенезу ДН највише одговорна *PKC α*. Главна улога *PKC α* је у појачаној ендокитози нефрина који је једна од главних компоненти слит дијафрагме - *slit diaphragm (SD)* (57). Појачана експресија *PKC α* на подоцитима у особа са ДМ повећава ендокитозу нефрина и тиме доводи до нестабилности *SD* (58).

Поред *PKC α* у патофизиологији ДН значајну улогу игра и изоформа *PKC β*. Док је *PKCα* одговорна за појаву албуминурије и нарушавање структуре гломерулске филтрационе

баријере, *PKC* β је одговорна за хипергликемијом изазвану реналну фиброзу, преко усходне регулације *TGF- β 1* који доприноси развоју гломеруларне фиброзе. Поред *PKC* β на дејство *TGF- β 1* утиче и *PKC* α која им улогу у сигналном одговору након активације *TGF- β 1* (56).

Изоформа *PKC* ϵ која бива активирана од стране *AGEs* доводи до појачане експресије на подоцитима *VEGF164* и *VEGF165* изоформи које код анималних модела доводе до структурних и функционалних реналних промена које се виде код ДН, укључујући протеинурију, гломерулску хипертрофију, задебљање гломерулске базалне мембране, пролиферацију мезангијума и губитак *SD* и стопаластих продужетака (59).

Ефекти завршних продуката гликозилације

Хронична хипергликемија доводи до неензимске гликозилације аминокиселина и протеина. Глукоза се неензимски везује за слободне аминок групе формирајући нестабилне продукте – *Schiff-ove* базе. Додатним реаранжманом формирају се нешто стабилнији али још увек реверзибилни Амадори продукти. Током времена ови продукти претрпе додатна умрежавања и претварају се у иреверзибилне завршне продукте гликозилације – *Advanced glycation end products (AGEs)* (60). *AGEs* посредују у различитим ћелијским активностима укључујући експресију и адхезију молекула, ћелијску хипертрофију, синтезу екстрацелуларног матрикса, епително мезенхимску трансформацију тубулских ћелија, инхибицију синтезе азот монооксида. Могу се везати за различите врсте ћелија, укључујући макрофаге и мезангијалне ћелије. Везујући се за макрофаге доводе до повећаног стварања и ослобађања проинфламаторних медијатора: *TNF- α* , интерлеукина, *PDGF*, *IGF-1*. Ослобођени медијатори стимулишу мезангијске ћелије на појачану синтезу мезангијалног матрикса што доприноси гломерулосклерози (53,60). *AGEs* стимулишу епителне ћелије проксималних тубула на појачану синтезу и ослобађање *TGF- β 1* што доводи до фиброзе тубулоинтерстицијума (61). *AGEs* своје ефекте испољавају преко рецептора *RAGE*. *RAGE* се налазе на површини тубулских ћелија и у мањој мери на гломерулским ћелијама. Након стварања комплекса *AGEs* - *RAGE* у ћелијама се појачано стварају *ROS* који доводе до апоптозе ћелија. Једна од функција *RAGE* је активација нуклеарног фактора $\kappa\beta$ који је значајан за одклањање – клиренс *AGEs* (60, 61).

Ефекти сорбитола

Хипергликемија стимулише полиолски пут метаболизма глукозе и појачано стварање сорбитола. У ткивима у која глокоза улази независно од инсулина, као што су ретина, очно сочиво, бубрег, хронична хипергликемија доводи до пораста концентрације глукозе. (47). Глукоза у реналне ћелије улази преко *GLUT-1* рецептора који се налазе на површини ћелија.

Повећана концентрација глукозе у крви доводи до појачане експресије *GLUT-1 mRNA* и појачане продукције *GLUT-1* протеина у мезангијалним ћелијама што за последицу има појачан улазак глукозе у ћелије (60,63). Повећана концентрација глукозе у ткиву доводи до нагомилавања сорбитола који настаје као последица повећаног метаболизма глукозе уз деловање ензима алдозо-редуктазе - *Aldose reductase (AR)*. Активност *AR* зависи од никотинамид аденин динуклеотид фосфата (*NADPH*). Депоновање сорбитола у епителним ћелијама проксималних тубула доводи до смањења слободног миоинозитола, смањења активности *Na⁺/K⁺-ATP-aze*, повећања потрошње кофактора ензима *NADPH* и *NAD⁺*, што има за последицу промену у ћелијском оксидативном потенцијалу и поремећај ћелијске функције (53,60).

Ренин ангиотензин систем у дијабетесној нефропатији

Код болесника са ДМ повећана је локална активност ренин ангиотензин система - *Renin-angiotensin system (RAS)*, тј. повећана је активност у гломерулу и реналним крвним судовима (53,60). Повећано је стварање проренина, а проренин се веже за специфичне проренин-ренин рецепторе, након чега долази до неензимске активације проренина у ренин, затим ренин изазива локално стварање ангиотензина II. Парадокслано појачаној активности *RAS -a*, плазма ренинска активност је ниска, претпоставља се због пораста екстрацелуларног волумена (53). Појачана је експресија ангиотензин II тип I рецептора - *angiotensin II type I receptors (AT-1R)*, преко којих ангиотензин II као снажан вазоконстриктор изазива вазоконстрикцију еферентне артериоле, што уз дилатацију аферентне артериоле доводи до пораста хидростатског притиска у гломерулским капиларима и пораста гломерулске филтрације. Повећана активност ангиотензина II доводи до пораста и системског крвног притиска (53,60). Поред хемодинамског ефекта ангиотензин II директно стимулише реналну продукцију *TGF-β1* у мезангијуму и епителним тубуларним ћелијама, подстиче стварање и других цитокина и фактора раста у реналним ћелијама као што су ендотелин-1, *MCP-1*, *IL-6*, *RANTES*, остеопонтин (47,60). Ангиотензин II повећава ослобађање *VEGF* из подоцита што доприноси поремећају филтрационе баријере и прогресије протеинурије (55). Сви ослобођени медијатори доприносе развоју гломерулосклерозе и ожиљавању тубулоинтерстицијума. Интезивирано је ослобађање алдостерон који такође убрзава прогресију реналног оштећења независно од ангиотензина II. Спорведена испитвања су доказала да блокадом рецептора за минералокортикостероиде се снижава протеинурија (60). Инхибитори ангиотензин конвертујућег ензима - *Angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACE i)* поред снижавања интрагломерулског притиска редукују реналну експресију *TGF-β1* (61).

Инфламација у дијабетесној нефропатији

Дијабетесна нефропатија се раније дефинисала као неинфламаторно обољење. Међутим резултати великог броја испитивања показују да активација имунолошког система и хронични инфламаторни процеси играју веома битну улогу у развоју ДН (36, 62).

Најзначајније инфламаторне ћелије које су укључене у развој дијабетесне нефропатије су макрофаги (M1 и M2 макрофаги) и Т лимфоцити. M1 макрофаги активирани *Th1* ћелијама повећавају инфламаторни одговор појачаном експресијом цитокина (интерлеукина, тумор некрозис фактора, и интерферона γ), за разлику од њих M2 макрофаги активирани *Th 2* ћелијама доводе до појачане експресије антиинфламаторних цитокина. M1 макрофаги појачавају инфламаторни одговор и појачаном продукцијом слободних кисеоничних радикала (36). *Lei* и сарадници су потврдили позитивну корелацију између *CD8* лимфоцита у циркулацији са албуминуријом код болесника са ДМ тип 2 (36,60,62).

Бројни хемокини су укључени у инфламаторни одговор у ДН, међу њима најзначајнији и први описани је *MCP-1*, који игра и важну улогу у раној фази развоја атеросклерозе. *MCP-1* утиче на трансформацију моноцита у макрофаге, који затим појачано продукују цитокине *IL-6*, *TNF- α* , а они пак доводе до почетних атеросклеротских промена у зиду крвног суда што резултује прогресијом болести (36). *Takebauasahi* и сарадници су потврдили код пацијената са присутном албуминуријом присуство повишене вредности *MCP-1* у циркулацији (65). Предпоставља се да се *MCP-1* не синтетише само у васкуларном зиду већ и у тубуларним епителним ћелијама (36, 65).

Још је 1991. године по први пут је сугерисано да инфламаторни цитокини учествују у развоју ДН. Данас се зна да инфламаторни цитокини играју веома важну улогу у развоју ДН и да су укључени у развој микроангиопатских компликација ДМ (36).

Код оболелих од ДМ појачана је секреција проинфламаторних интерлеукина 1, 6,18 (36,66). Интерлеукин 1 - *Interleukin 1 (IL-1)* изазива појачану експресију адхезионих молекула у гломерулским ендотелним ћелијама и другим бубрежним структурама. У мезангијалним ћелијама и епителним тубуларним ћелијама бубрега појачава експресију интрацелуларног адхезионог молекула-1 - *Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)*, као и Е селектина, додатно *IL-1* индукује синтезу простагландина *E2* у мезангијалним ћелијама што доводи до промена у гломерулској хемодинамици. *IL-1* модификује васкуларну пропустљивост и повећава експресију хемокина што води ка пролиферацији и синтези екстрацелуларног матрикса у мезангијуму (36,66,67). *IL-6* везано за ДН има плејотропне ефекте, има директан ефекат на гломерулску инфилтрацију ћелијама, пролиферацију

екстрацелуларног матрикса, задебљање гломерулске мембране, сматра се одговорним за прогресију ДН (36,66,67). *IL-18* у бубрегу особа са ДМ синтетишу Т лимфоцити, макрофаги, моноцити и ћелије проксималних тубула. Он појачава експресију *ICAM-1*, као и продукцију других инфламаторних цитокина у мезангијалним ћелијама, сматра се одговорним за ендотелну апоптозу. Његова концентрација је повећана код болесника са ДН. Потврдјена је директна корелација између *IL-18* и појачане уринарне екскреције албумина, чак се по неким ауторима сматра раним показатељем дијабетесне нефропатије (36,66).

TNF α има вишеструку улогу у инфламаторном одговору, синтетишу га моноцити, макрофаги и Т лимфоцити као и неке ћелије бубрега. Доводи до активације секундарних гласника, транскриптивних фактора, фактора раста, адхезионих молекула, експресије или синтезе других цитокина. Када се *TNF α* веже за рецептор на површини ћелије, активира више сигналних путева, који доводе до експресије одређених гена у бубрежним ћелијама што на крају резултује апоптозом или некрозом. *TNF α* као и претходно наведени интерлеукини у реналним структурама, мења хемодинамику унутар гломерула, повећава васкуларну пермеабилност, повећава инфилтрацију инфламаторним ћелијама, појачано стварање екстрацелуларног матрикса, појачану продукцију *ROS* (36,66,67).

Адхезионе молекуле *ICAM-1* и *Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)* омогућавају везивање леукоцита за васкуларни зид и њихов улазак у интиму, где луче протеолитичке ензиме одговорне за оштећење ткива и развој атеросклерозе (36,66).

Адипонектин и резистин су први описани адипокинихормони које луче адипоцити и који могу мењати активност инсулина. (35,66).

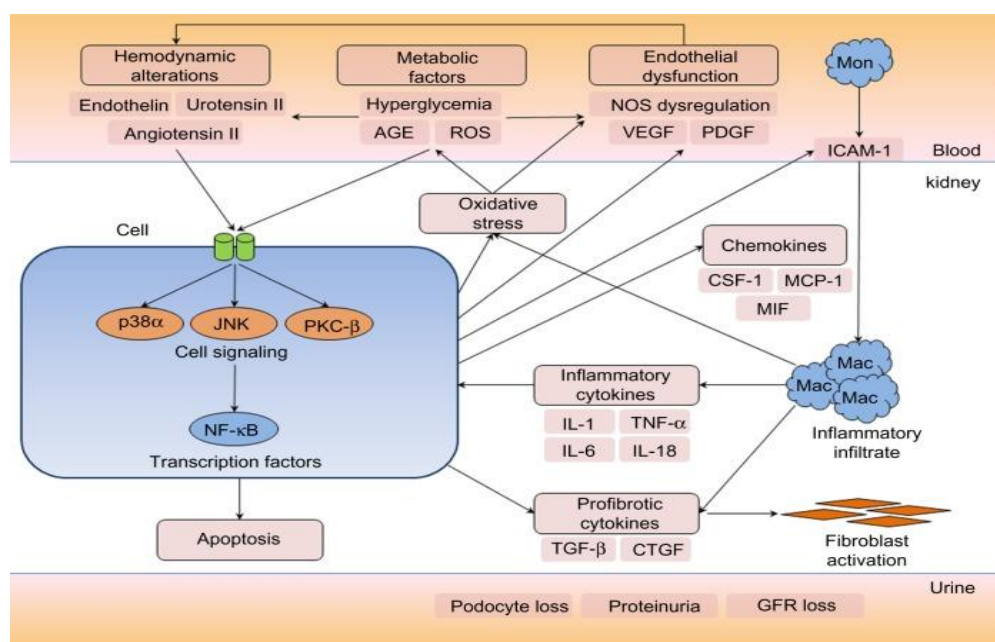
Оксидативни стрес у дијабетесној нефропатији

Оксидативни стрес игра значајну улогу у развоју микроваскуларних компликација ДМ. Метаболичке абнормалности у ДМ, а пре свега хипергликемија доводи до појачане продукције *ROS* у митохондријама. Појачана продукцију *ROS* на нивоу митохондрија изазива активирање пет главних путева укључених у развој микроваскуларних компликација ДМ. То су: полиолски пут, повећано стварање *AGEs*, појачана експресија рецептора за *AGEs* и активирање лиганда, активација *PKC* изоформи и повећана активност хексозаминског пута (36,68). Механизми којима ови путеви доводе до развоја ДН су изнети у претходном делу текста, осим хексозаминског пута чије ће активности бити сада описане. У условима хипергликемије и инсулинске резистенције глукоза након уласка у ћелију прелази у глукозу 6-фосфат, затим у фруктозу 6-фосфат, и уместо укључивања фруктозе 6-фосфата у гликолизни пут разградње као што се дешава у стању нормогликемије, он под дејством ензима фруктозе 6-фосфат аминотрансферазе - *Glutamine fructose-6-phosphate*

amidotransferase (GFAT) прелази у глукозамин 6-фосфат, који се даље конвертује до *UDP-N*-ацетилглукозамина након чега улази у ћелијско једро. У једру *UDP-N* ацетилглукозамин мења активност транскриптивних фактора што води појачаној синтези *TGF-β1* и *PAI-1* (68).

Преко наведених путева, повећана концентрација интрацелуларних *ROS* изазива промену у ангиогенези као одговор на исхемију, активира бројне проинфламаторне путеве и изазива дугоделујуће епигенетске промене. Ове епигенетске промене воде ка перзистентној експресији проинфламаторних гена и након нормализације глукозе у крви (такозвана „хипергликемијска меморија“) (66). Перзистентна експресија проинфламаторних гена остварује се преко више сигналних путева али се посебно истиче значај *JAK/STAT* пута (68).

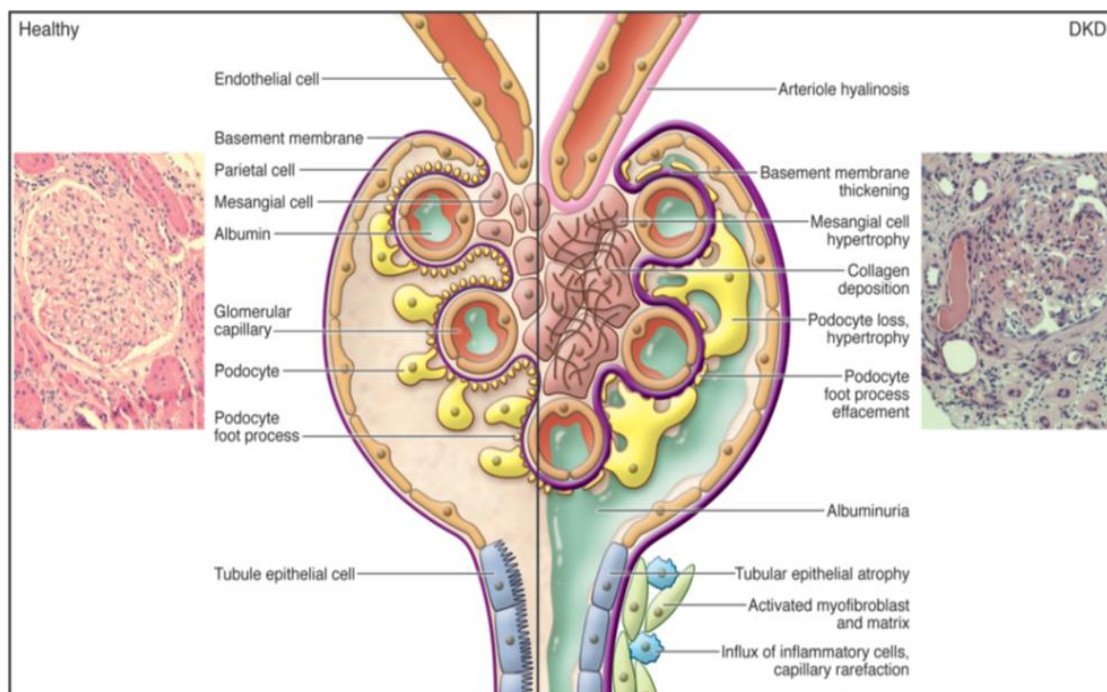
Сви претходно наведени механизми сумарно су приказани на слици 1.



Слика 1. Патофизиолошки механизми у дијабетесној нефропатији. Преузето из: Lim AKh. Diabetic nephropathy - complications and treatment. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 2014;7:361-81.

1.6.2.2.1.2. Структурне промене у бубрезима у склопу дијабетесне нефропатије

Микроскопске промене на нивоу гломерула су хијалиноза артериола, задебљање гломерулске базалне мембране, умножавање мезангијалних ћелија и увећање мезангијалног матрикса са депоновањем колагена, хипертофија и смањење броја подоцита уз губитак стопаластих продужетака (слика 2.) (69).



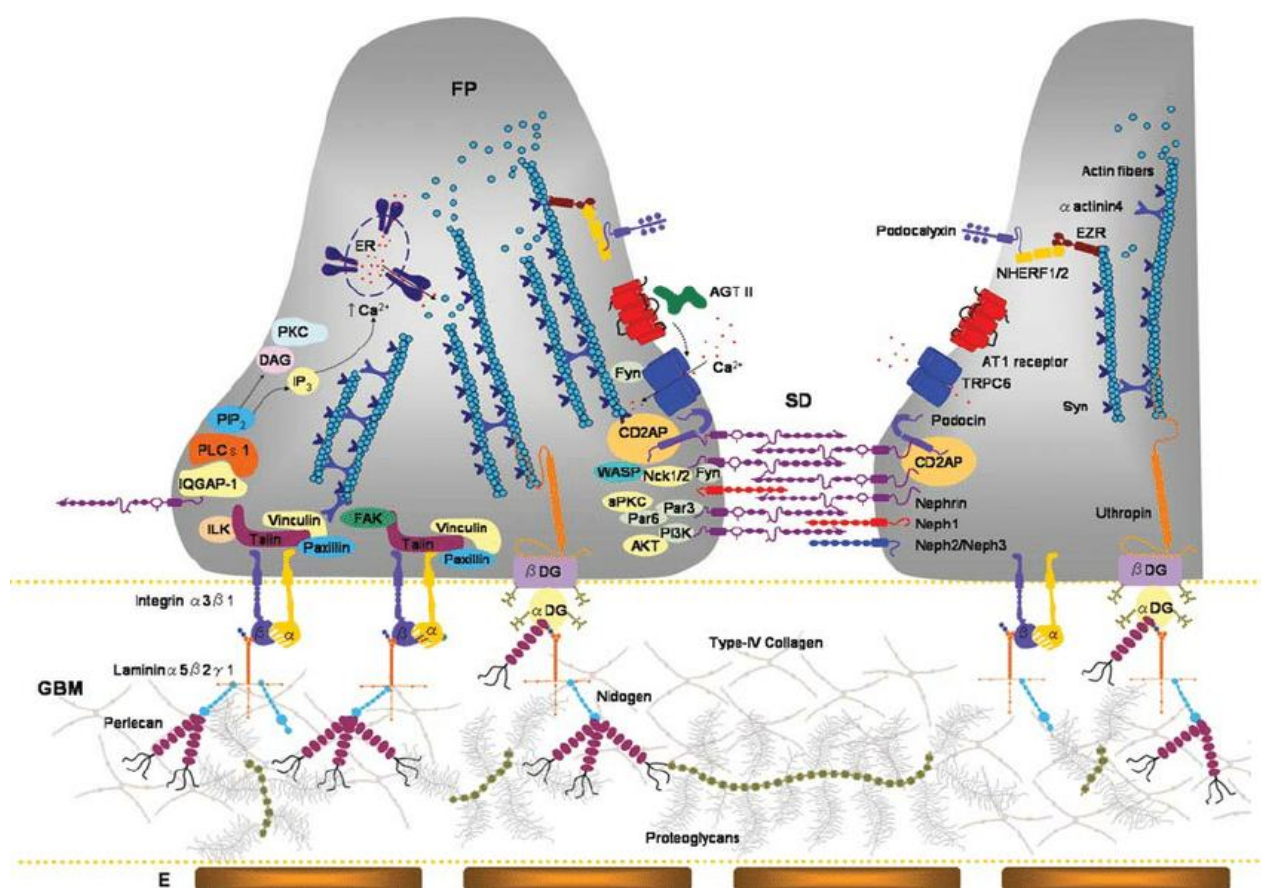
Слика 2. Патолошке промене у гломерулу у склопу дијабетесне нефропатије

Наведене промене доводе до поремећаја пермеабилитета гломерулске филтрационе баријере и појаве албуминурије а касније кроз мембрану пролазе и молекуле веће молекулске масе. Мезангијална експанзија је у негативној корелацији са капиларном филтрационом површином и јачином гломерулске филтрације (69).

Гломерулска филтрациона баријера се састоји од ендотелних капиларних ћелија, базалне мембране и висцералних епителних ћелија тј. подоцита који својим стопаластим продужецима налажу на базалну мембрану (слика 2.) (70). Гломерулска филтрациона баријера је негативног наелектрисања за шта су одговорни хепарин сулфат протеоглигани, који улазе у састав микроструктура гломерулске базалне мембране. Поред тога хепарин сулфат протеогликан је снажан инхибитор пролиферације мезангијалних ћелија (71). Сматра се да је генски полиморфизам ензима одговорног за метаболизам хепарин сулфата разлог поремећаја његове синтезе код болесника са лошом гликорегулацијом. Смањеним стварањем хепарин сулфат протеогликана смањује се негативно наелектрисање гломерулске мембране која постаје пропусна за негативно наелектрисане албумине - селективна албуминурија. Напредовањем промена тј. оштећењем подоцита и нарушавањем цитоскелета гломерулске мембране расте величина пора на мембрани што омогућава излазак и протеина веће молекулске масе – неселективна протеинурија (60,71). Детаљно ће бити описане промене у подоцитима, мезангијалном матриксу и тубулоинтерстицијуму.

Подоцитопатија

У склопу ДН прве и најважније промене на нивоу гломерула дешавају се на подоцитима. Подоцити су терминално диферентоване висцералне епителне ћелије које се налазе са уринарне стране гломерулске базалне мембране - *glomerular basement membrane (GBM)* и чине око 30% од укупног броја гломерулских ћелија (60). Први пут у литератури подоцити су описани 1929. од стране *Karl Zimmermana* (72). Подоцит се структурно састоји од волуминозног тела са више органела, примарних процеса и секундарних процеса или стопаластих продужетака. Стопаласте продужеци су грађени од актинских филамената који играју кључну улогу у везивању подоцита за *GBM*. Стопаласте продужеци суседних подоцита су међусобно повезани адхерентним везама које чине такозвану слит дијафрагму - *slit diaphragm (SD)* (Слика 3) (60).



Слика 3. Структура подоцита и гломерулске филтрационе баријере. Преузето из: Machuca E, Benoit G, Antignac C. Genetics of nephrotic syndrome: connecting molecular genetics to podocyte physiology. Hum Mol Genet. 2009;18(R2):R185-94.

SD диктира пропустљивост *GBM*, тако да кроз њу слободно могу да пролазе само вода и молекуле мале молекулске тежине растворене у води, док је непропустљива за молекуле велике молекулске тежине (60).

Многобројни протеини као што су нефрин, *CD2* удружени протеин, *ZO-1* подоцин, *P*-кадхерин детерминишу структуру *SD* и одговорни су за њену селективну пропустљивост према величини и облику молекула. Површина подоцита је подељена на два дела: апикалну мембрану и базалну мембрану. Апикална мембрана подоцита је строго негативно наелектрисана захваљујући гликопротеину гликокаликсину и хепарин сулфат протеогликану. Гликокаликсин одбија негативно наелектрисане серумске албумине и онемогућава пролазак албумина кроз гломерулску базалну мембрану. Базална површина подоцита је одговорна за интеграцију подоцита у гломерулску базалну мембрану. Простор између доње површине подоцита тј. стопаластог продужетка и *GBM* означава се као суб-подоцитни простор, он покрива око 50-60% филтрационе површине *GBM*. Суб-подоцитни простор доприноси ултрафилтрационом и хидрауличном отпору што игра веома важну улогу у гломерулској пропустљивост (60, 70).

Од претходно поменутих структурних протеина подоцита који су одговорни за функцију *SD* по свом значају се издваја нефрин. Нефрин је одговоран за контролу цитоскелетне архитектуре, облик и вијабилност подоцита, а има и улогу сигналног молекула. За адекватну гломерулску функцију неопходан је одређени ниво експресије нефрина. Код пацијената са ДМ ниво експресије нефрина на нивоу бубрега је снижен. Код оболелих од ДМ мутације и других гена као што су ген за подоцин *NPHS2*, α -актин-4 (*ACTN4*), ламинин $\beta 2$ - *laminin subunit beta 2 (LAMB2)*, *TRCP6* и фосфолипазе *Ce1 (PLCE1)* ремете функцију подоцита и доприносе развоју протеинурије (55,60,73).

Сви претходно наведени механизми којима хипергликемија мења функцију бубрега актуелни су и на нивоу подоцита. Повећан активност *RAS* локално у бубрегу, повећано стварање *AGEs*, појачана експресија *TGF- $\beta 1$* и *VEGF*, епително мезенхимска трансформација уз појачану експресију *AT-IR* убрзава апоптозу подоцита. Блокадом *AT-IR* смањује се губитак нефрина и превенира брисање стопаластих продужетака (73). Покреће се заправо читав низ сигналних путева који на крају воде до апоптозе подоцита.

На основу наведеног закључује се да подоцити играју квантитативно и квалитативно кључну улогу у адекватној гломерулској филтрацији (55,63).

Имајући у виду да су подоцити терминално диферентоване нерегенеративне ћелије њихово оштећење и апоптоза доводе до иреверзибилног смањења броја подоцита и поремећаја пермеабилности гломерулске мембране уз пролазак протеина из циркулације кроз мембрану. Иако су подоцити висцералне епителне ћелије, они имају експресију мезенхимних маркера што у ДМ доводи до њихове епително мезенхимске трансформације (60,70).

Хипергликемија директно утиче на подоците, нарушавањем њиховог структурног интегритета, вијабилности и функције. Глукоза у подоцит улази углавном преко *GLUT1* и *GLUT4* рецептора. Хипергликемија доводи до појачне експресије *GLUT-1 mRNA* и појачане продукције *GLUT-1* што доводи до појачаног уласка глукозе у подоците. Хипергликемија такође повећава стварање *ROS* преко *NADPH* оксидазе и индукује апоптозу подоцита активирањем митоген активирајуће протеин киназе *mitogen-activated protein kinase (MAPK)* и *caspase -3* каскаде (47,60,73). Хипергликемија такође доводи до појачане експресије јонских канала *TRPC6* на површини подоцита што доводи до пораста интрацелуларног Ca^{2+} и апоптозе подоцита. Један од путева апоптозе јесте активација калцинеурина и нуклеарног фактора активираних Т ћелија - *Nuclear factor of activated T-cells, (NFAT2)* услед пораста интрацелуларног Ca^{2+} , што доводи до *Bax* експресије а затим и апоптозе подоцита (74).

Мезангијалне промене

Промене у мезангијуму корелирају са задебљањем *GBM*. Долази до пролиферације мезангијалних ћелија и појачане синтезе екстрацелуларног мезангијалног матрикса, односно стварају се депозити компоненти екстрацелуларног матрикса укључујући колаген тип I, IV и V, ламинин и фибронектин. У каснијем току долази до генералног губитка мезангијалне целуларности уз стварање хомогених ацелуларних нодуса (*Kimmelstiel – Wilson*) који се примарно састоје од колагена тип IV. Мезангијална експанзија настаје као последица директног дејства хипергликемије и *AGEs* на мезангијалне ћелије, али и посредством повећане синтезе и експресије више фактора раста (47). Највише је испитана улога *TGF- β 1*. О механизмима којим *TGF- β 1* утиче на пролиферацију мезангијалних ћелија и експанзију екстрацелуларног матрикса делом је писано у претходном тексту а делом ће бити изнето у одељку „Нови биомаркери оштећења бубрега у склопу дијабетес мелитуса и дијабетесне нефропатије“ (61).

Поред *TGF- β 1* значајна улога приписује се тромбоцитном фактору раста бета *platelet-derived growth factor beta (PDGF- β)*. Појачана активност *PDGF- β* изазива појачану експресију гена за *TGF- β 1*(47,75).

Потврђено је да услови хипергликемије доводе до појачане синтезе класичног хормона раста - *growth hormone (GH)* у хипофизи, а он пак стимулише синтезу *IGF-1* у различитим ткивима. *GH* и *IGF-1* директно стимулишу појачану синтезу ламинина, фибронектина, протеогликана и колагена тип IV у мезангијалним ћелијама што резултује њиховом пролиферацијом и експанзијом екстрацелуларног матрикса. *GH* може независно од *IGF-1* имати улогу у патогенези гломерулосклерозе, код болесника са ДМ тип 1 његова

вредност у плазми је повишена док је вредност *IGF-1* у плазми снижена. Међутим доказано је да у условима хипергликемије локално у бубрегу имамо појачану експресију *IGF-1* независно од концентрације *GH* у плазми. *IGF-1* поред појачане синтезе ламинина, фибронектина, протеогликана и колагена тип IV у мезангијалним ћелијама код особа са ДМ изазива смањену активност матрикс металопротеиназе 2 - *matrix metalloproteinase-2* (*MMP2*) што доводи до смањене разградње и акумулације екстрацелуларног матрикса, слично дејство има и *TGF-β1* (47,60,63,76).

Интерлеукини *IL-1*, *IL -6*, *IL -18*, *ICAM-1* су такође одговорни за пролиферацију и повећану синтезу екстрацелуларног матрикса (66, 67).

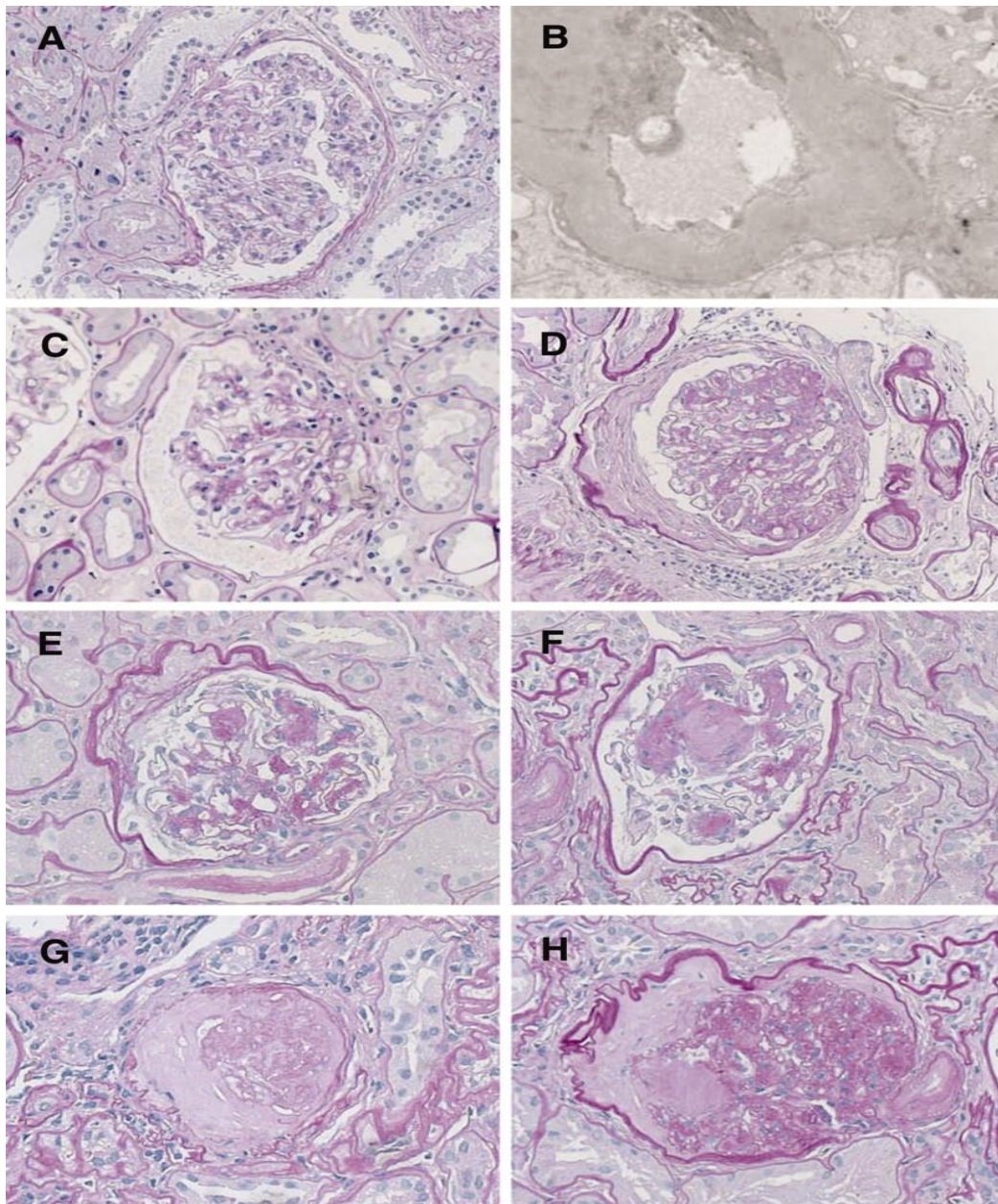
Tervaret и сарадници су предложили униформну класификацију морфолошких промена на нивоу бубрега, гломерула и мезангијума у ДН према којој разликујемо IV типа (78):

Тип I: Задебљање гломерулске базалне мембране – присутне су промене на *GBM* уз одсуство експанзије мезангијума, као и нодуларних промена у мезангијском матриксу (слика 4. *A* и *B*).

Тип II: Мезангијумска експанзија – дефинише се као повећање мезангијумског екстрацелуларног матрикса тако да ширина међупростора достиже два нуклеуса мезангијумских ћелија у бар два гломерула. Мезангијумска експанзија може бити блага (IIa) (слика 4. *C*) и тешка (IIb) (слика 4. *D*).

Тип III: Нодулска склероза (*Kimmelstiel-Wilson* nodusi – представљају фокалне, овалне или округле мезангијумске лезије састављене од ацелуларног хијалинизованог језгра које је окружено ретким полумесечастим мезангијским једрима. Довољно је да се на препарату види једна упечатљива *Kimmelstiel-Wilson* промена и ако не постоји више од 50% глобалне гломерулосклерозе промене се сврставају у Тип III (Слика 4. *E* и *F*).

Тип IV: Глобална (дифузна) дијабетесна гломерулосклероза – завршна фаза коју карактерише нагомилавање протеина екстрацелуларног матрикса у мезангијумском простору уз формирање бројних *Kimmelstiel-Wilson* промена (78). (Слика 4. *G* и *H*)



Слика 4. Морфолошке промене у гломерулу и мезангијуму у склопу дијабетесне нефропатије. Преузето од Fioretto P, Mauer SM, Bilous RW, Goetz FC, Sutherland DE, Steffes MW. Effects of pancreas transplantation on glomerular structure in insulin-dependent diabetic patients with their own kidneys. Lancet. 1993;342(8881):1193-6.

Тубулоинтерстицијске промене

У склопу ДН на нивоу тубулоинтерстицијума се јавља задебљање тубулоинтерстицијске базалне мембране, тубуларна атрофија, интерстицијска перитубуларна фиброза и атеросклероза. Најбитније промене за патогенезу ДН дешавају се на ниво проксималног тубула, где хипергликемија изазва оштећење епителних ћелија проксималног тубула и доводи до нагомилавања фибробласта у перитубулском ткиву (70). Оштећења су посредована: вазоактивним пептидима (ангиотензин II, ендотелин-1), AGEs, проинфламаторним цитокинима, факторима раста – *TGF-β1*, полиолским путем метаболизма глукозе, директним и индиректним ефектима протеинурије. Ослобођени

медијатори одговорни су за инфилтрацију интерстицијума моноцитима, макрофагима који покрећу додатне инфламаторне процесе. Преоптерећење епителних ћелија проксималног тубула са протеинима доводи до промене ћелијског фенотипа, активације проинфламаторног нуклеарног фактора $\kappa\beta$ који изазива секрецију низа цитокина и хемокина. Веома битан фактор који доприноси оштећењу тубулоинтерстицијума је и хипоксија која је изазвана прогресивном хијалинозом аферентних и еферентних артериола са последичним губитком перитубуларних капила (47,60,73).

На основу података из литературе закључено је да су промене на нивоу бубрега у случајевим потпуне контроле гликемије у дужем временском периоду реверзибилне. *Fioretto* и сар. су доказали да након трансплантације панкреаса код 13 болесника са ДМ тип 1 након 10 година долази до значајне редукције дебљине *GBM*. Услов за реверзибилност промена је вишегодишња нормогликемија, јер се сматра да ћелије бубрега развијају такозвану меморију за хипергликемијске услове, тако да је неопходно више година да се та меморија избрише. Наравно уколико је дошло до развоја значајних склеротичних промена реверзибилност више није могућа (79).

1.6.2.2.1.3. Дијагноза дијабетесне нефропатије

Пошто је ДН најчешћи узрок ТБИ неопходно је дијагнозу поставити у што ранијем стадијуму и што пре започети лечење. Још увек се као главни дијагностички критеријум користи албуминурија. Према препорукама *ADA* и америчке Националне фондације за болести бубрега (*National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative - NKF KDOQI*) за дијагнозу перзистентне микроалбуминурије неопходан је позитиван налаз у бар два од три узорка урина у размаку од 3-6 месеци (24,80). Албуминурија се може одређивати у спот узорку јутарњег урина када је најбоље израчунату албумин/креатинин однос (*UACR*). Нормалном албуминуријом се сматара *UACR* мањи од 30 *mg/g*, микроалбуминуријом вредност *UACR* измђу 30 и 300 *mg/g*, макроалбуминуријом вредност *UACR* већа од 300 *mg/g* (49). Осим из јутарњег урина албуминурија се може израчунати из узорка 24-часовног урина, где се вредност албуминурије до 150 *mg/24h* сматра нормоалбуминуријом, микроалбуминурија износи од 150-300 *mg/24h*, и макроалбуминурија преко 300 *mg/24h*. Осим анализе урина неопходно је одредити и ниво серумског креатинина у циљу израчунавања *GFR* (49,80,81).

Тако појава континуиране микроалбуминурије код оболелих од ДМ тип 1 представља маркер почетне ДН, и још увек је потенцијално реверзибилна. Дијагноза микроалбуминурије је важна не само због дефинисања ране фазе захваћености бубрега у

склопу ДМ већ представља и најјачи независни фактор кардиоваскуларног ризика код оболелих (82). Код ДМ тип 1 започети скрининг прегледе 5 година након постављања дијагнозе дијабетеса. Преваленца микроалбуминурије код оболелих од ДМ тип 1 варира од 7%-22%, и углавном је присутна код пацијената који имају лошу гликорегулацију (81,82,83).

Код оболелих од ДМ тип 2 већ у тренутку постављања дијагнозе 6,5% има присутну микроалбуминурију, а око 28% и придружену хипертензију и облитерантну ангиопатију (84). Микроалбуминурија код ДМ тип 2 није високо специфична за почетну ДН јер она може бити присутна заједно са инсулинском резистенцијом, гојазношћу и повишеним крвним притиском, али у сваком случају представља независни фактор ризика за кардиоваскуларни морбидитет и морталитет (46,82). Између 40% и 50% болесника са ДМ тип 2 и континуираном микроалбуминуријом умире од кардиоваскуларних догађаја што је око три пута већи проценат у ондосу на кардиоваскуларни морталитет дијабетичара са нормоалбуминуријом (46). Код оболелих од ДМ тип 2 са скрининг прегледима за ДН се почиње одмах по постављању дијагнозе (22,84).

Према препорукама *NKF KDOQI* и *ADA*, скрининг прегледи се обављају једном годишње уз обавезну проверу албуминурије и процену *GFR*. Ако се у спот узорку урина верификује микроалбуминурија, неопходно је израчунати секрецију албумина у урину током 24 часа (24,80).

Уколико се верификује макроалбуминурија код оболелих од ДМ тип 1 у раној фази болести, или је пак присутна брза прогресија албуминурије – протеинурије код оболелих од ДМ тип 2, неопходно је мислити и на друга обољења бубрега, превентивно примарне или секундарне гломерулонефритисе (22,85).

Код одређеног броја оболелих од ДМ верификовано је значајно снижење *GFR* али без присутне микроалбуминурије, овај тип дијабетесне болести се означава као „неалбуминурични“ фенотип. Он вероватно презентује другачији образац губитка бубрежне функције, а може се испољити и код тип 1 и тип 2 ДМ. Удруженост овог фенотипа показује слабу корелацију са ретинопатијом, степеном гликемијске контроле и хипертензијом, али показује линеарну корелацију са женским полом, непушењем цигарета и процентом кардиоваскуларних компликација (86). Те особе имају тенденцију ка краћој еволуцији ДМ (86,87). Према резултатима студије *DEMAND* међу популацијом болесника са ДМ тип 2 и клиренсом креатинина нижим од $60 \text{ ml/min/1,73m}^2$, око 40% пацијената је имало нормалну секрецију албумина, показано је да су те особе имале виши степен инсулинске резистенције, виши ниво серумских триглицерида и укупног и *LDL* холестерола, односно израженији метаболички синдром у односу на оне са очуваном *GFR* (87, 88). Све наведено

указује на могућу патофизиолошку повезаност тог фенотипа са макроангиопатијом а не микроангиопатијом (87, 88). *Krolewski* у свом раду износи теорију да неалбуминурични фенотипи дијабетесне болести бубрега настаје примарно на терену инфламације и тубулске лезије пре него у склопу гломерулопатије (87), док *Reutens* сматра да кључну улогу у неалбуминуричној дијабетесној болести бубрега имају понављане и нелечене епизоде акутног бубрежног оштећења (89).

1.6.2.2.1.4. Нови биомаркери оштећења бубрега у склопу дијабетес мелитуса и дијабетесне нефропатије

Пошто албуминурија као што смо претходно навели не мора увек да буде показатељ почетних промена у склопу ДН покушавају се идентификовати нови биомаркери бубрежног оштећења који би помогли у раном постављању дијагнозе, као и започињању лечења, што би имало за циљ успоравње прогресије ДН (90). Из досадашњих истраживања издвојило се неколико уринарних биомаркера. Биомаркери гломерулског оштећења: нефрин, *VEGF-A*, колаген тип IV, трансферин, подокаликсин, имуноглобулини, церулоплазмин, ламинин, фибронектин, гликозаминогликани. Од тубуларних биомаркера: липокалин са желатиназом неутрофила - *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)*, нефрин, *VEGF-A*, алфа 1-микроглобулин, молекул оштећења бубрега-1 - *kidney injury molecule-1 (KIM-1)*, *MCP-1*, *N-acetyl-β-D* глукозаминидаза, цистатин C, везујући протеин масних киселина јетре - *Liver-type fatty acid binding protein (L-FABP)*, и други (90). Подаци у литератури везани за наведене биомаркере још увек се односе на испитивања која су спроведена на мањем броју пацијената тако да је неопходно планирати студијска испитивања са укључењем већег броја пацијената.

На основу података из литературе ми смо се током нашег испитивања одлучили за праћење три следећа биомаркера код оболелих од ДМ тип 2: *TGF-β1* – као маркер реналне фиброзе, нефрин као маркер функције подоцита и *VEGF-A* као маркер функције подоцита и ендотелне дисфункције (61, 73). Нефрин и *VEGF-A* по неким ауторима се могу сматрати и маркерима оштећења проксималних тубула (73).

Трансформишући фактор раста β1

TGF-β1 је мултифункционални цитокин за који се сматра да игра једну од кључних улога у патофизиологији ДН (61,91). У условима хипергликемије имамо појачано стварање *TGF-β1* у готово свим ћелијама бубрега, његова експресија је појачана како у гломерулу тако и у тубулоинтерстицијуму (75). Доказана је појачана експресија *mRNA* за *TGF-β1* у

свим структурама бубрежног ткива (75,91,92). Код оболелих од ДМ, поред хипергликемије на појачану синтезу *TGF-β1* утичу: *AGEs*, оксидативни стрес, интрагломерулска хипертензија, активација *PKC*, де ново синтеза диацилглицерола и повишени нивои вазоактивних супстанци као што су ангиотензин II и ендотелин (91,92). *TGF-β1* стимулише синтезу екстрацелуларног матрикса и сматра се главним кривцем за развој реналне фиброзе у склопу ДН. Рецептори за *TGF-β1* могу се уочити на свим структурама гломерула (91,92). Као одговор на дејство *TGF-β1* мезангијумске и епителне ћелије појачавају синтезу протеогликана, фибронектина, колагена и ламинина. *TGF-β1* са друге стране инхибира синтезу колагеназа, а стимулише ткивну продукцију инхибитора маталопротеиназа смањујући тако активност матрикс маталопротеиназа које су иначе одговорне за разградњу екстрацелуларног матрикса. Матрикс маталопротеиназе садрже интерстицијску колагеназу, стромелизине и тип IV колагеназе, међу њима главна колагеназа коју продукују мезангијумске ћелије јесте *MMP-2*. У хуманом биоптичком материјалу бубрега код болесника са ДН показана је нисходна регулација гена за *MMP-2*. Такође је потврђено да су компоненте матрикса настале као продукти гликозилације резистентне на разградњу (61,91,92). У лабораторијским условима је потврђено да систем *TGF-β1* почиње са својом активношћу 48-72 часа после излагања условима хипергликемије. Након 6 дана наступа појачана синтеза фибронектина и колагена IV, док у року од 9 дана наступа хипертрофија гломерула (75,91). На анималним моделима (пацови са стрептозотозин изазваним ДМ) појачана синтеза протеина матрикса може се смањити применом анти- *TGF-β1-At*, док се гломерулска хипертрофија у потпуности превенира (91). Ангиотензин II директно стимулише реналну продукцију *TGF-β1* у мезангијуму и епителним тубуларним ћелијама, такође доводи до усходне регулације експресије рецептора за *TGF-β1*, повећава њихову продукцију и сензитивност мезангијумских ћелија на овај фактор раста (91).

Осим појачане синтезе екстрацелуларног матрикса и његове смањене разградње *TGF-β1* индукује трансформацију тубулских епителних ћелија у фибробласте, овај процес је одговоран за реналну фиброзу као резултат перзистентне инфламације (37,93). Сматра се да инхибиција *TGF-β1* на нивоу проксималног тубула више утиче на смањење албуминурије и реналне фиброзе, док инхибиција на нивоу гломерула више утиче са очуваће *GFR* (61,92).

Ефекти *TGF-β1* везани за инфламацију остварују се углавном преко *SMAD-ova*. *SMAD* су породица интрацелуларних протеина од којих су неки сигнални молекули а неки транскриптивни фактори који преносе екстрацелуларни сигнал након везивања *TGF-β1* за рецептор до једра а након тога коче или стимулишу експресију одређених гена (37, 93). Познате су три породице *SMAD-ova*: рецептор регулишући *SMAD-ovi - receptor-regulated SMADs* – (*R- SMADs*) где спадају *SMAD 1*, *SMAD 2*, *SMAD 3*, *SMAD 5* и *SMAD 8/9*, затим

заједнички-медијатор *SMAD-ovi - common SMADs (co- SMADs)* где спада само *SMAD 4* који је у интеракцији са *R- SMADs* и антагонистички или инхибиторни *SMAD-ovi* у које спадају *SMAD 6* и *SMAD 7*. Кључну улогу у проинфламаторном дејству *TGF-β1* изгледа има *SMAD 4*, док је *SMAD 7* одговоран за антиинфламаторно дејство. Доказано је да појачана разградња *SMAD 7* убрзава фиброзу посредовану са *TGF-β1* (93).

На основу података из литературе можемо закључити да се уринарни *TGF-β1* може сматрати биомаркером реналног оштећења у ДН, ниво *TGF-β1* по неким ауторима корелира са албуминуријом и падом *GFR* (61,94). *Min Joeng Kim* и сарадници (95), као и *Yanian Tian* и сарадници (96) су доказали да примена препарата витамина *D* може редуковати ниво *TGF-β1* у урину оболелих од ДМ тип 2 са последичним снижавањем албуминурије (95,96). *Zhang Z.* и сарадници су изнели да примена $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ доводи до нисходне регулације *TGF-β1* сигналног пута снижавајући експресију *SMAD 3* у бубрежном ткиву оболелих од ДМ (97). Предпоставља се да само инхибиција *TGF-β1* у урину, односно супресија на нивоу бубрега има значаја за успоравање прогресије ДН. Супресија *TGF-β1* на системском нивоу утиче на метаболизам воде и натријума доводећи до примарног хипералдостеронизма (92). Сматра се да би у циљу превенције и успоравања прогресије ДН у будућности требало испититати могућности локалне супресије *TGF-β1* (92).

Нефрин

Нефрин је структурни и сигнални протеин који припада породици имуноглобулина. Нефрин је један од структурних протеина који детерминишу структуру *SD* и одговоран је за њену селективну пропустљивост. Нефрин је одговоран за контролу цитоскелетне архитектуре, облик и вијабилност подоцита (73). За адекватну гломерулску функцију неопходан је одређени ниво експресије нефрина. Код пацијената са ДМ ниво експресије нефрина на нивоу бубрега је снижен (57,58). Мутације на нефринском гену *NPHS1* и редукција експресије *NPHS1* је одговорна за поремећај пропустљивости гломерулске мембране и појаву албуминурије (57). *Quack et al.* су спроведеним испитивањима дошли до закључка да је један од главних механизма у настанку протеинурије код дијабетичних пацова појачана ендоцитоза нефрина, која је посредована комплексом који се састоји од *PKC α*, протеина који је у интеракцији са *c* киназом-1 - *Protein interacting with C kinase 1 (PICK1)* и бета арестином 2. Хипергликемија повећава везивање бета-арестина и нефрина ин витро као и ин виво само уколико томе претходи активација нефрина *PKC α* фосфорилацијом (57). Наведена испитивања показују да је експресија *PKC α* контролисана нивоом глукозе у крви веома битна за одржавање функције *SD* (58).

Menne и колеге су доказали да је хипергликемијом изазвана смањена синтеза нефрина вероватно изазвана *PKC α* посредованом редукцијом транскриптивног фактора *Wilmsov tumor 1 (WT-1)* који се директно веже за промотор гена за нефрин (58,98).

Поред улоге структурног протеина нефрин има и улогу сигналног протеина који се налази на површини β ћелија панкреаса. Фосфорилација нефрина посредује у ослобађању инсулина из β ћелија панкреаса. *Uchida K.* и сарадници су на експерименталном нивоу доказали да дефосфорилација нефрина која се дешава у бубрегу у склопу ДМ игра значајну улогу у развоју албуминурије (99).

У склопу ДН експресија нефрина на ткиву бубрега је снижена због појачане ендцитозе нефрина, али је секресија нефрин у урину појачана и сматра се да корелира са протеинуријом. Нефрин се може сматрати биомаркером оштећења подоцита, али и маркером оштећења проксималног тубула (73).

Zhang и сарадници тврде да примена препарата витамина D код оболелих од ДМ и ДН појачава експресију нефрина у култури подоцита (97).

Васкуларни ендотелни фактор раста А

VEGF-A спада у групу про-агиогених гликопротеина, неопходан је за преживљавање, пролиферацију и диференцијацију ендотелних ћелија, подоцита и мезангијалних ћелија, а сматра се одговорним и за нормалну гломерулогенезу. На нивоу бубрега стварају га подоцити и епителне ћелије проксималног тубула (73). *VEGF-A* заједно са нефрином улази у састав *SD* и контролишу њену пермеабилност. У условима хроничне хипергликемије његова синтеза и ослобађање су појачани (69). Хистопатолошки налаз биопсије бубрега у раном стадијуму ДН, показује појачану експресију *mRNA VEGF-A* (101). Повећана синтеза *VEGF-A* снижава ниво експресије нефрина у бубрежном ткиву преко рецептора *VEGFR2*, кочећи фосфорилацију нефрина и поспешујући његову ендцитозу, што изазива поремећај пермеабилности *SD* и албуминурију (100). *VEGF-A* у условима хипергликемије стимулише активност *TGF- β 1* и доприноси мезангијалној пролиферацији, фибрози а касније и гломерулоскелрози. Такође *VEGF-A* снижава ниво азот монооксида уз последичну ендотелну дисфункцију. Високе концентрације *VEGF-A* одговорне су за патолошку ангиогенезу како у бубрегу тако и у другим ткивима (63,100).

Изоформа *PKC ϵ* која бива активирана од стране *AGEs* у условима хипергликемије доводи до појачане експресије на подоцитима *VEGF164* и *VEGF165* изоформи које код анималних модела доводе до структурних и функционалних реналних промена које се виде код ДН, укључујући протеинурију, гломерулску хипертрофију, задебљање гломерулске базалне мембране, пролиферацију мезангијума и губитак функције *SD* и стопаластих

продужетака (101). *Sun L.* са сарадницима је у мета анализи на 14000 испитаника уочио да *rs 2010963* и *rs 3025039* полиморфизми у оквиру гена за *VEGF* утичу на ризик за развоја ДН нарочито у азијатској популацији дијабетичара (102).

У периоду почетног и умереног оштећења бубрежног ткива ниво *VEGF-A* је повишен, међутим временом како оштећење подоцита и ћелија проксималног тубула напредује, како је фиброза све више изражен ниво *VEGF-A* се снижава јер су ћелије које га секретује дефинитивно оштећење. На основу спроведених истраживања претпоставља се да ће у будућности кључну улогу у успоравању прогресије ДН имати стабилизација функције подоцита и контрола дејства *VEGF-A* (63,100).

1.7. Лечење и превенција дијабетес мелитуса

Према Националном водичу добре клиничке праксе за дијагностиковање и лечење ДМ, терапија дијабетеса код сваког пацијента, обухвата 3 основна правца: 1. терапију поремећаја гликорегулације; 2. терапију поремећаја метаболизма липопротеина и 3. терапију повишеног артеријског притиска. У терапији сваког пацијента са дијабетесом неопходно је дефинисати индивидуалне циљне вредности гликемије и *HbA1c* у складу са следећим критеријумима (22).

1.7.1. Немедикаментна терапија

Терапија исхраном – подразумева придржавање дијететских мера, односно јасно одређеног укупног калоријског уноса уз правилан распоред оброка (22).

Терапија физичком активношћу у дијабетесу, подразумева првенствено сагледавање физичке спремности и навика пацијента, као и придружених болести, након чега се одређује програм физичких вежби (22).

Суштински ово указује на неопходност промене животног стила, што подразумева повећање физичке активности, измена лоших навика у исхрани, престанак пушења цигарета.

Препоруке су да се код жена које имају гестацијски дијабетес у личној анамнези, током целог живота сваке треће године спроводи тестирање на дијабетес или преддијабетес, такође током целог живота је неопходно придржавање хигијенскодијететског режима и промена стила живота. Уколико се женама са историјом гестацијског дијабетеса открије преддијабетес, саветује се промена животног стила, или увођење метформин као превенција дијабетеса (37).

1.7.2. Медикаментна терапија

Медикаментна терапија у типу 1 ДМ се састоји искључиво од терапије инсулином.

Трансплантација ендокриног панкреаса, као трансплантација целог или сегмента панкреаса или острваца ендокриног панкреаса се уводи под дефинисаним условима у клиничку праксу терапије типа 1 дијабетеса (22).

Медикаментна терапија у типу 2 ДМ не захтева стриктно примену инсулина. Који модалитет лечења ће бити укључен зависи од више фактора, а то су почетне вредности гликемије и *HbA1c*, животна доб болесника, као и придружене болести. Уколико вредности гликемије и *HbA1c* дозвољавају, лечење се започиње хигијенскодијететским мерама. Ако оне не дају задовољавајуће резултате креће се са медикаментном терапијом. (22).

Примена инсулинске терапије има посебно место у медикаментном лечењу типа 2 ДМ, због тога што врло ефикасно омогућава рано постизање и одржавање терапијских циљева. (22). Инсулин је код дијабетес мелитуса тип 2, као први терапијски избор, индикуван само код трудница и уколико је прва манифестација болести дијабетична кетоацидоза, или хиперосмоларно хипергликемично стање.

Кључни елементи терапије код свих болесника са дијабетес мелитусом су добра едукација, саветовање о дијети и редовној физичкој активности и праћење гликорегулације.(22)

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.

Детаљније ће бити описана терапија хроничних компликација.

1.7.3.1. Терапија и превенција хроничних компликација

Макроваскуларне компликације - строга контрола гликемије у значајној мери редукује развој макроваскуларних компликација, што је потврђено великом студијом *United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS)*, где је доказано да строжија гликорегулација смањује релативни ризик од развоја инфаркта миокарда (103). Слично доказује и студија *the Prospective Pioglitazone Clinical Trial in Macrovascular Events* где је доказано да употреба Пиоглитазоне у циљу гликорегулације у односу на плацебо групу снижава ризик од

кардиоваскуларног морталитета, нефаталног инфаркта миокарда и možданог удара (104). Осим строжије контроле гликорегулације препоручује се строга контрола крвног притиска уз употребу лекова из групе *ACEi* и блокатора *AT R*, контрола липидног статуса употребом хиполипемика, нарочито из групе статина, корекција недостатка витамина *D* (22,46). Размотрити примену аспирина (75–162 *mg*/дан) као примарну превенцију кардиоваскуларних болести у пацијената са ДМ тип 1 и тип 2 и повишеним кардиоваскуларним ризиком: мушкарци старији од 50 год и жене старије од 60 година који имају бар један фактор ризика (позитивна породична анамнеза за КВБ, хипертензија, пушење, дислипидемија, албуминурија) (22,46,82,104,105).

Микроваскуларне компликације:

Дијабетесна нефропатија – према препорукама националног водича добре клиничке праксе за дијагностиковање и лечење ДМ, терапија у фази инципијентне нефропатије, се своди на контролу артеријског притиска ($TA < 130/80 \text{ mmHg}$) и стриктне контроле гликорегулације (успостављање циљних вредности гликемије и *HbA1c* у задовољавајућем опсегу)(22,80). У табелама 4. и 5. су дати терапијски алгоритми за дијабетесну нефропатију.

Табела 4. Терапија инципијентне нефропатије

Терапија инципијентне нефропатије
Стриктна контрола артеријског притиска
$TA < 130/80 \text{ mmHg}$ (<i>ACEi</i> , <i>AT</i> блокатори, диуретици Хенлеове петље, антагонисти калцијумских канала, блокатори алфа адренергијских рецептора и др.
Стриктна контрола гликорегулације
- ДМ тип 1: интензивирана инсулинска терапија
- ДМ тип 2: интензивирана терапија: орални агенси, орални агенси + инсулин, монотерапија инсулином, интензивирана инсулинска терапија

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, редукацијом уноса протеина, као и ранијом применом терапије замене бубрега (22,80).

Табела 5. Терапија манифестне нефропатије

<i>Терапија манифестне нефропатије</i>
контрола артеријског притиска
контрола гликорегулације
отклањање поремећаја нивоа липопотеина
отклањање анемије
отклањање инфекције
редукција уноса протеина (< 0.8 g/kg ТТ)

Превенција дијабетесне нефропатије заснива се на редовним скрининг прегледима који подразумевају одређивање микроалбуминурије у спот узорку јутарњег урина или одређивањем албуминурије у узорку 24-часовног урина, уз одређивање серумског креатинина у циљу процене *GFR*. Код ДМ тип 1 као што смо раније навели започети скрининг прегледе 5 година након постављања дијагнозе дијабетеса, а код ДМ тип 2 одмах по постављању дијагнозе. Ако је *GFR* у референтним границама а микроалбуминурија није присутна скрининг прегледе обављати једном годишње, а ако је микроалбуминурија присутна започети лечење. Такође неопходна је стална едукација оболелих о утицају стила живота, физичке активности, начина исхране на гликорегулацију, ток ДМ и развој компликација (22,73,106).

У последње време на основу спроведених истраживања више аутора истиче значај примене витамина *D* код оболелих од ДМ. Спроведене су и многобројне студије, неке од њих потврђују позитиван ефекат примене витамина *D* док друге то нису доказале (107,108,109). Сматра се да витамина *D* захваљујући својим плејотропним ефектима као што су антиинфламаторно, антифибротичко, инхибиција *RAS-a*, може код оболелих од ДМ имати ренопротективну улогу (110). Аутори такође тврде да примена витамина *D* побољшава контролу гликорегулације чиме би се могао одложити развој ДН и евентуално успорити њена прогресија (110,111). У наредном поглављу ће детаљније бити описани ефекти витамина *D* који су од значаја за превенцију и лечење ДМ и ДН.

1.8. Витамин *D*

1.8.1. Историјат

Витамин *D* спада у групу липосолубилних витамина и већ дуже време се налази у жичи научних истраживања услед многобројних ефеката које остварује у људском организму (112).

Британски научник *Edward Mellanby* је 1919. изазвао рахитис код паса изостављајући млеко, маст, и хлеб у оброцима и не изалажући их сунчевој светлости. Даљим истраживањем *Mellanby* је утврдио да одређене дијететске мере као што су додавање путера или рибљег уља имају значаја у превенцији рахитиса. Амерички биохемичар *McCullum* је 1922. у својим експериментима на пацовима оболелим од рахитиса показао да рибље уље садржи одређени фактор који утиче на превенцију и лечење рахитиса и дао му назив витамин *D* (113).

Немачки физичар *Huldschinsky* је 1919. потврдио корисно дејство излагања деце оболеле од рахитиса ултравиолетним (УВ) зрацима. Професор биохемије *Steenbock*, је излагао УВ зрачењу и експерименталне животиње и њихову храну и дошао до закључка да у храни и кожи постоји одређена липидна фракција која под утицајем ултравиолетног зрачења прелази у супстанцу која остварује терапијски ефекат. Немачки физичар *Hesse*, са својим сарадницима 1925. поставља хипотезу да је супстанца која се активира под УВ зрацима можда холестерол. У сарадњи са *Windaus-ом*, и *Rosenheim-ом* током 1926. показали су да је испитивана супстанца хемијски сродна холестеролу, и означили су је прекурсором витамина *D*. Затим је дефинисана структура витамина *D2* а након четири године детерминисана је структуру 7- дехидрохолестерола (*7-Dehydrocholesterol - 7DHC*) а затим и структура витамина *D3* (113).

1.8.2. Хемијска структура витамина *D* и његова синтеза

Витамин *D* је секостеродни молекул. Под термином витамин *D* подразумева се више различитих форми једињења која су деривати холестерола а од којих најзначајнији физиолошки ефекат имају две форме: витамин *D2* тј. ергокалциферол и витамин *D3*, тј. холекалциферол (114). Ергокалцифеол потиче од биљака док холекалциферол настаје у људској и животињској кожи дејством УВБ зрачења на *7DHC*. Ове две форме разликују се међусобно и по хемијској структури, витамин *D2* има једну двоструку везу више између угљеникових *C* атома на позицији 22 и 23 и једну метил групу на позицији *C24*. Резултати спроведених студија су показали да холекалциферол има 3 до 4 пута потентнији ефекат у односу на ергокалциферол (115).

Особина витамина *D* да поред егзогених поседује и ендогени извор чини га јединственим у групи витамина. Квантитет витамина *D* може бити изражен тежинским јединицама или интернационалним јединицама (*IJ*), при чему 1 *IJ* витамина *D* одговара 0,025 μg (116).

Са хемијског аспекта након излагања *7DHC* УВБ зрачењу долази до кидања везе између угљеникових (*C*) атома на позицији 9 и 10 и последичног формирања двоструке везе на позицији *C10* и *C19* тј. формирања превитамина *D3* (117). Превитамин *D3*, се налази у свим слојевима коже при чему се око 2/3 налази у епидермису а остатак у дермису. Након синтезе превитамина *D3* изомеризацијом под утицајем телесне температуре настаје витамин *D3* који је за разлику од превитамина *D3* термостабилан. (117).

Након синтезе у кожи, витамин *D3* прелази у екстрацелуларни простор одакле бива процесом дифузије дистрибуиран у циркулацију, ту се везује за витамин *D* везујући протеин -*vitamin D binding protein (DBP)* уз помоћ ког бива транспортован у друге органе. Мишићно и масно ткиво у одређеној мери представљају депо за синтетисани витамин *D* (118).

Синтеза витамина *D2* се састоји из идентичних етапа као и синтеза витамина *D3*, при чему је полазна супстанца ергостерол који под утицајем УВБ зрачења подлеже фотолитичкој реакцији при којој се формира превитамин *D2* који је попут превитамина *D3* термо-нестабилан и чијом изомеризацијом настаје витамин *D2* (117).

Три основна извора витамина *D* јесу храна која садржи витамина *D* (путер, млеко, морска риба, рибље уље, печурке, жуманце, цигерица), излагање коже сунчевим зрацима и суплементи. Чак 80% серумске концентрације витамина *D* јесте ендогеног порекла (117).

1.8.3. Фармакокинетика витамина *D*

1.8.3.1. Апсорпција и дистрибуција витамина *D*

Процес апсорпције витамина *D*, било да је унет путем хране или синтетисан у кожи, се одвија већински у проксималном делу танког црева. Услед липофилне структуре витамина *D* неопходан фактор за апсорпцију јесте нормална жучна секреција тј. инкорпорирање неполарних молекула витамина *D* у мицеле жучних соли након чега се могу нормално апсорбовати у течној фази. Осим секреције жучних соли и мицеларног формирања апсорпција витамина *D* зависи и од желудачне и панкреасне секреције, процеса дифузије кроз водене слојеве и мембрану четкастог покрива интестиналних ћелија. (119). Код пацијената са одређеним интестиналним обољењима као што су билијарна опструкција, хронични панкреатитис, цистична фиброза, инсуфицијенција јетре, Кронова болест постоји смањење апсорпције витамина *D* (119).

Егзогени витамин *D* након апсорпције у танком цреву се преноси у лимфу, где је присутан у облику хиломикрона, веже се за *DBP* и даље преноси до јетре. Ендогени

витамин *D* се након синтезе у кожи преноси путем крви до јетре везан за *DBP* у великом проценту, и за албумине плазме у знатно мањем проценту. Негативан утицај на ниво *DBP* је доказан код обољења јетре, нефротског синдрома и малнутриције а позитиван утицај постоји током трудноће и естрогенске терапије (120,121).

1.8.3.2. Метаболизам витамина *D*

Метаболизам витамина *D* се врши у јетри и бубрезима. Метаболички пут обухвата две реакције хидроксилације које се одвијају у присуству ензима цитохрома *P450* који функционишу као оксидазе. Реакције хидроксилације су од суштинског значаја јер доводе до стварања биолошки активних облика витамина *D* из неактивних форми витамина *D2* и *D3* (110,121).

Метаболизам витамина *D* започиње у јетри хидроксилацијом у присуству митохондријалне 25α -хидроксилазе, изоформе *27A1* цитохрома *P450* (*CYP27A1*), на 25C атому калциферола чиме се формира 25 -хидрокси витамин *D* ($25(\text{OH})\text{D}$) тј. калцидиол или 25 -хидроксихолекалциферол, који је такође биолошки неактивна форма (110,121).

Иако је присуство 25α -хидроксилазе најинтензивније у јетри, доказано је њено постојање и у кожи, бубрезима и цревима. Од укупне количине синтетисаног и унетог витамина *D*, 75% се метаболише приликом првог проласка кроз јетру. Након формирања $25(\text{OH})\text{D}$ везан за *DBP* се транспортује у бубреге где се најпре филтрира а потом реапсорбује у проксималним бубрежним тубулима. Доказано је присуство површинског ћелијског рецептора на четкастом покрову епителних ћелија проксималног тубула, мегалин-кубулина који олакшава процес ендоцитозе $25(\text{OH})\text{D}$ везаног за *DBP*. Процес ендоцитозе врше како бубрежне ћелије тако и друге ћелије организма. У бубрезима се хидроксилацијом $25(\text{OH})\text{D}$ у присуству 1α -хидроксилазе (*CYP27B1*) формира поларније једињење $1,25$ -дихидрокси витамин *D* ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$) тј. калцитиол који представља физиолошки активан облик витамина *D* и на основу чијих физиолошких ефеката се витамин *D* класификује као витамин и као хормон (110,121).

Реакције хидроксилације које се одвијају у јетри и бубрезима се осим по врсти ензима неопходних за њихову реализацију разликују и по условљености ендокриним механизмима. Формирање $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ у бубрезима се налази у негативној повратној спреси са паратиroidним жлездама тј. индуковано је паратиroidним хормоном (*PTH*), хипокалцемијом и хипофосфатемијом, док инхибиторни ефекат на синтезу показује хиперфосфатемија, фактор раста фибробласта 23 - *Fibroblast growth factor 23* (*FGF23*) и сам $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Индуктивни и инхибиторни ефекат наведени фактори остварују мењањем

интензитета активности ензима 1- α хидроксилазе. Реакција формирања про-хормона, 25(OH)D, није ендокрино регулисана и зависи искључиво од присутне концентрације витамина D унетог путем хране или синтетисаног у кожи (110,117,121). Поред бубрега присуство ензима 1 α -хидроксилазе се може детектовати и у остеобластима, плаценти, простати, кератиноцитима, макрофагима, Т-лимфоцитима, канцерогеним ћелијама, хипоталамусу, церебелуму и субстанцији нигри, паратиroidној жлезди (121).

Осим поменутих 25 α и 1 α -хидроксилазе, у метаболизму витамина D учествује и 24-хидроксилаза (CYP24A1) која је задужена за катаболизам оба метаболита витамина D. Други ензим који врши катаболичке реакције у јетри и танком цреву је CYP3A4 (110,122).

Биолошки активан метаболит, 1,25(OH)2D, може да оствари свој ефекат тек након везивања за витамин D рецептор (VDR), након везивања за VDR, комплекс витамина D/ VDR у ћелијском једру се веже за нуклеарни кофактор ретиноид X рецептор - *retinoid X receptor* – (RXR), који даље активира промотр гена VDRE и започиње процес транскрипције гена. (110,121).

Витамин D и његови метаболити излучује се већинским делом путем жучи и фецеса, док се један мањи део излучује путем урина (110,117).

Серумска концентрација 25(OH)D је најпоузданији маркер статуса витамина D у организму, и она одражава збир ендогено синтетисаног и егзогеног витамина D. Синтеза калцидиола није ендокрино регулисана за разлику од синтезе калцитриола и калцидиол се карактерише знатно дужим временом полуелиминације које просечно износи око 2 недеље (у опсегу од 10 дана до 3 недеље) док је код калцитриола време полуелиминације свега од 4 до 6 сати (123). Јединична вредност 25(OH)D се може изразити као ng/ml или nmol/L при чему 1 ng/ml еквивалент 2,5 nmol/L (123).

1.8.4. Дистрибуција витамина D у односу на пол, старосну доб и географско подручје

Дефицијенција и инсуфицијенција витамина D попримају пандемијске размере широм света и могу се срести у различитим старосним популацијама. Пандемијска појава дефицијенције витамина D у многим крајевима није препозната и није адекватно третирана. Алармирајући податак је да тренутно у свету код 1 билиона људи постоји дефицијенција или инсуфицијенција витамина D (124).

Два основна узрочника настанка дефицијенције јесу недовољна изложеност сунчевим зрацима или неадекватан нутритивни унос витамина D. Осим ова два узрока доказан је

значај и других фактора попут старости, типа коже, индекса телесне масе, географског подручја становања, употребе крема за сунчање са заштитним фактором и други (124).

Дефицијенција у дечијем периоду је повезана са појавом рахитиса док је у периоду одраслих и старијих везана за појаву остеомаластије, остеопорозе и последично настанка фрактура. Сматра се да особе женског пола чешће имају недостатак витамина *D*, што се донекле објашњава већим садржајем масти код жена са последичним стварањем депоа витамина *D* у организму (124). Постојање дефицијенције витамина *D* се повезује са повећањем морбидитета за кардиоваскуларна, канцерогена, метаболичка (дијабетес мелитус), имунолошка, психолошка и друга хронична обољења (124).

Преваленца дефицијенције витамина *D* је висока у земљама широм света, у Италији преваленца у општој популацији износи 17%, у Шпанији 33.9%, Немачкој 50% док је у Великој Британији 87,1% (124).

Поремећен метаболизам глукозе односно ДМ је фактор ризика за развој дефицијенције витамина *D*. Код оболелих од ДМ који су мршави ризик за дефицијенцију витамина *D* је за 25% већи него у општој популацији, док је код гојазних пацијената са ДМ ризик за 35% већи (124).

1.8.5. Физиолошки ефекти витамина *D*

Физиолошки ефекти витамина *D* се могу поделити у две велике групе а то су скелетни и ван скелетни ефекти.

Скелетни ефекти витамина *D* огледају се у одржавању хомеостазе калцијума и фосфора, односно у одржавању минералне хомеостазе. Дефицијенција витамина *D* код деце у периоду раста и развоја доводи до појаве рахитиса док код одраслих изазива секундарни хиперпаратиреозидизам, остеомаластију и остеопорозу (121,125).

Нескелетни ефекти витамина *D* су вишеструки и објашњавају се присуством *VDR* у већини ткива и органа у организму (111). У нескелетне ефекте витамина *D* спадају: улога у превенцији карцинома, превенцији кардиоваскуларних обољења, превенцији и лечењу дијабетес мелитуса, улога у превенцији настанка и модификовања тока аутоимуних болести, улога у психичким обољењима (125,126,127,128).

С обзиром да се у нашем раду бавимо дијабетес мелитусом и његовом реперкусијом на бубрег, детаљније ће бити описана улога витамина *D* у превенцији и лечењу ДМ и компликација у склопу њега.

1.8.5.1. Улога витамина *D* у превенцији и лечењу дијабетес мелитуса

Како ДМ тип 2 представља један од водећих здравствених проблема у свету подаци о позитивном ефекту корекције недостатака витамина *D* код ових пацијената навела је научнике на велики број истраживања. Ефекат витамина *D* у превенцији дијабетес мелитуса заснован је на експресији *VDR-a* на бета ћелијама панкреаса и стимулативном утицају калцитриола на секрецију инсулина, затим на редуцију инсулинске резистенције у мишићима, као и на пораст нивоа остеокалцина синтетисаног у остеобластима који повећава синтезу инсулина у панкреасу и редукује инфламацију која је присутна у инсулинској резистенцији (97,107). Сматра се да би витамин *D* могао да оствари свој ефекат у смислу снижавања инсулинске резистенције, потребан је његов оптимални ниво у крви између 80 и 119 $nmol/L$ (124). Спроведена истраживања су показала да примена витамина *D* може у одређеној мери да редукује ризик од настанка дијабетеса (109,111,129). Тако је опсервациона студија у Данској „*Copenhagen City Heart Study*“, спроведена на 9841 испитанику без ДМ, пратила пацијенте током 29 година, и показала да испитаници који су имали просечну вредност $25(OH)D < 12.5 nmol/L$ имали 22% већи ризик од настанка ДМ тип 2 у односу на испитанике где је серумска концентрација $25(OH)D \geq 50 nmol/L$, испитаници код којих је $25(OH)D \geq 75 nmol/L$ су имали 8% мањи ризик обољевања у односу на испитанике код којих је ниво $25(OH)D$ био између $50 nmol/L - 75 nmol/L$ (108).

Дупло слепа, рандомизована, плацебо контролисана студија спроведена на 118 пацијената са дијабетес мелитусом тип 2 и витамин *D* инсуфицијенцијом показала је да је осмонедељна комбинована примена витамина *D* у дози 50000 *IJ*/недељно и 1,000 *mg*/дневно калцијума знатно ефикаснија у смањењу нивоа јутарње гликемије и *HbA1c* у односу на ефекат примене појединачних компоненти или плацеба (130).

Поред побољшања гликоругалиције истиче се да корекција недостатака витамина *D* има значајан антиинфламаторни ефекат код оболелих од ДМ тип 2, што би могло бити од великог значаја имајући у виду да се инфламацији приписује скоро централна улога у патофизиолошком механизму настанка ДМ тип 2. Доказано је да примена витамина *D* снижава ниво проинфламаторних интерлеукина, смањује макрофагну инфилтрацију, лимфоцитну пролиферацију, инхибира *Th1* лимфоците а активира *Th2*, блокира дендритичку диференцијацију ћелија и поспешује секрецију антиинфламаторног *IL-10* (36,131,132). Такође витамин *D* индукује $CD4+$ и $CD25+$ регулаторне лимфоците који делују инхибиторно на инфламаторне процесе, а инхибира дејство *TNF α* , *ICAM*, *VCAM-1*. Сви претходно наведени механизми утичу на спорији развој атеросклеротских промена и нижу инциденцу нежељених кардиоваскуларних догађаја (36,128).

Такође од стране више аутора потврђен је антипротеинурички ефекат корекције недостатка витамина *D* код оболелих од ДМ тип 2 (128,133,134,135). Пошто се протеинурија истиче као главна циљна мета на коју треба деловати у смислу успоравања прогресије ДМ тип 2, овај ефекат треба посебно истакнути (128). Антипротеинурички ефекат витамин *D* остварује инхибицијом *RAS-a* у јукстагломеруларном апарату бубрега и то нисходном регулацијом транскрипције гена, услед везивања за транскрипциони фактор циклични аденозин монофосфат (сАМФ)-CRE-везујући протеин - *Cyclic AMP-Response Element (CRE) -binding protein* и онемогућавајући реналну транскрипцију. Поред утицаја на ренин, хипотензиван ефекат настаје и услед директног ефекта на васкуларне ћелије и метаболизам калцијума. Наведеним механизмима витамин *D* доводи до боље контроле крвног притиска и интрагломерулског притиска (127,128). Према подацима из литературе утврђена је негативна корелација између серумске концентрације витамина *D* и висине крвног притиска (136). Антипротеинурички ефекат остварује се још побољшањем гликорегулације, антифибротичким дејством – снижавањем активности *TGF-β1* у урину, повећањем експресије нефрина на нивоу бубрега, редукацијом нивоа и других фактора раста који ремете функцију *SD* и подоцита, као што је *VEGF-A*, *MCP-1* (128,133,134,135,137).

Корекција недостатака витамина *D* код пацијената са ДМ тип 2, према искуствима неких аутора поправља липидни статус те на тај начин може превенирати кардиоваскуларне компликације (135,138). *Xiao Fei Qin* са сарадницима је доказао да примена витамина *D* код пацијената са сниженим нивоом витамина *D*, хиперлипидемијом и терапијом статинима, након заједничке употребе статина и витамина *D* (2000 IU/дневно) током шест месеци, доводи до значајног снижења нивоа и триглицерида и холестерола у односу на пацијенте које су уз статине користили плацебо (139). *Paloma Muñoz-Aguirre* је такође након примене витамина *D* у дози од 4000 IU/дневно код постменопаузалних жена са ДМ тип 2 постигао значајно снижење нивоа триглицерида (140). Неки аутори нису потврдили позитиван ефекат витамина *D* на липидни статус (141).

На основу претходно изнетих података закључујемо да корекција недостатка витамина *D* код оболелих од ДМ тип 2 има значајан ренопротективни ефекат који се огледа у побољшању гликорегулације, снижавању протеинурије, побољшању липидног статуса, антиинфламаторном ефекту, антифибротичком ефекту, инхибицији *RAS*.

Ренопротективни ефекат огледа се и у антифибротичком дејству витамина *D*, јер је доказано да код оболелих од ДМ примена витамина *D* доводи до снижавања нивоа *TGF-β1* у урину, а *TGF-β1* се сматра главним кривцем за развој реналне фиброзе (92,95,96). Такође према искуству аутора корекција недостатака витамина *D* код оболелих од ДМ тип 2 повећава експресију нефрина на нивоу бубрега а редукује неке друге факторе раста као што

је *VEGF-A*, *MCP-1*, (58,102). У циљу добијања егзактнијих података о дејству витамина *D* на нивоу бубрега потребно је још додатних испитивања, ако је могуће на већем броју пацијената и у дужем временском периоду.

Наравно да неки аутори нису потврдили позитиван утицај витамина *D* у склопу ДМ (141,142). Мета анализа која је обухватала 35 студија није показала позитиван ефекат примене витамина *D* на глукозну хомеостазу и превенцију дијабетеса (143). Претпоставља се да су за различите резултате о ефекту витамина *D* код оболелих од ДМ тип 2 одговорни некохерентни подаци, мали број испитаника и кратак период праћења болесника.

Знајући да једна трећина оболелих од ДМ развија ДН и да је ДН водећи узрок терминалне бубрежне слабости, ренорпоективно дејство витамина *D* треба што детаљније испитати. Управо због претходно изнетих искустава других аутора одлучили смо да код наших пацијената са ДМ тип 2 и недостатком витамина *D* испитамо ефекат надокнаде витамина *D* како на класичне факторе који утичу на прогресију болести као што су протеинурија, гликорегулација, липидни статус, инфламација тако и на главног узрочника фиброзе *TGF-β1*, маркере функције подоцита и проксималног тубула нефрин и *VEGF-A* који је још одговоран и за функцију ендотела.

1.8.6. Препоруке за превенцију и лечење недостатака витамина *D*

Након вишегодишњих научних дебата о адекватном нивоу *25(OH)D*, већина научних удружења (American Academy of Developmental Medicine and Dentistry; European Menopause Andropause Society; European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis; European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition; European Vitamin D Association; Brazilian Society of Endocrinology and Metabology) је прихватила следећу класификацију статуса витамина *D*: дефицијенција представља ниво *25(OH)D* <50 *nmol/l* (20 *ng/ml*), инсуфицијенција је у опсегу вредности од 50 *nmol/l* до 75 *nmol/l* (од 21 до 29 *ng/ml*), док суфицијенција представља опсег од 75 *nmol/l* до 250 *nmol/l* (од 30 до 100 *ng/ml*). Дати су и предлози минималних нивоа *25(OH)D* у крви који су неопходни за позитиван утицај витамина *D* у одређеним болестима. Тако је за позитиван утицај витамина *D* у мускулоскелтним болестима пожељан минимални ниво *25(OH)D* у крви од 50 *nmol/L* -80 *nmol/L*, код кардиоваскуларних обољења 75 *nmol/L* – 100 *nmol/L*, код малигних обољења 100 *nmol/L*, код респираторних болести 75 *nmol/L* – 100 *nmol/L*, код дијабетес мелитуса 100 *nmol/L*, код аутоимуних болести и инфекције 100 *nmol/L*, код неуролошких поремећаја 75 *nmol/L* – 100 *nmol/L*, у трудноћи 75 *nmol/L* (112).

На основу резултата бројних испитивања и студија усаглашени су ставови више научних удружења као што су *European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO)*, *European Menopause and Andropause Society (EMAS)*], *Kidney Disease: Improving Global Outcomes Clinical Practice (KDIGO)*, *American Geriatrics Society*, *American Academy of Developmental Medicine and Dentistry (AADMD)* и састављене су препоруке за употребу витамина *D*. Пре свега препоручује се да минимални ниво *25(OH)D* у крви износи 75 nmol/L , али да ипак треба преферирати нешто виши ниво од $100\text{--}150 \text{ nmol/L}$ (112).

У циљу превенције дефицијенције витамина *D* код здраве популације се препоручује употреба следећих доза витамина *D*: код беба до 1 године старости препоручује се употреба $400\text{--}1000 \text{ IU/дневно}$ ($10\text{--}25 \mu\text{g}$ /дневно) витамина *D*, код деце старије од 1 годину $600\text{--}1000 \text{ IU/дневно}$ ($15\text{--}25 \mu\text{g}$ /дневно), код одраслих $1500\text{--}2000 \text{ IU/дневно}$ ($37,5\text{--}50 \mu\text{g}$ /дневно), код гојазних особа са $\text{BMI} > 30 \text{ kg/m}^2$, могу се употребљавати и до три пута веће дозе од препоручених за особе за нормалном телесном тежином (112).

Када се витамин *D* употребљава у циљу корекције дефицијенције препоруке за употреби су следеће: витамин *D* се код беба млађих од 1 месеца примењује у дози од 1000 IU/дневно ($25 \mu\text{g}$ /дневно), код беба и деце узраста од 1 месеца до 10 година у дози од 2000 IU/дневно ($50 \mu\text{g}$ /дневно), код деце и адолесцената од 11-18 година у дози од 4000 IU/дневно ($100 \mu\text{g}$ /дневно), код одраслих и старијих особа у дози од $4000\text{--}10000 \text{ IU/дневно}$ ($100\text{--}250 \mu\text{g}$ /дневно). Ако су присутна обољења гастроинтестиналног тракта која отежавају цревну апсорпцију витамина *D* дозе могу бити и значајно више (112).

Интоксикација витамином *D* дешава се при нивоу $25(\text{OH})\text{D} > 375 \text{ nmol/l}$ (150 ng/ml) и сматра се веома ретком компликацијом (112). Прва манифестација интоксикације витамином *D* је појачана екскреција калцијума путем урина, смањивањем реапсорпције калцијума у проксималним тубулима (110). Када компензаторни механизми више не могу да повећавају излучивање калцијума урином, његова концентрација у крви расте. Хиперкалцемија снижава ниво *PTH*, што последично смањује излучивања фосфора путем бубрега. Високе концентрације $25(\text{OH})\text{D}$ директно преко *VDR* у цреву додатно повећава интестиналну апсорпцију калцијум и фосфора, што додатно повећава њихов ниво у крви, а услед тога расте калцијум/фосфор производ растворљивости што условљава појаву калцификација у меким ткивима, ткиву бубрега (нефрокалциноза), али и зидовима крвних судова (110,144). Хиперкалцемија такође изазива опстипацију, вазоконстрикцију са последичном артеријском хипертензијом, срчане аритмије, депресију, конфузију, полиурију, полидипсију (110,144).

У циљу корекције недостатка витамина *D* и превенције његовог недостатка саветује се и престанак пушења цигарета (112). *Brot* и сарадници као и други аутори, тврде да пушење цигарета негативно утиче на ниво витамина *D* у крви (145,146). С обзиром да се пушење наводи као потенцијални фактор ризика за убрзавање развоја васкуларних компликација код ДМ у нашем раду биће испитан утицај пушачког статуса пацијената са ДМ тип 2 на азотне материје, параметре гликорегулације, инфламације, липидни статус, протеинурију, ниво витамина *D* у крви. Такође провериће се утицај пушачког статуса на биомаркере нефрин, *TGF-β₁* и *VEGF-A* у крви и урину. Према доступним подацима из литературе корекција недостатка витамина *D* има јачи супресорски ефекат на ниво *TGF-β₁* у урину само код непушача (95).

2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ

2.1. Хипотезе студије:

1. Концентрација албумина у урину, код пацијената са ДМ тип 2 и недостатком витамина *D*, значајно је нижа након надокнаде витамина *D*.
2. Концентрација нефрина и *VEGF-A* у урину и крви, код пацијената са ДМ тип 2 и недостатком витамина *D*, значајно је нижа након надокнаде витамина *D*.
3. Концентрација *TGF-β₁* у урину је код пацијената са ДМ тип 2 и недостатком витамина *D*, значајно нижа након надокнаде витамина *D*.
4. Ниво *HbA_{1c}*, *CRP*-а, укупног холестерола и триглицерида у крви, код пацијената са ДМ тип 2 и недостатком витамина *D*, значајно је нижи након надокнаде витамина *D*.
5. Ниво *HbA_{1c}*, *CRP*-а, укупног холестерола и триглицерида у крви, као и концентрација албумина, нефрина, *TGF-β₁* и *VEGF-A* у урину и нефрина и *VEGF-A* у крви, код пацијената са ДМ тип 2 и недостатком витамина *D*, након надокнаде витамина *D* значајно се снижава само код непушача.

2.2. Циљеви студије:

1. Анализирати социо-демографске карактеристике (пол, старост, индекс телесне масе и пушачки статус), албуминурију, ниво витамина *D* у крви, *HbA_{1c}*, јутарњу гликемију, албумине, серумско гвожђе, *CRP*, укупни холестерол, триглицериде и клиренс креатинина код пацијента са дијабетес мелитусом тип 2 и недостатком витамина *D*.
2. Испитати утицај надокнаде витамина *D* на концентрацију албумина, нефрина, *TGF-β₁* и *VEGF-A* у урину и нефрина, *TGF-β₁* и *VEGF-A* у крви.
3. Испитати утицај надокнаде витамина *D* на ниво *HbA_{1c}*, *CRP*-а, укупног холестерола и триглицерида у крви.
4. Испитати утицај нивоа витамина *D* у крви на почетку испитивања на ефекте надокнаде витамина *D*.
5. Испитати утицај нивоа витамина *D* на крају испитивања на ефекте надокнаде витамина *D*.
6. Испитати утицај статуса пушења цигарета на ефекат надокнаде витамина *D* код болесника са дијабетес мелитусом тип 2 и недостатком витамина *D*.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

За спровођење истраживања добијена је сагласност од Етичког одбора Војномедицинске академије у Београду, као и Начелника организацијских јединица у којима је истраживање било спроведено.

3.1. Врста студије

У циљу истраживања спроведена је проспективна, кохортна студија, на укупно 90 пацијената.

3.2. Популација која је анализирана

Комплетно испитивање је спроведено у Клиници за нефрологију, Клиници за ендокринологију, Институту за медицинску биохемију и Институту за медицинска истраживања Војномедицинске академије.

Испитивање је вршено на пацијентима који се амбулантно и хоспитално лече у Клиници за нефрологију и Клиници за ендокринологију Војномедицинске академије, због дијагностикованог ДМ тип 2, са или без ДН. Код свих пацијената је потврђен недостатак (инсуфицијенција/дефицијенција) витамина *D*.

3.3. Узорковање

Укључени су пацијенти са ДМ тип 2 и недостатком (инсуфицијенција/ дефицијенција) витамина *D*. Дефицијенција подразумева ниво витамина $D < 50 \text{ nmol/L}$, а инсуфицијенција ниво од 50 до 75 nmol/L . Укупно је укључено 90 пацијената, оба пола, старости од 18 – 75 година.

Критеријуми за укључивање су били:

1. клиренс креатинина $\geq 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$,
2. стабилна терапија ДМ (орални хипогликемици или инсулинска терапија) током три месеца пре започињања студије, и током студије
3. стабилне дозе *ACEi* или *ARBs* током три месеца пре започињања студије и током студије
4. вредност албуминурије се може кретати од нормоалбуминурије, преко микроалбуминурије до макроалбуминурије.

Критеријум за искључивање:

1. гломерулонефритис
2. системска болест везивног ткива
3. серумски калцијум (коригован према албуминима у серуму) $> 2.45 \text{ mmol/L}$,
4. серумски фосфор $> 1.65 \text{ mmol/L}$,
5. конгестивна срчана слабост
6. преболели инфаркт миокарда
7. лоше регулисана артеријска хипертензија
8. малигна болест
9. цироза јетре,
10. хепатитис Б или Ц
11. жене током трудноће или дојења
12. употреба препарата витамина D током шест месеци пре укључења у студију
13. укљученост у другу студију

Пацијенти су затим подељени у три једнаке групе од по 30 пацијената на основу вредности албуминурије на почетку студије:

1. Група - пацијенти са нормоалбуминуријом: $UACR < 30 \text{ mg/g}$,
2. Група - пацијенти са микроалбуминуријом: вредност $UACR$ измђу 30 и 300 mg/g ,
3. Група - пацијенти са макроалбуминуријом, вредност $UACR > 300 \text{ mg/g}$.

3.4. Варијабле које су мерене у студији

Свим пацијентима је пре укључења у студију узета анамнеза, урађен физички преглед. Праћене су следеће варијабле: пол, старост, пушачки статус, телесна маса, телесна висина, индекс телесне масе - *Body mass index (BMI)*.

Праћени су следећи хематолошки и биохемијски параметри:

1. Основни хематолошки и биохемијски профил: хемоглобин, уреа, креатинин, јутарња гликемија, албумини, калцијум, фосфор, укупни холестерол, триглицериди, као и *CRP*, *HbA1c* и *iPTH*; сви параметри су одређени на почетку студије и након шестомесечне надокнаде витамина D. Једино је вредност калцијума, фосфора и витамина D проверена и два месеца након започињања надокнаде због евентуалне корекције дозе препарата витамина D.

2. Албуминурија је одређена односом албумин/креатинин (*UACR*) у јутарњем узорку урина, на почетку студије и након шестомесечне надокнаде витамина *D*, 24-часовна протеинурија је одређена из узорка 24-часовног урина, на почетку студије и након шестомесечне надокнаде витамина *D*
3. Клиренс креатинина је израчунат применом *CKD-EPI* формуле на почетку студије и након шестомесечне надокнаде витамина *D* (147).
4. Концентрација нефрина је одређена у узорку венске крви, и у јутарњем узорку урина, у јутарњем узорку урина је поред апсолутне концентрације одређена и коригована концентрација нефрина (нефрин/креатинин однос), на почетку студије и након шестомесечне надокнаде витамина *D*.
5. Концентрација *TGF-β₁* је одређена у узорку венске крви, и у јутарњем узорку урина, у јутарњем узорку урина је поред апсолутне концентрације одређена и коригована концентрација *TGF-β₁* (*TGF-β₁*/креатинин однос), на почетку студије и након шестомесечне примене витамина *D*.
6. Концентрација *VEGF-A* је одређена у узорку венске крви, и у јутарњем узорку урина, у јутарњем узорку урина је поред апсолутне концентрације одређена и коригована концентрација *VEGF-A* (*VEGF-A* /креатинин однос), на почетку студије и након шестомесечне примене витамина *D*.

3.4.1. Хематолошке и биохемијске анализе

Хематолошке и биохемијске анализе крви, хемоглобин, албумин, серумско гвожђе, јутарња гликемија, калцијум, фосфор, *CRP*, *HbA1c*, *iPTH*, витамин *D* су одређени у Институту за биохемију Војномедицинске академије, а *VEGF-A*, нефрин и *TGF-β₁* у крви и урину одређени су у Институту за медицинска истраживања Војномедицинске академије.

Крвна слика

Параметри крвне слике су анализирани из вакутајнера са љубичастом бојом чепа (пуна крв), који као антикоагуланс садрже *K2EDTA* (1,8 *mg K2EDTA* по *ml* крви). Крвна слика је одређена методом проточне цитометрије (*Flow cytometry*), за ћелијске елементе, на апарату: *Advia 120*, произвођача, *Siemens*, а **хемоглобин** је одређен фотометријски. Хемоглобин (*Hgb*) - референтна вредност за жене је износила: 115-165 *g/L* и за мушкарце: 130-180 *g/L*,

Уреа: Одређена је квантитативно, спектрофотометријском УВ методом са уреазом и глутамат-дехидрогеназом, на апарату *ADVIA 1800, Dimension RxL Max* произвођача *Siemens*. Референтна вредност: 2,5-7,5 *mmol/L*.

Креатинин: Вредности креатинина у серуму пацијената су одређене модификованом Jaffe, спектрофотометријском методом, на апарату ADVIA 1800, *Dimension RxL Max*, произвођача *Siemens*. Референтне вредности су различите у зависности од пола и износе за мушкарце: 62-115 $\mu\text{mol/l}$, а за жене: 44-88 $\mu\text{mol/l}$.

Албумин: Анализа албумина у серуму је извођена спектрофотометријском методом са *bromcresol green-BCG*, на апарату ADVIA 1800, *Dimension RxL Max*, произвођача *Siemens*. Референтне вредности су 32-50 g/l.

Серумско гвожђе Fe: је одређено на апарату ADVIA 1800, *Dimension RxL Max*, произвођача *Siemens*. Принцип: спектрофотометрија (*Endpoint, ferozin*). Референтна вредност Fe: мушкарци: 11-31 $\mu\text{mol/l}$. Жене: 9-31 $\mu\text{mol/l}$.

Глукоза: вредности глукозе су одређене методом спектрофотометрије (*Endpoint, heksokinaza*), коришћењем апарта ADVIA 1800, *Dimension RxL Max*, произвођача *Siemens*. Референтне вредности су од 4,1 до 5,9 mmol/L.

HbA1c: Вредности гликозилираног хемоглобина (*HbA1c*) су одређене методом спектрофотометрије, на апарату ADVIA 1800, *Dimension RxL Max*, произвођача *Siemens*. Референтне вредности су изражене у % (4,5-6,20%), или mmol/mmol (24-43 mmol/mmol).

Ц-реактивни протеин (CRP): Концентрацију *CRP-a* смо одређивали методом: *particle enhanceo turbidimetric imunoassay (PETIA)*, на апарату *Dimension RxL Max*, произвођача *Siemens*. Референтне вредности су: 0-4 mg/l.

Холестерол: Вредности холестерола су одређене спектрофотометријском методом (*Endpoint*), на апарату ADVIA 1800, *Dimension RxL Max*, произвођача *Siemens*. Референтне вредности су подељене на: пожељно < 5,2 mmol/l, гранично ризично 5,2-6,2 mmol/l, ризично $\geq 6,2$ mmol/l.

Триглицериди: Вредности триглицерида су одређене спектрофотометријском методом (*Endpoint*), на апарату ADVIA 1800, *Dimension RxL Max*, произвођача *Siemens*. Референтне вредности су подељене на: пожељно < 1.7 mmol/l, гранично ризично 1,7-2,29 mmol/l, ризично $\geq 2,3$ mmol/l.

Витамин D: Вредности витамина D су одређене по принципу: *Chemiluminiscent microarticle imunoassay-CMIA*, на апарату *Architect i2000 SR(ABBOTT)*. Циљне вредности су 75-138 nmol/l, од 50-75 nmol/l – инсуфицијенција, од 23.73-49,9 блага дефицијенција, испод 23.37 nmol/l тешка дефицијенција.

Калцијум: Одређивање концентрације калцијума је рађено спектрофотометријском методом (*Endpoint*), на апарату ADVIA 1800, *Dimension RxL Max*, произвођача *Siemens*. Референтне вредности серумског калцијума су 2,15-2,60 mmol/l.

Фосфор: Одређивање концентрације фосфора је рађено спектрофотометријском методом (*Endpoint, milibdat*), на апарату *ADVIA 1800, Dimension RxL Max*, произвођача *Siemens*. Референтне вредности су од 0,78-1,65 *mmol/l*.

Интактни паратхормон (*iPTH*): Концентрација интактног паратхормона- *iPTH* је одређена методом: *Direct chemoluminometric immunoassay-OCLIA*, на апарату *Advia centaur XP* произвођача *Siemens*. Референтне вредности су 1,48-7,63 *pmol/l*.

Клиренс креатинина: је одређен 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 m2* (147).

Албумин/креатинин однос (*UACR*): је одређиван из јутарњег узорка урина, из ког се користећи имунонефелометријску методу израчунава концентрација албумина у урину. Референтне вредности су од 0,00 до 30,00 *mg/L*. Из истог узорка урина се одређује концентрација креатинина. Концентрација креатинина у урину је одређена модификованом *Jaffe* методом (*Cockcroft DW*) и изражава се у $\mu\text{mol/L}$. Затим након конверзије јединица дели се концентрација албумина са концентрацијом креатинина, добијени количник се изражава у *mg/g*. Микроалбуминурија је рађена на апарату *BN II Nephelometer* произвођача *Siemens*. Нормоалбуминуријом сматра се вредност *UACR* мања од 30 *mg/g*, микроалбуминуријом вредност *UACR* између 30 и 300 *mg/g*, макроалбуминуријом вредност *UACR* већа од 300 *mg/g*.

24-часовна протеинурија (протеинурија по – *Biuretu*): 24-часовна протеинурија је одређивана из узорка 24-часовног урина, који је скупљан претходног дана, по методи *спектрофотометрија (pyrogallol red*, на апарату *Advia 1800*, произвођача *Siemens* и апарату *Dimension RxLmax*, произвођача *Siemens*). Референтна вредност: 0-150 *mg/l*, а укупна 24-часовна протеинурија се израчунава према дневној диурези.

Одређивање нефрина у урину и крви: анализе су урађене из предходно узетих узорка јутарњег урина и венске крви. Да би се одстранио талог, узорци су центрифугирани на 1000g у трајању од 15 минута. Течни део је одливен у епендорфе запремине 1,5 *ml* и до момента анализе замрзнути на -80°C. Концентрација нефрина у крви и урину одређена је применом *ELISA* комерцијалног имуноензимског теста, коришћен је *Human NPHN (Nephrin) ELISA Kit, Catalog No : E-EL-H1901, Elabscience Biotechnology Co.Ltd, Wuhan, Hubei Province*. Тест за одређивање нефрина се заснива на квантитативној сендвич ензим имуноесеј техници. У тесту су коришћене полистиренске плоче са 96 бунарчића. У сваки бунарчић микроплоче обложен биотин-коњугованим поликлонским антителима специфичним за нефрин и Авидином који је коњугован са пероксидазом рена (*Avidin-HRP*), додат је узорак урина или крви. Слободне компоненте су испране. Присуство нефрина у

узорку урина или крви изазвало је промену боје, тј. јавља се плава боја која је након додавања сумпорне киселине, као раствора за заустављање процеса прешла у жуту боју. Интензитет боје је био пропорционалан количини везаног нефрина, а одређен је спектрофотометријски на таласној дужини од $450\text{ nm}\pm 2\text{nm}$. Минимална концентрација нефрина у урину и крви (*Human NPHN*) која се може измерити овим тестом (сензитивност теста) је $0,1\text{ ng/ml}$. Детекциони ранг износи: $0.16\text{-}10\text{ ng/mL}$. Концентрација нефрина у сваком узорку урина исказана је у апсолутној концентрацији, у pg/ml и коригованој концентрацији према вредности креатинина у датом узорку урина, у ng/gU_{Cr} , концентрација креатинина у урину је одређена модификованом *Jaffe* методом (Cockcroft DW). Док су концентрације у крви изражене у апсолутним концентрацијама у pg/ml .

Одређивање *TGF-β1* у крви и урину: анализе су урађене из предходно узетих узорака јутарњег урина и крви. Да би се одстранио талог, узорци су центрифугирани на 1000 g у трајању од 15 минута. Течни део је одливен у епендорфе запремине $1,5\text{ ml}$ и до момента анализе замрзнути на -80°C . Концентрација *TGF-β1* у крви и урину одређена је применом *ELISA* комерцијалног имуноензимског теста, коришћен је *Human TGF-β1 (Transforming Growth Factor Beta 1) ELISA Kit, Catalog No: E-EL-H0110, Elabscience Biotechnology Co.Ltd, Wuhan, Hubei Province*. 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 *TGF-β1*. У сваки бунарчић микроплоче обложен биотин-коњугованим поликлонским антителима специфичним за *TGF-β1* и Авидином који је коњугован са пероксидазом рена (*Avidin-HRP*), додат је узорак урина или крви. Слободне компоненте су испране. Присуство *TGF-β1* у узорку урина или крви изазвало је промену боје, тј. јавља се плава боја која је након додавања сумпорне киселине, као раствора за заустављање процеса прешла у жуту боју. Интензитет жуте боје, измерен спектрофотометријски на таласној дужини од $450\text{ nm}\pm 2\text{nm}$, је директно пропорционалан количини везаног *TGF-β1*. Минимална концентрација *TGF-β1* у урину која се може измерити овим тестом (сензитивност теста) је 18.75 pg/mL . Детекциони ранг износи: $31.25\text{-}2000\text{ pg/mL}$, коефицијент варијације је $< 10\%$. Концентрација *TGF-β1* у сваком узорку урина исказана је у апсолутној концентрацији, у pg/ml и коригованој концентрацији према вредности креатинина у датом узорку урина, у ng/gU_{Cr} , док су концентрације у крви изражене у апсолутним концентрацијама у pg/ml .

Одређивање *VEGF-A* у крви и урину: анализе су као и код претходна два биомаркеу урађене из предходно узетих узорака јутарњег урина и крви, који су до момента анализе замрзнути на -80°C . Концентрација *VEGF-A* у крви и урину одређена је применом *ELISA* комерцијалног имуноензимског теста, коришћен је *Human VEGF-A (Vascular Endothelial*

Cell Growth Factor A) ELISA Kit Catalog No : E-EL-H0111, *Elabscience Biotechnology Co.Ltd, Wuhan, Hubei Province*. 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 *VEGF-A*. У сваки бунарчић микроплоче обложен биотин-коњугованим поликлонским антителима специфичним за *VEGF-A* и Авидином који је коњугован са пероксидазом рена, додат је узорак урина или крви. Слободне компоненте су испране. Присуство *VEGF-A* у узорку урина или крви изазвало је промену боје, тј. јавља се плава боја 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 *VEGF-A*. Минимална концентрација *VEGF-A* у урину која се може измерити овим тестом (сензитивност теста) је 18.75 pg/mL . Детекциони ранг износи: $31.25\text{--}2000\text{ pg/mL}$. Концентрација *VEGF-A* у сваком узорку урина исказана је у апсолутној концентрацији, у pg/mL и коригованој концентрацији према вредности креатинина у датом узорку урина, у ng/gU_{Cr} , док су концентрације у крви изражене у апсолутним концентрацијама у pg/mL .

3.5. Терапијски протокол

Код свих пацијената на почетку студије започета је надокнада витамина *D* холекалциферол капим $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}$ (*Vigantol*[®] 20000 IJ/mL оралне капи, раствор - *Cholecalciferol*; Merck KgaA, Germany), у дози од 20 000 IJ два пута недељно. Препоручено је да пацијент дневну дозу накапа у кашику са водом или супом и попије уз ручак.

Након два месеца од започињања студије, свим пацијентима је проверен ниво витамина *D*, калијума и фосфора у серуму. У случају нивоа калијума у серуму (кориговано према нивоу албумина у серуму) преко $2,45\text{ mmol/L}$, обуставила би се даља надокнада. Такође у случају хиперфосфатемије, односно нивоа серумског фосфора преко $1,6\text{ mmol/L}$, надокнада би се обуставила.

На основу нивоа витамина *D* у крви, након двомесечне надокнаде, одређена је доза витамина *D* коју је пацијент користио наредна четири месеца. Код пацијената који су нормализовали ниво витамина *D* у крви супституција је наредна четири месеца настављена са холекалциферол капима у дози од 5000 IJ два пута недељно. Код пацијената код којих је ниво витамина *D* остао снижен, наредна четири месеца супституција је настављена са холекалциферол капима у дози од 20 000 IJ два пута недељно.

Пацијенти нису пријавили неки од могућих акутних нежељених догађаја, као што су срчане аритмије, мучнина, повраћање, психички симптоми, поремећај свести, реакције преосетљивости уз свраб, осип или копривњачу. Такође није било ни хроничних тегоба: повећан нагон за мокрењем, повећана жеђ, губитак апетита, губитак тежине, затвор, надутост, мучнина, абдоминални бол или дијареја, поремећаји на нивоу коже и поткожног ткива.

3.6. Статистичка обрада података

Комплетна статистичка анализа података је урађена у статистичком компјутерском програму, *PASW Statistics*, верзија 18. Све атрибутивне варијабле представљене су у облику фреквенци појединих категорија, а статистичка значајност између појединих категорија је тестирана Хи-квадрат тестом, код таблица контингенције 2x2 коришћена је Јетсова корекција континуитета. Све континуалне варијабле су представљене у облику медијане и интерквartilног распона (*IQR*)- 25-75 перцентил (подаци нису испуњавали услове за нормалну расподелу), док је за поређења група код континуалних варијабли коришћен Ман-Витнијев или Крускал-Волисов тест за независне узорке или Вилкоксон тест за зависне узорке који нису показивали нормалну расподелу која је проверена на основу Колмогоров-Смирновљевог теста. Корелација између варијабли је испитана уз помоћ Спирманове корелације ранга, а јачина корелације је процењивана на основу Кохенових критеријума: $r > 0,5$ веома јака корелација; $r 0,3-0,49$ средње јака корелација; $r < 0,29$ слаба корелација. Све анализе су процењене на нивоу статистичке значајности од $p < 0,05$. Након статистичке обраде података резултати су представљени табеларно и графички.

4. РЕЗУЛТАТИ

У студији је укупно праћено 90 пацијената са ДМ тип 2 и недостатком (инсуфицијенција/дефицијенција) витамина *D*. Пацијенти су подељени у три једнаке групе на основу вредности албуминурије, односно односа албумина и креатинина у јутарњем урину (*UACR*), на почетку испитивања: 30 пацијената је имало нормалну албуминурију, 30 пацијената је било са микроалбуминуријом, док је 30 имало макроалбуминурију. Код свих пацијента је спроведена шестомесечна терапија холекалциферол капима.

4.1. Социодемографске и антропометријске карактеристике пацијената

Укупно је у студију укључено 48 мушкараца (53.33%) и 42 жене (46.67%). У групи са нормоалбуминуријом било је 16 мушкараца (53.33%) и 14 жена (46.67%), у групи са микроалбуминуријом било је 17 мушкараца (56.67%) и 13 жена (43.33%), док је у групи са макроалбуминуријом било 15 мушкараца (50.00%) и 15 жена (50.00%). Табела 6.

Просечна старост пацијената у групи са нормоалбуминуријом износила је 62.00 године (58,00-69,00), у групи са микроалбуминуријом 62.00 године (52.50-69.00), а у групи са макроалбуминуријом 66.00 година (62.25-69.50). Табела 6.

Табела 6. Социодемографске карактеристике пацијената

<i>UACR</i> :	Пол: Мушкарци/Жене	Старост; године
	Број (%)	Медијана (IQR)
Нормоалбуминурија	16 (53.33) / 14 (46.7)	62.00 (58.00-69.00)
Микроалбуминурија	17 (56.66) /13 (43.3)	62.00 (52.50-69.00)
Макроалбуминурија	15 (50.00) /15 (50.0)	66.00 (62.25-69.50)
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.875*	<i>p</i> = 0.281**

*- *Chi-square test*; **- *Kruskal Wallis test*; *UACR*- албумин/креатинин однос; *IQR*- интерквartilни опсег: 25-75 перцентил

Највиши *BMI* имали су пацијенти у групи са макроалбуминуријом 28.40 kg/m^2 , најнижи у групи са микроалбуминуријом 27.45 kg/m^2 , док је групи са нормоалбуминријом износио 27.50 kg/m^2 . Није било статистички значајне разлике у вредности *BMI* између група. Табела 7. Само 9 пацијената (10%) је имало *BMI* испод 25, од тога 5 (11.11%) мушакраца и 4 (9.52%) жена.

Табела 7. Антропометријске карактеристике пацијената

<i>UACR</i> :	Телесна висина; <i>m</i>	Телесна маса; <i>kg</i>	<i>BMI</i> ; <i>kg/m²</i>
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Нормоалбуминурија	1.70 (1.65-1.77)	80.00 (74.25-85.00)	27.50 (25.62-28.70)
Микроалбуминурија	1.73 (1.70-1.83)	89.00 (79.88-91.25)	27.45 (26.52-30.12)
Макроалбуминурија	1.71 (1.68-1.80)	87.50 (79.00-91.00)	28.40 (26.31-31.62)
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.035 *	<i>p</i> = 0.010 *	<i>p</i> = 0.120*

*- *Kruskal Wallis test*; *BMI* - Индекс телесне масе; *UACR*- албумин/креатинин однос у урину; *IQR*- интерквартилни опсег: 25-75 перцентил

Просечна еволуција ДМ тип 2 тј. укупно трајање болести од постављања дијагнозе у групи са нормоалбуминуријом је износило 10.00 година (5.75-14.25), у другој групи такође 10.00 година (5.75-15.25), а у трећој 15.00 година (10.00-20.00). Табела 8.

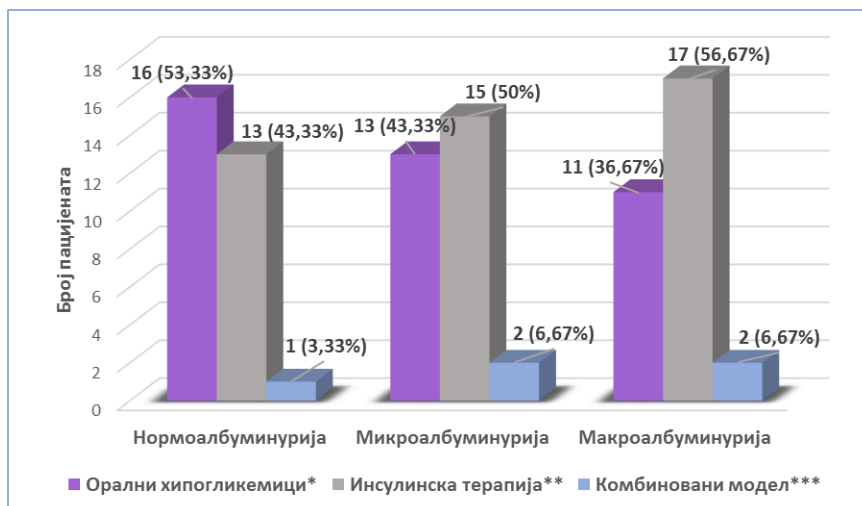
Табела 8. Укупно трајање болести

<i>UACR</i> :	Еволуција дијабетес мелитуса; године
	Медијана (<i>IQR</i>)
Нормоалбуминурија	10.00 (5.75-14.25)
Микроалбуминурија	10.00 (5.75-15.25)
Макроалбуминурија	15.00 (10.00-20.00)
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.001 *

*- *Kruskal Wallis test*; *UACR*- албумин/креатинин однос у урину; *IQR*- интерквартилни опсег: 25-75 перцентил

У групи пацијената са нормоалбуминуријом 16 пацијената (53.33%) за гликорегулацију користи оралне хипогликемике, 13 пацијената (43.33%) у групи са микроалбуминуријом и 11 пацијената (36.67%) у групи са макроалбуминуријом такође (*Chi square test*; *p*=0.425). Инсулинску терапију је користило 13 пацијената (43.33%) у групи са нормоалбуминуријом, 15 пацијената (50.00%) у групи са микроалбуминуријом, и 17 пацијената (56.66%) у групи са макроалбуминуријом (*Chi square test*; *p*=0.587), док је комбиновани модел лечења примењиван код једног пацијента (3.33%) у групи са нормоалбуминуријом, код 2 пацијента (6.66%) у групи са микроалбуминуријом и такође код два пацијента (6.66%) у групи са макроалбуминуријом (*Chi square test*; *p*=0.809). Графикон 1.

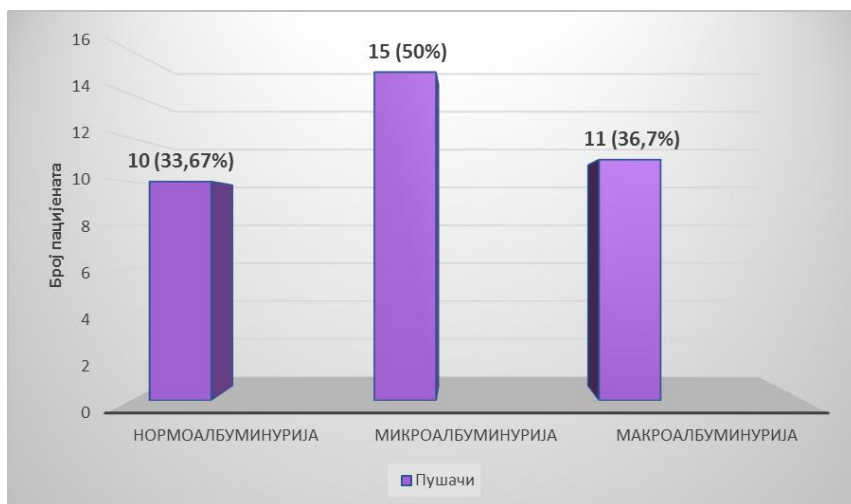
Графикон 1. Дистрибуција пацијената у односу на врсту терапије за дијабетес мелитус



Chi-square test; *- $p = 0.425$; ** - $p = 0.587$; *** - $p = 0.809$

Када је пушачки статус у питању у групи пацијената са нормоалбуминуријом 10 пацијената (33.33%) пуши цигарете, у групи са микроалбуминуријом 15 пацијената (50.00%), и у групи са макроалбуминуријом 11 пацијената (36.7%). Графикон 2.

Графикон 2. Дистрибуција пацијената који пуше цигарете у односу на *UACR*



Chi-square test; *- $p = 0.378$

4.2. Анализа резултатат пре употребе витамина *D* и након шестомесечне примене витамина *D*

Инсуфицијенцију витамина *D* имало је 22 пацијента (24.44%), док је дефицијенцију имало 68 пацијената (75.55%). Најнижи ниво витамина *D* на почетку испитивања имали су пацијенти у групи са макроалбуминуријом, просечно 28,49 *nmol/L* (22,40-47,67). Након шестомесечне примене витамина *D*, статистички значајан пораст вредности витамина *D*

имамо код пацијената у све три групе. У групи пацијената са нормоалбуминуријом ниво витамина *D* након шестомесечне супституције се повисио са 42.53 *nmol/L* (30.40-46.25) на 79.65 *nmol/L* (69.09-92.12) ($p < 0.001$), у групи са микроалбуминуријом ниво витамина *D* се повисио са 47.03 *nmol/L* (33.18-53.88) на 86.65 *nmol/L* (70.50-92.85) ($p < 0.001$) док је у групи са макроалбуминуријом пораст са 28.49 *nmol/L* (22.40-47.67) на 69.22 (54.74-78.04) ($p < 0.001$). Табела 9.

Табела 9. Ниво витамина *D* у крви пре и након шестомесечне примене витамина *D*

<i>UACR</i> :	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	<i>p</i> вредност
	Витамин <i>D</i> (<i>nmol/L</i>)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Нормоалбуминурија	42.53 (30.40-46.25)	79.65 (69.09-92.12)	$p < 0.001^{**}$
Микроалбуминурија	47.03 (33.18-53.88)	86.65 (70.50-92.85)	$p < 0.001^{**}$
Макроалбуминурија	28.49 (22.40-47.67)	69.22 (54.74-78.04)	$p < 0.001^{**}$
<i>p</i> вредност	$p = 0.006^*$	$p = 0.009^*$	

*- *Kruskal Wallis test*; **- *Wilcoxon Signed Ranks test*; *UACR*- албумин/креатинин однос у урину; *IQR*-интерквартилни опсег: 25-75 перцентил

Процентуално највећи пораст забележен је у групи пацијената са нормоалбуминуријом 118.21 % (57.13-165.99). Табела 10. Код свих пацијената забележен је скок нивоа витамина *D* у крви, осим код једног пацијента из групе са макроалбуминуријом.

Табела 10. Процентуално повећање нивоа витамина *D* у крви након шестомесечне терапије

<i>UACR</i> :	Повећање нивоа витамина <i>D</i> у крви (%)
	Медијана (<i>IQR</i>)
Нормоалбуминурија	118.21 (57.13-165.99)
Микроалбуминурија	95.16 (52.18-152.23)
Макроалбуминурија	109.19 (54.45-167.75)
<i>p</i> вредност	$p = 0.673^*$

*- *Kruskal Wallis test*; *UACR*- албумин/креатинин однос у урину; *IQR*- интерквартилни опсег: 25-75 перцентил

4.3. Основни биохемијски параметри

Анализирали смо основне биохемијске параметре на почетку студије и након шестомесечне примене витамина *D*.

На почетку студије најниже нивое хемоглобина и серумског гвожђа имамо у групи пацијената са макроалбуминуријом, али је разлика без статистичке значајности, такође

након завршене терапије ниво хемоглобина и серумског гвожђа је најнижи у истој групи али је опет разлика без статистичке значајности. Табела 11.

Када је у питању вредност уреје у крви, на почетку студије најниже вредности су имали пацијенти у групи са нормоалбуминуријом 5.95 mmol/L (5.10-7.13), затим пацијенти у групи са микроалбуминуријом 6.90 mmol/L (5.47-8.20), док су највише вредности имали пацијенти са макроалбуминуријом 8.40 mmol/L (5.37-9.72), разлика између група је статистички значајна ($p = 0.004$). Након завршене терапије снижење нивоа уреје имамо у свим групама, али је само у групи пацијената са нормоалбуминуријом разлика статистички значајна (на почетку студије 5.95 mmol/L (5.10-7.13) након терапије 5.85 mmol/L (5.15-6.57) ($p = 0.032$)). Табела 11.

Серумски креатинин је на почетку студије најнижи био у групи пацијената са нормоалбуминуријом $76.50 \text{ }\mu\text{mol/L}$ (66.75-90.25), затим у групи са микроалбуминуријом $82.00 \text{ }\mu\text{mol/L}$ (71.00-96.75), и највиши у групи са макроалбуминуријом $86.00 \text{ }\mu\text{mol/L}$ (74.75-106.00) разлика између група нема статистичку значајност. Након завршене надокнаде статистички значајан пад имамо само у групи пацијената са макроалбуминуријом, где је серумски креатинин са $86.00 \text{ }\mu\text{mol/L}$ (74.75-106.00) се снизио на $82.00 \text{ }\mu\text{mol/L}$ (71.50-104.75) ($p = 0.022$). Табела 11.

Клиренс креатинина је на почетку испитивања највиши у групи пацијената са нормоалбуминуријом 84.30 mL/min (64.05-91.55), затим у групи са микроалбуминуријом 68.60 mL/min (61.00-94.25), док су најниже вредности имали пацијенти у групи са макроалбуминуријом 63.20 mL/min (60.57-89.97), разлика између група није статистички значајна. Након шестомесечне надокнаде имамо пораст клиренса креатинина у све три групе, али је статистичка значајност присутна у групи пацијената са микроалбуминуријом и макроалбуминуријом. У групи пацијената са микроалбуминуријом клиренс креатинина са почетних 68.60 mL/min (61.00-94.25), након супституције је износио 74.15 mL/min (63.82-90.70) ($p = 0.049$). У групи пацијената са макроалбуминуријом клиренс креатинина на почетку студије је износио 63.20 mL/min (60.57-89.97) а након супституције 68.80 mL/min (62.00-90.07) ($p = 0.040$). Табела 11.

Ниво албумина у крви на почетку испитивања је био највиши у групи пацијената са микроалбуминуријом 43.00 g/L (40.75-44.00), затим у групи са нормоалбуминуријом 42.50 g/L (41.00-44.25), док су најниже вредности имали пацијенти са макроалбуминуријом 41.00 g/L (36.75-42.00), разлика између група је статистички значајна ($p = 0.001$). Пораст нивоа албумина има статистичку значајност само у групи пацијената са нормоалбуминуријом где имамо пораст са $42,50 \text{ g/L}$ (41,00-44,25) на $44,00 \text{ g/L}$ (42,00-46,00) - $p = 0,001$. Табела 11.

Табела 11. Вредности биохемијских параметара пре и након шестомесечне примене витамина D

<i>UACR</i> :	Пре терапије		<i>p</i> вредност
	Након 6-месечне терапије		
	Хемоглобин (g/L)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Нормоалбуминурија	136.50 (120.75-143.25)	133.00 (119.75-145.00)	<i>p</i> = 0.097**
Микроалбуминурија	140.50 (128.75-144.25)	137.50 (128.75-145.00)	<i>p</i> = 0.710**
Макроалбуминурија	126.50 (122.25-132.75)	128.00 (122.75-142.00)	<i>p</i> = 0.141**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.092*	<i>p</i> = 0.197*	
	Уреа (mmol/L)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Нормоалбуминурија	5.95 (5.10-7.13)	5.85 (5.15-6.57)	<i>p</i> = 0.032**
Микроалбуминурија	6.90 (5.47-8.20)	6.20 (5.20-7.95)	<i>p</i> = 0.147**
Макроалбуминурија	8.40 (5.37-9.72)	8.15 (5.47-9.22)	<i>p</i> = 0.484**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.004*	<i>p</i> = 0.003*	
	Креатинин (μmol/L)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Нормоалбуминурија	76.50 (66.75-90.25)	73.00 (64.00-82.50)	<i>p</i> = 0.273**
Микроалбуминурија	82.00 (71.00-96.75)	83.50 (70.50-94.25)	<i>p</i> = 0.090**
Макроалбуминурија	86.00 (74.75-106.00)	82.00 (71.50-104.75)	<i>p</i> = 0.022**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.149*	<i>p</i> = 0.136*	
	Клиренс креатинина (mL/min)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Нормоалбуминурија	84.30 (64.05-91.55)	86.30 (71.15-95.45)	<i>p</i> = 0.286**
Микроалбуминурија	68.60 (61.00-94.25)	74.15 (63.82-90.70)	<i>p</i> = 0.049**
Макроалбуминурија	63.20 (60.57-89.97)	68.80 (62.00-90.07)	<i>p</i> = 0.040**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.101*	<i>p</i> = 0.143*	
	Албумин (g/L)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Нормоалбуминурија	42.50 (41.00-44.25)	44.00 (42.00-46.00)	<i>p</i> = 0.001**
Микроалбуминурија	43.00 (40.75-44.00)	42.00 (40.00-45.00)	<i>p</i> = 0.586**
Макроалбуминурија	41.00 (36.75-42.00)	41.50 (35.00-43.00)	<i>p</i> = 0.104**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.001*	<i>p</i> = 0.001*	
	Гвожђе (μmol/L)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Нормоалбуминурија	15.50 (12.00-17.77)	15.00 (12.75-17.25)	<i>p</i> = 0.260**
Микроалбуминурија	15.00 (12.00-17.00)	13.50 (11.75-21.50)	<i>p</i> = 0.609**
Макроалбуминурија	14.10 (12.75-17.25)	13.50 (11.00-16.00)	<i>p</i> = 0.162**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.998*	<i>p</i> = 0.430*	

*- *Kruskal Wallis test*; **- *Wilcoxon Signed Ranks test*; *UACR*- албумин/креатинин однос у урину; *IQR*- интерквartilни опсег: 25-75 перцентил

4.4. Параметри инфламације и гликорегулације

Као параметар инфламације анализирали смо ниво *CRP-a*. На почетку студије најнижи ниво *CRP-a* имали су пацијенти у групи са нормоалбуминуријом али разлика у нивоу између група није била статистички значајна. Након завршене надокнаде статистички значајно снижење нивоа *CRP-a* је забележено у групи пацијената са нормоалбуминуријом где је вредност са 1,48 mg/L (0,99-3,08) снижена на 1,42 mg/L (0,87-2,96) ($p < 0.001$) и у групи са микроалбуминуријом где имао пад са 1,60 mg/L (0,95-2,22) на 1,16 mg/L (0,80-2,15) ($p = 0.001$). Табела 12.

Као параметре гликорегулације анализирали смо ниво јутарње гликемије и *HbA1c*. На почетку испитивања разлика у нивоу јутарње гликемије није била статистички значајна између група, а најнижи ниво имали су пацијенти у групи са микроалбуминуријом. Након завршене надокнаде статистички значајно снижење нивоа гликемије имамо у групи пацијената са нормоалбуминуријом и макроалбуминуријом: у групи са нормоалбуминуријом имамо пад са 8,60 mmol/L (6,85-10,02) на 7,90 mmol/L (6,68-8,93) - $p = 0.001$, а у групи са макроалбуминуријом са 9,40 mmol/L (7,90-10,60) на 8,05 mmol/L (7,13-8,95) - $p = 0,001$. Табела 12.

На почетку испитивања најнижи ниво *HbA1c* имали су пацијенти из групе са нормоалбуминуријом али није било статистички значајне разлике у вредностима између група. Након завршене надокнаде постигнуто је статистички значајно снижење *HbA1c* у све три групе: у групи са нормоалбуминуријом *HbA1c* снижен је са 6,97% (6,60-7,80) на 6,80% (6,20-7,70) ($p = 0.001$), у групи са микроалбуминуријом имамо пад са 7,15 % (6,57-8,42) на 6,95 % (6,40-7,60) ($p < 0.001$), и у групи са макроалбуминуријом пад са 7,80 % (6,72-8,70) на 7,10 % (6,80-8,62) ($p = 0.016$). Табела 12.

Табела 12. Нивои *CRP-a*, јутарње гликемије и *HbA1c* пре и после шестомесечне надокнаде витамином *D*

<i>UACR</i> :	Пре терапије	Након 6- месечне терапије	р вредност
	<i>CRP (mg/L)</i>		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Нормоалбуминурија	1,48 (0,99-3,08)	1,42 (0,87-2,96)	<i>p</i> < 0,001**
Микроалбуминурија	1,60 (0,95-2,22)	1,16 (0,80-2,15)	<i>p</i> = 0,001**
Макроалбуминурија	1,52 (1,01-2,25)	1,22 (0,95-2,16)	<i>p</i> = 0,943**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0,786*	<i>p</i> = 0,809*	
<i>UACR</i> :	Јутарња гликемија (<i>mmol/L</i>)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
	Нормоалбуминурија	8,60 (6,85-10,02)	7,90 (6,68-8,93)
Микроалбуминурија	7,50 (6,67-9,35)	7,95 (5,70-8,23)	<i>p</i> = 0,020**
Макроалбуминурија	9,40 (7,90-10,60)	8,05 (7,13-8,95)	<i>p</i> = 0,001**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0,036*	<i>p</i> = 0,366*	
<i>UACR</i> :	Гликозилирани хемоглобин (%)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
	Нормоалбуминурија	6,97 (6,60-7,80)	6,80 (6,20-7,70)
Микроалбуминурија	7,15 (6,57-8,42)	6,95 (6,40-7,60)	<i>p</i> < 0,001**
Макроалбуминурија	7,80 (6,72-8,70)	7,10 (6,80-8,62)	<i>p</i> = 0,016**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0,192*	<i>p</i> = 0,069*	

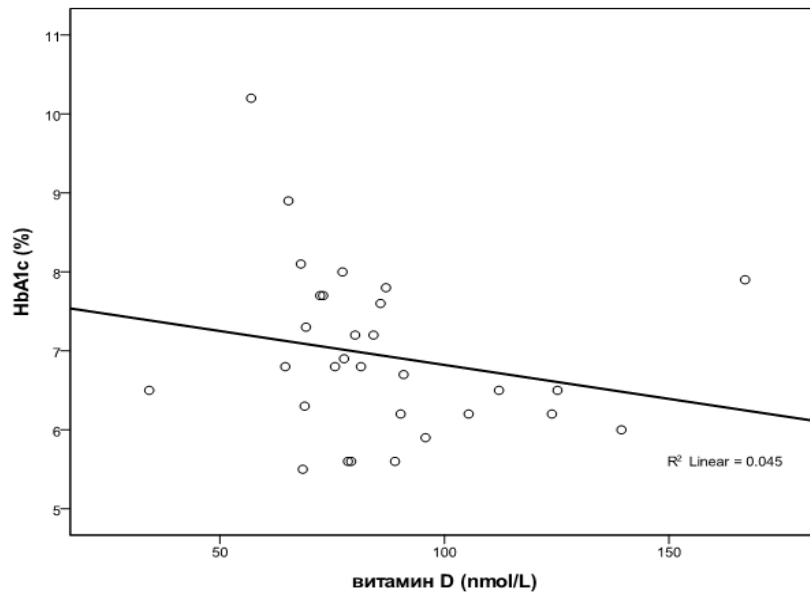
*- *Kruskal Wallis test*; **- *Wilcoxon Signed Ranks test*; *UACR*- албумин/креатинин однос; *IQR*- интерквartilни опсег: 25-75 перцентил

Корелирали смо ниво витамина *D* у крви и ниво *CRP-a*, јутарње гликемије (*FBG*), *HbA1c* након шестомесечне примене холекалциферола, умерену негативну корелацију само доказали у групи пацијената са нормоалбуминуријом између витамина *D* и *HbA1c* ($r = -0.342$; $p = 0.064$). Табела 13. и Графикон 3.

Табела 13. Корелација између нивоа витамина *D* и нивоа *CRP-a*, *FBG* and *HbA1c* након шестомесечне надокнаде витамина *D* у групи пацијената са нормоалбуминуријом (*Spearman's rho*)

		<i>Vitamin D</i>	<i>CRP</i>	<i>FBG</i>	<i>HBA1C</i>
<i>Vitamin D</i>	<i>r</i> coefficient	1.000			
	<i>p</i> value				
<i>CRP</i>	<i>r</i> coefficient	0.121	1.000		
	<i>p</i> value	0.525			
<i>FBG</i>	<i>r</i> coefficient	-0.061	0.148	1.000	
	<i>p</i> value	0.750	0.435		
<i>HBA1C</i>	<i>r</i> coefficient	-0.342	-0.133	0.578	1.000
	<i>p</i> value	0.064	0.485	0.001	

Графикон 3. Корелација између нивоа витамина *D* и *HbA1c* у групи пацијената са нормоалбуминуријом након шестомесечне надокнаде витамином *D* (*Spearman's rho* = -0.342; $p = 0.064$)

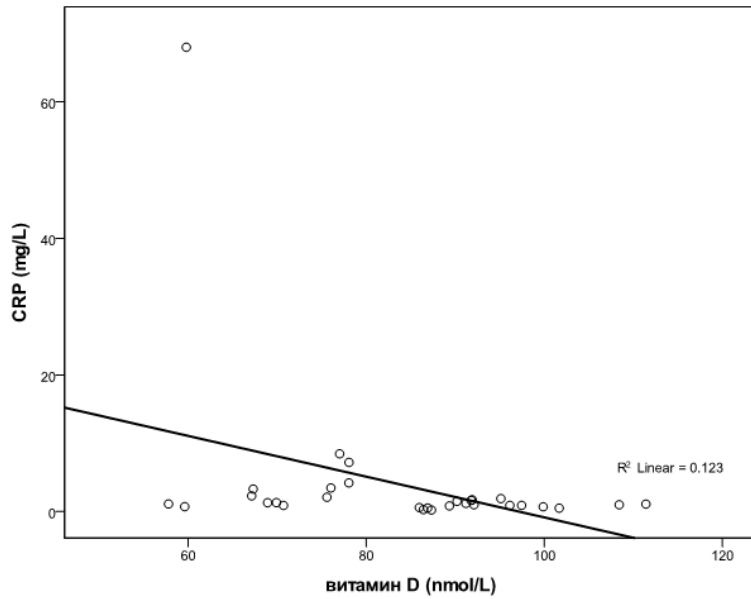


У групи пацијената са микроалбуминуријом доказана је негативна корелација између нивоа витамина *D* и нивоа *CRP*-а након шестомесечне надокнаде витамином *D* ($r = -0.368$; $p = 0.046$) Табела 14. и Графикон 4.

Табела 14. Корелација између нивоа витамина *D* и *CRP*-а у групи пацијената са микроалбуминуријом након шестомесечне надокнаде витамином *D* (*Spearman's rho*)

		<i>Vitamin D</i>	<i>CRP</i>	<i>FBG</i>	<i>HBA1C</i>
<i>Vitamin D</i>	r coefficient	1.000			
	p value				
<i>CRP</i>	r coefficient	-0.368	1.000		
	p value	0.046			
<i>FBG</i>	r coefficient	0.241	0.282	1.000	
	p value	0.199	0.131		
<i>HBA1C</i>	r coefficient	0.266	0.114	0.327	1.000
	p value	0.156	0.550	0.078	

Графикон 4. Корелација нивоа витамина *D* и *CRP*-а у групи пацијената са микроалбуминуријом након шестомесечне надокнаде витамином *D* (*Spearman's rho* = -0.368; *p* = 0.046)

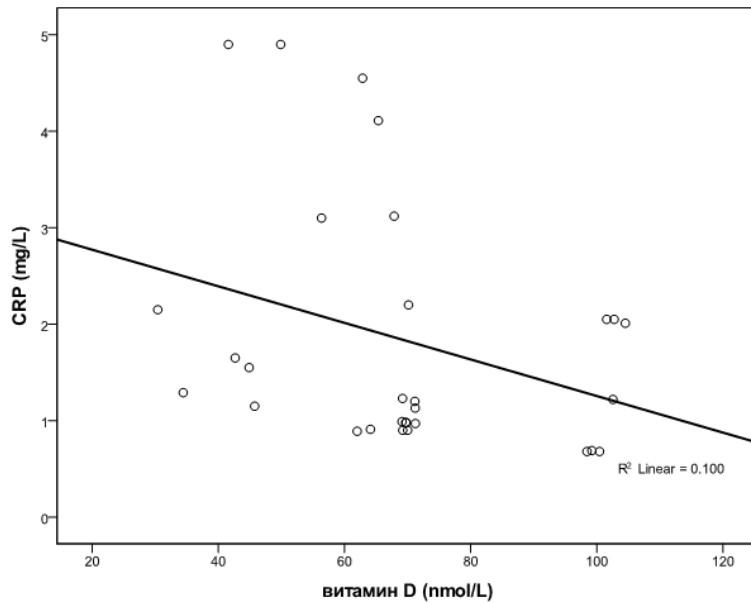


У групи пацијената са макроалбуминуријом негативна корелација је доказана такође између нивоа витамина *D* и нивоа *CRP*-а након шестомесечне надокнаде витамином *D* (*r* = -0.375; *p* = 0.041). Табела 15. Графикон 5.

Табела 15. Корелација између нивоа витамина *D* и *CRP*-а у групи пацијената са макроалбуминуријом након шестомесечне надокнаде витамином *D* (*Spearman's rho*)

		<i>Vitamin D</i>	<i>CRP</i>	<i>FBG</i>	<i>HBA1C</i>
<i>Vitamin D</i>	<i>r</i> coefficient	1.000			
	<i>p</i> value				
<i>CRP</i>	<i>r</i> coefficient	-0.375	1.000		
	<i>p</i> value	0.041			
<i>FBG</i>	<i>r</i> coefficient	0.438	-0.538	1.000	
	<i>p</i> value	0.016	0.002		
<i>HBA1C</i>	<i>r</i> coefficient	-0.169	0.093	0.505	1.000
	<i>p</i> value	0.372	0.625	0.004	

Графикон 5. Корелација нивоа витамина *D* и *CRP-a* у групи пацијената са макроалбуминуријом након шестомесечне супституције витамином *D* (*Spearman's rho* = -0.375; *p* = 0.041)



4.5. Калцијум, фосфор и *iPTH*

Анализирали смо ниво калцијума и фосфора на почетку испитивања, након два месеца надокнаде и након шест месеци надокнаде витамина *D*. Два месеца након започињања надокнаде, као ни шест месеци након започињања надокнаде нису забележене вредности калцијума преко 2,45 *mmol/L*, нити фосфора преко 1,65 *mmol/L*.

На почетку испитивања највиши ниво серумског калцијума имали су пацијенти у групи са нормоалбуминуријом 2.39 *mmol/L* (2.31-2.42), затим пацијенти из групе са микроалбуминуријом 2.38 *mmol/L* (2.29-2.40), а најнижи ниво имали су пацијенти у групи са макроалбуминуријом 2.31 *mmol/L* (2.26-2.37). Постоји и статистичка значајност у разлици нивоа између група (*p* = 0.002). Након завршене супституције нема статистички значајне разлике између нивоа калцијума између група, и нису прекорачене вредности преко 2,45 *mmol/L*. Табела 16.

Разлика у нивоу фосфора на почетку студије, као и након завршене супституције не показује статистичку значајност између група, као ни статистички значајну разлику између вредности на почетку и на крају студије ни у једној групи. Табела 16.

iPTH је на почетку испитивања био најнижи у групи пацијената са нормоалбуминуријом 3.40 (2.18-5.05), затим у групи са микроалбуминуријом 5.05 (4.00-

6.15), а највиши је био у групи пацијената са макроалбуминуријом 7.10 (5.48-9.20), постоји и статистички значајна разлика између група ($p < 0.001$). Након завршене супституције ниво *iPTH* статистички је значајно снижен у групи пацијената са нормоалбуминуријом – на почетку студије *iPTH* је износио 3,40 *pmol/L* (2,18-5,05) а након супституције 3,25 *pmol/L* (2,10-4,50) ($p = 0,003$), док је у групи са микроалбуминуријом ниво *iPTH* у статистички значајном порасту са 5,05 *pmol/L* (4,00-6,15) на 5,10 *pmol/L* (3,35-6,22) ($p = 0,021$). Tabela 16.

Табела 16. Вредности калцијума, фосфора *iPTH* у крви пре и шест месеци након надокнаде витамина *D*

<i>UACR</i> :	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	p вредност
	Калцијум (<i>mmol/L</i>)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Нормоалбуминурија	2.39 (2.31-2.42)	2.38 (2.32-2.42)	$p = 0.628^{**}$
Микроалбуминурија	2.38 (2.29-2.40)	2.34 (2.30-2.40)	$p = 0.354^{**}$
Макроалбуминурија	2.31 (2.26-2.37)	2.35 (2.28-2.40)	$p = 0.002^{**}$
p вредност	p = 0.002*	p = 0.401*	
Фосфор (<i>mmol/L</i>)			
<i>UACR</i> :	Медијана (<i>IQR</i>)		
Нормоалбуминурија	1.10 (1.01-1.19)	1.06 (0.91-1.19)	$p = 0.165^{**}$
Микроалбуминурија	1.10 (0.99-1.17)	1.07 (0.98-1.19)	$p = 0.684^{**}$
Макроалбуминурија	1.16 (1.02-1.30)	1.10 (1.00-1.29)	$p = 0.348^{**}$
p вредност	$p = 0.123^*$	$p = 0.149^*$	
<i>iPTH</i> (<i>pmol/L</i>)			
<i>UACR</i> :	Медијана (<i>IQR</i>)		
Нормоалбуминурија	3.40 (2.18-5.05)	3.25 (2.10-4.50)	$p = 0.003^{**}$
Микроалбуминурија	5.05 (4.00-6.15)	5.10 (3.35-6.22)	$p = 0.021^{**}$
Макроалбуминурија	7.10 (5.48-9.20)	7.02 (5.05-9.70)	$p = 0.363^{**}$
p вредност	p < 0.001*	p < 0.001*	

*- *Kruskal Wallis test*; **- *Wilcoxon Signed Ranks test*; *UACR*- албумин/креатинин однос у урину; *IQR*-интерквартилни опсег: 25-75 перцентил

4.6. Параметри липидног статуса

Као параметре липидног статуса анализирали смо ниво укупног холестерола и триглицерида у крви на почетку испитивања и након завршене надокнаде витамина *D*.

На почетку испитивања најнижи ниво укупног холестерола у крви су имали пацијенти у групи са нормоалбуминуријом, затим пацијенти у групи са

микроалбуминуријом, док су највише вредности имали пацијенти са макроалбуминуријом, разлика између група је била статистички значајна ($p = 0.032$). Након шестомесечне надокнаде витамина *D* имамо статички значајно снижење нивоа укупног холестерола у све три групе пацијената. У групи пацијената са нормоалбуминуријом ниво укупног холестерола је снижен са са $5,01 \text{ mmol/L}$ (4,36-5,39) на $4,45 \text{ mmol/L}$ (3,90-5,10) ($p < 0,001$), у групи пацијената са микроалбуминуријом са $5,52 \text{ mmol/L}$ (4,84-6,32) на $4,66 \text{ mmol/L}$ (4,14-5,30) ($p < 0,001$), а у групи са макроалбуминуријом са $5,66 \text{ mmol/L}$ (4,73-6,36) на $4,79 \text{ mmol/L}$ (4,39-5,77) ($p < 0,001$). Није било статистички значајне разлике између група након завршене надокнаде. Табела 17.

Ниво триглицерида у крви на почетку испитивања није се статистички значајно разликовао између група. Након шестомесечне надокнаде витамина *D* ниво триглицерида је статистички значајно снижен у све три групе. Триглицериди су у групи са нормоалбуминуријом снижени са $1,81 \text{ mmol/L}$ (1,31-2,41) на $1,44 \text{ mmol/L}$ (1,10-1,77) ($p < 0,001$), у групи са микроалбуминуријом са $2,16 \text{ mmol/L}$ (1,61-2,80) на $1,43 \text{ mmol/L}$ (1,16-1,71) ($p < 0,001$) и у групи са макроалбуминуријом са $1,81 \text{ mmol/L}$ (1,58-2,90) на $1,49 \text{ mmol/L}$ (1,40-2,22) ($p < 0,001$). Није било статистички значајне разлике између група у нивоу триглицерида на крају студије. Табела 17.

Табела 17. Вредности укупног холестерола и триглицерида у крви, пре и након шест месеци надокнаде витамина *D*

<i>UACR</i> :	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	<i>p</i> вредност
	Укупни холестерол (<i>mmol/L</i>)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Нормоалбуминурија	5.01 (4.36-5.39)	4.45 (3.90-5.10)	$p < 0.001^{**}$
Микроалбуминурија	5.52 (4.84-6.32)	4.66 (4.14-5.30)	$p < 0.001^{**}$
Макроалбуминурија	5.66 (4.73-6.36)	4.79 (4.39-5.77)	$p < 0.001^{**}$
<i>p</i> вредност	$p = 0.032^*$	$p = 0.333^*$	
<i>UACR</i> :	Триглицериди (<i>mmol/L</i>)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
	Нормоалбуминурија	1.81 (1.31-2.41)	
Микроалбуминурија	2.16 (1.61-2.80)	1.43 (1.16-1.71)	$p < 0.001^{**}$
Макроалбуминурија	1.81 (1.58-2.90)	1.49 (1.40-2.22)	$p < 0.001^{**}$
<i>p</i> вредност	$p = 0.194^*$	$p = 0.116^*$	

*- *Kruskal Wallis test*; **- *Wilcoxon Signed Ranks test*; *UACR*- албумин/креатинин однос у урину; *IQR*-интерквартилни опсег: 25-75 перцентил

Након супституције витамина *D* процентуално највећи пад нивоа укупног холестерола имали су пацијенти у групи са макроалбуминуријом 8.47 % (5.98-23.67), уз статистички значајну разлику у процентима између група. Табела 18.

Након завршене надокнаде процентуално највиши пад триглицерида имали су пацијенти у групи са микроалбуминуријом 26.10% (17.96-41.06). Такође присутна статистички значајна разлика у процентима између група. Табела 18.

Табела 18. Процентуално смањење укупног холестерола и триглицерида након надокнаде витамина *D* у односу на базалне вредности

<i>UACR</i> :	Смањење холестерола (%)
	Медијана (<i>IQR</i>)
Нормоалбуминурија	4.47 (0.53-7.80)
Микроалбуминурија	7.88 (2.32-26.31)
Макроалбуминурија	8.47 (5.98-23.67)
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.014*
<i>UACR</i> :	Смањење триглицерида (%)
	Медијана (<i>IQR</i>)
Нормоалбуминурија	15.36 (4.91-34.97)
Микроалбуминурија	26.10 (17.96-41.06)
Макроалбуминурија	11.07 (4.40-26.84)
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.014*

4.7. *UACR* и 24-часовна протеинурија

Као златни стандард за постављање дијагнозе дијабетесне нефропатије анализирали смо ниво албуминурије, односно ниво *UACR* и 24-часовне протеинурије.

Након шестомесечне надокнаде витамин *D* у све три групе пацијената смо забележили статистички значајно снижење нивоа *UACR*: у групи са нормоалбуминуријом *UACR* је снижен са 26.70 *mg/g* (18.22-28.60) на 22.80 *mg/g* (11.67-27.45) (*p* = 0.028), у групи са микроалбуминуријом са 100.40 *mg/g* (81.02-122.02) на 58.30 *mg/g* (33.77-83.05) (*p*<0.001), док је у групи са макроалбуминуријом пад са 520.75 *mg/g* (359.87-2726.07) на 329.40 *mg/g* (152.22-2948.25) (*p* = 0.015). Табела 19.

Такође након завршене надокнаде у све три групе имамо статистички значјно снижење нивоа 24-часовне протеинурије: у групи са нормоалбуминуријом 24-часовна протеинурија је снижена са 0,071 *gr/24h* (0,046-0,101) на 0,060 *gr/24h* (0,026-0,085) (*p* = 0,003), у групи са микроалбуминуријом са 0,221 *gr/24h* (0,182-0,273) на 0,136 *gr/24h* (0,100-

0,200) ($p < 0,001$), и у групи са макроалбуминуријом са 0,967 gr/24h (0,707-4,993) на 0,664 gr/24h (0,319-5,140) ($p = 0,015$). Табела 19.

Табела 19. Вредности *UACR*-а и 24-часовне протеинурије, пре и након шест месеци надокнаде витамина *D*

<i>UACR</i> :	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	<i>p</i> вредност
	24-часовна протеинурија (g/24h)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Нормоалбуминурија	0.071 (0.046-0.101)	0.060 (0.026-0.085)	$p = 0.003^{**}$
Микроалбуминурија	0.221 (0.182-0.273)	0.136 (0.100-0.200)	$p < 0.001^{**}$
Макроалбуминурија	0.967 (0.707-4.993)	0.664 (0.319-5.140)	$p = 0.015^{**}$
<i>p</i> вредност	$p < 0.001^*$	$p < 0.001^*$	
<i>UACR</i> :	<i>UACR</i> (mg/g)		<i>p</i> вредност
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Нормоалбуминурија	26.70 (18.22-28.60)	22.80 (11.67-27.45)	$p = 0.028^{**}$
Микроалбуминурија	100.40 (81.02-122.02)	58.30 (33.77-83.05)	$p < 0.001^{**}$
Макроалбуминурија	520.75 (359.87-2726.07)	329.40 (152.22-2948.25)	$p = 0.015^{**}$
<i>p</i> вредност	$p < 0.001^*$	$p < 0.001^*$	

*- *Kruskal Wallis test*; **- *Wilcoxon Signed Ranks test*; *UACR*- албумин/креатинин однос; *IQR*- интерквartilни опсег: 25-75 перцентил

На крају студије процентуално највиши пад нивоа *UACR* имали су пацијенти у групи са микроалбуминуријом 40.99% (16.94-61.33), такође процентуално највећи пад 24-часовне протеинурије имали су пацијенти у групи са микропротеинуријом 35.66% (17.40-48.51). Разлика између група је статистички значајна. Табела 20.

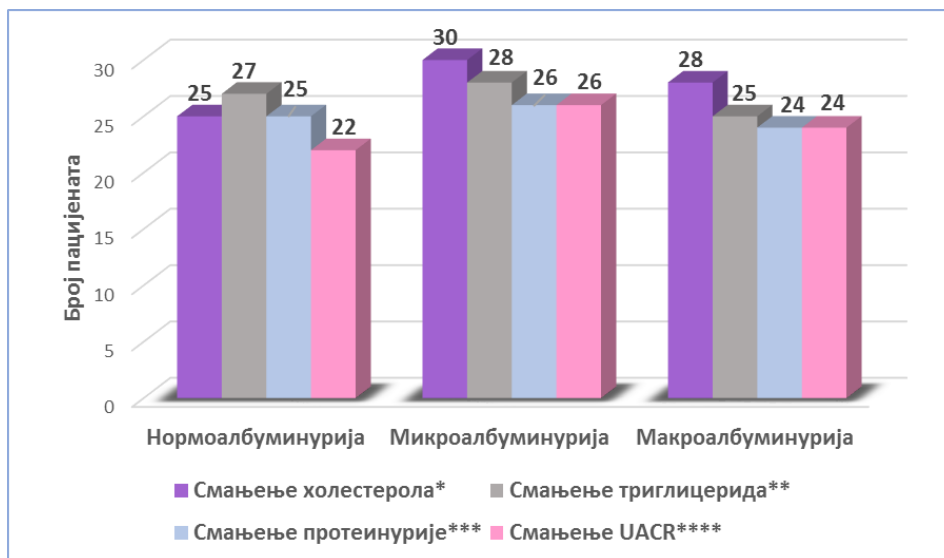
Табела 20. Процентуално смањење *UACR* и 24-часовне протеинурије након надокнаде витамина *D* у односу на базалне вредности

<i>UACR</i> :	Смањење 24-часовне протеинурије (%)
	Медијана (<i>IQR</i>)
Нормоалбуминурија	17.71 (9.40-33.55)
Микроалбуминурија	35.66 (17.40-48.51)
Макроалбуминурија	32.52 (20.03-52.87)
<i>p</i> вредност	$p = 0.037^*$
<i>UACR</i> :	Смањење <i>UACR</i> (%)
	Медијана (<i>IQR</i>)
Нормоалбуминурија	4.72 (-0.37-22.88)
Микроалбуминурија	40.99 (16.94-61.33)
Макроалбуминурија	36.56 (21.82-55.87)
<i>p</i> вредност	$p = 0.001^*$

*- *Kruskal Wallis test*; *UACR*- албумин/креатинин однос; *IQR*- интерквartilни опсег: 25-75 перцентил

Упоредивши испитиване групе међусобно у односу на број пацијената код којих је дошло до снижавања нивоа укупног холестерола, триглицерида, 24-часовне протеинурије и *UACR*, није било статистички значајне разлике између њих. Графикон 6.

Графикон 6. Дистрибуција пацијената у односу на смањење холестерола, триглицерида и протеинурије након терапије витамином *D*



Chi-square test; *- $p = 0.053$; **- $p = 0.455$; ***- $p = 0.787$; ****- $p = 0.435$

4.8 Корелација нивоа витамина *D* у крви и укупног холестерола, триглицерида, *UACR* и 24-часовне протеинурије

Након шестомесечне надокнаде витамина *D* корелирали смо ниво витамина *D* у крви и ниво укупног холестерола, триглицерида у крви и *UACR* и 24-часовне протеинурије у све три групе. Једино је у групи пацијената са макроалбуминуријом доказана јака негативна корелација између нивоа витамина *D* и нивоа укупног холестерола ($r = - 0.570$; $p < 0.001$), између нивоа витамина *D* и 24-часовне протеинурије ($r = - 0.685$; $p < 0.001$) и између нивоа витамина *D* и нивоа *UACR* ($r = - 0.676$; $p < 0.001$). Табела 21. Табела 22. Табела 23. Графикон 7, 8 и 9. Доказана је и јака позитивна корелација између укупног холестерола и *UACR* ($r = 0.796$; $p < 0.001$), и јака позитивна корелација између укупног холестерола и 24-часовне протеинурије ($r = 0.796$; $p < 0.001$). Табела 23.

Табела 21. Корелација нивоа витамина *D* у крви и укупног холестерола, триглицерида, 24-часовне протеинурије и *UACR* након шестомесечне надокнаде витамина *D* у групи пацијената са нормоалбуминуријом (*Spearman's rho*)

		Витамин <i>D</i>	Холестерол	Триглицериди	Протеинурија	<i>UACR</i>
Витамин <i>D</i>	<i>r</i> коефицијент	1.000				
	<i>p</i> вредност					
Холестерол	<i>r</i> коефицијент	-0.062	1.000			
	<i>p</i> вредност	0.745				
Триглицериди	<i>r</i> коефицијент	0.065	0.276	1.000		
	<i>p</i> вредност	0.732	0.140			
24-часовна протеинурија	<i>r</i> коефицијент	-0.159	0.002	0.020	1.000	
	<i>p</i> вредност	0.403	0.992	0.915		
<i>UACR</i>	<i>r</i> коефицијент	-0.163	-0.034	-0.026	0.950	1.000
	<i>p</i> вредност	0.389	0.859	0.890	< 0.001	

UACR- албумин/креатинин однос у урину

Табела 22. Корелација нивоа витамина *D* у крви и укупног холестерола, триглицерида, 24-часовне протеинурије и *UACR* након шестомесечне надокнаде витамина *D* у групи пацијената са микроалбуминуријом (*Spearman's rho*)

		Витамин <i>D</i>	Холестерол	Триглицериди	Протеинурија	<i>UACR</i>
Витамин <i>D</i>	<i>r</i> коефицијент	1.000				
	<i>p</i> вредност					
Холестерол	<i>r</i> коефицијент	-0.040	1.000			
	<i>p</i> вредност	0.834				
Триглицериди	<i>r</i> коефицијент	-0.072	0.044	1.000		
	<i>p</i> вредност	0.707	0.818			
24-часовна протеинурија	<i>r</i> коефицијент	0.114	0.050	0.272	1.000	
	<i>p</i> вредност	0.549	0.794	0.145		
<i>UACR</i>	<i>r</i> коефицијент	0.117	0.038	0.270	0.983	1.000
	<i>p</i> вредност	0.537	0.843	0.149	< 0.001	

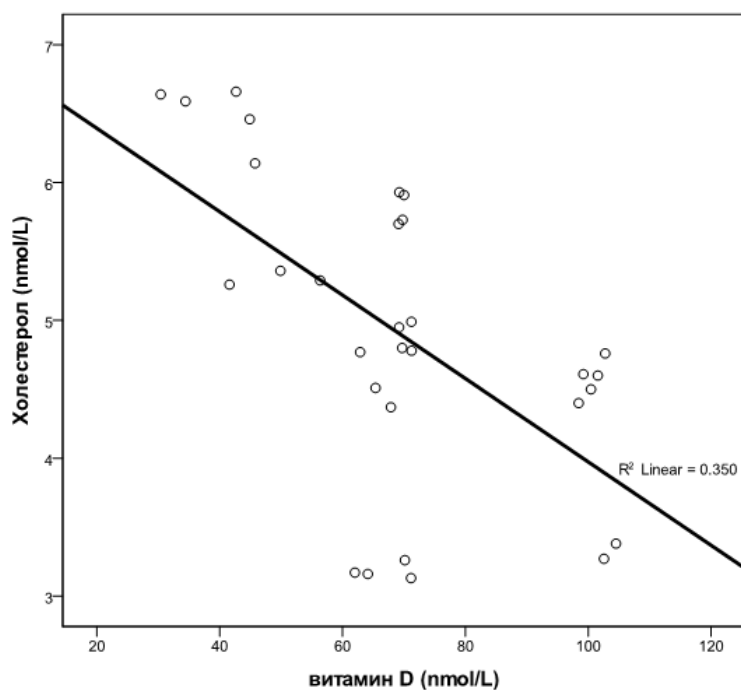
UACR- албумин/креатинин однос у урину

Табела 23. Корелација нивоа витамина *D* у крви и укупног холестерола, триглицерида, 24-часовне протеинурије и *UACR* након шестомесечне надокнаде витамина *D* у групи пацијената са макроалбуминуријом (*Spearman's rho*)

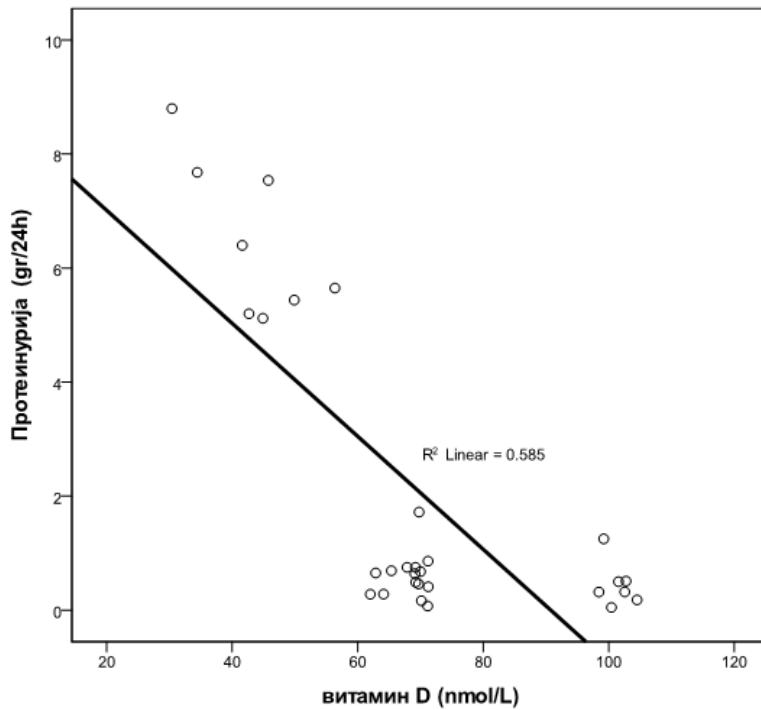
		Витамин D	Холестерол	Триглицериди	Протеинурија	UACR
Витамин D	г коефицијент	1.000				
	р вредност					
Холестерол	г коефицијент	-0.570	1.000			
	р вредност	0.001				
Триглицериди	г коефицијент	-0.056	0.357	1.000		
	р вредност	0.769	0.053			
24-часовна протеинурија	г коефицијент	-0.685	0.788	0.108	1.000	
	р вредност	<0.001	<0.001	0.569		
UACR	г коефицијент	-0.676	0.796	0.134	0.996	1.000
	р вредност	< 0.001	< 0.001	0.479	< 0.001	

UACR- албумин/креатинин однос у урину

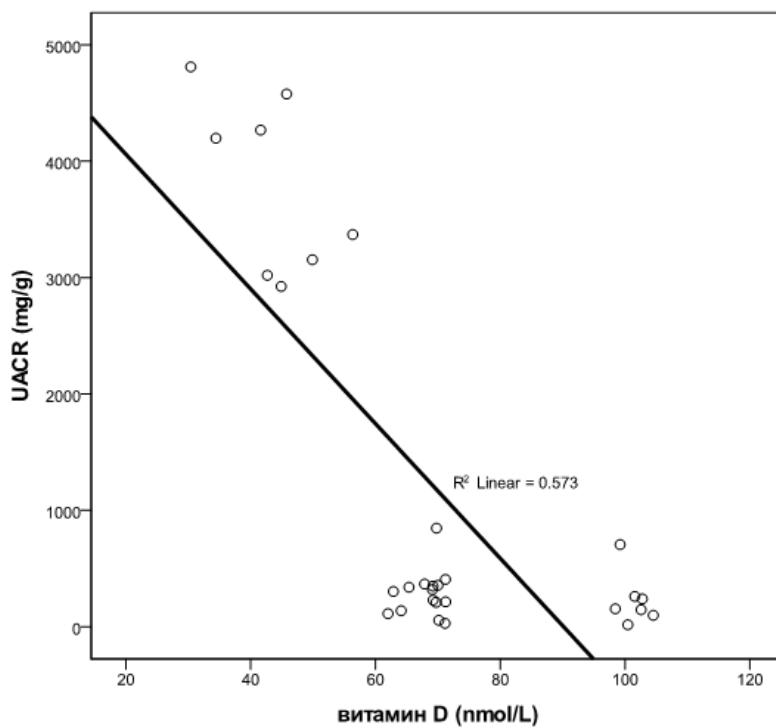
Графикон 7. Корелација између нивоа витамина *D* и укупног холестерола након надокнаде витамина *D*, у групи са макроалбуминуријом (*Spearman's rho* = -0.570; $p < 0.001$)



Графикон 8. Корелација између нивоа витамина *D* и 24-часовне протеинурије након надокнаде витамина *D*, у групи са макроалбуминуријом (*Spearman's rho* = -0.685; $p < 0.001$)



Графикон 9. Корелација између нивоа витамина *D* и односа *UACR* након надокнаде витамина *D*, у групи пацијената са макроалбуминуријом (*Spearman's rho* = -0.676; $p < 0.001$)



4.9. Биомеркери у серуму и урину

4.9.1 Концентрација нефрина у крви и урину

Као параметар функције подоцита пратили смо апсолутне концентрације нефрина у урину и крви и кориговане концентрације нефрина у урину које су кориговане према концентрацији креатинина у јутарњем узорку урину и изражене у ng/gU_{Cr} , на почетку испитивања и након шестомесечне надокнаде витамина *D*. На почетку студије највише апсолутне концентрације нефрина у урину имали су пацијенти у групи са нормоалбуминуријом 574.00 pg/mL (293.25-1244.75), затим пацијенти са микроалбуминуријом 569.00 pg/mL (285.00-760.75), док су најниже концентрације имали пацијенти у групи са макроалбуминуријом 356.50 pg/mL (286.75-632.50). Разлика између група није имала статистичку значајност. Табела 24.

Након шестомесечне надокнаде витамина *D* забележили смо статистички значајно снижење апсолутних концентрација нефрина у урину само у групи пацијената са микроалбуминуријом са 569.00 pg/mL (285.00-760.75) на 316.50 pg/mL (288.75-635.00) ($p = 0.028$), док у групи пацијената са нормоалбуминуријом имамо нумерички пад апсолутних вредности али без статистичке значајности. Табела 24.

На почетку студије највише кориговане концентрације нефрина у урину имали су пацијенти у групи са нормоалбуминуријом $612.11 \text{ ng/gU}_{Cr}$ (340.83-1237.22), затим пацијенти са микроалбуминуријом $507.89 \text{ ng/gU}_{Cr}$ (319.23-659.92), док су најниже концентрације имали пацијенти у групи са макроалбуминуријом $392.68 \text{ ng/gU}_{Cr}$ (294.20-656.77). Разлика између група није имала статистичку значајност. Табела 24. Након шестомесечне надокнаде витамина *D* забележили смо нумерички значајно снижење коригованих концентрација нефрина у урину само у групи пацијената са микроалбуминуријом, али без статистичке значајности. Табела 24.

У крви највише концентрације нефрина имали су пацијенти из групе са нормоалбуминуријом 439.00 pg/mL (0.00-3898.50), затим пацијенти у групи са макроалбуминуријом 398.50 pg/mL (293.00-1930.25), док су најниже вредности имали пацијенти у групи са микроалбуминуријом 287.00 pg/mL (0.00-6197.50). Након шестомесечне надокнаде витамина *D* није забележено статистички значајно снижење ни у једној групи. Табела 24.

Табела 24. Апсолутне и кориговане концентрације нефрина у урину и концентрација нефрина у крви пре и након шестомесечне терапије витамином *D*

UACR:	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	p вредност
	Нефрин - урин (pg/mL)		
	Медијана (IQR)		
Нормоалбуминурија	574.00 (293.25-1244.75)	570.50 (271.50-630.00)	p = 0.350**
Микроалбуминурија	569.00 (285.00-760.75)	316.50 (288.75-635.00)	p = 0.028**
Макроалбуминурија	356.50 (286.75-632.50)	544.00 (297.50-608.00)	p = 0.940**
p вредност	p = 0.619*	p = 0.641*	
	Нефрин – урин коригована конц. (ng/gU _{Cr})		
Нормоалбуминурија	612.11 (340.83-1237.22)	543.97 (316.78-681.30)	p = 0.177**
Микроалбуминурија	507.89 (319.23-659.92)	343.60 (267.35-724.80)	p = 0.056**
Макроалбуминурија	392.68 (294.20-656.77)	458.74 (310.41-670.39)	p = 0.992**
p вредност	p = 0.203*	p = 0.551*	
UACR:	Нефрин - крв (pg/mL)		
	Медијана (IQR)		
Нормоалбуминурија	439.00 (0.00-3898.50)	430.00 (0.00-3938.25)	p = 0.875**
Микроалбуминурија	287.00 (0.00-6197.50)	605.50 (287.75-9712.50)	p = 0.472**
Макроалбуминурија	398.50 (293.00-1930.25)	3198.00 (670.25-9890.00)	p = 0.004**
p вредност	p = 0.543*	p = 0.039*	

*- *Kruskal Wallis test*; **- *Wilcoxon Signed Ranks test*; UACR- албумин/креатинин однос у урину; IQR- интерквartilни опсег: 25-75 перцентил

4.9.2. Концентрација *TGF-β1* у урину и крви

Као параметар реналне фиброзе пратили смо концентрацију *TGF-β1* у јутарњем узорку урина и крви. У урину смо одређивали апсолутну концентрацију *TGF-β1* у јутарњем узорку урина и кориговану концентрацију *TGF-β1* која је коригована према концентрацији креатинина у јутарњем узорку урину и изражена у ng/gU_{Cr}.

На почетку испитивања најниже апсолутне концентрације *TGF-β1* у урин забележили смо код пацијента у групи са нормоалбуминуријом 50.50 pg/mL (45.75-64.00), затим у групи са макроалбуминуријом 54.00 pg/mL (49.75-58.25), док су највише апсолутне концентрације имали пацијенти у групи са микроалбуминуријом 59.00 pg/mL (51.75-67.25). Након шестомесечне надокнаде витамина *D* статистички значајно ниже апсолутне концентрације *TGF-β1* у урин имали су пацијенти у групи са макроалбуминуријом 48.50 pg/mL (37.00-51.00) ($p < 0.001$). Табела 18. Пацијенти у групи са микроалбуминуријом су имали нумерички пад вредности али без статистичке значајности. Табела 25.

На почетку испитивања најниже кориговане концентрације $TGF-\beta 1$ у урин забележили смо код пацијента у групи са нормоалбуминуријом 55.84 ng/gU_{Cr} (50.08-69.44), затим у групи са макроалбуминуријом 56.41 ng/gU_{Cr} (46.33-62.30), док су највише апсолутне концентрације имали пацијенти у групи са микроалбуминуријом 61.67 ng/gU_{Cr} (49.88-70.95). Након шестомесечне надокнаде витамина D статистички значајно ниже кориговане концентрације $TGF-\beta 1$ у урин имали су пацијенти у групи са макроалбуминуријом 46.03 ng/gU_{Cr} (39.28-57.25) ($p < 0.001$). Табела 18. Пацијенти у групи са микроалбуминуријом су имали нумерички пад вредности али без статистичке значајности. Табела 25.

Када је у питању ниво $TGF-\beta 1$ у крви, највише концентрације имали су пацијенти у групи са нормоалбуминуријом 54.50 pg/mL (37.25-81.00), затим пацијенти у групи са микроалбуминуријом 47.50 pg/mL (40.25-90.25), док су најниже вредности забележене у групи пацијената са макроалбуминуријом 42.00 pg/mL (33.50-61.50). Након завршене супституције није било статистички значајног пада вредности ни у једној од испитиваних група. Табела 25.

Табела 25. Апсолутне и кориговане концентрације $TGF-\beta 1$ у урину и концентрација $TGF-\beta 1$ у крви пре и након шестомесечне терапије витамином D

<i>UACR:</i>	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	<i>p</i> вредност
	<i>TGF-β1</i> - урин (<i>pg/mL</i>)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Нормоалбуминурија	50.50 (45.75-64.00)	52.00 (45.00-63.25)	$p = 0.897^{**}$
Микроалбуминурија	59.00 (51.75-67.25)	54.00 (49.00-61.75)	$p = 0.080^{**}$
Макроалбуминурија	54.00 (49.75-58.25)	48.50 (37.00-51.00)	$p < 0.001^{**}$
<i>p</i> вредност	$p = 0.100^*$	$p = 0.001^*$	
	<i>TGF-β1</i> - урин коригована конц. (<i>ng/gU_{Cr}</i>)		
Нормоалбуминурија	55.84 (50.08-69.44)	58.81 (45.78-71.85)	$p = 0.943^{**}$
Микроалбуминурија	61.67 (49.88-70.95)	57.17 (52.12-67.90)	$p = 0.336^{**}$
Макроалбуминурија	56.41 (46.33-62.30)	46.03 (39.28-57.25)	$p < 0.001^{**}$
<i>p</i> вредност	$p = 0.342^*$	$p = 0.001^*$	
	<i>TGF-β1</i> - крв (<i>pg/mL</i>)		
<i>UACR:</i>	Медијана (<i>IQR</i>)		
Нормоалбуминурија	54.50 (37.25-81.00)	48.50 (40.75-51.75)	$p = 0.201^{**}$
Микроалбуминурија	47.50 (40.25-90.25)	47.00 (45.00-72.25)	$p = 0.638^{**}$
Макроалбуминурија	42.00 (33.50-61.50)	51.00 (41.50-67.50)	$p = 0.313^{**}$
<i>p</i> вредност	$p = 0.285^*$	$p = 0.649^*$	

*- *Kruskal Wallis test*; **- *Wilcoxon Signed Ranks test*; *UACR*- албумин/креатинин однос у урину; *IQR*-интерквартилни опсег: 25-75 перцентил

4.9.3. Концентрација *VEGF-A* у урину и крви

Пратили смо *VEGF-A* у јутарњем узорку урина и крви. У урину смо одређивали апсолутну концентрацију *VEGF-A* у јутарњем узорку урина и кориговану концентрацију *VEGF-A* која је коригована према концентрацији креатинина у јутарњем узорку урину и изражена у $\mu\text{g/g}U_{Cr}$.

Пре започињања надокнаде најниже апсолутне концентрације *VEGF-A* у јутарњем урину измерили смо у групи пацијената са нормоалбуминуријом 47.00 pg/mL (38.75-64.25), затим у групи пацијената са макроалбуминуријом 55.50 pg/mL (47.00-58.00), док су највише вредности имали пацијенти у групи са микроалбуминуријом 58.00 pg/mL (46.50-75.00). Након завршене наодокнаде витамина *D* у све три групе забележили смо статистички значајно ниже вредности *VEGF-A*. Табела 26. У групи пацијената са микроалбуминуријом доказана је и негативна корелација између нивоа витамина *D* и апсолутне концентрације *VEGF-A* у урину након надокнаде. (*Spearman's rho* = -0,362, $p < 0,082$) . Графикон 10.

Пре започињања надокнаде најниже кориговане концентрације *VEGF-A* у јутарњем урину измерили смо у групи пацијената са нормоалбуминуријом $47.47 \mu\text{g/g}U_{Cr}$ (42.60-58.86), затим у групи пацијената са макроалбуминуријом $55.42 \mu\text{g/g}U_{Cr}$ (44.12-65.32), док су највише вредности имали пацијенти у групи са микроалбуминуријом $57.62 \mu\text{g/g}U_{Cr}$ (43.60-80.17). Након завршене наодокнаде витамина *D* у све три групе забележили смо статистички значајно ниже вредности *VEGF-A*. Табела 26. У групи пацијената са микроалбуминуријом доказана је и снажна негативна корелација између нивоа витамина *D* и коригованих концентрација *VEGF-A* у урину након надокнаде. (*Spearman's rho* = -0,531, $p < 0,008$) .

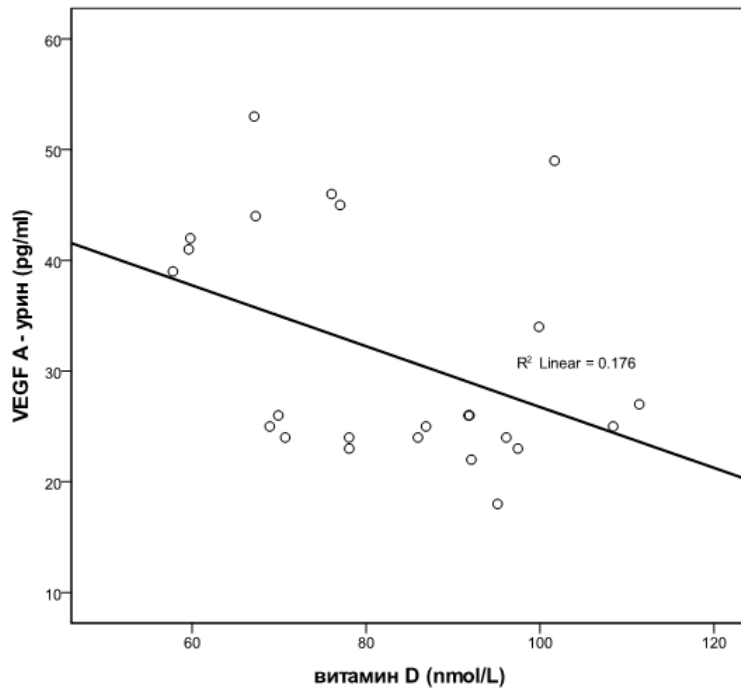
Кад је у питању ниво *VEGF-A* у крви пре започете супституције најниже вредности су измерене код пацијената у групи са нормоалбуминуријом 34.00 pg/mL (29.00-44.25), затим у групи са микроалбуминуријом 35.00 pg/mL (29.00-50.25), док су највише вредности имали пацијенти у групи са макроалбуминуријом 43.00 pg/mL (35.75-53.75). Након спроведене надокнаде нисмо забележили статистици значајан пад вредности ни у једној испитиваној групи. Табела 26. Код пацијената у групи са макроалбуминуријом имамо нумерички значајан пад вредности (Табела 26.), и потврђену негативну корелацију између витамина *D* и нивоа *VEGF-A* у крви након супституције (*Spearman's rho* = - 0,336; $p < 0.070$). Графикон 11.

Табела 26. Апсолутне и кориговане концентрације *VEGF-A* у урину и концентрација *VEGF-A* у крви пре и након шестомесечне терапије витамином *D*

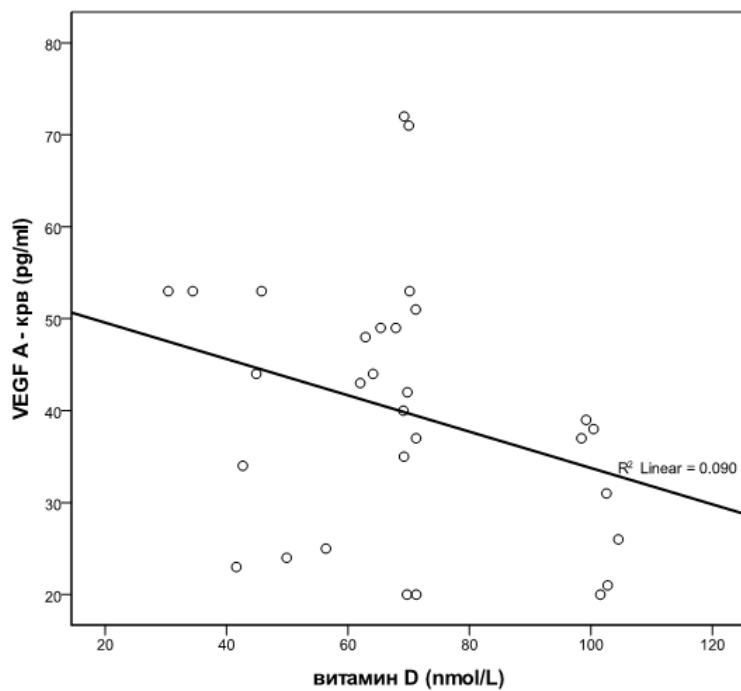
<i>UACR:</i>	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	<i>p</i> вредност
	<i>VEGF-A</i> - урин (<i>pg/mL</i>)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Нормоалбуминурија	47.00 (38.75-64.25)	29.00 (25.00-40.75)	<i>p</i> = 0.001**
Микроалбуминурија	58.00 (46.50-75.00)	26.00 (24.00-41.75)	<i>p</i> < 0.001**
Макроалбуминурија	55.50 (47.00-58.00)	24.50 (21.00-35.00)	<i>p</i> < 0.001**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.073*	<i>p</i> = 0.103*	
	<i>VEGF-A</i> - урин коригована конц. (<i>ng/gU_{Cr}</i>)		
Нормоалбуминурија	47.47 (42.60-58.86)	29.48 (27.32-42.03)	<i>p</i> = 0.003**
Микроалбуминурија	57.62 (43.60-80.17)	27.97 (25.64-39.96)	<i>p</i> < 0.001**
Макроалбуминурија	55.42 (44.12-65.32)	27.58 (21.38-40.66)	<i>p</i> = 0.001**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.346*	<i>p</i> = 0.251*	
	<i>VEGF-A</i> - крв (<i>pg/mL</i>)		
<i>UACR:</i>	Медијана (<i>IQR</i>)		
Нормоалбуминурија	34.00 (29.00-44.25)	38.00 (23.50-46.00)	<i>p</i> = 0.943**
Микроалбуминурија	35.00 (29.00-50.25)	38.50 (29.75-49.25)	<i>p</i> = 0.294**
Макроалбуминурија	43.00 (35.75-53.75)	39.50 (25.75-49.50)	<i>p</i> = 0.323**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.059*	<i>p</i> = 0.894*	

*- Kruskal Wallis test; **- Wilcoxon Signed Ranks test; *UACR*- албумин/креатинин однос у урину; *IQR*-интерквartilни опсег: 25-75 перцентил

Графикон 10. Корелација између нивоа витамина *D* и апсолутне концентрације *VEGF-A* у урину након надокнаде витамина *D*, у групи пацијената са микроалбуминуријом (*Spearman's rho* = - 0.362, $p < 0.082$).



Графикон 11. Корелација између нивоа витамина *D* и апсолутне концентрације *VEGF-A* у крви након надокнаде витамина *D*, у групи пацијената са макроалбуминуријом (*Spearman's rho* = - 0.336 $p < 0.070$)



4.10. Анализа резултата у односу на ниво витамина *D* у крви на почетку студије

Анализирали смо такође како је степен недостатака витамина *D* на почетку испитивања утицао на резултатае током студије. На почетку испитивања 68 (75.55%) пацијената је имало дефицијенцију витамина *D*, а 22 (24.44%) пацијента инсуфицијенцију. У односу на ниво недостатака витамина *D* пацијенте смо поделили у две групе: 1. група - пацијенти који су на почетку испитивања имали инсуфицијенцију витамина *D*, и 2. група - пацијенти који су на почетку испитивања имали дефицијенцију витамина *D*.

4.10.1. Параметри инфламације и гликорегулације у односу на ниво витамина *D* у крви на почетку студије

На почетку испитивања пацијенти који су имали дефицијенцију витамина *D* имали су нижи ниво *CRP-a* (1,37 mg/L (0,98-2,47)) у односу на пацијенте са инсуфицијенцијом витамина *D* (1,60 mg/L (0,97-2,22)), међутим након шестомесечне надокнаде витамина *D* у обадве групе пацијената постигнуто је статистички значајно снижење нивоа *CRP-a*. Табела 27. Није било статистички значајне разлике између група ни на почетку студије ни након завршене супституције.

Ниво јутарње гликемије је на почетку студије у групи пацијената са дефицијенцијом витамина *D* био виши, након шестомесечне надокнаде постигнут је статистички значајан пад нивоа јутарње гликемије у истој групи ($p < 0,001$), док у групи пацијената са инсуфицијенцијом витамина *D* није било редукције нивоа гликемије након супституције. Табела 27. Између група разлика у вредностима није имала статистичку значајност.

Ниво *HbA1c* на почетку студије је у групи пацијената са дефицијенцијом витамина *D* био виши у односу на групу пацијената са инсуфицијенцијом. Након шестомесечне надокнаде постигнут је статистички значајан пад нивоа *HbA1c* у обадве групе. Између група разлика у вредностима није имала статистичку значајност. Табела 27.

Табела 27 . Ниво *CRP*-а, јутарње гликемије и *HbA1c* пре и након шестомесечне терапије витамином *D*, у односу на ниво витамина *D* на почетку испитивања,

Витамин <i>D</i> :	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	<i>p</i> вредност
	<i>CRP</i> (mg/L)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Дефицијенција	1,37 (0,98-2,47)	1,23 (0,90-3,05)	<i>p</i> = 0,002**
Инсуфицијенција	1,60 (0,97-2,22)	1,27 (0,91-2,06)	<i>p</i> = 0,003**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0,836*	<i>p</i> = 0,929*	
Витамин <i>D</i> :	Гликемија (mmol/L)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
	Дефицијенција	8,90 (6,62-10,07)	7,70 (5,98-8,57)
Инсуфицијенција	7,95 (7,37-10,37)	8,05 (7,28-9,03)	<i>p</i> = 0,821**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0,622*	<i>p</i> = 0,067*	
Витамин <i>D</i> :	Гликозилирани хемоглобин (%)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
	Дефицијенција	7,35 (6,60-8,47)	7,05 (6,50-7,70)
Инсуфицијенција	7,15 (6,60-7,82)	6,80 (6,40-7,30)	<i>p</i> = 0,014**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0,672*	<i>p</i> = 0,392*	

*- *Mann-Whitney U test*; **- *Wilcoxon Signed Ranks test*; *IQR*- интерквартилни опсег: 25-75 перцентил

4.10.2. Азотне материје и клиренс креатинина у односу на ниво витамина *D* у крви на почетку студије

На почетку испитивања, пацијенти који су имали дефицијенцију витамина *D* имали су нижи ниво серумског креатинина, урее и виши клиренс креатинина у односу на пацијенте са инсуфицијенцијом витамина *D*, али разлика између група није имала статистичку значајност. Након шестомесечне надокнаде витамина *D* статистички значајан пад нивоа креатинина ($p < 0,001$) и урее ($p = 0,002$) имамо само у групи пацијената са почетном дефицијенцијом витамина *D*. Ниво серумског креатинин је након шестомесечне надокнаде статистички значајно нижи у групи пацијената са почетном дефицијенцијом витамина *D* у односу на ниво код пацијената са инсуфицијенцијом витамана *D* ($p = 0,021$). Такође статистчки значајан пораст клиренса креатинина ($p < 0,001$) након супституције имамо само у групи пацијената са почетном дефицијенцијом витами *D*. Табела 28.

Табела 28. Вредности креатинина, урее и клиренса креатинина, пре и након шестомесечне надокнаде витамина *D*, у односу на ниво витамина *D* на почетку испитивања,

Витамин <i>D</i> :	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	<i>p</i> вредност
	Креатинин ($\mu\text{mol/L}$)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Дефицијенција	80,00 (67,75-100,75)	77,00 (64,00-90,00)	$p < 0,001^{**}$
Инсуфицијенција	83,00 (76,25-103,00)	85,00 (80,00-100,00)	$p = 0,276^{**}$
<i>p</i> вредност	$p = 0,195^*$	$p = 0,021^*$	
Клиренс креатинина (mL/min)			
Витамин <i>D</i> :	Медијана (<i>IQR</i>)		
Дефицијенција	73,60 (61,10-90,20)	76,60 (63,40-94,60)	$p < 0,001^{**}$
Инсуфицијенција	69,80 (60,77-92,87)	71,50 (60,77-90,00)	$p = 0,295^{**}$
<i>p</i> вредност	$p = 0,917^*$	$p = 0,342^*$	
Уреа (mmol/L)			
Витамин <i>D</i> :	Медијана (<i>IQR</i>)		
Дефицијенција	6,55 (5,30-8,65)	6,20 (5,20-8,45)	$p = 0,002^{**}$
Инсуфицијенција	7,00 (6,00-8,12)	6,40 (5,35-7,95)	$p = 0,986^{**}$
<i>p</i> вредност	$p = 0,933^*$	$p = 0,966^*$	

*- *Mann-Whitney U test*; **- *Wilcoxon Signed Ranks test*; *IQR*- интерквартилни опсег: 25-75 перцентил

4.10.3. Липидни статус у односу на ниво витамина *D* у крви на почетку студије

Ниво укупног холестерола на почетку испитивања је виши у групи пацијената са дефицијенцијом витамина *D* 5,39 mmol/L (4,63-6,09), у односу на пацијенте са инсуфицијенцијом витамина *D* 5,06 mmol/L (4,31-5,68), међутим након шестомесечне надокнаде ниво укупног холестерола је статистички значајно нижи у обадве групе. Није било сатистички значајне разлике између група ни на почетку студије ни након завршене супституције. Табела 29.

Ниво триглицерида код пацијената са дефицијенцијом витамина *D* на почетку испитивања је нижи у односу на ниво триглицерида код пацијената са инсуфицијенцијом витамина *D*. Након шестомесечне супституције у обадве групе постигнут је статистички значајан пад вредности триглицерида. Није било статистички значајне разлике између група ни на почетку студије ни на крају. Табела 29.

Табела 29 . Ниво укупног холестерола и триглицерида пре и након шестомесечне надокнаде витамина *D*, у односу на ниво витамина *D* на почетку испитивања.

Витамин <i>D</i> :	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	<i>p</i> вредност
	Укупни холестерол (<i>mmol/L</i>)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Дефицијенција	5,39 (4,63-6,09)	4,70 (4,03-5,26)	<i>p</i> < 0,001**
Инсуфицијенција	5,06 (4,31-5,68)	4,69 (4,09-5,50)	<i>p</i> = 0,004**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0,217*	<i>p</i> = 0,750*	
Триглицериди (<i>mmol/L</i>)			
Витамин <i>D</i> :	Медијана (<i>IQR</i>)		
Дефицијенција	1,82 (1,54-2,75)	1,45 (1,18-1,92)	<i>p</i> < 0,001**
Инсуфицијенција	1,86 (1,44-2,50)	1,54 (1,30-2,01)	<i>p</i> = 0,002**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0,639*	<i>p</i> = 0,430*	

*- *Mann-Whitney U test*; **- *Wilcoxon Signed Ranks test*; *IQR*- интерквартилни опсег: 25-75 перцентил

4.10.4. Вредност 24-часовне протеинурије и *UACR* у односу на ниво витамина *D* у крви на почетку студије

Анализом резултата се види да пацијенти са дефицијенцијом витамина *D* на почетку испитивања имају ниже вредности 24-часовне протеинурије и *UACR*. Након шестомесечне надокнаде витамина *D* ниво и 24-часовне протеинурије и *UACR* су статистички значајно нижи у обадве групе. Разлика између група није статистички значајна. Табела 30.

Табела 30. Ниво 24-часовне протеинурије и *UACR* пре и након шестомесечне надокнаде витамина *D*, у односу на ниво витамина *D* на почетку испитивања.

Витамин <i>D</i> :	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	<i>p</i> вредност
	24-часовна протеинурија (<i>g/24h</i>)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Дефицијенција	0,193 (0,097-0,870)	0,117 (0,061-0,482)	<i>p</i> < 0,001**
Инсуфицијенција	0,257 (0,153-0,290)	0,184 (0,084-0,298)	<i>p</i> = 0,002**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 1,000*	<i>p</i> = 0,508*	
<i>UACR</i> (<i>mg/g</i>)			
Витамин <i>D</i> :	Медијана (<i>IQR</i>)		
Дефицијенција	88,30 (27,95-439,80)	39,30 (23,95-225,37)	<i>p</i> < 0,001**
Инсуфицијенција	115,75 (68,57-134,65)	78,85 (27,32-127,00)	<i>p</i> = 0,004**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0,966*	<i>p</i> = 0,589*	

*- *Mann-Whitney U test*; **- *Wilcoxon Signed Ranks test*; *UACR*- албумин/креатинин однос у урину; *IQR*- интерквартилни опсег: 25-75 перцентил

4.10.5. Нефрин у односу на ниво витамина *D* у крви на почетку студије

Пацијенти са дефицијенцијом витамина *D* на почетку испитивања имали су виши ниво апсолутних и коригованих концентрација нефрина у урину у односу на пацијенте са инсуфицијенцијом витамина *D*, код њих је након шестомесечне надокнаде витамина *D* дошло до статистички значајног пада апсолутних концентрација нефрина ($p = 0,017$) и коригованих концентрација нефрина ($p = 0,036$). Није било статистички значајне разлике у нивоу апсолутних и коригованих концентрација нефрина између група. Табела 31.

Ниво нефрина у крви је виши на почетку испитивања код пацијената са дефицијенцијом витамина *D* у односу на пацијенте са инсуфицијенцијом, и након шестомесечне надокнаде није било статистички значајног пада нивоа нефрина ни у једној групи. Табела 31.

Табела 31. Апсолутне и кориговане концентрације нефрина у урину и концентрација нефрина у крви, у односу на ниво витамина *D* на почетку испитивања.

Витамин <i>D</i> :	Пре супституције	Након 6 месеци супституције	<i>p</i> вредност
	Нефрин - урин (<i>pg/mL</i>)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Дефицијенција	571,50 (290,00-1064,75)	501,00 (293,50-621,25)	$p = 0,017^{**}$
Инсуфицијенција	459,50 (285,00-596,75)	542,00 (293,75-1115,75)	$p = 0,626^{**}$
<i>p</i> вредност	$p = 0,350^*$	$p = 0,803^*$	
	Нефрин - урин коригована конц. (<i>ng/gU_{Cr}</i>)		
Дефицијенција	565,08 (328,02-716,48)	454,58 (308,18-671,96)	$p = 0,036^{**}$
Инсуфицијенција	399,55 (299,04-646,03)	460,79 (254,65-963,17)	$p = 0,848^{**}$
<i>p</i> вредност	$p = 0,268^*$	$p = 0,660^*$	
Витамин <i>D</i> :	Нефрин - крв (<i>pg/mL</i>)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
	Дефицијенција	398,50 (280,25-7783,25)	
Инсуфицијенција	148,00 (0,00-582,75)	567,00 (290,25-3762,50)	$p = 0,006^{**}$
<i>p</i> вредност	$p = 0,055^*$	$p = 0,229^*$	

*- *Mann-Whitney U test*; **- *Wilcoxon Signed Ranks test*; *IQR*- интерквартилни опсег: 25-75 перцентил

4.10.6. *TGF-β1* у односу на ниво витамина *D* у крви на почетку студије

Ниво апсолутних и коригованих концентрација *TGF-β1* у урину на почетку испитивања је виши код пацијената са дефицијенцијом витамина *D* у односу на пацијенте

са инсуфицијенцијом, али као и код нефрина после надокнаде витамина *D* у овој групи имамао статистички значајан пад апсолутних концентрација *TGF-β1* са 55,00 *pg/mL* (48,25-61,75) на 50,50 *pg/mL* (43,00-58,75) ($p = 0,001$), и значајан пад коригованих концентрација *TGF-β1* са 57,83 *ng/gUCr* (49,56-64,80) на 54,52 *ng/gUCr* (43,95-64,77) ($p = 0,018$). Није било статистички значајне разлике апсолутних и коригованих концентрација *TGF-β1* у урину између група ни на почетку студије ни на крају. Табела 32.

TGF-β1 у крви је такође вишег нивоа на почетку испитивања у групи пацијената са дефицијенцијом витамина *D* у односу на групу са инсуфицијенцијом, и као код нефрина након шестомесечне супституције имамо у групи пацијената са инсуфицијенцијом витамина *D* статистички значајан пораст нивоа *TGF-β1*. Табела 32.

Табела 32. Апсолутне и кориговане концентрације *TGF-β1* у урину и концентрација *TGF-β1* у крви у односу на ниво витамина *D* на почетку испитивања.

Витамин <i>D</i> :	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	<i>p</i> вредност
	<i>TGF-β1</i> - урин (<i>pg/mL</i>)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Дефицијенција	55,00 (48,25-61,75)	50,50 (43,00-58,75)	$p = 0,001^{**}$
Инсуфицијенција	52,50 (47,75-66,25)	50,00 (47,00-67,50)	$p = 0,363^{**}$
<i>p</i> вредност	$p = 0,873^*$	$p = 0,338^*$	
<i>TGF-β1</i> - урин коригована конц. (<i>ng/gUCr</i>)			
Дефицијенција	57,83 (49,56-64,80)	54,52 (43,95-64,77)	$p = 0,018^{**}$
Инсуфицијенција	54,70 (45,84-71,63)	54,05 (49,50-67,16)	$p = 0,355^{**}$
<i>p</i> вредност	$p = 0,903^*$	$p = 0,476^*$	
Витамин <i>D</i> :	<i>TGF-β1</i> - крв (<i>pg/mL</i>)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
	Дефицијенција	48,00 (37,00-69,00)	
Инсуфицијенција	44,50 (38,75-62,00)	60,50 (47,00-88,25)	$p = 0,044^{**}$
<i>p</i> вредност	$p = 0,818^*$	$p = 0,013^*$	

*- *Mann-Whitney U test*; **- *Wilcoxon Signed Ranks test*; *IQR*- интерквартилни опсег: 25-75 перцентил

4.10.7. *VEGF-A* у односу на ниво недостатака витамина *D* на почетку студије

Као и код претходна два биомаркера, виши ниво апсолутних концентрација *VEGF-A* у урину на почетку испитивања имали су пацијенти са дефицијенцијом витамина *D*. Након шестомесечне надокнаде витамина *D* у обадве групе пацијената имамо статистички значајан пад апсолутних и коригованих концентрација *VEGF-A*, с тим што је у групи

пацијената са дефицијенцијом витамина *D*, ниво апсолутних концентрација на крају испитивања нижи у односу на пацијенте са инсуфицијенцијом, иако је њихов ниво на почетку испитивања био више. Табела 28.

Пацијенти са дефицијенцијом витамина *D* на почетку испитивања су имали виши ниво *VEGF-A* у крви у односу на пацијенте са инсуфицијенцијом, и након супституције није било статистички значајног снижења вредности. Табела 33.

Табела 33. Апсолутне и кориговане концентрације *VEGF-A* у урину и концентрација *VEGF-A* у крви у односу на ниво витамина *D* на почетку испитивања.

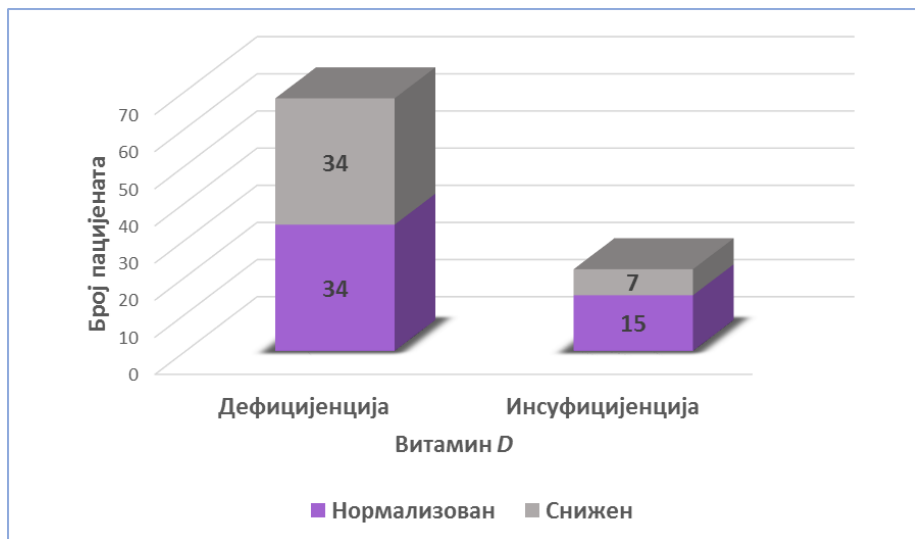
Витамин <i>D</i> :	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	<i>p</i> вредност
	<i>VEGF-A</i> - урин (<i>pg/mL</i>)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Дефицијенција	54,50 (43,75-59,00)	26,00 (22,50-38,50)	<i>p</i> < 0,001**
Инсуфицијенција	53,00 (44,75-83,25)	26,50 (24,00-44,25)	<i>p</i> = 0,004**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0,550*	<i>p</i> = 0,599*	
	<i>VEGF-A</i> - урин коригована конц. (<i>ng/gU_{Cr}</i>)		
Дефицијенција	54,08 (43,33-64,80)	27,65 (24,65-40,11)	<i>p</i> < 0,001**
Инсуфицијенција	56,89 (44,56-98,33)	28,18 (27,42-41,70)	<i>p</i> = 0,005**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0,698*	<i>p</i> = 0,488*	
	<i>VEGF-A</i> - крв (<i>pg/mL</i>)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Дефицијенција	39,00 (32,00-51,75)	40,00 (31,00-49,00)	<i>p</i> = 0,937**
Инсуфицијенција	35,00 (28,25-38,25)	31,50 (22,75-49,00)	<i>p</i> = 1,000**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0,052*	<i>p</i> = 0,132*	

*- *Mann-Whitney U test*; **- *Wilcoxon Signed Ranks test*; *IQR*- интерквартилни опсег: 25-75 перцентил

4.11. Анализа резултата у односу на ниво витамина *D* у крви на крају студије

Анализирали смо какав је утицај на резултате имао ниво витамина *D* на крају испитивања. Од 68 пацијената са дефицијенцијом витамина *D* на почетку студије њих 34 (50.00%) је након шестомесечне надокнаде нормализовало ниво витамина *D*, док је код 34 (50.00%) пацијента ниво остао снижен. Од 22 пацијента који су на почетку студије имали инсуфицијенцију витамина *D*, њих 15 (68.18%) је након шестомесечне супституције нормализовало витамин *D*, а код 7 (31.81%) пацијената ниво је остао снижен. Графикон 12.

Графикон 12. Дистрибуција пацијената у односу на почетни ниво витамина *D* (инсуфицијенција/дефицијенција) и ниво витамина *D* након шестомесечне надокнаде (нормализован/снижен)- *McNemar test*; $p = 0,010$



У односу на ниво витамина *D* у крви након шестомесечне супституције пацијенте смо поделили у две групе: 1. Група – пацијенти који су на крају испитивања нормализовали ниво витамина *D* у крви, 2. Група – пацијенти код којих је на крају испитивања ниво витамина *D* остао снижен. Поред резултата на крају студије упоредили смо и њихове резултате на почетку испитивања.

4.11.1. Параметри инфламације и гликорегулације у односу на ниво витамина *D* у крви на крају студије

Пацијенти који су на крају студије имали ниво витамина *D* у референтним границама статистички значајно су снизили ниво *CRP*-а на крају студије у односу на ниво на почетку студије ($p < 0,001$). Ти пацијенти су имали ниже вредности *CRP*-а на почетку и на крају студије у односу на пацијенте код којих је ниво витамина *D* остао снижен на крају студије, али без статистичке значајности у разлици вредности између група. Табела 34.

Пацијенти код којих је на крају студије ниво витамина *D* био у референтним границама, имали су нумерички ниже вредности (али без статистичке значајности у разлици) јутарње гликемије како пре супституције тако и по завршетку надокнаде у односу на пацијенте код којих је ниво витамина *D* остао снижен на крају студије. Пацијенти из обадве групе су имали статистички значајно ниже вредности јутарње гликемије на крају студије у односу на вредности на почетку студије. Табела 34.

Пацијенти код којих је на крају студије ниво витамина *D* био у референтним границама, имали су статистички значајно ниже вредности *HbA1c* на почетку испитивања у односу на пацијенте код којих је ниво витамина *D* на крају студије остао снижен ($p = 0,041$). У обадве групе пацијената ниво *HbA1c* на крају испитивања је статистички значајно нижи у односу на вредности на почетку студије. Табела 34.

Табела 34. Ниво *CRP*-а, јутарње гликемије и *HbA1c* пре и након шестомесечне надокнаде витамина *D*, у односу на ниво витамина *D* на крају студије

Витамин <i>D</i> :	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	<i>p</i> вредност
	Ц реактивни протеин (<i>mg/L</i>)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Нормализован	1,50 (0,98-2,25)	1,22 (0,69-2,05)	$p < 0,001^{**}$
Снижен	1,62 (0,97-2,72)	1,30 (0,94-3,10)	$p = 0,496^{**}$
<i>p</i> вредност	$p = 0,939^*$	$p = 0,195^*$	
Витамин <i>D</i> :	Гликемија (<i>mmol/L</i>)		<i>p</i> вредност
	Медијана (<i>IQR</i>)		
	Нормализован	8,30 (6,70-10,05)	
Снижен	8,40 (7,40-10,15)	8,00 (7,05-8,55)	$p = 0,001^{**}$
<i>p</i> вредност	$p = 0,441^*$	$p = 0,894^*$	
Витамин <i>D</i> :	Гликозилирани хемоглобин (%)		<i>p</i> вредност
	Медијана (<i>IQR</i>)		
	Нормализован	7,10 (6,35-7,80)	
Снижен	7,80 (6,70-8,60)	7,10 (6,50-7,90)	$p < 0,001^{**}$
<i>p</i> вредност	$p = 0,041^*$	$p = 0,258^*$	

*- *Mann-Whitney U test*; **- *Wilcoxon Signed Ranks test*; *IQR*- интерквартилни опсег: 25-75 перцентил

4.11.2. Азотне материје и клиренс креатинина у односу на ниво витамина *D* у крви на крају студије

Пацијенти који су на крају студије имали ниво витамина *D* у референтним границама, на почетку студије су имали нижи ниво серумског креатинина у односу на пацијенте са сниженим нивоом витамина *D* на крају студије, али без статистичке значајности у разлици. Код пацијената у обадве групе ниво креатинина статистички је значајно нижи након шестомесечне супституције. Табела 35.

Клиренс креатинина је у групи пацијената који су на крају стаудије имали ниво витамина *D* у референтним границама на почетку студије био виши него у групи пацијената код којих је ниво витамина *D* на крају студије остао снижен, али је статистички значјан пораст серумског креатинин на крају студије забележен у групи пацијената са сниженим нивоом витамина *D* на крају студије ($p = 0,039$). Ниво клиренса креатинина између група није се статистички значајно разликовао ни на почетку ни на крају студије. Табела 35.

Ниво урее на почетку студије је нижи у групи пацијената која је на крају студије имала ниво витамина *D* у референтним границама. У обадве групе на крају студије имамо нумерички значајан пад вредности урее али само у групи пацијената код којих је ниво витамина *D* остао снижен и статистички значајан ($p = 0,007$). Ипак ниво урее између група се није статистички значајно разликовао ни на почетку ни на крају студије. Табела 35.

Табела 35. Вредности креатинина, клиренса креатинина и урее, пре и након шестомесечне надокнаде витамина *D*, у односу на ниво витамина *D* на крају студије

Витамин <i>D</i> :	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	<i>p</i> вредност
	Креатинин ($\mu\text{mol/L}$)		
	Медијана (IQR)		
Нормализован	81,00 (69,00-100,50)	81,00 (71,50-90,00)	$p = 0,037^{**}$
Снижен	82,00 (66,50-103,50)	80,00 (61,50-101,00)	$p = 0,033^{**}$
<i>p</i> вредност	$p = 0,935^*$	$p = 0,706^*$	
Витамин <i>D</i> :	Клиренс креатинина (mL/min)		
	Медијана (IQR)		
	Нормализован	72,30 (61,00-90,60)	
Снижен	66,60 (61,10-90,90)	77,80 (62,00-95,12)	$p = 0,039^{**}$
<i>p</i> вредност	$p = 0,789^*$	$p = 1,000^*$	
Витамин <i>D</i> :	Уреа (mmol/L)		
	Медијана (IQR)		
	Нормализован	6,70 (5,30-7,80)	
Снижен	7,15 (5,35-9,05)	6,20 (5,20-8,70)	$p = 0,007^{**}$
<i>p</i> вредност	$p = 0,176^*$	$p = 0,573^*$	

*- Mann-Whitney *U* test; **- Wilcoxon Signed Ranks test; IQR- интерквartilни опсег: 25-75 перцентил

4.11.3. Липидни статус у односу на ниво витамина *D* у крви на крају студије

Ниво укупног холестерола у крви је статистички значајно нижи на почетку студије у групи пацијената која је на крају студије имала ниво витамина *D* у референтним границама у односу на групу код које је ниво витамина *D* остао снижен ($p < 0,001$). На крају студије у

обадве групе пацијената имамо статистички значајно снижење нивоа укупног холестерола, са тим што је у групи пацијената са нормализованим витамином *D* ниво холестерола статистички значајно нижи у односу на групу са сниженим нивоом витамина *D* на крају студије. Табела 36.

Ниво триглицерида је на почетку испитивања за нијансу нижи у групи пацијената код којих је ниво витамина *D* на крају студије остао снижен, у обадве групе имамо статистички значајан пад вредности нивоа триглицерида на крају студије, са тим што је у групи пацијената са нормализованим нивоом витамином *D* на крају студије вредност за нијансу нижа. Разлика у нивоу триглицерида на почетку и на крају студије између група не показује статистичку значајност. Табела 36.

Табела 36. Ниво укупног холестерола и триглицерида у крви, пре и након шестомесечне надокнаде витамина *D*, у односу на ниво витамина *D* на крају студије

Витамин <i>D</i> :	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	<i>p</i> вредност
	Укупни холестерол (<i>mmol/L</i>)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Нормализован	4,87 (4,33-5,60)	4,40 (3,92-4,94)	<i>p</i> < 0,001**
Снижен	5,68 (5,04-6,43)	5,01 (4,48-5,71)	<i>p</i> < 0,001**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> < 0,001*	<i>p</i> = 0,008*	
Витамин <i>D</i> :	Триглицериди (<i>mmol/L</i>)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
	Нормализован	1,84 (1,42-2,52)	
Снижен	1,82 (1,57-3,16)	1,49 (1,34-2,24)	<i>p</i> < 0,001**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0,461*	<i>p</i> = 0,127*	

*- *Mann-Whitney U test*; **- *Wilcoxon Signed Ranks test*; *IQR*- интерквartilни опсег: 25-75 перцентил

4.11.4. Вредност 24-часовне протеинурије и *UACR* у односу на ниво витамина *D* у крви на крају студије

Ниво 24-часовне протеинурије и *UACR* су статистички значајно нижи на почетку студије у групи пацијената који су на крају студије имали ниво витамина *D* у референтним границама у односу на групу код које је ниво витамина *D* остао снижен (*p* < 0,001). На крају студије у обадве групе пацијената имамо статистички значајно снижење нивоа 24-часовне протеинурије и *UACR*, са тим што је у групи пацијената са нормализованим витамином *D* ниво 24-часовне протеинурије и *UACR* статистички значајно нижи у односу на групу са сниженим нивоом витамина *D* на крају студије. Табела 37.

Табела 37. Вредност 24-часовне протеинурије и *UACR* пре и након шестомесечне надокнаде витамина *D*, у односу на ниво витамина *D* на крају студије

Витамин <i>D</i> :	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	<i>p</i> вредност
	24-часовна протеинурија (g/24h)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Нормализован	0,180 (0,081-0,290)	0,100 (0,050-0,185)	<i>p</i> < 0,001**
Снижен	0,605 (0,134-1,142)	0,300 (0,087-0,805)	<i>p</i> = 0,004**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> < 0,001*	<i>p</i> < 0,001*	
Витамин <i>D</i> :	<i>UACR</i> (mg/g)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
	Нормализован	81,90 (27,30-123,40)	
Снижен	314,20 (49,90-594,60)	138,00 (28,25-387,10)	<i>p</i> = 0,003**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> < 0,001*	<i>p</i> < 0,001*	

*- *Mann-Whitney U test*; **- *Wilcoxon Signed Ranks test*; *UACR*- албумин/креатинин однос у урину; *IQR*-интерквartilни опсег: 25-75 перцентил

4.11.5. Нефрин у урину и крви у односу на ниво витамина *D* у крви на крају студије

Након завршене шестомесечне супституције витамина *D* анализирали смо ниво апсолутних и коригованих концентрација нефрина у урину и ниво нефрина у крви у зависности да ли је на крају студије ниво витамина *D* био у референтним границама, или је остао снижен. Анализирани су нивои на почетку студије и на крају студије. Ниво апсолутних концентрација нефрина је на почетку и на крају студије био виши у групи пацијената који су на крају студије имали витамин *D* у референтним границама у односу на пацијенте који код којих је ниво витамина *D* остао снижен, али разлика није била статистички значајна. Такође ниво нефрина на крају студије снижен је у обадве групе у односу на почетне вредност, али без статистичке значајности. Табела 38.

Кориговане концентрације нефрина у урину су биле више на почетку испитивања код пацијената код којих је ниво витамина *D* на крају студије остао снижен, али су у овој групи на крају испитивања кориговане концентрације ниже у односу на пацијенте са нормализованим нивоом витамина *D*. Нема статистички значајне разлике између групу нити између вредности на почетку и на крају студије. Табела 38.

Концентрација нефрина у крви је виша како на почетку испитивања тако и на крају испитивања у групи пацијената са нивоом витамина *D* у референтним границама на крају студије.

Табела 38. Апсолутне и кориговане концентрације нефрина у урину и концентрација нефрина у крви у односу на ниво витамина *D* на крају испитивања.

Витамин <i>D</i> :	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	<i>p</i> вредност
	Нефрин - урин (<i>pg/mL</i>)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Нормализован	574,00 (287,00-625,00)	532,00 (295,00-630,50)	<i>p</i> = 0,459**
Снижен	567,00 (286,50-972,50)	490,00 (291,50-599,00)	<i>p</i> = 0,075**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0,939*	<i>p</i> = 0,476*	
	Нефрин – урин коригована конц. (<i>ng/gU_{Cr}</i>)		
Нормализован	528,57 (328,02-654,39)	510,94 (292,96-709,24)	<i>p</i> = 0,532**
Снижен	583,35 (309,65-907,34)	451,59 (291,87-631,27)	<i>p</i> = 0,053**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0,849*	<i>p</i> = 0,513*	
	Нефрин - крв (<i>pg/mL</i>)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Нормализован	560,00 (0,00-16415,00)	980,00 (287,00-10562,50)	<i>p</i> = 0,940**
Снижен	341,00 (137,00-848,00)	623,00 (292,00-4848,00)	<i>p</i> = 0,001**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0,526*	<i>p</i> = 0,637*	

*- Mann-Whitney *U* test; **- Wilcoxon Signed Ranks test; *IQR*- интерквартилни опсег: 25-75 перцентил

4.11.6. TGF-β1 у урину и крви у односу на ниво витамина *D* у крви на крају студије

Ниво апсолутних и коригованих концентрација *TGF-β1* у урину је на почетку испитивања био нижи у групи пацијената код којих је ниво витамина *D* остао снижен на крају испитивања. Након завршене надокнаде у обадве групе пацијената имамо статистички значајно ниже нивое апсолутних концентрација *TGF-β1* у урину, али су нивои у групи пацијената са сниженим нивоом витамина *D* на крају испитивања статистички значајно нижи (*p* = 0,004). Табела 39.

Ниво *TGF-β1* у крви је на почетку испитивања нижи у групи пацијената са сниженим нивоом витамина *D* на крају студије у односу на пацијенте са нормализованим нивоом витамина *D* на крају студије. Након шестомесечне надокнаде у групи пацијената са витамином *D* у референтним границама на крају испитивања имамо нумерички значајан пад нивоа са 54,00 *pg/mL* (46,00-75,50) на 48,00 *pg/mL* (38,50-52,00) али без статистичке значајности (*p* = 0,276), док у групи пацијената са сниженим нивоом витамина *D* на крају испитивања немамо пад вредности након супституције витамина *D*. Табела 39.

Табела 39. Апсолутне и кориговане концентрације *TGF-β1* у урину и концентрација *TGF-β1* у крви у односу на ниво витамина *D* на крају испитивања

Витамин <i>D</i> :	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	<i>p</i> вредност
	<i>TGF-β1</i> - урин (pg/mL)		
	Медијана (IQR)		
Нормализован	58,00 (48,50-66,50)	54,00 (49,00-60,00)	<i>p</i> = 0,018**
Снижен	52,00 (47,50-58,00)	49,00 (39,00-53,50)	<i>p</i> = 0,022**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0,030*	<i>p</i> = 0,004*	
	<i>TGF-β1</i> - урин коригована конц. (ng/gU _{Cr})		
Нормализован	60,19 (52,54-70,49)	56,50 (49,89-67,67)	<i>p</i> = 0,134**
Снижен	51,74 (45,94-64,13)	47,48 (39,98-63,01)	<i>p</i> = 0,054**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0,056*	<i>p</i> = 0,027*	
	<i>TGF-β1</i> - крв (pg/mL)		
	Медијана (IQR)		
Нормализован	54,00 (46,00-75,50)	48,00 (38,50-52,00)	<i>p</i> = 0,276**
Снижен	41,00 (35,00-64,50)	50,00 (43,00-65,00)	<i>p</i> = 0,610**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0,012*	<i>p</i> = 0,286*	

*- Mann-Whitney U test; **- Wilcoxon Signed Ranks test; IQR- интерквartilни опсег: 25-75 перцентил

4.11.7. VEGF-A у урину и крви у односу на ниво витамина *D* у крви на крају студије

Ниво апсолутних и коригованих концентрација *VEGF-A* у урину је на почетку испитивања био нижи код пацијената који су на крају испитивања имали ниво витамина *D* у референтним границама у односу на пацијенте код којих је ниво витамина *D* остао снижен. Након завршене супституције апсолутне и кориговане концентрације *VEGF-A* у урину статистички су значајно снижене у обадве групе, при чему су вредности у групи пацијената која је на крају студије имала витамин *D* у референтним границама ипак ниже, али без статистичке значајности у разлици. Табела 40.

Ниво *VEGF-A* у крви на почетку испитивања је у групи пацијената који су на крају студије имали витамин *D* у референтним границама нижи у односу на пацијенте код којих је ниво витамина *D* остао снижен. Након завршене супституције ниво *VEGF-A* у крви је у групи пацијената са витамином *D* у референтним границама на крају студије нумерички нижи, али без статистичке значајности. Такође на крају студије ниво *VEGF-A* у крви је у групи пацијената са нормализованим нивоом витамина *D* 35,00 pg/mL (23,50-48,50) нижи у односу на групу пацијента код којих је ниво витамина *D* остао снижен 42,00 (34,50-49,50) - *p* = 0,052, али без статистичке значајности. Табела 40.

Табела 40. Апсолутне и кориговане концентрације *VEGF-A* у урину и концентрација *VEGF-A* у крви у односу на ниво витамина *D* на крају испитивања

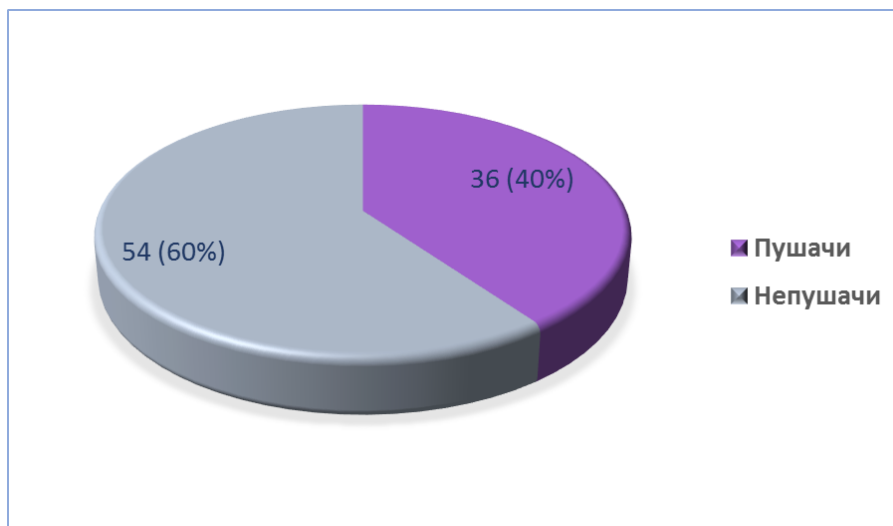
Витамин <i>D</i> :	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	<i>p</i> вредност
	<i>VEGF-A</i> - урин (<i>pg/mL</i>)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Нормализован	54,00 (42,25-72,00)	26,00 (23,25-43,00)	<i>p</i> < 0,001**
Снижен	54,50 (47,00-59,00)	27,50 (23,50-39,25)	<i>p</i> < 0,001**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0,729*	<i>p</i> = 0,969*	
	<i>VEGF-A</i> - урин коригована конц. (<i>ng/gU_{Cr}</i>)		
Нормализован	51,84 (42,69-64,43)	27,93 (24,88-37,85)	<i>p</i> < 0,001**
Снижен	58,69 (43,90-69,61)	28,91 (26,59-40,52)	<i>p</i> < 0,001**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0,423*	<i>p</i> = 0,483*	
	<i>VEGF-A</i> - крв (<i>pg/mL</i>)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Нормализован	37,00 (30,00-51,00)	35,00 (23,50-48,50)	<i>p</i> = 0,527**
Снижен	38,00 (32,50-49,50)	42,00 (34,50-49,50)	<i>p</i> = 0,631**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0,749*	<i>p</i> = 0,052*	

*- *Mann-Whitney U test*; **- *Wilcoxon Signed Ranks test*; *IQR*- интерквартилни опсег: 25-75 перцентил

4.12. Анализа резултата у односу на пушачки статус пацијената

Све пацијенте смо на основу пушаког статуса, неvezано за вредност протеинурије на почетку студије поделили у две групе. Прву групу чине пацијенти који не пуше цигарете, а другу групу чине пацијенти који пуше цигарете. У првој групи било је 54 (60.00%) пацијента, а у другој групи 36 (40.00%) пацијената. Графикон 13. Анализирани су сви резултати на почетку студије и након шестомесечне надокнаде витамина *D*.

Графикон 13. Дистрибуција пацијената у односу на пушачки статус



4.12.1. Социодемографске и антропометријске карактеристике пацијената у односу на пушачки статус

У групи пацијената који не пуше цигарете било је 27 (50.00%) пацијената мушког пола и 27 (50.00%) женског пола, док је у групи пацијената који пуше цигарете био 21 (58.33%) пацијент мушког пола, и 15 (41.67%) пацијената женског пола. Табела 36.

Просечна животна доб у групи пацијената који не пуше цигарете износи 67.00 (62.00-70.00) година, док у групи пацијената који пуше цигарете износи 60.00 (54.75-63.75) година. Животна доб, односно старост у групи пацијената који пуше цигарете је статистички значајно нижа у односу на групу пацијената који не пуше цигарете ($p < 0.001$). Табела 41.

Табела 41. Социодемографске карактеристике пацијената у односу на пушачки статус

Пушачки статус:	Пол: Мушкарци/Жене	Старост; године
	Број (%)	Медијана (IQR)
Непушачи	27 (50.00) / 27 (50.00)	67.00 (62.00-70.00)
Пушачи	21 (58.33) / 15 (41.67)	60.00 (54.75-63.75)
p вредност	$p = 0.438^*$	$p < 0.001^{**}$

*- *Chi-square test*; **- *Mann-Whitney U test*; IQR- интерквartilни опсег: 25-75 перцентил

Главне антропометријске карактеристике пацијената су приказане у табели 42. Пацијенти из групе непушача су имали статистички значајно нижу телесну висину ($p = 0.047$) и тежину ($p = 0.030$), али без значајније разлике у вредности *BMI*. Табела 42.

Табела 42. Антропометријске карактеристике пацијената у односу на пушачки статус

Пушачки статус:	Телесна висина; <i>m</i>	Телесна маса; <i>kg</i>	<i>BMI</i> ; <i>kg/m²</i>
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Непушачи	1.70 (1.68-1.78)	82.00 (77.00-89.00)	27.65 (25.85-29.57)
Пушачи	1.74 (1.68-1.83)	89.00 (79.63-91.75)	27.95 (26.60-30.10)
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.047*	<i>p</i> = 0.030*	<i>p</i> = 0.387*

*- *Mann-Whitney U test*; *BMI* - Индекс телесне масе; *IQR*- интерквartilни опсег: 25-75 перцентил

Разлика у дужини еволуције ДМ тип 2 између група није статистички значајна, просечна дужина трајања ДМ тип 2 у групи непушача износи 11.50 (8.00-18.00) година, а у групи пушача 10.00 (5.25-15.75) година. Табела 43.

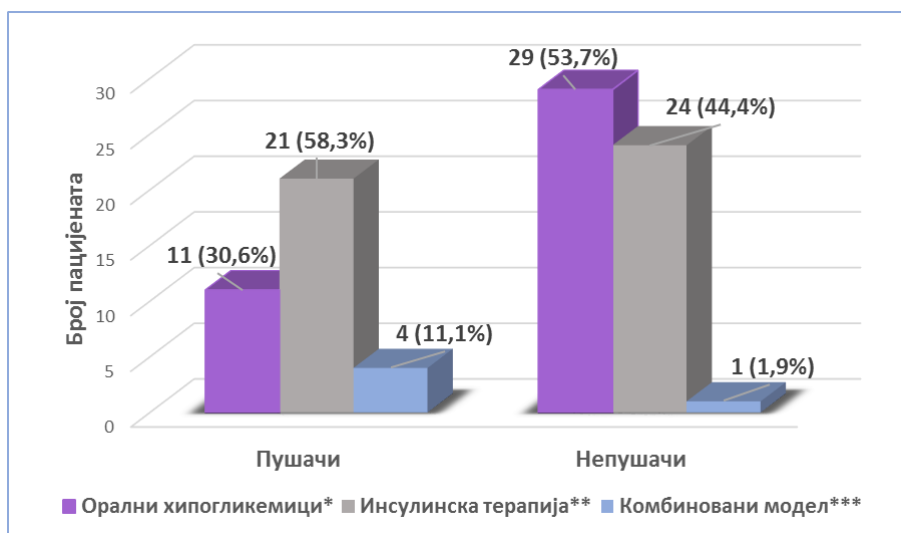
Табела 43. Укупно трајање болести у односу на пушачки статус пацијената

Пушачки статус:	Трајање дијабетес мелитуса; године
	Медијана (<i>IQR</i>)
Непушачи	11.50 (8.00-18.00)
Пушачи	10.00 (5.25-15.75)
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.159*

*- *Mann-Whitney U test*; *IQR*- интерквartilни опсег: 25-75 перцентил

По питању терапије коју пацијенти користе за контролу гликемије у склопу ДМ тип 2, у групи непушача 29 (53.70%) пацијената користи оралне хипогликемике, 24 пацијента (44.44%) инсулинску терапију, а свега 1 пацијент (1.85%) има комбиновани модалитете лечења. У групи пушача 11 пацијената (30.55%) користи оралне хипогликемике, 21 пацијент (58.33%) користи инсулинску терапију, а 4 пацијента (11.11%) имају комбиновани модалитет лечења. Графикон 14.

Графикон 14. Дистрибуција пацијената према пушаком статусу у односу на врсту терапије за дијабетес мелитус



Chi-square test; *- $p = 0.051$; ** - $p = 0.282$; *** - $p = 0.159$

4.12.2. Концентрација витамина *D* у односу на пушачки статус пацијената

Група пацијената који не пуше цигарете су имали нижи ниво витамина *D* на почетку студије 36.79 nmol/L (28.30-49.50) у односу на пацијенте који пуше цигарете 42.62 nmol/L (28.69-51.11), након шестомесечне надокнаде витамина *D* у обадве групе је дошло до статистички значајног пораста нивоа витамина *D* ($p < 0.001$). Ниво витамина *D* је након завршене супституције нумерички виши у групи непушача, мада разлика у нивоу витамина *D* између група на почетку и на крају студије није статистички значајна. Табела 44.

Табела 44. Ниво витамина *D* у крви у односу на пушачки статус пацијената

Пушачки статус:	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	<i>p</i> вредност
	Витамин <i>D</i> (nmol/L)		
	Медијана (IQR)		
Непушачи	36.79 (28.30-49.50)	77.46 (67.73-95.28)	$p < 0.001^{**}$
Пушачи	42.62 (28.69-51.11)	76.52 (68.24-91.86)	$p < 0.001^{**}$
<i>p</i> вредност	$p = 0.618^*$	$p = 0.767^*$	

* - *Mann-Whitney U test*; ** - *Wilcoxon Signed Ranks test*; IQR - интерквartilни опсег: 25-75 перцентил

У групи непушача имамо процентуално виши пораст нивоа витамина *D* 117.52% (58.10-165.99) у односу на групу пушача 98.36 % (50.80-148.97), али без статистичке значајности. Табела 45.

Табела 45. Процентуално повећање нивоа витамина *D* у крви након надокнаде у односу на базалне вредности код пушача и непушача

Пушачки статус:	Повећање нивоа витамина <i>D</i> у крви (%)
	Медијана (<i>IQR</i>)
Непушачи	117.52 (58.10-165.99)
Пушачи	98.36 (50.80-148.97)
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.166*

*- *Mann-Whitney U test*; *IQR*- интерквartilни опсег: 25-75 перцентил

4.12.3. Основни биохемијски параметри у односу на пушачки статус пацијената

На почетку испитивања пацијенти из групе непушача имали су статистички значајно нижи ниво хемоглобина у односу на пацијенте из групе пушача ($p = 0.026$), а након шестомесечне терапије ниво хемоглобина је само у групи непушача статистички значајно виши ($p = 0.049$). Табела 46.

На почетку студије серумски креатинин је у групи непушача нижи у односу на пацијенте који пуше цигарете али разлика је без статистичке значајности, док на крају испитивања статистички значајно ниже вредности у односу на почетак студије имају само пацијенти у групи пушача ($p = 0.012$). Табела 46.

Клиренс креатинина је на почетку студије виши у групи непушача у односу на пушаче али разлика нема статистичку значајност, док је на крају студије ниво клиренса креатинина статистички је значајно виши у обадве групе у односу на почетак студије. Табела 46.

Ниво урее у крви је на почетку студије нижи код пацијената који не пуше цигарете, у односу на пацијенте који пуше цигарете, али је на крају студије ниво урее статистички значајно нижи само у групи пушача ($p = 0.012$). Табела 46.

Ниво албумина у крви је на почетку студије нижи у групи пацијената који не пуше цигарете у односу на пацијенте који пуше цигарете али без статистичке значајности, и само у овој групи на крају студије имамо статистички значајан пораст нивоа албумина ($p < 0,001$). Табела 46.

Ниво гвожђа у крви је на почетку студије нижи у групи пацијенат који не пуше цигарете у односу на пацијенте који пуше цигарете али разлика је без статистичке значајности, у обадве групе након завршене надокнаде витамина *D* није било статистички значајног пораста нивоа гвожђа. Табела 46.

Табела 46. Ниво хемоглобина, креатинина, урее, албумина и гвожђа у крви и клиренса креатинина, пре и након надокнаде витамина *D* у односу на пушачки статус пацијената.

Пушачки статус:	Пре терапије	6 месеци након терапије	<i>p</i> вредност
	Хемоглобин (g/L)		
	Медијана (IQR)		
Непушачи	128.50 (120.00-141.00)	129.50 (122.75-143.25)	<i>p</i> = 0.049**
Пушачи	138.00 (126.25-144.00)	136.00 (126.25-145.00)	<i>p</i> = 0.869**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.026*	<i>p</i> = 0.110*	
Пушачки статус:	Креатинин ($\mu\text{mol/L}$)		
	Медијана (IQR)		
	Непушачи	81.00 (64.75-105.00)	
Пушачи	83.00 (75.25-89.75)	80.00 (72.00-88.50)	<i>p</i> = 0.012**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.358*	<i>p</i> = 0.931*	
Пушачки статус:	Клиренс креатинина (mL/min)		
	Медијана (IQR)		
	Непушачи	72.95 (60.87-90.45)	
Пушачи	69.00 (61.60-91.00)	77.90 (66.70-90.60)	<i>p</i> = 0.023**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.602*	<i>p</i> = 0.326*	
Пушачки статус:	Уреа (mmol/L)		
	Медијана (IQR)		
	Непушачи	6.25 (5.10-8.33)	
Пушачи	7.01 (5.92-8.85)	6.25 (5.30-8.07)	<i>p</i> = 0.012**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.109*	<i>p</i> = 0.607*	
Пушачки статус:	Албумин (g/L)		
	Медијана (IQR)		
	Непушачи	41,00 (40,00-43,00)	
Пушачи	42,00 (40,25-44,00)	42,50 (39,25-44,00)	<i>p</i> = 0,867**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0,450*	<i>p</i> = 0,703*	
Пушачки статус:	Гвожђе ($\mu\text{mol/L}$)		
	Медијана (IQR)		
	Непушачи	14,00 (12,00-18,25)	
Пушачи	15,00 (13,25-17,00)	15,00 (12,00-17,00)	<i>p</i> = 0,478**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0,406*	<i>p</i> = 0,817*	

*- Mann-Whitney U test; **- Wilcoxon Signed Ranks test; IQR- интерквартилни опсег: 25-75 перцентил

4.12.4. Параметри инфламације и гликорегулације у односу на пушачки статус

Ниво *CRP-a* на почетку испитивања је био нижи у групи пацијената који не пуше цигарете у односу на пацијенте који пуше цигарете али је разлика без статистичке значајности. Након спроведене надокнаде витамина *D* у обадве групе имао статистички значајно снижење нивоа *CRP-a*, али разлика у нивоу између група није статистички значајна. Табела 47.

Што се тиче параметара гликорегулације, ниво јутарње гликемије и *HbA1c* су на почетку испитивања такође били нижи код пацијената који не пуше цигарете, након шестомесечне надокнаде и ниво јутарње гликемије и *HbA1c* су статистички значајно нижи у обадве групе пацијената. Табела 47. Међутим када је у питању разлика нивоа *HbA1c* између две групе, ниво *HbA1c* је у групи пацијената који не пуше цигарете статистички значајно нижи и на почетку испитивања ($p = 0.015$) и након завршене надокнаде ($p = 0.012$). Разлика у нивоу јутарње гликемије између група не показује статистичку значајност. Табела 47.

Табела 47. Ниво *CRP-a*, јутарње гликемије и *HbA1c* пре и након шестомесечне терапије витамином *D* у односу на пушачки статус пацијената

Пушачки статус:	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	<i>p</i> вредност
	<i>CRP (mg/L)</i>		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Непушачи	1.37 (0.98-3.07)	1.37 (0.90-3.48)	$p = 0.005^{**}$
Пушачи	1.60 (0.98-1.89)	1.21 (0.90-1.64)	$p = 0.002^{**}$
<i>p</i> вредност	$p = 0.226^*$	$p = 0.175^*$	
Пушачки статус:	Гликемија (<i>mmol/L</i>)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
	Непушачи	8.35 (6.70-9.75)	
Пушачи	8.60 (7.32-10.37)	8.15 (6.90-8.65)	$p = 0.001^{**}$
<i>p</i> вредност	$p = 0.468^*$	$p = 0.230^*$	
Пушачки статус:	Гликозилирани хемоглобин (%)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
	Непушачи	7.07 (6.47-7.82)	
Пушачи	8.00 (6.80-8.65)	7.25 (6.80-8.45)	$p < 0.001^{**}$
<i>p</i> вредност	$p = 0.015^*$	$p = 0.012^*$	

*- *Mann-Whitney U test*; **- *Wilcoxon Signed Ranks test*; *IQR*- интерквartilни опсег: 25-75 перцентил

4.12.5. Липидни статус у односу на пушачки статус пацијената

Када је у питању липидни статус, ниво укупног холестерола и триглицерида у крви је у групи пацијената који не пуше цигарете на почетку студије био нижи у односу на пацијенте који пуше цигарете, али разлика без статистичке значајности. Након завршене супституције витамином *D* у обадве групе пацијената имамо статистички значајно ниже нивое укупног холестерола и триглицерида у крви ($p < 0.001$). Разлике у вредности укупног холестерола и триглицерида између две групе не показују статистичку значајност. Табела 48.

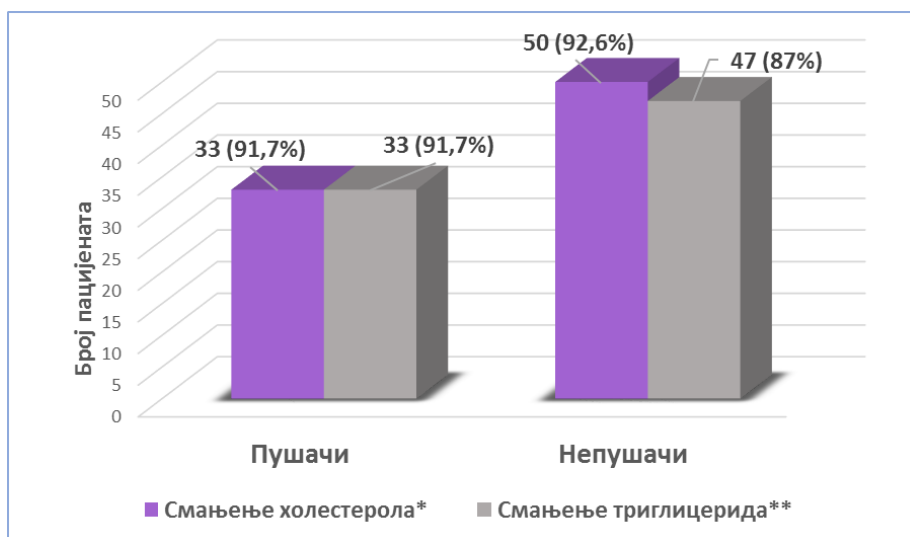
Табела 48. Ниво укупног холестерола и триглицерида у крви, пре и након шестомесечног терапије витамином *D*, у односу на пушачки статус пацијената

Пушачки статус:	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	<i>p</i> вредност
	Укупни холестерол (<i>mmol/L</i>)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Непушачи	5.20 (4.64-5.70)	4.60 (3.94-5.12)	$p < 0.001^{**}$
Пушачи	5.42 (4.43-6.65)	4.84 (4.19-5.60)	$p < 0.001^{**}$
<i>p</i> вредност	$p = 0.286^*$	$p = 0.166^*$	
Пушачки статус:	Триглицериди (<i>mmol/L</i>)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
	Непушачи	1.82 (1.45-2.63)	
Пушачи	1.86 (1.57-2.65)	1.41 (1.18-1.79)	$p < 0.001^{**}$
<i>p</i> вредност	$p = 0.587^*$	$p = 0.174^*$	

*- *Mann-Whitney U test*; **- *Wilcoxon Signed Ranks test*; *UACR*- албумин/креатинин однос у урину; *IQR*-интерквартилни опсег: 25-75 перцентил

Анализирали смо и дистрибуцију пацијената код којих је дошло до снижавања нивоа укупног холестерола и триглицерида након супституције витамина *D*, у групи која не пуши цигарете и групи која пуши цигарете. Тако да у групи непущача 50 (92.59%) пацијената је редуковало ниво укупног холестерола, 47 (87.00%) пацијената је редуковало ниво триглицерида. У групи пушача 33 пацијента (91.67%) су редуковала ниво укупног холестерола, 33 (91.67%) пацијента су редуковала ниво триглицерида. Графикон 15. Процентуално разлика између две групе када је у питању број пацијената који су редуковали ниво укупног холестерола је минимална, нешто виши проценат пацијената који су редуковали ниво триглицерида се налази у групи пушача. Графикон 15.

Графикон 15. Дистрибуција пацијената у односу на смањење укупног холестерола и триглицерида након терапије витамином *D* у односу на пушачки статус пацијената



Chi-square test; *- $p = 1.000$; ** - $p = 0.732$;

Упоредили смо и процентуално снижење нивоа укупног холестерола и триглицерида на крају студије у односу на вредности на почетку студије. Разлика у процентуалном снижењу укупног холестерола између група није статистички значајна, али када је у питању ниво триглицерида, пацијенти који пуше цигарете процентуално су статистички значајно више снижили ниво триглицерида у односу на пацијенте који не пуше цигарете. Табела 49.

Табела 49. Процентуално смањење укупног холестерола и триглицерида након надокнаде витамина *D* у односу на базалне вредности код пушача и непушача

Пушачки статус:	Смањење укупног холестерола (%)
	Медијана (<i>IQR</i>)
Непушачи	6.91 (2.27-18.70)
Пушачи	7.74 (2.52-23.86)
<i>p</i> вредност	$p = 0.515^*$
Пушачки статус:	Смањење триглицерида (%)
	Медијана (<i>IQR</i>)
Непушачи	12.66 (4.58-37.31)
Пушачи	21.20 (15.18-39.40)
<i>p</i> вредност	$p = 0.044^*$

*- *Mann-Whitney U test*; *IQR*- интерквartilни опсег: 25-75 перцентил

Корелирали смо ниво витамина *D* након шестомесечне надокнаде са нивоом укупног холестерола и триглицерида на крају студије и у групи пацијената који не пуше цигарете нисмо добили значајну корелацију. Табела 50.

Табела 50. Корелација нивоа витамина *D* у крви и нивоа укупног холестерола и триглицерида након шестомесечне надокнаде витамина *D* у групи непушача (*Spearman's rho*)

		Витамин <i>D</i>	Холестерол	Триглицериди
Витамин <i>D</i>	<i>r</i> коефицијент	1.000		
	<i>p</i> вредност			
Холестерол	<i>r</i> коефицијент	-0.097	1.000	
	<i>p</i> вредност	0.486		
Триглицериди	<i>r</i> коефицијент	-0.034	0.285	1.000
	<i>p</i> вредност	0.809	0.037	

Корелирали смо ниво витамина *D* након шестомесечне супституције са нивоом укупног холестерола и триглицерида на крају студије и у групи пацијената који пуше цигарете добили јаку негативну корелацију између нивоа витамина *D* и укупног холестерола ($r = -0.543$, $p = 0.001$). Табела 51.

Табела 51. Корелација нивоа витамина *D* у крви и нивоа укупног холестерола и триглицерида након шестомесечне надокнаде витамина *D* у групи пушача (*Spearman's rho*)

		Витамин <i>D</i>	Холестерол	Триглицериди
Витамин <i>D</i>	<i>r</i> коефицијент	1.000		
	<i>p</i> вредност			
Холестерол	<i>r</i> коефицијент	-0.543	1.000	
	<i>p</i> вредност	0.001		
Триглицериди	<i>r</i> коефицијент	-0.100	0.247	1.000
	<i>p</i> вредност	0.561	0.147	

4.12.6. *UACR* и 24-часовна протеинурија у односу на пушачки статус пацијената

По питању протеинурије, 24-часовна протеинурија и *UACR* су нижи на почетку испитивања у групи пацијената који не пуше цигарете, након завршене надокнаде витамина *D* ниво и 24-часовне протеинурије и *UACR* је статистички значајно нижи у обадве групе. Вредности 24-часовне протеинурије и *UACR* између две групе не показује статистички значајну разлику. Табела 52.

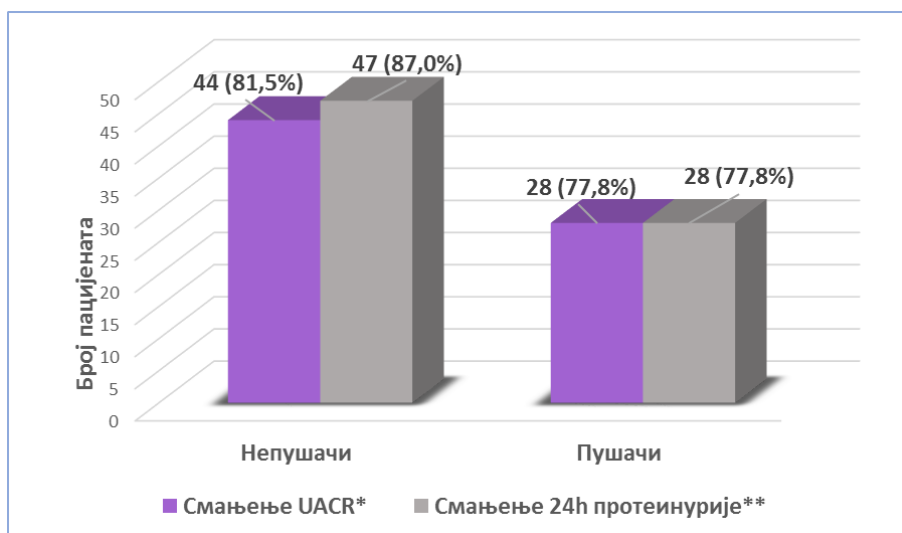
Табела 52. Ниво 24-часовне протеинурије и *UACR* пре и након шестомесечне надокнаде витамина *D* у односу на пушачки статус пацијената

Пушачки статус:	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	<i>p</i> вредност
	24-часовна протеинурија (g/24h)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Непушачи	0.203 (0.087-0.682)	0.113 (0.060-0.341)	<i>p</i> < 0.001**
Пушачи	0.251 (0.112-0.907)	0.156 (0.090-0.455)	<i>p</i> = 0.004**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.273*	<i>p</i> = 0.199*	
	<i>UACR</i> (mg/g)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Непушачи	88.30 (27.60-333.17)	37.85 (24.42-167.92)	<i>p</i> < 0.001**
Пушачи	112.90 (29.47-496.87)	64.85 (27.92-216.05)	<i>p</i> = 0.006**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.277*	<i>p</i> = 0.263*	

*- *Mann-Whitney U test*; **- *Wilcoxon Signed Ranks test*; *UACR*- албумин/креатинин однос у урину; *IQR*- интерквартилни опсег: 25-75 перцентил

Анализирали смо и дистрибуцију пацијената код којих је дошло до снижења нивоа 24-часовне протеинурије и *UACR* након надокнаде витамина *D*, у групи пацијената која не пуши цигарете и групи која пуши цигарете. Тако да је у групи непушача 47 (87.00%) пацијената редуковало 24-часовну протеинурију, а 44 (81.48%) пацијента су редуковала *UACR*. У групи пушача 28 (77.78%) пацијената је редуковало ниво 24-часовне протеинурије, и исто толико је редуковало ниво *UACR*. Графикон 16. Процентуално је нешто виши број пацијенат редуковао протеинурију у групи непушача у односу на пушаче. Графикон 16.

Графикон 16. Дистрибуција пацијената у односу на смањење 24-часовне протеинурије и *UACR* након надокнаде витамина *D* у односу на пушачки статус пацијената



Chi-square test; *- $p = 0.872$; ** - $p = 0.386$

Упоредили смо и процентуално снижење нивоа 24-часовне протеинурије и *UACR* на крају студије у односу на вредности на почетку студије и добили да је у групи непушача проценат снижења 24-часовне протеинурије и *UACR* виши у односу на групу пушача али разлика није статистички значајна. Табела 53.

Табела 53. Процентуално смањење 24-часовне протеинурије и *UACR* након надокнаде витамина *D* у односу на базалне вредности код пушача и непушача

Пушачки статус:	Смањење 24-часовне протеинурије (%)
	Медијана (<i>IQR</i>)
Непушачи	30.51 (13.15-51.21)
Пушачи	26.90 (17.47-38.19)
<i>p</i> вредност	$p = 0.499^*$
Пушачки статус:	Смањење <i>UACR</i> (%)
	Медијана (<i>IQR</i>)
Непушачи	31.24 (1.59-55.82)
Пушачи	27.03 (2.88-41.77)
<i>p</i> вредност	$p = 0.479^*$

* - *Mann-Whitney U test*; *IQR*- интерквartilни опсег: 25-75 перцентил

Након завршене шестомесечне надокнаде витамина *D*, корелирали смо ниво витамина *D* и вредности 24-часовне протеинурије, *UACR*, нивоа укупног холестерола и триглицерида. У групи пацијенат који не пуше цигарете добили смо негативну корелацију између нивоа

витамина *D* и 24-часовне протеинурије ($r = -0.419, p = 0.002$) и витамина *D* и *UACR* ($r = -0.453, p = 0.001$). Табела 54.

Корелирали смо и ниво 24-часовне протеинурије и *UACR* са нивоом укупног холестерола и триглицерида на крају студије у групи пацијената који не пуше цигарете и нисмо добили значајну корелацију између ових параметара. Табела 54.

Табела 54. Корелација нивоа витамина *D* у крви и 24-часовне протеинурије, *UACR*, укупног холестерола и триглицерида након шестомесечне надокнаде витамина *D* у групи непушача (*Spearman's rho*)

		Витамин D	Холестерол	Триглицериди	Протеинурија	<i>UACR</i>
Витамин D	<i>r</i> коефицијент	1.000				
	<i>p</i> вредност					
Холестерол	<i>r</i> коефицијент	-0.097	1.000			
	<i>p</i> вредност	0.486				
Триглицериди	<i>r</i> коефицијент	-0.034	0.285	1.000		
	<i>p</i> вредност	0.809	0.037			
Протеинурија	<i>r</i> коефицијент	-0.419	0.146	0.085	1.000	
	<i>p</i> вредност	0.002	0.291	0.541		
<i>UACR</i>	<i>r</i> коефицијент	-0.453	0.128	0.055	0.991	1.000
	<i>p</i> вредност	0.001	0.356	0.692	<0.001	

Након завршене шестомесечне примене витамина *D*, корелирали смо вредности витамина *D* и вредности 24-часовне протеинурије, *UACR*, нивоа укупног холестерола и триглицерида и у групи пацијената који пуше цигарете. Добили смо јаку негативну корелацију између нивоа витамина *D* и нивоа укупног холестерола ($r = -0.543, p < 0.001$). Корелирали смо и ниво 24-часовне протеинурије и *UACR* са нивоом укупног холестерола и триглицерида и добили јаку позитивну корелацију између 24-часовне протеинурије и укупног холестерола ($r = 0.503, p = 0.002$) и 24-часовне протеинурије и нивоа триглицерида ($r = 0.493, p = 0.002$). Такође смо добили позитивну корелацију између *UACR* и нивоа укупног холестерола ($r = 0.480, p = 0.003$), и између *UACR* и нивоа триглицерида ($r = 0.480, p = 0.003$). Табела 55.

Табела 55. Корелација нивоа витамина D у крви и 24-часовне протеинурије, UACR, укупног холестерола и триглицерида након шестомесечне надокнаде витамином D у групи пушача (*Spearman's rho*)

		Витамин D	Холестерол	Триглицериди	Протеинурија	UACR
Витамин D	r коефицијент	1.000				
	p вредност					
Холестерол	r коефицијент	-0.543	1.000			
	p вредност	0.001				
Триглицериди	r коефицијент	-0.100	0.247	1.000		
	p вредност	0.561	0.147			
Протеинурија	r коефицијент	-0.117	0.503	0.493	1.000	
	p вредност	0.495	0.002	0.002		
UACR	r коефицијент	-0.109	0.480	0.480	0.993	1.000
	p вредност	0.525	0.003	0.003	<0.001	

4.12.7. Нефрин у урину и крви у односу на пушачки статус пацијената

Анализирали смо ниво апсолутних концентрација нефрина у урину и коригованих концентрација нефрина у урину и ниво нефрина у крви на почетку студије и након завршене надокнаде витамина D у односу на пушачки статус пацијената. Ниво апсолутних концентрација нефрина у урину на почетку испитивања је био незнатно нижи у групи пацијената који пуше цигарете у односу на групу у којој пацијенти не пуше цигарете, али разлика је без статистичке значајности. Након завршене супституције ниво апсолутних концентрација нефрина у урину су ниже али без статистичке значајности у односу на почетне вредности. Такође разлика у вредностима на почетку и на крају студије између две групе нема статистичку значајност. Табела 56.

Кориговане концентрације нефрина у урину су на почетку студије више код пацијената који пуше цигарете. Након шестомесечне надокнаде витамина D, пацијенти који пуше цигарете имају нумерички значајан пад концентрацијен нефрина али без статистичке значајности, њихове кориговане концентрације су на крају студије ниже у одноцу на пацијенте који не пуше, такође без статистичке значајности. Табела 56.

Концентрација нефрина у крви и на почетку и на крају испитивања је нижа у групи пацијената који не пуше цигарете у односу на групу пацијената који пуше цигарете али разлика је без статистичке значајности, а ниво нефрина након шестомесечне студије расте у обадве групе, али такође без статистичке значајности. Разлика између нивоа две групе на почетку и на крају студије не показује статистичку значајност. Табела 56.

Табела 56. Апсолутне и кориговане концентрације нефрина у урину и концентрација нефрина у крви у односу на пушачки статус пацијената

Пушачки статус:	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	<i>p</i> вредност
	Нефрин - урин (<i>pg/mL</i>)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Непушачи	571.50 (285.00-616.50)	526.00 (295.75-617.75)	<i>p</i> = 0.355**
Пушачи	567.00 (296.00-1241.50)	355.50 (280.25-629.00)	<i>p</i> = 0.148**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.618*	<i>p</i> = 0.824*	
	Нефрин – урин коригована конц. (<i>ng/gU_{Cr}</i>)		
Непушачи	527.45 (323.90-657.99)	460.79 (313.21-662.79)	<i>p</i> = 0.230**
Пушачи	596.67 (309.07-1203.40)	406.59 (263.48-694.58)	<i>p</i> = 0.164**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.902*	<i>p</i> = 0.697*	
Пушачки статус:	Нефрин - крв (<i>pg/mL</i>)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Непушачи	295.50 (205.50-1107.50)	773.50 (279.25-4860.00)	<i>p</i> = 0.158**
Пушачи	468.00 (0.00-8215.75)	815.50 (365.00-15923.00)	<i>p</i> = 0.051**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.796*	<i>p</i> = 0.445*	

*- *Mann-Whitney U test*; **- *Wilcoxon Signed Ranks test*; *IQR*- интерквартилни опсег: 25-75 перцентил

4.12.8. *TGF-β1* у урину и крви у односу на пушачки статус пацијената

Анализирали смо ниво апсолутних концентрација *TGF-β1* у урину и коригованих концентрација *TGF-β1* у урину и ниво *TGF-β1* у крви на почетку студије и након завршене надокнаде витамина *D* у односу на пушачки статус пацијената. Ниво апсолутних и коригованих концентрација *TGF-β1* у урину на почетку испитивања је био статистички значајно нижи у групи пацијената који не пуше цигарете, док је на крају испитивања ниво апсолутних концентрација *TGF-β1* у урину снижен у обадве групе али статистички значајан пад имамо само у групу пацијената који пуше цигарете (*p* = 0.001). Табела 57.

Ниво *TGF-β1* у крви на почетку и на крају испитивања је нижи у групи пацијената који не пуше цигарете али разлика је без статистичке значајности. Такође упоредивши ниво *TGF-β1* у крви на почетку и на крају студије у обадве групе нивои су снижени али не статистички значајно. Табела 57.

Табела 57. Апсолутне и кориговане концентрације *TGF-β1* у урину и концентрација *TGF-β1* у крви у односу на пушачки статус пацијената

Пушачки статус:	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	<i>p</i> вредност
	<i>TGF-β1</i> - урин (pg/mL)		
	Медијана (IQR)		
Непушачи	52.00 (47.00-58.25)	50.50 (43.00-61.00)	<i>p</i> = 0.183**
Пушачи	59.50 (49.50-68.00)	50.50 (45.00-59.00)	<i>p</i> = 0.001 **
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.004 *	<i>p</i> = 0.814*	
	<i>TGF-β1</i> - урин коригован (ng/gU _{Cr})		
Непушачи	54.32 (45.97-62.73)	56.23 (44.43-67.95)	<i>p</i> = 0.494**
Пушачи	62.58 (51.74-72.12)	52.49 (45.86-62.07)	<i>p</i> = 0.003 **
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.020 *	<i>p</i> = 0.718*	
	<i>TGF-β1</i> - крв (pg/mL)		
	Медијана (IQR)		
Непушачи	47.00 (37.00-66.00)	47.00 (37.00-63.00)	<i>p</i> = 0.181**
Пушачи	48.00 (37.25-72.00)	50.00 (46.00-74.00)	<i>p</i> = 0.350**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.970*	<i>p</i> = 0.079*	

*- Mann-Whitney U test; **- Wilcoxon Signed Ranks test; IQR- интерквартилни опсег: 25-75 перцентил

4.12.9. VEGF-A у урину и крви у односу на пушачки статус пацијената

Анализирали смо ниво апсолутних концентрација *VEGF-A* у урину и коригованих концентрација *VEGF-A* у урину и ниво *VEGF-A* у крви на почетку студије и након завршене супституције витамина *D* у односу на пушачки статус пацијената.

Ниво апсолутних и коригованих концентрација *VEGF-A* у урину на почетку и на крају испитивања је био нижи у групи пацијената који не пуше цигарете, али разлика није била статистички значајна. Упоредивши ниво апсолутних концентрација *VEGF-A* у урину на почетку и на крају испитивања статистички значајно снижавање нивоа имамо у обадве групе (*p* < 0.001). Табела 58.

Ниво *VEGF-A* у крви на почетку испитивања је за нијансу био виши у групи пацијената који не пуше цигарете али разлика је без статистичке значајности. Упоредивши ниво *VEGF-A* у крви на почетку и на крају испитивања само у групи пацијената који не пуше цигарете имамо пад вредности, додуше пад није статистички значајан, док у групи пацијената који пуше цигарете имамо пораст нивоа *VEGF-A*, такође без статистичке значајности. Табела 58.

Табела 58. Апсолутне и кориговане концентрације *VEGF-A* у урину и концентрација *VEGF-A* у крви у односу на пушачки статус пацијената

Пушачки статус:	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	<i>p</i> вредност
	<i>VEGF-A</i> - урин (<i>pg/mL</i>)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Непушачи	50.50 (42.25-59.00)	25.00 (22.25-36.50)	<i>p</i> < 0.001**
Пушачи	57.00 (44.75-72.25)	27.50 (25.00-43.50)	<i>p</i> < 0.001**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.211*	<i>p</i> = 0.225*	
	<i>VEGF-A</i> - урин коригована конц. (<i>ng/gU_{Cr}</i>)		
Непушачи	50.14 (42.98-65.64)	27.63 (25.36-39.65)	<i>p</i> < 0.001**
Пушачи	58.57 (45.52-75.95)	29.47 (25.74-44.67)	<i>p</i> < 0.001**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.272*	<i>p</i> = 0.528*	
	<i>VEGF-A</i> - крв (<i>pg/mL</i>)		
	Медијана (<i>IQR</i>)		
Непушачи	38.00 (30.50-50.25)	37.00 (24.75-48.00)	<i>p</i> = 0.359**
Пушачи	37.00 (32.25-50.75)	41.50 (31.25-53.00)	<i>p</i> = 0.479**
<i>p</i> вредност	<i>p</i> = 0.967*	<i>p</i> = 0.133*	

*- *Mann-Whitney U test*; **- *Wilcoxon Signed Ranks test*; *IQR*- интерквартилни опсег: 25-75 перцентил

5. ДИСКУСИЈА

Дијабетес мелитус је хронично метаболичко обољење које предстаља један од водећих здравствених проблема у свету. У свету је 2015. регистровано 415 милиона случајева ДМ, а за 2040. процењено је да ће број оболелих износити 642 милиона (11). Последњих неколико деценија глобална преваленција ДМ је у сталном порасту и 2015. је код оболелих животне доби од 20-79 година процењена на 8,8% (интервал несигурности: 7,2-11,3%), а претпоставља се да ће 2040. износити 10.4% (8.5–13.5%). Већ 2015. године, процењено је да више од 700 милиони одраслих људи широм света имају дијабетес мелитус или интолеранцију на глукозу, а да је код скоро половине од тих болесника обољење још увек непрепознато. Око 87-91% оболелих од ДМ има ДМ тип 2, што је подстакнуто и растућом епидемијом гојазности у целом свету (12).

Отприлике једна трећина оболелих од ДМ развија ДН и хроничну бубрежну слабост (12). С обзиром на број оболелих као и трошкове лечења ТБИ хемодијализом или трансплантацијом бубрега, спроводе се стална истраживања којима се покушава доказати како односно чиме превенирати настанак ДН, како успорити њену прогресију, и који би то биомаркери могли помоћи у раном постављању дијагнозе ДН (17,18,90).

Већ је доказано да промена стила живота успорава прогресију ДН. Ренопротективно дејство приписује се и следећим лековима: *ACEi* и блокатори *AT Rs*, алскирен, не хидропиридински блокатори калцијумских канала, фенофибрати, спиринолактон, хидрохлортиазид (54,148,149).

Према досадашњим сазнањима ренорпотективна улога приписује се и витамину *D*. Витамин *D* је есенцијални хормон који се у организам уноси путем хране (10-20%) или синтезом у кожи. Поред његове основне функције одржавање хомеостазе калцијума и фосфора, приписују му се и многа друга дејства као што су антифибротичко дејство, протективно дејство у стабилизацији кардиомиоцита и превенцији и успоравњу прогресије хипертрофије леве коморе, превенција развоја срчане слабости, редукција експресије гена укључених у атеросклерозу као и васкуларних фактора раста, антиинфламаторно дејство, снижавање инсулинске резистенције, инхибиција *RAS*, снижавање албуминурије код пацијената са хроничном бубрежном болести као и код пацијената са ДМ (97,107). На основу наведеног можемо закључити да надокнада витамина *D* код особа са ДМ и недостатком витамина *D* може имати ренопротективно дејство, односно утицати да спорију прогресију ДН.

С обзиром да је одређивање нивоа витамина *D* у крви технички лако изводљиво и да надокнада истог холекалциферол капима није скупа терапија, одлучили смо да спроведемо

испитивање код болесника са ДМ тип 2 и недостатком (инсуфицијенција/дефицијенција) витамина *D*. Спровели смо проспективну, кохортну студију, током које смо код 90 пацијената са ДМ тип 2 и инсуфицијенцијом/дефицијенцијом витамина *D*, 6 месеци вршили надокнаду витамина *D* са холекалциферол капима пер ос. На основу искустава других аутора у периоду корекције недостатака витамина *D*, ординирали смо више дозе холелакциферола 20 000 *I.U.* два пут недељно, а након нормализације нивоа витамина *D* настављала се надокнада са стандардним дозама (95). Након завршене надокнаде анализирали смо како корекција недостатака витамина *D* утиче на основне биохемијске параметре, липидни статус, параметре гликорегулације и инфламације, као и вредност *UACR* и 24-часовне протеинурије и клиренса креатинина.

Поред претходно наведених параметара одлучили смо да пратимо ефекат надокнаде витамина *D* и на следеће биомаркере: *TGF-β1*, нефрин и *VEGF-A* у крви и урину. *TGF-β1* стимулише синтезу екстрацелуларног матрикса и смањује активност матрикс металопроотеиназа. С обзиром да се рецептори за *TGF-β1* уочавају на свим структурама гломерула и да глукоза и завршни продукти гликозилације стимулишу продукцију *TGF-β1* у готово свим ћелијама, те је његова експресија у гломерулу и тубулоинтерстицијуму оболелих од ДМ појачана, хтели смо да испитамо да ли надокнада недостатака витамина *D* може довести до смањења његове експресије на нивоу бубрега (92,97). Нефрин и *VEGF-A* се сматрају показатељима функције финих структура гломерула односно подоцита. Нефрин је један од протеина *SD*, који детерминишу њену структуру и одговоран је за њену селективну пропустљивост. Нефрин је одговоран и за контролу цитоскелетне архитектуре, облик и вијабилност подоцита и има улогу сигналног молекула. За адекватну гломерулску функцију неопходан је одређени ниво експресије нефрина (73,100). *VEGF-A* је протеин који у бубрегу секретују подоцити, и ендотелне ћелије проксималних тубула, одговоран је за патолошку ангиогенезу како у бубрегу тако и у другим ткивима (100,101). У условима хроничне хипергликемије његова синтеза и ослобађање су појачани (100,101). *VEGF-A* заједно са нефрином утиче на регулацију функције *SD* (73,100). Хистопатолошки налаз биопсије бубрега у раном стадијуму ДН, показује појачану експресију *mRNA VEGF-A* (100). На основу спроведених истраживања научници претпостављају да ће у будућности кључну улогу у успоравању прогресије ДН имати стабилизација функције подоцита и *VEGF-A*. Наша идеја је била да ће корекција недостатака витамина *D* позитивно утицати на стабилизацију функције подоцита.

С обзиром да смо током испитивања све наведене параметре па и биомаркере пратили и код болесника са нормолабуминуријом, видећемо да ли би се неки од биомаркера и биохемијских параметара могао издвојити као евентуални биомаркер раног бубрежног

оштећења пре појаве микроалбуминурије. Ти подаци ће бити предмет наредних истраживања.

5.1. Социодемографске и антропометријске карактеристике наших пацијената

Дијабетес мелитус тип 2 је како смо рекли хронично метаболичко обољење које се најчешће јавља код особа старијих од 30 година, мада ова граница није стриктна и постоје истина ретки случајеви испољавања ДМ тип 2 код деце (12). Тачан почетак обољења је тешко одредити, с обзиром да је симптоматологија неспецифична, често у тренутку постављања дијагнозе имамо већ испољене и неке од хроничних компликација (84). Што се тиче разлике у половима преваленца код мушкараца и жена у животној доби од 20-25 година је готово иста, од 25-69 године живота преваленца је нешто виша код мушкараца, а од 70-79 је нешто виша код жена (12).

У нашу студију је укључено укупно 90 пацијената, од тога 48 мушкараца (53.33%) и 42 жене (46.67%). У групи са нормоалбуминуријом било је 16 мушкараца (53.33%) и 14 жена (46.67%), у групи са микроалбуминуријом било је 17 мушкараца (56.67%) и 13 жена (43.33%), док је групи са макроалбуминуријом било 15 мушкараца (50.00%) и 15 жена (50.00%). Просечна старост пацијената у групи са нормоалбуминуријом износила је 62.00 године (58,00-69,00), у групи са микроалбуминуријом 62.00 године (52.50-69.00), а у групи са макроалбуминуријом 66.00 година (62.25-69.50). Нешто већи број мушкараца је у складу са подацима других аутора и нешто већом преваленцом ДМ код мушкараца у животној доби у којој се налазе наши пацијенти (12,13,19).

Просечна еволуција ДМ тип 2 код наших пацијената у групи са нормоалбуминуријом је износила 10.00 година (5.75-14.25), у другој групи такође 10.00 година (5.75-15.25), а у трећој 15.00 година (10.00-20.00).

Највиши *BMI* имали су пацијенти у групи са макроалбуминуријом 28.40 kg/m^2 (26.31-31.62), најнижи у групи са микроалбуминуријом 27.45 kg/m^2 (26.52-30.12), док је групи са нормоалбуминријом износио 27.50 kg/m^2 (25.62-28.70). Није било статистички значајне разлике у вредности *BMI* између група. Готово су сви пацијенти били са прекомерном телесном масом, што се с обзиром на животну доб наших пацијената подудара са подацима других аутора (19). Преваленција гојазности у Сједињеним Државама на пример, утростручила се са 13% у 1960. години на 38% у 2014. (19). Разлика између полова везано за гојазност доста зависи од животне доби, тако је 2013. проценат жена са прекомерном тежином износио 38%, што је врло слично проценту гојазних мушкараца 37% (13,19). Међутим, на основу података који су добијени из мета анализа жене ипак у односу на

мушкарце имају већу тенденцију да буду гојазне (12). Нарочито након 45. године живота код жена расте склоност ка гојазности, док је код мушкараца прекомерна тежина чешћа у млађој животној доби (12,13,150).

Кад је у питању терапијски модалитет који су користили наши пацијенти за лечење ДМ приближно исти број пацијената је користио оралне хипогликемике и инсулинску терапију, није било статистички значајне разлике између група.

5.2. Анализа резултата пре и након шестомесечне примене витамина *D*

Најнижи ниво витамина *D* на почетку испитивања имали су пацијенти у групи са макроалбуминуријом, код њих је и након супституције ниво витамина *D* остао најнижи. Ови пацијенти су имали и највише почетне вредности серумског креатинина и најниже почетне вредности клиренса креатинина, што се слаже са подацима других аутора да је недостатак витамина *D* чешћи код пацијената са ДМ тип 2 и макроалбуминуријом и ХБИ (108,151). Након шестомесечне примене холекалциферола ниво витамина *D* је статистички значајно повишен у све три групи пацијената.

С обзиром да смо у периоду корекције недостатка витамина *D* ординирали више дозе холекалциферола од уобичајених није било нежељених дејстава витамина *D*, није забележена хиперкалцемија, нити повишене вредности фосфора и витамина *D*. На почетку испитивања највиши ниво калцијума у крви уз најнижи ниво ниво *P* и *iPTH* имали су пацијенти из групе са нормоалбуминуријом, што одговара њиховом нивоу клиренса креатинина, док су најнижи ниво калцијума у крви са највишим нивоом *P* и *iPTH* имали пацијенти у групи са макроалбуминуријом. Тако је било и након завршене надокнаде. С обзиром да није било нежељених догађаја током студије можемо сматрати безбедним примену виших доза холекалциферола (20000 *IJ* два пута недељно), у периоду корекције недостатка витамина *D*, наравно уз адекватну контролу нивоа калцијума и фосфора.

Статистички значајно снижење вредности *iPTH* забележено је у групи пацијената са нормоалбуминуријом. Пошто су сви пацијенти у тој групи имали нормалне вредности *iPTH*, питање да ли овај пад има значаја у пракси. Међутим с обзиром да витамин *D* има позитиван ефекат на метаболизам костију тј. “боне турновер” повећавајући активност остеокласта, повећавајући волумен кости и трабекуларно задебљање, вероватно и ово снижење *iPTH*, које смо ми забележили може бити од користи (107,110,132).

На почетку испитивања, основни биохемијски параметри које смо пратили у принципу су одговарали степену албуминурије и јачини бубрежне функције, односно нивоу клиренсу креатинина. Тако смо најниже вредности хемоглобина, серумског гвожђа, албумина имали

у групи пацијената са макроалбуминуријом, ти пацијенти су имали најнижи ниво клиренса креатинина, и највиши ниво серумског креатинина и урее. Након шестомесечне примене витамина *D* разлика у нивоу хемоглобина и серумског гвожђа у све три групе се није статистички значајно променила. Статистички значајан пораст албумина имамо само у групи пацијената са нормоалбуминуријом, и у тој групи имамо статистички значајан пад нивоа урее. У групи пацијента са микроалбуминуријом имамо статистички значајан пад нивоа креатинина, а у тој и групи пацијената са макроалбуминуријом имамо статистички значајан пораст нивоа клиренса креатинина. Позитиван ефекат примене витамина *D* на азотне материје имамо управо код пацијената код којих је то најпотребније, тј. оних код којих су се испољили знаци ДН.

Као параметре гликорегулације пратили смо вредности *HbA1c* и ниво јутарње гликемије. На почетку испитивања најнижи ниво *HbA1c* имали су пацијенти из групе са нормоалбуминуријом, затим пацијенти из групе са микроалбуминуријом, а највиши ниво пацијенти из групе са макроалбуминуријом, тако је било и на крају испитивања. Ниво *HbA1c* и јутарње гликемије након шестомесечне примене холекалциферола је у све три групе пацијената статистички значајно нижи. Разлика у нивоу *HbA1c* на почетку и на крају испитивања између група не показује статистичку значајност. За *HbA1c* је доказана и умерена негативна корелација ($r = -0.342$; $p = 0.064$) између нивоа витамина *D* и вредности *HbA1c*, али само у групи пацијената са нормоалбуминуријом. И други аутори наводе позитиван ефекат витамина *D* на гликорегулацију код пацијената са ДМ тип 2 (109,111,129,135,152). Сматра се да се тај ефекат остварује повећањем инсулинске сензитивности стимулишући и интензивирајући експресију инсулинских рецептора у скелтним мишићима уз активацију *peroxisome proliferator activator receptor δ* (*PPAR δ*), и инхибицијом *RAS-a* (који је познат као инхибитор дејства инсулина на периферна ткива) (110). Такође, витамин *D* утиче на појачано ослобађање инсулина повећавајући интрацелуларни ниво калцијума у бета ћелијама панкреаса. Витамин *D* може имати и директан ефекат на функцију бета ћелија, који се остварује везивањем његовог активног облика у крви за *VDR*, који је присутан у бета ћелијама панкреаса. Доказано је да мишеви без функционалног *VDR-a* показују оштећену секрецију инсулина након оптерећења глукозом (96,97,111).

Сматра се да хронична инфламација има централну улогу у развоју ДМ и ДН, а да витамин *D* може директно или индиректно смањити ефекат те системске инфламације (36). Анти-инфламаторни ефекат се огледа у смањеном ослобађању бројних проинфламаторних цитокина, као што су *TNF- α* , *IL-6*, *IL-12*, *IL-18*, *IL-1 β* , *INF- γ* , блокади диференцијације дендритичких ћелија, инхибицији лимфоцитне пролиферације, инхибицији формирања

пенастих ћелија, смањеном уносу холестерола у макрофаге и побољшаном регулаторном развоју Т лимфоцита (инхибиција *Th1* и активација *Th2* лимфоцита) или пак у појачаном ослобађању анти-инфламаторних цитокина, као што је *IL-10* (36,97,110,132). Као параметар анти-инфламаторног дејства витамина *D* пратили смо ниво *CRP-a*. Након шестомесечне надокнаде, статистички значајно снижење нивоа *CRP-a* имамо у групи пацијената са нормоалбуминуријом и микроалбуминуријом, док је методом корелације доказана умерена негативна корелација између вредности витамина *D* и нивоа *CRP-a* у групи пацијената са микроалбуминуријом ($r = -0.368$; $p = 0.046$) и макроалбуминуријом ($r = -0.375$; $p = 0.041$). Тиме смо код наших пацијената потврдили антиинфламаторни ефекат витамина *D*. Слична искуства имали су и други аутори (97,131,132,135).

О утицају витамина *D* на липидни статус постоје различита мишљења. *Xiao Fei Qin* са сарадницима је доказао да примена витамина *D* (2000 IU/дневно) код пацијената са сниженим нивоом витамина *D*, хиперлипидемијом и терапијом статинима, након заједничке употребе током шест месеци, доводи до значајног снижења нивоа и триглицерида и холестерола у односу на пацијенте које су уз статине користили плацебо (139). *Paloma Muñoz-Aguirre* је такође након примене витамина *D* у дози од 4000 IU/дневно код постменопаузалних жена са ДМ тип 2 постигао значајно снижење нивоа триглицерида (140). Код наших пацијената на почетку испитивања најнижи ниво укупног холестерола имали су пацијенти у групи са нормоалбуминуријом, затим пацијенти у групи са микроалбуминуријом а највиши ниво пацијенти у групи са макроалбуминуријом, присутна је и статистичка значајност у разлици нивоа укупног холестерола између група. На крају испитивања статистички значајно је снижен ниво укупног холестерола код пацијената у све три групе. У групи пацијената са макроалбуминуријом доказана је јака негативна корелација ($r = -0.570$; $p < 0.001$), између вредности витамина *D* и вредности холестерола. Ниво триглицерида је на крају испитивања такође статистички значајно нижи у све три групе пацијената у односу на почетне вредности, између група не постоји статистички значајна разлика, нити значајна корелација између нивоа витамина *D* и нивоа триглицерида.

Протеинурија, према већини аутора, представља главну мету на коју треба деловати у циљу превенције и успоравања ДН, као и снижавања инциденце кардиоваскуларних догађаја (128,133,134). Антипротеинурички ефекат витамин *D* остварује инхибицијом *RAS-a* и смањењем реналне фиброзе редукцијом *TGF-β/SMAD* пута. Витамин *D*, поред инхибиције *RAS-a* на нивоу бубрега, снижава експресију ренина на нивоу срца, чиме утиче на снижавање вредности крвног притиска. Осим тога, успоравањем фиброзе превенира и успорава прогресију хипертрофије леве коморе и развој срчане слабости, редукује експресију гена укључених у атеросклерозу као и васкуларних фактора раста

(128,133,134,137,149). *de Zeeuw* је у студији *VITAL* потврдио антипротеинурички ефекат витамина *D* (134), сличне резултате објавили су и други аутори (133,135). Код наших пацијената као параметар протеинурије пратили смо *UACR* и 24-часовну протеинурију, након 6 месеци примене витамина *D* статистички значајно је снижен ниво и *UACR* и 24-часовна протеинурија у све три групе пацијената. У групи пацијената са макроалбуминуријом доказана је и јака негативна корелација између нивоа витамина *D* и нивоа *UACR* ($r = -0.676; p < 0.001$) и између нивоа витамина *D* и 24-часовне протеинурије ($r = -0.685; p < 0.001$). Такође у групи пацијената са макроалбуминуријом постоји јака позитивна корелација између нивоа укупног холестерол и *UACR* ($r = 0.796, p < 0.001$), и између укупног холестерола и 24-часовне протеинурије ($r = 0.788, p < 0.001$). Код наших пацијената из све три групе, надокнада витамина *D* имала је снажан антипротеинурички ефекат. Такође потврђеном јаком позитивном корелацијом између *UACR* и протеинурије и холестерола можемо тврдити да снижавањем протеинурије витамин *D* индиректно утиче и на поправљање липидног статус, првенствено укупног холестерола.

За адекватну гломерулску функцију неопходан је одређени ниво експресије нефрина (58). У условим хипергликемије у структурама гломерула се снижава експресија нефрина, али повећава екскреција нефрина у урину (58,98,99). *Petrica L* је показала да концентрација нефрина у урину корелира са нивоом протеинурије код пацијената са ДМ тип 2 и ДН (73). Код наших пацијената није био такав случај. На почетку испитивања апсолутне и кориговане концентрације нефрина у урину су биле највише у групи пацијената са нормоалбуминуријом, затим код пацијената са микроалбуминуријом и најниже код пацијената са макроалбуминуријом. Након шестомесечне примене витамина *D*, само су пацијенти у групи са микроалбуминуријом статистички значајно снизили почетне концентрације нефрина. Пацијенти из групе са нормоалбуминуријом су имали и највише концентрације нефрина у крви, а након примене витамина *D* ни у једној групи пацијената нема статистички значајног снижења нивоа нефрина у крви.

С обзиором да се рецептори за *TGF-β₁* уочавају на свим структурама гломерула и да глукоза и завршни продукти гликозилације стимулишу продукцију *TGF-β₁* у готово свим ћелијама, његова експресија у гломерулу и у тубулоинтерстицијуму оболелих од ДМ је појачана (92,94,96). *Kim MJ* и сарадници су доказали да концентрација *TGF-β₁* у урину расте пропорционално прогресији дијабетесне нефропатије, као и да примена виших доза холекалциферола у периоду корекције недостатка витамина *D* значајно снижава ниво *TGF-β₁* у урину, и то нарочито код непушача (95). Код наших пацијената најниже апсолутне и кориговане концентрације *TGF-β₁* у урину имали су пацијенти у групи са нормоалбуминуријом, затим пацијенти у групи са макроалбуминуријом, а највише

пацијенти у групи са микроалбуминуријом, нивои између група нису били статистички значајно различити. Након шестомесечне примене витамина *D* апсолутне и кориговане концентрације су снижене код пацијената у групи са микроалбуминуријом и макроалбуминуријом, а статистички значајна разлика присутна је само у групи пацијента са макроалбуминуријом. На основу ових података можемо закључити, да корекција недостатка витамина *D*, може утицати на снижавање нивоа $TGF-\beta_1$ у урину, код пацијената са ДМ и већ испољеним знацима ДН, односно присутном албуминуријом. Када је у питању концентрација $TGF-\beta_1$ у крви, код наших пацијената стање је обрнуто у односу на вредности у урину, најниже концентрације имали су пацијенти са макроалбуминуријом, затим пацијенти са микроалбуминуријом, а највише пацијенти са нормоалбуминуријом, разлика није статистички значајна између група. Подаци других аутори који су анализирали ниво $TGF-\beta_1$ у крви су различити, тако су су *Kim MJ* и сарадници потврдили да ниво $TGF-\beta_1$ у крви корелира са прогресијом ДН односно нивоом албуминурије, док су други аутори, додуше на анималном моделу показали да ниво $TGF-\beta_1$ у крви није повишен код животиња са микро и макроалбуминуријом (92,94,95,96,153). У сваком случају *Chang i sradanici* сматрају да је за успоравање прогресије ДН значајнија локална супресија активности $TGF-\beta_1$, односно на нивоу бубрега. Они тврде да супресија дејства $TGF-\beta_1$ на нивоу подоцита више утиче на успоравање губитка *GFR* него на снижавање албуминурије и интерстицијске фиброзе. Док супресија дејства $TGF-\beta_1$ на нивоу проксималног тубула више утиче на снижавање албуминурије и успоравање интерстицијске фиброзе него на *GFR*. Они износе да је код пацијената са ДМ и ДН системска супресија дејства $TGF-\beta_1$ чак штетна, јер то доводи до примарног алдостеронизма и поремећеног метаболизма воде и натријума, тако да предпостављају да један од механизма лечења и успоравања ДН нефропатије у будућности треба да буде управо циљана супресија $TGF-\beta_1$ само на нивоу бубрега (92). С обзиром да је код наших пацијената ниво $TGF-\beta_1$ након супституције витамина *D* снижен само у урину можемо рећи да је витамин *D* само на нивоу бубрега вршио супресију $TGF-\beta_1$, управо као што се препоручује.

Хронична хипергликемија како смо већ навели стимулише синтезу *VEGF-A*, и покреће низ међусобно повезаних метаболичких и хемодинамских процеса који су одговорни за развој ДН (63). У периоду почетног и умереног оштећења бубрежног ткива ниво *VEGF-A* у бубрегу је повишен, међутим временом како оштећење подоцита и проксималног тубула напредује, како је фиброза све више изражена ниво *VEGF-A* може да се снизи јер су ћелије које га секретује дефинитивно оштећене (63,100). Код наших пацијената пре започињања примене витамина *D* најниже апсолутне и кориговане концентрације *VEGF-A* у јутарњем урину имали су пацијената са нормоалбуминуријом, затим пацијенти са

макроалбуминуријом, док су највише вредности имали пацијенти у групи са микроалбуминуријом. То управо потврђује тврдњу да у фази узрапредовале ДН где је степен оштећења подоцита и ћелија проксималног тубула већи, ниво *VEGF-A* може да се снижава у односу на фазе ДН где имамо нижи степен оштећења бубрега. Након завршене надокнаде у све три групе забележили смо статистички значајно снижење апсолутних и коригованих концентрација *VEGF-A* у урину. Управо у групи пацијената са микроалбуминуријом, где је била највиша апсолутна и коригована концентрација *VEGF-A*, доказана је и умерена негативна корелација између витамина *D* и апсолутне концентрације *VEGF-A* у урину након надокнаде (*Spearman's rho* = -0,362, $p < 0,082$) и јака негативна корелација између витамина *D* и кориговане концентрације *VEGF-A* у урину након надокнаде. (*Spearman's rho* = -0,531, $p < 0,008$). Кад је у питању ниво *VEGF-A* у крви пре започете надокнаде најниже вредности су измерене код пацијената у групи са нормоалбуминуријом, затим у групи са микроалбуминуријом, док су највише вредности имали пацијенти у групи са макроалбуминуријом. Након спроведене терапије са витамином *D* нисмо забележили статистици значајан пад вредности ни у једној испитиваној групи. Код пацијената у групи са макроалбуминуријом након надокнаде имамо нумерички значајан пад вредности и потврђену умерену негативну корелацију између витамина *D* и нивоа *VEGF-A* у крви (*Spearman's rho* = -0,336; $p < 0,070$).

Генерално можемо закључити да смо код наших пацијената корекцијом недостатка витамина *D* и његовом шестомесечном применом постигли редукацију нивоа *UACR*, 24часовне -протеинурије, *HbA1c*, *CRP-a*, укупног холестерола, триглицерида, *VEGF-A* у урину, *TGF-β₁* у урину и нефрина у урину. Статистички значајна негативна корелација између нивоа витамина *D* и нивоа *UACR*, 24-часовне протеинурије, укупног холестерола, *CRP-a* и *VEGF-A* у крви доказана је у групи пацијената са макроалбуминуријом. Ова група пацијената имала је најнижи стартни клиренс креатинина, а на крају испитивања постигнут је статистички значајан пораст истог. Такође код ове групе пацијената постигнут је статистички значајан пад апсолутних и коригованих концентрација *VEGF-A* и *TGF-β₁* у урину па на основу тога можемо рећи да је током нашег испитивања, витамин *D* имао најефикасније ренопротективно дејство код пацијената са макроалбуминуријом и почетном ХБИ. С обзиром да смо постигли статистички значајно снижење нивоа *UACR*, 24-часовне протеинурије, триглицерида, укупног холестерола, *HbA1c-a*, *CRP-a*, *VEGF-A* и у друге две групе, и нефрина код пацијената са микроалбуминуријом, можемо закључити да примена витамин *D* код свих пацијената са ДМ тип 2 има ренопротективну улогу.

5.3. Анализа резултата у односу на ниво витамина *D* у крви на почетку испитивања

Пошто смо претпоставили да није исто ако пацијент има благо снижен ниво витамина *D* или пак тешку дефицијенцију, анализирали смо добијене резултате на основу степена недостатка витамина *D* на почетку испитивања. На почетку испитивања 68 (75.55%) пацијената је имало дефицијенцију витамина *D*, а 22 (24.44%) пацијента инсуфицијенцију. У односу на ниво недостатка витамина *D* пацијенте смо поделили у две групе: 1. група - пацијенти који су на почетку испитивања имали инсуфицијенцију витамина *D*, и 2. група - пацијенти који су на почетку испитивања имали дефицијенцију витамина *D*.

На почетку испитивања пацијенти који су имали дефицијенцију витамина *D* имали су нижи ниво *CRP-a* у односу на пацијенте са инсуфицијенцијом витамина *D*, међутим након шестомесечне надокнаде витамина *D* у обадве групе пацијената постигнуто је статистички значајно снижење нивоа *CRP-a*. Није било статистички значајне разлике између група ни на почетку студије ни након завршене надокнаде. Ниво јутарње гликемије је на почетку студије у групи пацијената са дефицијенцијом витамина *D* био виши, у односу на пацијенте са инсуфицијенцијом витамина *D*, након шестомесечне надокнаде постигнут је статистички значајан пад нивоа јутарње гликемије у истој групи ($p < 0,001$), док у групи пацијената са инсуфицијенцијом витамина *D* није било редукције нивоа гликемије након терапије. Између група разлика у вредностима није имала статистичку значајност. Ниво *HbA1c* на почетку студије је у групи пацијената са дефицијенцијом витамина *D* био виши у односу на групу пацијената са инсуфицијенцијом. Након шестомесечне терапије постигнут је статистички значајан пад нивоа *HbA1c* у обадве групе. Између група разлика у вредностима није имала статистичку значајност. На основу изнетих резултата видимо да пацијенти са нижим нивоом витамина *D* на почетку испитивања имају виши ниво јутарње гликемије и *HbA1c*, што указује на лошију гликорегулацију (124). Нижи ниво витамина *D* није код тих пацијената условио и виши ниво *CRP-a*.

На почетку испитивања, пацијенти који су имали дефицијенцију витамина *D* имали су нижи ниво серумског креатинина, урее и виши клиренс креатинина у односу на пацијенте са инсуфицијенцијом витамина *D*, али разлика између група није имала статистичку значајност. Након шестомесечне примене витамина *D* статистички значајан пад нивоа креатинина и урее имамо само у групи пацијената са почетном дефицијенцијом витамина *D*. Ниво серумског креатинина је након шестомесечне надокнаде и статистички значајно нижи у групи пацијената са почетном дефицијенцијом витамина *D* у односу на ниво код пацијената са инсуфицијенцијом витамина *D* ($p = 0,021$). Такође статистички значајан пораст клиренса креатинина ($p < 0,001$) након надокнаде имамо само у групи пацијената са

почетном дефицијенцијом витамина *D*. На основу изнетих података долазимо до закључка да виши степен недостатка витамина *D* на почетку испитивања код наших пацијената није условио и више нивое азотних материја уз последично нижи клиренс креатинина, али су неведени параметри у овој групи пацијената статистички значајно побољшани у односу на пацијенте са блажим недостатаком витамина *D*.

Ниво укупног холестерола на почетку испитивања је виши у групи пацијената са дефицијенцијом витамина *D*, међутим након шестомесечне терапије ниво укупног холестерола је статистички значајно нижи у обадве групе. Није било статистички значајне разлике између група ни на почетку студије ни након завршене надокнаде. Ниво триглицерида на почетку испитивања је нижи код пацијената са дефицијенцијом витамина *D*, након шестомесечне примене холекалциферола у обадве групе постигнут је статистички значајан пад вредности триглицерида. Није било статистички значајне разлике између група ни на почетку студије ни на крају. Разлике између група у нивоу укупног холестерола и триглицерида на почетку испитивања су минималне тако да не можемо тврдити да виши степен недостатка витамина *D* условљава лошији липидни статус, али супституција витамина *D* итекако поправља липидни статус код наших пацијената.

Пацијенти са дефицијенцијом витамина *D* на почетку испитивања имају нижи ниво 24-часовне протеинурије и *UACR*. Након шестомесечне надокнаде витамина *D* ниво и 24-часовне протеинурије и *UACR* су статистички значајно нижи у обадве групе. Разлика између група није статистички значајна. Видимо да у нашој групи пацијената виши степен недостатка витамина *D* не значи нужно и виши степен албуминурије, али супституција витамина *D* статистички значајно снижава албуминурију.

Када су у питању биомаркери које смо пратили, имамо следеће резултате. Сви биомаркери и нефрин и *VEGF-A* и *TGF-β₁* како у урину тако и у крви имају вишу концентрацију код пацијената са дефицијенцијом витамина *D*. Након шестомесечне примене витамина *D* само пацијенти са дефицијенцијом витамина *D* имају статистички значајно снижење концентрације нефрина у урину. Нефрин у крви након шестомесечне надокнаде парадоксално расте у обадве групе пацијената. Када је у питању *TGF-β₁* статистички значајно снижење концентрације *TGF-β₁* у урину након примене витамина *D* имају само пацијенти са почетном дефицијенцијом витамина *D*. У крви промена ниво *TGF-β₁* код пацијента са дефицијенцијом витамина *D* након терапије се није статистички значајно мењала, а код пацијената са инсуфицијенцијом витамина *D* је статистички значајно порасла. Ниво *VEGF-A* у урину је након надокнаде статистички значајно снижен у обадве групе, док је у крви ниво снижен само у групи са инсуфицијенцијом витамина *D* али без статистичке значајности.

На основу изнетих података можемо рећи да пацијенти са дефицијенцијом витамина *D* имају више вредности *HbA1c*, и више концентрације свих биомаркера како у урину тако и у крви. Такође, само пацијенти са дефицијенцијом витамина *D* након шестомесечне примене витамина *D* имају статистички значајно ниже нивое нефрина, *TGF-β₁* и *VEGF-A* у урину, што значи да примена витамина *D* има јаче ренопротективно дејство код пацијената са вишим степеном недостатка витамина *D* (112).

5.4. Анализа резултата у односу на ниво витамина *D* у крви на крају испитивања

Анализирали смо и какав утицај на резултате има ниво витамина *D* на крају испитивања. Од 68 пацијената са дефицијенцијом витамина *D* на почетку студије њих 34 (50.00%) је након шестомесечне терапије нормализовало ниво витамина *D*, док је код 34 (50.00%) пацијента ниво остао снижен. Од 22 пацијента који су на почетку студије имали инсуфицијенцију витамина *D*, њих 15 (68.18%) је након шестомесечне терапије нормализовало витамин *D*, а код 7 (31.81%) пацијената ниво је остао снижен. Потребно је у наредним испитивањима проверити зашто прилично висок проценат пацијената није нормализовао вредност витамина *D*. У односу на ниво витамина *D* у крви након шестомесечне терапије пацијенте смо поделили у две групе: 1. Група – пацијенти који су на крају испитивања нормализовали ниво витамина *D* у крви, 2. Група – пацијенти код којих је на крају испитивања ниво витамина *D* остао снижен. Поред резултата на крају студије упоредили смо и њихове резултате на почетку испитивања.

Пацијенти који су на крају студије имали ниво витамина *D* у референтним границама статистички значајно су снизили ниво *CRP-a* на крају студије у односу на ниво на почетку студије ($p < 0,001$). Ти пацијенти су имали ниже вредности *CRP-a* на почетку и на крају студије у односу на пацијенте код којих је ниво витамина *D* остао снижен на крају студије, али без статистичке значајности у разлици вредности између група. Што значи, да ако се ниво витамина *D* након шестомесечне надокнаде доведе до референтних вредности већа је шанса да ће се ниво *CRP-a* статистички значајно снизити у односу на почетне вредности (132).

За статистички значајно снижавање нивоа јутарње гликемије након терапије није неопходно да ниво витамина *D* након надокнаде буде у референтним вредностима, јер статистички значајан пад нивоа јутарње гликемије након супституције имамо у обадве групе. Пацијенти код којих је на крају студије ниво витамина *D* био у референтним границама, имали су статистички значајно ниже вредности *HbA1c* на почетку испитивања у односу на пацијенте код којих је ниво витамина *D* на крају студије остао снижен ($p = 0,041$).

У обадве групе пацијената ниво *HbA1c* на крају испитивања је статистички значајно нижи у односу на вредности на почетку студије. На основу изнетих резултата видимо да за побољшање параметара гликорегулације није неопходно да се ниво витамина *D* након супституције доведе до референтних граница. Више аутора је спроводило надокнаду витамина *D* у краћем временском период од нас и такође су имали повољан терапијски ефекат (111). Што показује да витамин *D* дефинитивно има повољан ефекат на гликорегулацију код пацијената са ДМ тип 2.

Да би надокнада витамина *D* довела до статистички значајног снижавања нивоа азотних материја и пораста клиренса креатинина у односу на почетне вредности није предуслов да ниво витамина *D* након терапије буде у референтним границама. Наши пацијенти који су на крају студије имали ниво витамина *D* у референтним границама, на почетку студије су имали нижи ниво серумског креатинина у односу на пацијенте са сниженим нивоом витамина *D* на крају студије, али без статистичке значајности у разлици. Код пацијената у обадве групе ниво креатинина статистички је значајно нижи након шестомесечне надокнаде. Исто се односи и на клиренс креатинина, где статистички значајан пораст клиренса креатинина након надокнаде имамо у групи пацијената код којих је ниво витамина *D* на крају студије остао снижен ($p = 0,039$). Пацијенти који су на крају студије имали ниво витамина *D* у референтним границама на почетку студије су имали виши клиренс креатинина него пацијенти са сниженим нивоом витамина *D* на крају студије. Ниво клиренса креатинина између група није се статистички значајно разликовао ни на почетку ни на крају студије. Када је у питању уреа, на почетку студије ниво уреа је нижи у групи пацијената која је на крају студије имала ниво витамина *D* у референтним границама. У обадве групе на крају студије имамо нумерички значајан пад вредности али само у групи пацијената код којих је ниво витамина *D* остао снижен и статистички значајан пад ($p = 0,007$). Ипак ниво уреа између група се није статистички значајно разликовао ни на почетку ни на крају студије.

Када је у питању липидни статус, након завршене надокнаде и код пацијената са нивоом витамина *D* у референтним границама и код пацијената код којих је ниво витамина *D* остао снижен имамо статистички значајно снижење укупног холестерола и триглицерида ($p < 0,001$). Код триглицерида нема статистички значајне разлике између група у нивоима на почетку и на крају испитивања, али је ниво укупног холестерола и на почетку студије ($p < 0,001$) и на крају ($p = 0,008$) статистички значајно нижи у групи пацијената са витамином *D* у референтним границама на крају студије. Надокнада витамина *D* дефинитивно код наших пацијената поправља липидни статус, а ниво укупног холестерола је статистички значајно нижи ако је ниво витамина *D* након супституције у референтним границама.

Ниво 24-часовне протеинурије и *UACR* су статистички значајно нижи на почетку и на крају студије у групи пацијената која је након терапије имала ниво витамина *D* у референтним границама у односу на групу код које је ниво витамина *D* остао снижен ($p < 0,001$). На крају студије у обадве групе пацијената имамо статистички значајно снижење нивоа 24-часовне протеинурије и *UACR* у односу на вредности пре терапије. Примена витамина *D* дефинитивно снижава албуминурију и 24-часовну протеинурију код оболелих од ДМ тип 2, с тим што нормализација нивоа витамина *D* на крају студије статистички значајно појачава тај ефекат.

Када су у питању биомаркери и нормализација нивоа витамина *D* након терапије имамо следеће стање. И нефрин и *TGF-β₁* на почетку испитивања имају више концентрације (и апсолутне и кориговане) у урину и крви код пацијената у групи са нормализованим нивоом витамина *D* на крају студије. Код *TGF-β₁* разлика је статистички значајна. Након шестомесечне примене витамина *D* ниво нефрина остаје виши у групи пацијената са витамином *D* у референтним вредностима, али разлика у нивоима нема статистичку значајност, нити су се нивои између група статистички значајно разликовали. Апсолутне и кориговане концентрације *TGF-β₁* у урину су статистички значајно ниже након надокнаде витамина *D* у обадве групе, а ниво *TGF-β₁* је статистички значајно виши и на почетку и на крају студије у групи пацијената који имају ниво витамина *D* на крају студије у референтним границама. Ниво *TGF-β₁* у крви је након завршене супституције снижен у групи пацијената са нивоом витамина *D* у референтним границама али разлика нема статистичку значајност. Концентрације *VEGF-A* су и на почетку студије и на крају студије како у урину, тако и у крви нижи код пацијената са витамином *D* у референтним границама након терапије, али разлика нема статистичку значајност. Након супституције апсолутне и кориговане концентрације *VEGF-A* у урину су статистички значајно снижене у обадве групе, док је концентрација у крви снижена код пацијената са нормализованим нивоом витамина *D* на крају студије, али пад није статистички значајан.

Кад сумирамо наведене податке можемо закључити да нормализација нивоа витамина *D* након шестомесечне надокнаде не доводи код пацијената до статистички значајнијег снижења нивоа нефрина, *TGF-β₁* и *VEGF-A* како у урину тако и у крви, у односу на пацијенте код којих је ниво витамина *D* након терапије остао снижен.

5.5. Анализа резултата у односу на пушачки статус пацијената

Више аутора је у својим радовима изнело да пушење цигарета негативно утиче на ниво витамина *D* у крви и да је ниво витамина *D* код оболелих од ДМ тип 2 и који пуше

цигарете значајно нижи у односу на непушаче (145,146,154). Такође *Kim MJ* са сарадницима наводи да корекција недостатка витамина *D* има снажнији ефекат на снижавање протеинурије и *TGF-β₁* код пацијената који не пуше цигарете у односу на оне који пуше цигарте, па смо одлучили да анализирамо наше добијене резултате у односу на пушачки статус пацијента (95).

Сви пацијенти су на основу пушаког статуса, невезано за вредност албуминурије на почетку студије, подељени у две групе. Прву групу чине пацијенти који не пуше цигарете и у њој је било 54 (60.00%) пацијента, а другу групу чине пацијенти који пуше цигарете, и у њој је било 36 (40.00%) пацијената. Анализирани су сви резултати на почетку студије и након шестомесечне примене витамина *D*.

У групи пацијената који не пуше цигарете било је подједнако пацијената мушког и женског пола, док је у групи пацијената који пуше цигарете било нешто више мушкараца 58.33%. Пацијенти који не пуше цигарете били су статистички значајно старији (67.00 (62.00-70.00) година) у односу на пацијенте који пуше цигарете (60.00 (54.75-63.75) година). Разлика у дужини еволуције ДМ тип 2 између група није статистички значајна. По питању терапије коју пацијенти користе за контролу гликемије у склопу ДМ тип 2, групе се нису статистички значајно разликовале.

Супротно другим ауторима група пацијената који не пуше цигарете су на почетку студије имали нижи ниво витамина *D* у односу на пацијенте који пуше цигарете, након шестомесечне примене витамина *D* у обадве групе ниво витамина *D* је статистички значајно порастао ($p < 0.001$) (145). Ниво витамина *D* је након завршене терапије нумерички виши у групи непушача, мада разлика у нивоу витамина *D* између група на почетку и на крају студије није статистички значајна. Процентуално у групи непушача имамо виши пораст нивоа витамина *D* у односу на почетне вредности 117.52% али је разлика без статистичке значајности. На основу изнетих података закључујемо да пушење цигартера не условљава и иницијално нижи ниво витамина *D* у крви, такође надокнада витамина *D* је у обадве групе пацијената довела до статистички значајног пораста нивоа витамина *D* који је процентуално ипак виши код непушача.

Ниво основних биохемијских параметра, као што су ниво хемоглобина, албумина и гвожђа у серуму је на почетку испитивања био нижи код пацијената који не пуше цигарете у односу на пацијенте који пуше цигарете, једино је код хемоглобина разлика била и статистички значајна. Након шестомесечне примене витамина *D* статистички значајан пораст нивоа хемоглобина, албумина имамо само код пацијената који не пуше цигарете, али нивои између група нису статистички значајно различити. Код азотних материја, на почетку студије ниже нивое урее и креатинина су имали пацијенти који не пуше, али

разлика између група није статистички значајна. Након терапије статистички значајно снижење нивоа урее и креатинина имамо код пацијената који пуше цигарете. Разлика у нивоима између група није имала статистичку значајност, а клиренс креатинина је на почетку испитивања био нижи код непушача, а након терапије статистички значајан пораст имамо само код пушача. Разлика између група на крају студије није била статистички значајна. На основу овог видимо да су резултати подељени, тј. корекција недостатка витамина *D* има значајнији ефекат на ниво албумина и хемоглобина код непушача, док су азотне материје и клиренс креатинина значајније поправљени код пушача.

На ниво *CRP-a* као параметра инфламације, корекција недостатка витамина *D* је деловала подједнако и код пушача и код непушача, тако да не бисмо могли рећи да је антиинфламаторно дејство јаче изражено у једној од група (154).

Што се тиче параметара гликорегулације, ниво *HbA1c* је статистички значајно снижен након примене витамина *D* у обадве групе пацијената, али је ниво и на почетку испитивања и на крају испитивања статистички значајно нижи у групи пацијената који не пуше цигарете, на почетку испитивања ($p = 0.015$) и на крају испитивања ($p = 0.012$). Тако да кад су у питању наши пацијенти, можемо рећи да пацијенти који не пуше цигарете имају иницијално бољу гликорегулацију, и да је примена витамина *D* имала већи ефекат на побољшање гликорегулације код непушача (145,146).

Када је у питању липидни статус, након завршене надокнаде витамина *D* у обадве групе пацијената имамо статистички значајно ниже нивое укупног холестерола и триглицерида у крви ($p < 0.001$), али разлике у вредностима између две групе не показују статистичку значајност. Процентуално имамо статистички значајно већи пад нивоа триглицерида код пушача у односу на пацијенте који не пуше цигарете ($p = 0.044$). Док смо пак корелацијом нивоа витамина *D* након шестомесечне терапије са нивоом укупног холестерола и триглицерида на крају студије само у групи пацијената који пуше цигарете добили јаку негативну корелацију између нивоа витамина *D* и укупног холестерола ($r = -0.543$, $p = 0.001$). На основу ових података можемо рећи да код пацијената који пуше цигарете супституција витамина *D* има снажнији ефекат на корекцију липидног статуса у односу на пацијенте који не пуше цигарете. Ово је од посебног значаја имајући у виду да су атеросклеротксе промене код пушача јаче изражене (145,146).

По питању протеинурије, ниво 24-часовне протеинурије и *UACR* су након шестомесечне примене витамина *D* статистички значајно нижи у обадве групе. Вредности 24-часовне протеинурије и *UACR* између две групе не показује статистички значајну разлику. Такође, процентуално снижење 24-часовне протеинурије и *UACR* између две групе не показује статистичку значајност. Након завршене шестомесечне примене витамина *D*,

корелирали смо вредности витамина *D* и вредности 24-часовне протеинурије и *UACR*. У групи пацијената који не пуше цигарете добили смо негативну корелацију између витамина *D* и 24-часовне протеинурије ($r = -0.419$, $p = 0.002$) и витамина *D* и *UACR* ($r = -0.453$, $p = 0.001$). Корелирали смо и ниво 24-часовне протеинурије и *UACR* са нивоом укупног холестерола и триглицерида на крају студије, у групи пацијената који не пуше цигарете нисмо добили значајну корелацију између ових параметара. У групи пацијената који пуше цигарете, нисмо доказали негативну корелацију између витамина *D* и 24-часовне протеинурије и витамина *D* и *UACR*. Корелирали смо и ниво 24-часовне протеинурије и *UACR* са нивоом укупног холестерола и триглицерида на крају испитивања и добили јаку позитивну корелацију између 24-часовне протеинурије и укупног холестерола ($r = 0.503$, $p = 0.002$) и 24-часовне протеинурије и нивоа триглицерида ($r = 0.493$, $p = 0.002$). Такође смо добили позитивну корелацију између *UACR* и нивоа укупног холестерола ($r = 0.480$, $p = 0.003$), и између *UACR* и нивоа триглицерида ($r = 0.480$, $p = 0.003$). Кад сумирамо ове резултате видимо да је протеинурија снижена и код пацијената који пуше и који не пуше цигарете, али је негативна корелација доказана само у групи пацијената који не пуше цигарете (145).

Ниво апсолутних и коригованих концентрација нефрина у урину је на почетку испитивања био незнатно нижи у групи пацијената који пуше цигарете, након завршене супституције пацијенти који пуше цигарете имају значајан нумерички пад апсолутних и коригованих концентрација нефрина у урину али разлика између група како на почетку тако и на крају испитивања је без статистичке значајности. Концентрација нефрина у крви и на почетку и на крају испитивања је нижа у групи пацијената који не пуше цигарете али разлика између група је без статистичке значајности, а ниво нефрина након шестомесечне примене витамина *D* расте у обадве групе, али такође без статистичке значајности (145,146).

Ниво апсолутних и коригованих концентрација *TGF-β1* у урину на почетку испитивања је био статистички значајно нижи у групи пацијената који не пуше цигарете, док је на крају испитивања ниво апсолутних и коригованих концентрација *TGF-β1* у урину снижен у обадве групе али статистички значајан пад имамо само у групу пацијената који пуше цигарете ($p = 0.001$). Што је у супротности са другим ауторима (95). *Kim* и сарадници су доказали статистички значајно снижење нивоа *TGF-β1* у урину након примене витамина *D* само код непушача (95). Ниво *TGF-β1* у крви на почетку и на крају испитивања је нижи у групи пацијената који не пуше цигарете али разлика је без статистичке значајности, и разлика између група није статистички значајна.

Ниво апсолутних и коригованих концентрација *VEGF-A* у урину на почетку и на крају испитивања је био нижи у групи пацијената који не пуше цигарете, али разлика између група није била статистички значајна. Након завршене супституције ниво апсолутних и коригованих концентрација *VEGF-A* у урину на крају испитивања статистички је значајно снижен у обадве групе ($p < 0.001$). Ниво *VEGF-A* у крви на почетку испитивања је за нијансу био виши у групи пацијената који не пуше цигарете али разлика између група како на почетку, тако и на крају студије је без статистичке значајности. Упоредивши ниво *VEGF-A* у крви на почетку и на крају испитивања нема статистички значајне промене.

Када сумирамо резултате везане за пушачки статус можемо рећи да су наши пацијенти који пуше цигарете имали виши ниво витамина *D* у крви на почетку испитивања у односу на непушаче, али да је примена витамина *D* довела до већег процентуалног пораста његове концентрације на крају студије код непушача. Концентрације свих испитиваних биомаркера у урину на почетку испитивања су више код пацијената који пуше цигарете у односу на непушаче, такво стање је и са концентрацијама у крви, једино је вредност *VEGF-A* нижа код пушача. Након завршене надокнаде витамина *D*, *VEGF-A* у урину је снижен у обадве групе, док је *TGF-β1* снижен само код пушача. Протеинурија и липидни статус су кориговани у обадве групе али негативна корелација између витамина *D* и протеинурије је доказана код непушача, а између витамина *D* и холестерола код пушача. Корекцију недостатка витамина *D* треба у сваком случају спроводити и код пушача и код непушача.

На основу свих претходно изнетих резултата можемо рећи да корекција недостатка витамина *D* код наших пацијената са ДМ тип 2, има ренопротективно дејство, како код пацијената са присутном албуминуријом, тако и код пацијената без албуминурије. Узимајући у обзир све праћене параметре као и биомаркере можемо рећи да је то дејство можда и најјаче код пацијенат са већ испољеном ДН, односно микро и макроалбуминуријом. Такође поред ренопротективног ефекта, витамин *D* код пацијената са ДМ тип 2 вероватно утиче и на превенцију кардиоваскуларних догађаја, с обзиром да је статистички значајно снижена албуминурија, коригован липидни статус и побољшани параметри гликорегулације и инфламације. Међутим кардиоваскуларни догађаји нису били предмет садашњег испитивања, али нам добијени подаци могу сугерисати на шта би смо могли ставити акценат у наредним студијама.

Да ли се неки од праћених биомаркера може издвојити као рани биомаркер ДН не можемо јасно рећи. Оно што је сигурно да витамин *D* снижава концентрацију *VEGF-A* у

урину и код пацијената без албуминурије, што би могло указивати на позитиван ефекат витамина *D* на стабилизацију функције подоцита и пре појаве манифестне ДН. Код оболелих од ДМ познато је да концентрација *VEGF-A* већ у раним фазама болести расте, и управо се сматра да ће се контролом *VEGF-A* утицати на стабилизацију подоцита а тиме и на превенцију ДН. Контролом *VEGF-A* могле би се у одређеној мери превенирати и друге васкуларне компликације.

Могуће је да би се са већим бројем пацијената и дужим периодом праћења добили још егзактнији подаци. Могао би се детаљније испитати ефекат витамина *D* на проинфламаторне цитокине и кардиоваскуларне догађаје које овом приликом нисмо пратили. Испитивање би се могло проширити и на нове уринарне или серумске биомаркере које други аутори наводе као потенцијалне ране показатеље развоја и прогресије ДН.

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу изнетих резултата могу се извести следећи закључци:

1. Примена холекалциферола према наведеном студијском протоколу доводи до статистички значајног пораста концентрације витамина *D* у крви код пацијената са ДМ тип 2 и недостатком витамина *D*, без пропратних нежељених ефеката.
2. Корекција недостатка витамина *D* код пацијената са ДМ тип 2, доводи до пораста клиренса креатинина код пацијената у групи са микроалбуминуријом и макроалбуминуријом, снижења концентрације *CRP-a* у групи са нормоалбуминуријом и микроалбуминуријом и снижење *HbA1c*, укупног холестерола, триглицерида, *UACR* и 24-часовне протеинурије у све три испитиване групе.
3. Након корекције недостатка витамина *D* апсолутне и кориговане концентрације нефрина у урину су статистички значајно снижене код пацијената са микроалбуминуријом.
4. Након корекције недостатка витамина *D* апсолутне и кориговане концентрације *TGF-β1* у урину су статистички значајно снижене код пацијената са макроалбуминуријом, и нумерички значајно снижене у групи са микроалбуминуријом, нема промена у концентрацији *TGF-β1* у крви.
5. Корекција недостатка витамина *D* значајно снижава апсолутне и кориговане концентрације *VEGF-A* у урину код пацијената у све три испитиване групе, али без утицаја на концентрацију *VEGF-A* у крви.
6. Надокнада витамина *D* има јаче ренопротективно дејство код пацијената који на почетку студије имају дефицијенцију витамина *D*, ти пацијенти на почетку испитивања имају вишу концентрацију *HbA1c*, и свих праћених биомаркера како у урину тако и у крви у односу на пацијенте са инсуфицијенцијом витамина *D*.
7. Нормализација нивоа витамина *D* на крају студије статистички значајно појачава ефекат витамина *D* на снижавање *UACR*, 24-часовне протеинурије и укупног холестерола у крви.
8. Корекција недостатака витамина *D* побољшава липидни статус и повећава клиренс креатинина код пацијената који пуше цигарете.
9. Корекција недостатака витамина *D* побољшава гликорегулацију и снижава *UACR* и 24-часовну протеинурију код пацијената који не пуше цигарете.
10. Ниво праћених биомаркера је на почетку испитивања нижи код пацијената који не пуше цигарете, а након надокнаде витамина *D* статистички значајно снижење *TGF-*

$\beta 1$ у урину имју пацијената који пуше цигарете, док је концентрација *VEGF-A* у урину снижена и код пушача и код непушача.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. *Ahmed AM*. History of diabetes mellitus. *Saudi Med J* 2002;23(4):373-8.
2. *Iskeandar AZ*. Arabic-Islamic medicine and its influence on the Latin West. *Medical Journal of Islamic World* 1986;1:64-67.
3. *McGrew RE*. Encyclopedia of Medical history. 1st ed. London, (United Kingdom): McMillan Press; p. 74-297.
4. *Langerhans P*. Contributions to the microscopic anatomy of the pancreas. Berlin (DE): Lang G; 1869. Reprint of the German origin with an English Translation. Morrison H. Baltimore, (USA): The John Hopkin's Press;1937. p. 85- 105.
5. *Pratt JH*. A reappraisal of researchers leading to the discovery of insulin. *Journal of History of Medicine* 1954; 9: 281-289.
6. *Wrenshall GA, Hatenyi G, Feasby WR*. The story of insulin. London, (United Kingdom): The Bodley Heod Ltd;1962. p. 39-52.
7. *Banting F, Best C, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA*. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus: a preliminary report. *Canadian Medical Association Journal* 1922;12:141-146.
8. *Gerich JE*. Oral hypoglycemic agents. *New Eng J Med* 1989;321:1231-1245.
9. *Mac Pherson JN, Feely J*. Insulin. *BMJ* 1990;300:731-736.
10. *Amitani M, Asakawa A, Amitani H, Inui A*. The role of leptin in the control of insulin-glucose axis. *Front Neurosci* 2013;7:51.
11. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*. 7th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2015.
12. *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.
13. *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.
14. *Holman N, Young B, Gadsby R*. Current prevalence of Type 1 and Type 2 diabetes in adults and children in the UK. *Diabet Med J Br Diabet Assoc* 2015;32:1119–20.
15. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 populationbased studies with 4.4 million participants. *Lancet Lond Engl* 2016;387:1513–30.
16. *van Dooren FEP, Neffs G, Schram MT, Verhey FRJ, Denollet J, Pouwer F*. Depression and risk of mortality in people with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 2013;8:e57058.

17. *Degli Esposti L, Saragoni S, Buda S, Sturani A, Degli Esposti E.* Glycemic control and diabetes-related health care costs in type 2 diabetes; retrospective analysis based on clinical and administrative databases. *Clin Outcomes Res CEOR* 2013;5:193–201.
18. Diabetes UK. The cost of diabetes. Diabetes UK, London, United Kingdom; 2014.
19. United States Renal Data System. 2016 USRDS Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. Bethesda, MD: National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2016.
20. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. World population prospects: the 2015 revision. New York, USA: World Population Prospects; 2015.
21. Serbian Diabetes Register; report No7. Edt. Rakočević I., Miljuš D. Institute of Public Health of Serbia "Dr Milan Jovanović Batut" 2013. Incidence and mortality of diabetes in Serbia.
22. *Lalić NM, Zamaklar M, Pudar G, Kocić R, Antić S, Pešić M et al.* Nac vodič dobre Klin prakse DIABETES Mellit. 2012.
23. World Health Organization. Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycemia: Report of a WHO/IDF Consultation. Geneva, World Health Org., 2006.
24. *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;37(10):2864–83.
25. *Atkinson MA, Maclaren NK.* The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1994;331:1428.
26. *Tisch R, McDevitt H.* Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 1996; 85:291.
27. *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.
28. *Imagawa A, Hanafusa T, Miyagawa J, Matsuzawa Y.* A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies. Osaka IDDM Study Group. *N Engl J Med* 2000; 342: 301.
29. *Atkinson MA, Eisenbarth GS.* Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet.* 2001 Jul 21;358(9277):221-9. Review. Erratum in: *Lancet.* 2001; 358(9283): 766.
30. *Hyöty H, Taylor KW.* The role of viruses in human diabetes. *Diabetologia* 2002; 45:1353.
31. *Lin YC, Chang YH, Yang SY, Wu KD, Chu TS.* Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease. *J Formos Med Assoc.* 2018;117(8):662-675.
32. *Baynest HW.* Classification, Pathophysiology, Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *Diabetes Metab.* 2015; 6(5): 1–9.

33. *Sladek R, Rocheleau G, Rung J, et al.* A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 2007; 445:881.
34. *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.
35. Gong W, Liu ZH, Zeng CH, Peng A, Chen HP, Zhou H, Li LS. Amylin deposition in the kidney of patients with diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2007; 72(2): 213-8.
36. *Duran-Salgado MB, Rubio-Guerra AF.* Diabetic nephropathy and inflammation. *World J Diabetes.* 2014; 5(3): 393-8.
37. *American Diabetes Association.* 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018, *Diabetes Care* 2018;41(1):S13-S27.
38. *Association AD.* Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care.* 2016;39(1):13–22.
39. *Pinhas-Hamiel O, Zeitler P.* Acute and chronic complications of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *Lancet.* 2007;369(9575):1823–31.
40. *Aastha Chawla, Rajeev Chawla, and Shalini Jaggi.* Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? *Indian J Endocrinol Metab* 2016; 0(4):546–551.
41. *Duff M, Demidova O, Blackburn S, Shubrook J.* Cutaneous Manifestations of Diabetes Mellitus. *Clin Diabetes.* 2015;33(1):40–8.
42. *Krentz AJ, Clough G, Byrne CD.* Interactions between microvascular and macrovascular disease in diabetes: Pathophysiology and therapeutic implications. *Diabetes Obes Metab.* 2007;9:781–91.
43. *Al-Wakeel JS, Hammad D, Al Suwaida A, Mitwalli AH, Memon NA, Sulimani F.* Microvascular and macrovascular complications in diabetic nephropathy patients referred to nephrology clinic. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2009;20:77–85.
44. *Matheus AS, Gomes MB.* Early aggressive macrovascular disease and type 1 diabetes mellitus without chronic complications: A case report. *BMC Res Notes.* 2013;6:222.
45. *Orasanu G, Plutzky J.* The pathologic continuum of diabetic vascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53(5 Suppl):S35–42.
46. *Ruan Y, Guo Y, Zheng Y, Huang Z, Sun S, Kowal P, Shi Y, Wu F.* Cardiovascular disease (CVD) and associated risk factors among older adults in six low-and middle-income countries: results from SAGE Wave 1. *BMC Public Health.* 2018;18(1):778. doi: 10.1186/s12889-018-5653-9.
47. *Parchwani D. Upadhyah A.* Diabetic Nephropathy: Progression and Pathophysiology. *International Journal of Medical Science and Public Health* 2012;1:Issue 2
48. *Dragović T.* Prirodni tok dijabetesne nefropatije. In: *Dragović T.* editor. *Dijabetesna nefropatija patofiziologija, primarna i sekundarna prevencija.* Belgrade: Medija centar „Obrana“; 2017. p. 21-40. (Serbian)

49. *Nah EH, Cho S, Kim S, Cho HI.* Comparison of Urine Albumin-to-Creatinine Ratio (ACR) Between ACR Strip Test and Quantitative Test in Prediabetes and Diabetes. *Ann Lab Med.* 2017;37(1):28-33.
50. *Araki S, Haneda M, Sugimoto T, Isono M, Isshiki K, Kashiwagi A et al.* Factors associated with frequent remission of microalbuminuria in patients with type 2 diabetes, *Diabetes* 2005;54:2983-7.
51. *Geade P, Tarnow L, Vedel P, Parving HH, Pederson O.* Remission to normoalbuminuria during multifactorial treatment preserves kidney function in patients with type 2 diabetes and microalbuminuria. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 2784-8.
52. *Fioretto P, Caramori ML, Mauer M.* The kidney in diabetes: dynamic pathways of injury and repair. The Camillo Golgi Lecture 2007. *Diabetologia* 2008;51(8):1347–55.
53. *Dragović T.* Uticaj metaboličke kontrole na nastanak i razvoj bubrežne lezije u šećernoj bolesti. *Vojnosanit Pregl* 2002; 59(3):293–297.
54. *Novak JE, Yee J.* Diabetes and the Kidney: Sweet Dreams. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2018;25(2):115-118.
55. *Carranza K, Veron D, Cercado A, Bautista N, Pozo W, Tufro A, Veron D.* Cellular and molecular aspects of diabetic nephropathy; the role of VEGF-A. *Nefrologia.* 2015; 35(2): 131-8.
56. *Teng B, Duong M, Tossidou I, Yu X, Schiffer M.* Role of protein kinase C in podocytes and development of glomerular damage in diabetic nephropathy. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014;5:179.
57. *Quack I, Woznowski M, Potthoff SA, Palmer R, Konigshausen E, Sivritas S, et al.* PKC alpha mediates beta-arrestin2-dependent nephrin endocytosis in hyperglycemia. *J Biol Chem* 2011; 286:12959–70.
58. *Menne J, Meier M, Park JK, Boehne M, Kirsch T, Lindschau C, et al.* Nephrin loss in experimental diabetic nephropathy is prevented by deletion of protein kinase C alpha signaling in vivo. *Kidney Int* 2006;70:1456–62.
59. *Veron D, Reidy K. J, Bertuccio C, Teichman J, Villegas G, Jimenez J Shen W, Kopp JB, Thomas DB, Tufro A.* Overexpression of VEGF-A in podocytes of adult mice cause glomerular disease. *Kidney Int* 2010; 77(11): 989-99.
60. *Anil Kumar P, Welsh GI, Saleem MA, Menon RK.* Molecular and cellular events mediating glomerular podocyte dysfunction and depletion in diabetes mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014;5:151.
61. *Yehia M. Shaker, Hanan A. Soliman, Elham Ezzat, Nervana S. Hussein, Esmat Ashour, Ashraf Donia, Soad M. Eweida.* Serum and urinary transforming growth factor beta 1 as biochemical markers in diabetic nephropathy patients. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences.* 2014; 3(1):16-23.

62. *Lei L, Mao Y, Meng D, Zhang X, Cui L, Huo Y, Wang Y.* Percentage of circulating CD8+ T lymphocytes is associated with albuminuria in type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2014;122 (1): 27-30.
63. *Brosius FC, Coward RJ.* Podocytes, signaling pathways, and vascular factors in diabetic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2014;21(3):304-10.
64. *Gnudi L, Viberti G, Raij L, Rodriguez V, Burt D, Cortes P, Hartley B, Thomas S, Maestrini S, Gruden G.* GLUT-1 over expression: Link between hemodynamic and metabolic factors in glomerular injury? *Hypertension* 2003; 42:19-24.
65. *Takebayashi K, Matsumoto S, Aso Y, Inukai T.* Association between circulating monocyte chemoattractant protein-1 and urinary albumin excretion in nonobese Type 2 diabetic patients. *J Diabetes Complications* 2006;20:98-104.
66. *García-García PM, Getino-Melián MA, Domínguez-Pimentel V, Navarro-González JF.* Inflammation in diabetic kidney disease. *World J Diabetes.* 2014;5(4):431-43.
67. *Lopez-Parra V, Mallavia B, Egido J, Gomez-Guerrero C.* Immunoinflammation in Diabetic Nephropathy: Molecular Mechanisms and Therapeutic Options. In: Chan JSD. *Diabetic Nephropathy.* InTech, Chapters, 2012:127-146.
68. *Marrero MB, Banes-Berceli AK, Stern DM, Eaton DC.* Role of the JAK/STAT signaling pathway in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290:F762-F768.
69. *Moriya T, Tanaka K, Hosaka T, Hirasawa T, Fujita Y.* Renal structure as an indicator for development of albuminuria in normo- and microalbuminuric type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2008;82(3):298-304.
70. *Kefalides NA.* Basement membrane research in diabetes mellitus. *Coll Relat Res* 1981;1:295–910.
71. *Groggel G, Stevenson J, Hovingh P, Linker A, Border W.* Changes in heparan sulfate correlate with increased glomerular permeability. *Kidney Int* 1988;33:517-523.
72. *Zimmerman KW.* Über den Bau des glomerulus der menschlichen niere. *Z Mikr Anat Forsch* 1929;18:520–2.
73. *Petrica L, Vlad A, Gluhovschi G, Gadalean F, Dumitrascu V, Gluhovschi C, Velciov S, Bob F, Vlad D, Popescu R, Milas O, Ursoniu S.* Proximal tubule dysfunction is associated with podocyte damage biomarkers nephrin and vascular endothelial growth factor in type 2 diabetes mellitus patients: a cross-sectional study. *PLoS One.* 2014; 9(11):e112538.
74. *Satoh D, Hirose T, Harita Y, Daimon C, Harada T, Kurihara H, et al.* aPKC λ maintains the integrity of the glomerular slit diaphragm through trafficking of nephrin to the cell surface. *J Biochem* (2014);156:115–28.

75. *Dipaolo S, Ranieri E, Schena F.* High glucose concentration induces the overexpression of TGF- β through the activation of a platelet derived growth factor loop in human mesangial cells. *Am J Pathol* 1996;149: 2095-2106.
76. *Vasylyeva TL, Ferry RJ.* Novel roles of the IGF – IGFBP axis in etiopathophysiology of diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;76(2):177-86.
77. *Gilbert RE, Cooper ME.* The tubulo-interstitium in progressive diabetic kidney disease: more than an aftermath of glomerular injury. *Kidney Int* 1999;56:1627–37.
78. *Tervaret T.C., Mooyaart A., Amann K., Cohen A., Cook H. et.al.* Pathologic classification of diabetes nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:556-63.
79. *Fioretto P, Mauer S, Bilous R.W, Gotez F.C, Sutherlan D.E, Steffs M.W.* Effects of pancreas transplantation on glomerular structure in insulin dependent diabetic patients with their own kidneys. *Lancet* 1993; 342:1193-6.
80. *National kidney Foundation. KDOQI Clinical Practics Guideline for Diabetes and CKD 2012 update. Am J Kidney Dis* 2012;60(5):850-86.
81. *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.
82. *Sharma P.* Estimated glomerular filtration rate and urine albumin-to-creatinine ratio are renal markers associated with risks of cardiovascular diseases. *J Lab Physicians.* 2017; 9(4):343-344.
83. *Dragovic T.* Microalbuminuria in diabetes: definition, identification techniques, and the significance of early recognition. *Vojnosanit Pregl* 2006; 63(12): 1027–1032.
84. *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.
85. *O'Connor AS, Schelling JR.* Diabetes and the Kidney. *Am J Kidney Dis.* 2005;46(4):766–73.
86. *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.
87. *Krolewski A.S., Niewczas M.A., Skupien J., Gohda T., Smiles A., Eckfeldt J.H. et.al.* Early progressive renal decline precedes the onset of microalbuminuria and its progresione to macroalbuminuria. *Diabetes Care* 2014;37:226-34.
88. *Dwyer JP, Parving HH, Hunsicker LG, Ravid M, Remuzzi G, Lewis JB.* Renal Dysfunction in the Presence of Normoalbuminuria in Type 2 Diabetes: Results from the DEMAND Study. *Cardiorenal Med.* 2012 Feb;2(1):1-10.
89. *Reutens A.* Epidemiology of diabetic kidney disease. *Med Clin N Am* 2013;97:1-18.

90. Lee SY, Choi ME. Urinary biomarkers for early diabetic nephropathy: beyond albuminuria. *Pediatr Nephrol*. 2015;30(7):1063-75.
91. Chen S, Jim B, Ziyadeh FN. Diabetic nephropathy and transforming growth factor-beta: transforming our view of glomerulosclerosis and fibrosis build-up. *Semin Nephrol*. 2003;23(6):532-43.
92. Chang AS., Hathaway CK., Smithies O., Kakoki M. Transforming growth factor- β 1 and diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2016; 310(8):F689–F696.
93. Lan HY. Diverse roles of TGF- β /Smads in renal fibrosis and inflammation. *Int J Biol Sci* 2011;7:1056-1067.
94. Qiao YC, Chen YL, Pan YH, Ling W, Tian F, Zhang XX, Zhao HL. Changes of transforming growth factor beta 1 in patients with type 2 diabetes and diabetic nephropathy: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(15): e6583.
95. Kim MJ, Frankel AH, Donaldson M, Darch SJ, Pusey CD, Hill PD, Mayr M, Tam FW. Oral cholecalciferol decreases albuminuria and urinary TGF- β 1 in patients with type 2 diabetic nephropathy on established renin-angiotensin-aldosterone system inhibition. *Kidney Int*. 2011; 80(8): 851-60.
96. Tian Y, Lv G, Yang Y, Zhang Y, Yu R, Zhu J, Xiao L, Zhu J. Effects of vitamin D on renal fibrosis in diabetic nephropathy model rats. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(6):3028-37.
97. Zhang Z, Sun L, Wang Y, Ning G, Minto AW, Kong J, et al. Renoprotective role of the vitamin D receptor in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2008; 73(2): 163-71.
98. Wagner N, Wagner KD, Xing Y, Scholz H, Schedl A.. The major podocyte protein nephrin is transcriptionally activated by the Wilms' tumor suppressor WT1. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:3044–51.
99. Uchida K, Suzuki K, Iwamoto M, Kawachi H, Ohno M, Horita S, Nitta K. Decreased tyrosinephosphorylation of nephrin in rat and human nephrosis. *Kidney Int*. 2008;73(8):926-32.
100. Tufro A, Veron D. VEGF and podocytes in diabetic nephropathy. *Semin Nephrol*. 2012; 32(4): 385-93.
101. Veron D, Reidy KJ, Bertuccio C, Teichman J, Villegas G, Jimenez J, et al. Overexpression of VEGF-A in podocytes of adult mice causes glomerular disease. *Kidney Int* 2010;77:989–99.
102. Sun L, Yuan Q., Cao N., Guo W., Yao L., Freng J., M. et al. VEGF polymorphism may contribute to the risk of diabetic nephropathy in patients with diabetes mellitus: a meta analysis. *The Scientific World Journal* 2014; ID 624573.
103. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008;359:1577–89.

104. Charbonnel B, Dormandy J, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Skene A; PROactive Study Group. The prospective pioglitazone clinical trial in macrovascular events (PROactive): can pioglitazone reduce cardiovascular events in diabetes? Study design and baseline characteristics of 5238 patients. *Diabetes Care*. 2004;27(7):1647-53.
105. Fuller JH, Stevens LK, Wang SL. Risk factors for cardiovascular mortality and morbidity: The WHO multinational study of vascular disease in diabetes. *Diabetologia*. 2001;44(Suppl 2):S54-64.
106. Willison A, Tully V, Davey P. All Patients with Diabetes Should Have Annual UACR Tests. Why is That So Hard? *BMJ Qual Improv Rep*. 2016;5(1). pii:u209185.w3747.
107. Mitri J, Pittas AG. Vitamin D and diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2014;43(1):205-32.
108. Afzal S, Bojesen SE, Nordestgaard BG. Low 25-hydroxyvitamin D and risk of type 2 diabetes: a prospective cohort study and metaanalysis. *Clin Chem* 2013;59(2):381-91.
109. Park SK, Garland CF, Gorham ED, BuDoff L, Barrett-Connor E. Plasma 25-hydroxyvitamin D concentration and risk of type 2 diabetes and pre-diabetes:12-year cohort study. *PLoS One*. 2018;13(4):e0193070. doi:10.1371/journal.pone.0193070.
110. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev*. 2016; 96(1): 365-408.
111. Li X, Liu Y, Zheng Y, Wang P, Zhang Y. The Effect of Vitamin D Supplementation on Glycemic Control in Type 2 Diabetes Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* 2018 19; 10(3). pii: E375. doi: 10.3390/nu10030375.
112. Autier P, Boniol M, Pizot C, Mullie P. Vitamin D status and ill health: a systematic review. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014; 2(1): 76-89.
113. De Luca H. History of the discovery of vitamin D and its active metabolites. *Bonekey* 2014. Rep 3:479.
114. Janković S.M. Farmakologija i toksikologija. 3 izdanje. Medicinski fakultet u Kragujevcu 2011. Rep 3:479
115. Kimball S, Fuleihan Gel-H, Vieth R. Vitamin D: a growing perspective. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2008; 45(4):339-414.
116. German Nutrition Society. New reference values for vitamin D. *Ann Nutr Metab* 2012;60(4): 241-6.
117. Holick MF. Bioavailability of vitamin D and its metabolites in black and white adults. *N Engl J Med* 2013;369(21): 2047-8.
118. Cipriani C, Pepe J, Piemonte S, Colangelo L, Cilli M, Minisola S. Vitamin D and its relationship with obesity and muscle. *Int J Endocrinol* 2014: 8412-48.

119. *Tsiaras WG, Weinstock MA.* Factors influencing vitamin D status. *Acta Derm Venereol* 2011; 91(2): 115-24.
120. *Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E.* Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289(1):F8-28.
121. *Bover J, Egido J, Fernández-Giráldez E, Praga M, Solozábal-Campos C, Torregrosa JV, Martínez-Castelao A.* Vitamin D, vitamin D receptor and the importance of its activation in patients with chronic kidney disease. *Nefrologia.* 2015;35(1):28-41.
122. *Jones G, Prosser DE, Kaufmann M.* Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D. *J Lipid* 2014;55(1): 13-31.
123. *Zervekh JE.* Blood biomarkers of vitamin D status. *Am J Clin Nutr* 2008;87(4):1087S-91S.
124. *Pludowski P, Holick MF, Grant WB, Konstantynowicz J, Mascarenhas MR, Haq A, et.al.* Vitamin D supplementation guidelines. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018;175:125-135.
125. *Holick MF.* Vitamin D Deficiency. *N Engl J Med* 2007;357(3): 266-81.
126. *Mohr SB.* A brief history of vitamin d and cancer prevention. *Ann Epidemiol* 2009;19(2): 79-83
127. *Gonzalez-Parra E, Rojas-Rivera J, Tuñón J, Praga M, Ortiz A, Egido J.* Vitamin D receptor activation and cardiovascular disease. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27 Suppl 4: iv17-21
128. *Humalda JK, Goldsmith DJ, Thadhani R, de Borst MH.* Vitamin D analogues to target residual proteinuria: potential impact on cardiorenal outcomes. *Nephrol Dial Transplant* 2015; 30(12): 1988-94.
129. *Mirhosseini N, Vatanparast H, Mazidi M, Kimball SM.* Vitamin D Supplementation, Glycemic Control, and Insulin Resistance in Prediabetics: A Meta-Analysis. *J Endocr Soc.* 2018;2(7):687-709.
130. *Tabesh M, Azadbakht L, Faghihimani E, Tabesh M, Esmailzadeh A.* Effects of calcium-vitamin D co-supplementation on metabolic profiles in vitamin D insufficient people with type 2 diabetes: a randomised controlled clinical trial. *Diabetologia.* 2014;57(10):2038-47.
131. *Asemi Z, Samimi M, Tabassi Z, Shakeri H, Esmailzadeh A.* Vitamin D supplementation affects serum high-sensitivity C-reactive protein, insulin resistance, and biomarkers of oxidative stress in pregnant women. *J Nutr* 2013; 143(9): 1432-8.
132. *Garbossa SG, Folli F.* Vitamin D, sub-inflammation and insulin resistance. A window on a potential role for the interaction between bone and glucose metabolism. *Rev Endocr Metab Disord* 2017;18(2):243-58.
133. *Momeni A, Mirhosseini M, Kabiri M, Kheiri S.* Effect of vitamin D on proteinuria in type 2 diabetic patients. *J Nephropathol* 2017;6(1):10-4.
134. *de Zeeuw D, Agarwal R, Amdahl M, Audhya P, Coyne D, Garimella T, et al.* Selective vitamin D receptor activation with paricalcitol for reduction of albuminuria in patients with type 2 diabetes (VITAL study): a randomised controlled trial. *Lancet* 2010; 376 (9752): 1543-51.

135. Petrović M, Dragović T, Petrović S, Obrenčević K, Rančić N, Đurašinović T, Petrović D, Ignjatović Lj, Rabrenović V, Nenezić N, Marinković D, Maksić Đ. Effect of vitamin D on proteinuria, lipid status, glycoregulation and c-reactive protein in patients with type-2 diabetes mellitus. *Vojnosanit Pregl* (2018); DOI: <https://doi.org/10.2298/VSP180525113P>
136. Schmitz KJ, Skinner HG, Bautista LE, et al. Association of 25-hydroxyvitamin D with blood pressure in predominantly 25-hydroxyvitamin D deficient Hispanic and African Americans. *Am J Hypertens* 2009;22(8): 867-70.
137. Huang Y, Yu H, Lu J, Guo K, Zhang L, Bao Y, et al. Oral supplementation with cholecalciferol 800 IU ameliorates albuminuria in Chinese type 2 diabetic patients with nephropathy. *PLoS One* 2012; 7(11): e50510.
138. Ramiro-Lozano JM, Calvo-Romero JM. Effects on lipid profile of supplementation with vitamin D in type 2 diabetic patients with vitamin D deficiency. *Ther Adv Endocrinol Metab* 2015; 6(6): 245-8.
139. Qin F.X. et.al. Effects of vitamin D on plasma lipid profiles in statin-treated patients with hypercholesterolemia: A randomized placebo-controlled trial. *Clinical Nutrition* 2015;34(2):201–206.
140. Aguirrea P.M. et al. The effect of vitamin D supplementation on serum lipids in postmenopausal women with diabetes: A randomized controlled trial. *Clinical Nutrition* 2015; 34(5): 799-804.
141. Sollid ST, Hutchinson MY, Fuskevåg OM, Figenschau Y, Joakimsen RM, Schirmer H, Njølstad I, Svartberg J, Kamycheva E, Jorde R. No effect of high-dose vitamin D supplementation on glycemic status or cardiovascular risk factors in subjects with prediabetes. *Diabetes Care*. 2014;37(8): 2123-31.
142. Kampmann U, Mosekilde L, Juhl C, et al. Effects of 12 weeks high dose vitamin D3 treatment on insulin sensitivity, beta cell function, and metabolic markers in patients with type 2 diabetes and vitamin D insufficiency - a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Metabolism* 2014;63(9): 1115-24.
143. Seida JC, Mitri J, Colmers IN, Majumdar SR, Davidson MB, Edwards AL, Hanley DA, Pittas AG, Tjosvold L, Johnson JA. Clinical review: Effect of vitamin D3 supplementation on improving glucose homeostasis and preventing diabetes: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014; 99(10): 3551-60. Erratum in: *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(8): 3219.
144. Hansen KE. High-dose vitamin D: helpful or harmful? *Curr Rheumatol Rep*. 2011;13(3):257-64.
145. Brot C, Jorgensen NR, Sorensen OH. The influence of smoking on vitamin D status and calcium metabolism. *Eur J Clin Nutr*. 1999;53(12):920-6.

146. Jiang CQ, Chan YH, Xu L, Jin YL, Zhu T, Zhang WS, Cheng KK, Lam TH. Smoking and serum vitamin D in older Chinese people: cross-sectional analysis based on the Guangzhou Biobank Cohort Study. *BMJ Open*. 2016; 6(6): e010946.
147. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3rd, Feldman HI, et al. CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009; 150(9): 604-12. Erratum in: *Ann Intern Med* 2011(20); 155(6): 408.
148. Fried LF, Emanuele N, Zhang JH, Brophy M, Conner TA, Duckworth W, et al. Combined angiotensin inhibition for the treatment of diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 2013; 369(20): 1892-903.
149. Parving HH, Brenner BM, McMurray JJ, de Zeeuw D, Haffner SM, Solomon SD, et al. Cardiorenal end points in a trial of aliskiren for type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2012; 367(23): 2204-13.
150. Pereira-Santos M, Costa PR, Assis AM, Santos CA, Santos DB. Obesity and vitamin D deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 2015; 16(4): 341-9.
151. Xiao X, Wang Y, Hou Y, Han F, Ren J, Hu Z. Vitamin D deficiency and related risk factors in patients with diabetic nephropathy. *J Int Med Res* 2016; 44(3): 673-84.
152. Rafiq S, Jeppesen PB. Is Hypovitaminosis D Related to Incidence of Type 2 Diabetes and High Fasting Glucose Level in Healthy Subjects: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Nutrients* 2018; 10(1). pii: E59. doi: 10.3390/nu10010059.
153. Sauriasari R, Pratiwi MY. Urinary TGF- β 1 was not independently associated with renal function in diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2018;11:597-602.
154. Maxwell CS, Wood RJ. Update on vitamin D and type 2 diabetes. *Nutr Rev*. 2011; 69(5): 291-5.

БИОГРАФИЈА

Асист. др сц.мед. Маријана Д. Петровић је рођена 27.11.1974. године у Власеници. Основну и средњу школу је завршила са одличним успехом. Дипломирала је на Медицинском факултету Универзитета у Београду 2000. године, а специјализацију из интерне медицине завршила је 2005. год. на Војномедицинској Академији са одличним успехом. Од тада ради као лекар - специјалиста у Клиници за нефрологију Војномедицинске академије. 2016. године завршила је последипломске студије облика уже специјализације из нефрологије и положила субспецијалистички испит. Од 2012. године је асистент на Медицинском факултету Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду.

Школске 2010/11. год. уписала је академске докторске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, на предмету Експериментална и клиничка интерна медицина, модул нефрологија и 02.03.2011.године положила је усмени докторски испит, са оценом 9 (девет).

Члан је Тима за кадаверичну трансплантацију бубрега ВМА, Нефролошке секције Српског лекарског друштва, Удружења нефролога Србије, Европског удружење за нефрологију дијализу и трансплантацију (ERA-EDTA), Удружења за трансплантацију органа Србије. Обучена је за самостално извођење перкутаних ултразвучно контролисаних биопсија бубрега. Актуелни пројекат у ком учествује: МФВМА/8/15-17: „Исхрана, нутритивни статус, кардиоваскуларни коморбидитет и квалитет живота код пацијената са преддијализном хроничном бубрежном инсуфицијенцијом и на хемодијализи". Учествовала је на бројним домаћим и међународним научним скуповима и објавила је више научних радова. Поседује знање енглеског и руског језика.

Библиографија

Рад у међународном часопису (M23):

1. **Petrović M**, Dragović T, Petrović S, Obrenčević K, Rančić N, Đurašinović T, Petrović D, Ignjatović Lj, Rabrenović V, Nenezić N, Marinković D, Maksić Đ. Effect of vitamin D on proteinuria, lipid status, glycoregulation and c-reactive protein in patients with type-2 diabetes mellitus. *Vojnosanit Pregl* 2018; doi: 10.2298/VSP180525113P **M23**
2. Obrenčević K, Petrović D, Aleksić P, **Petrović M**, Rančić N, Jovanović D, Nikolić B, Mijušković M, Vavić N, Ignjatović Lj, Maksić Đ. Successful treatment of idiopathic retroperitoneal fibrosis with combined immunosuppressive therapy. *Vojnosanit Pregl* 2018; doi: 10.2298/VSP170714008O **M23**
3. Petrović S, Doder R, Perišić N, **Petrović M**, Brčerević I, Roganović B. Erdheim-Chester disease - A case report. *Vojnosanit Pregl* 2017; 74(6): 585-589. **M23**
4. Dinić MŽ, Zečević RD, Hajduković Z, Mijušković M, Djurić P, Jović Z, Grdinić A, **Petrović M**, Terzić B, Pejović J, Kandolf Sekulović L. Psoriasis is independent factor for early atherosclerosis: A prospective study of cardiometabolic risk profile. *Vojnosanit Pregl* 2016; 73(12): 1094-101. Erratum in: *Vojnosanit Pregl* 2016; 73(12): 1094-101. Erratum in: *Vojnosanit Pregl* 2018; 75(3): 334. **M23**.
5. Mijušković M, Vavić N, Rusović S, Ignjatović L, Obrenčević K, Radojević M, Kovačević Z, Čukić Z, **Petrović M**, Pilčević D, Tadić Pilčević 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. **M23**.
6. 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. **M23**
7. Mijušković M, Milović N, Kovačević B, Jovanović D, Stefanović D, Ignjatović L, Terzić B, Pilčević JT, **Petrović M**, Pilčević D, Obrenčević K, Cerović S. Acquired cystic disease and renal cell carcinoma in hemodialysis patients - A case report on three patients. *Vojnosanit Pregl* 2015;72(10): 932-6. **M23**
8. Ignjatović L, Jovanović D, Kronja G, Dujić A, Marić M, Ignjatović D, Hrvacević R, Kovacević Z, **Petrović M**, Elaković D, Marenović T, Lukić Z, Trkuljić M, Stanković B, Maksić D, Butorajac J, Colić M, Drasković-Pavlović B, Kapulica-Kuljić N, Drasković N, Misović S, Stijelja B, Milović N, Tosevski P, Filipović N, Romić P, Jevtić M, Drasković M, Vavić N, Rabrenović V, Paunić Z, Radojević M, Bjelanović Z, Tomić A, Aleksić P, Kosević B, Mocović D, Bancević V, Magić Z, Vojvodić D, Balint B, Ostojić G, Tukić L, Murgić J, Pervulov S, Rusović S, Sjenčić G, Vesna B, Milavić-Vujković M, Jandrić D, Raicević R, Mijusković M, Obrenčević K, Pilčević D, Cukić Z, Petrović M, Petrović M, Tadić J, Terzić B, Karan Z, Bokonjić D, Dobrić S, Antunović M, Bokun R, Dimitrijević J, Vukomanović-Djurđević B. Living unrelated donor kidney transplantation-a fourteen-year experience. *Vojnosanit Pregl* 2010; 67(12): 998-1002. **M23**
9. **Petrović M**, Petrović S, Obrenčević K, Vavić N, Jovanović D, Maksić Đ, Rančić N, Dragović T, Obradović S, Pilčević D, Tadić J, Vukomanović-Đurđević B, Ignjatović LJ, Mijušković M, Čukić Z. Haemorrhagic fever with renal syndrome and diabetes mellitus - case report. *MD-Medical Data* 2016; 8(1): 047-050. **M52**

Поглавље у књизи М42 (М45):

1. Kovačević Z, Jovanović D, Rabrenović V, **Petrović M.** Patofiziologija hemoragijske groznice sa bubrežnim sindromom. U: Kovačević Z, Jovanović D, Gligić A, Škatarčić V, Dimitrijević J, Marković-Denić Lj, Rabrenović V, Čakanac R, urednici. Hemoragijska groznica sa bubrežnim sindromom. Aleksandrovac: Red Apple doo; 2008:46-58.
2. Marijana Petrović. Patofiziologija dijabetesne nefropatije. U: Tamara Dragović i saradnici. Dijabetesna nefropatija. Beograd: Medija centar „Odbrana“;2017:39-59.

8. 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: Текстурални штампани материјал

Врста рада - ВР: Докторска дисертација

Аутор - АУ: Маријана Д. Петровић

Ментор/коментор - МН: Др сци. мед. Тамара Драговић, ванредни професор

Наслов рада - НР: Утицај супституције витамина D на концентрацију VEGF-A у крви и TGF- β 1 и нефрина у урину код болесника са дијабетес мелитусом тип 2

Језик публикације - ЈП: Српски / ћирилица

Језик извода - ЈИ: Српски / Енглески

Земља публиковања - ЗП: Република Србија

Уже географско подручје - УГП: Шумадијски округ

Година - ГО: 2019.

Издавач - ИЗ: Ауторски репринт

Место и адреса - МС: 34000 Крагујевац, Светозара Марковића 69, Република Србија

Физичи опис рада - ФО: Дисертација има 156 стране, 8 поглавља, 58 табела, 16 графикон, 4 слике и 154 цитиране библиографске јединице

Научна област - УДК: Медицина

Научна дисциплина - ДИ: Клиничка и експериментална интерна медицина - Нефрологија

Предметна одредница/ кључне речи - ПО: дијабетес мелитус тип 2, дијабетесна нефропатија, Хемоглобин А1ц, Ц-реактивни протеин, холестерол, триглицериди, витамин Д, албумин/креатинин однос, холекалциферол, нефрин, VEGF-A и TGF- β 1

Чува се - ЧУ: У У библиотеци Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, Србија

Важна напомена- МН:

Извод – ИД: Увод/Циљ: Недостатак витамина D је често присутан код пацијената са дијабетес мелитусом тип 2 и може бити фактор ризика за бржу прогресију дијабетесне нефропатије и већу инциденцу кардиоваскуларних догађаја. Циљ наше студије је био да се испита утицај надокнаде витамина D на параметре

гликорегулације, инфламације, липидног статуса, албуминурију и биомаркере оштећења бубрежног ткива – нефрин, VEGF-A и TGF- β_1 код пацијената са дијабетес мелитусом тип 2 и недостатком витамина D.

Методe: У проспективну, кохортну студију смо укључили 90 пацијената са дијабетес мелитусом тип 2 и недостатком (инсуфицијенција/дефицијенција) витамина D; од тога је 30 пацијената имало нормалну албуминурију, 30 микроалбуминурију и 30 макроалбуминурију. Спроведена је шестомесечна надокнада витамина D холекалциферол капима: током прва 2 месеца са 20000 IU два пута недељно, а затим је код пацијената код којих је ниво витамина D остао снижен настављено са истом дозом још 4 месеца. Код пацијената код којих се ниво витамина D нормализовао, настављено са 5000 IU два пута недељно. На почетку и на крају испитивања мерен је у крви ниво албумина, хемоглобина, серумског гвожђа, урее, креатинина, јутарње гликемије, гликозилираног хемоглобина, калцијума, фосфора, укупног холестерола, триглицерида, Ц-реактивног протеина, интактног паратиреоидног хормона, а из урина је праћена 24-часовна протеинурија, албумин/креатинин однос и клиренс креатинина. Биомаркери су праћени и у урину и у крви. Вредности калцијума, фосфора и витамина D су проверене и два месеца након започињања супституције због евентуалне корекције дозе холекалциферола. Анализирани су резултати и на основу нивоа витамина D на почетку и на крају студије, као и на основу пушачког статуса оболелих.

Резултати: Најнижи ниво витамина D пре терапије имали су пацијенти у групи са макроалбуминуријом, док је на крају испитивања статистички значајно повишен ниво витамина D у све три групе. Након шестомесечне примене витамина D, постигнуто је статистички значајно снижење нивоа албумин/креатинин односа, 24-часовне протеинурије, укупног холестерола, триглицерида, хемоглобина A1ц и VEGF-A у урину у све три испитиване групе, Ц-реактивног протеина у групи са нормоалбуминуријом и микроалбуминуријом, нефрина у урину у групи са микроалбуминуријом и TGF- β_1 у урину у групи са макроалбуминуријом.

Закључак: Надокнада витамина D високим дозама холекалциферола код пацијената са ДМ тип 2 (са или без албуминурије) снижава Ц-реактивни протеин, хемоглобин A1ц, укупни холестерол, триглицериде у крви и албумин/креатинин однос, 24-часовну протеинурију, VEGF-A, TGF- β_1 и нефрин у урину .

Датум прихватања теме од стране ННВ - ДП: 09.11.2016. године

Датум одбране - ДО:

Чланови комисије - КО:

Председник: Проф. др Дејан Петровић, ванредни професор Факултета медицинских наука
Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина

Члан Проф. др Гордана Радосављевић, ванредни професор Факултета медицинских наука
Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија

Члан Доц. др Мирјана Мијушковић, доцент Медицинског факултета Војномедицинске
академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Интерна медицина

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 material, printed

Contents code: CC Ph.D. Thesis

Author: AU Marijana D. Petrović

Menthor/co-mentor – MN: Associate Professor Tamara Dragović MD PhD

Title – TI: Effect of vitamin D supplementation and concentration of VEGF-A in serum and TGFβ₁ and nephrin in urine in patients with type 2 diabetes mellitus.

Language of text - LT: Serbian/Cyrillic

Language of abstract - LA: Serbian / English

Country of publication – CP: Republic of Serbia

Locality of publication – LP: Shumadia Administrative District

Publication year – PY: 2019

Publisher – PU: Author reprint

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

Physical description – PD: 156 pages, 58 tables, 16 graphics, 4 images and 154 citations

Scientific field – SF: Medicine

Scientific discipline – SD: Experimental and clinical medicine

Subject/key words – SKW: Type-2 diabetes mellitus, diabetic nephropathy, hemoglobin A1c, C-reactive protein, cholesterol, triglycerides, vitamin D, albumin/creatinine ratio, cholecalciferol, nephrin, VEGF-A, TGF- β₁.

UDC

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

Note – N:

Abstract – AB: Background/Aim: Vitamin D insufficiency/deficiency is often present in patients with Type-2 diabetes mellitus and could present a risk factor for rapid progression of diabetic nephropathy and higher incidence of cardiovascular events. The aim of this study was to examine the influence of vitamin D supplementation on glucoregulation, inflammation, cholesterol, triglycerides, albuminuria and biomarkers of renal injury – nephrin, VEGF-A and TGF- β₁ in patients with Type-2 diabetes mellitus and vitamin D insufficiency/deficiency.

Methods: We included 90 patients with Type-2 diabetes mellitus and vitamin D insufficiency/deficiency in this prospective, cohort study. Patients are divided in 3 equal groups: 30 patients with normal albuminuria, 30 with microalbuminuria and 30 with macroalbuminuria. Therapy included 6 months of supplementation with cholecalciferol

drops: first 2 months with 20000 IU twice weekly, than if vitamin D level remained below normal range, we proceeded with same dose next 4 months. If the level of vitamin D normalized, we proceeded with 5000 IU twice weekly. At the beginning and at the end of the study we measured levels of albumin, hemoglobin, serum iron, urea, creatinine, fasting blood glucose, hemoglobin A1c, calcium, phosphorus, total cholesterol, triglycerides, C-reactive protein, intact parathyroid hormone, and urine analysis: 24-hour urine protein, albumin/creatinine ratio and creatinine clearance. Biomarkers are measured in serum and urine. Levels of calcium, phosphorus and vitamin D are also checked 2 months after beginning of therapy due to possible correction of cholecalciferol dose. Results are analysed according to the vitamin D level at the beginning and at the end of the study, and also according to the smoking habits of the patients.

Results: The lowest level of vitamin D, before therapy, is found in patients with macroalbuminuria, while at the end of the study we found significantly higher level of vitamin D in all three groups. After 6 months of therapy we found significant decrease of 24-hour urine protein, total cholesterol, triglycerides, hemoglobin A1c and VEGF-A in urine, in all three groups, and C-reactive protein in patients with normal albuminuria and microalbuminuria, nephrin in urine in patients with microalbuminuria and TGF- β_1 in urine in patients with macroalbuminuria.

Conclusion: vitamin D supplementation with high-dose cholecalciferol in patients with Type-2 diabetes mellitus (with or without albuminuria) decreases C-reactive protein, hemoglobin A1c, total cholesterol, triglycerides in serum, and albumin/creatinine ratio, 24-hour urine protein, VEGF-A, TGF- β_1 and nephrin in urine.

Accepted by the Scientific Board on – ASB: Nov. 09th 2016.

Defended on – DE:

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

- Chairman** Associate professor, Dejan Petrovic, MD, PhD, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac,
Member Associate professor, Gordana Radosavljevic, MD, PhD, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac,
Member Assistant Professor, Mirjana Mijuskovic, MD, PhD, Military Medical Academy, University of Defence, Belgrade.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Маријана Д. Петровић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Утицај супституције витамина D на концентрацију VEGF-A у крви и TGF- β 1 и нефрина у урину код болесника са дијабетес мелитусом тип 2

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 Крагујевцу, 26.12.2018. године,

потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Маријана Д. Петровић _____,

дозвољавам

не дозвољавам

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

Утицај супституције витамина D на концентрацију VEGF-A у крви и TGF- β 1 и нефрина у урину код болесника са дијабетес мелитусом тип 2

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 дозвољавам¹

¹ 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 прерада²

У Крагујевцу _____, 26.12.2018. године,

потпис аутора

² 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

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: **EFFECT OF VITAMIN D ON PROTEINURIA, LIPID STATUS, GLICOREGULATION AND C-REACTIVE PROTEIN IN PATIENTS WITH TYPE-2 DIABETES MELLITUS**

EFEKAT VITAMINA D NA PROTEINURIJU, LIPIDNI STATUS, GLIKOREGULACIJU I C-REAKTIVNI PROTEIN KOD PACIJENATA SA DIJABETES MELITUSOM TIP 2

Authors **Marijana Petrović***, **Tamara Dragović†**, **Stanko Petrović‡**, **Katarina Obrenčević***, **Nemanja Rančić||**, **Tatjana Đurašinović§**, **Dejan Petrović¶**, **Ljiljana Ignjatović***, **Violeta Rabrenović***, **Nemanja Nenezić†**, **Dejan Marinković†**, **Đoko Maksić*** *Vojnosanitetski pregled* (2018); Online First June, 2018.

UDC:

DOI: <https://doi.org/10.2298/VSP180525113P>

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.

PAPER ACCEPTED

EFFECT OF VITAMIN D ON PROTEINURIA, LIPID STATUS, GLICOREGULATION
AND C-REACTIVE PROTEIN IN PATIENTS WITH TYPE-2 DIABETES MELLITUS

EFEKAT VITAMINA D NA PROTEINURIJU, LIPIDNI STATUS,
GLIKOREGULACIJU I C-REAKTIVNI PROTEIN KOD PACIJENATA SA DIJABETES
MELITUSOM TIP 2

Marijana Petrović*, Tamara Dragović†, Stanko Petrović‡, Katarina Obrenčević*, Nemanja Rančić||, Tatjana Đurašinović§, Dejan Petrović¶, Ljiljana Ignjatović*, Violeta Rabrenović*, Nemanja Nenezić†, Dejan Marinković†, Đoko Maksić*

*Clinic for Nephrology, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

†Clinic for Endocrinology, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

‡Clinic for Gastroenterology and Hepatology, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

||Centre for Clinical Pharmacology; Medical Faculty Military Medical Academy,
University of Defence, Belgrade, Serbia

§Institute of Medical Biochemistry, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

¶Department of Internal medicine; Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac,
Serbia ‡

Corresponding author: Petrović Marijana; Clinic for Nephrology, Military Medical
Academy, Crnotravska 17, Belgrade, Serbia; E-mail: makystan@yahoo.com

Abstract

Background/Aim: Vitamin D insufficiency/deficiency is often present in patients with Type-2 diabetes mellitus and could present a risk factor for rapid progression of diabetic nephropathy and for higher incidence of cardiovascular events. The aim of this study was to examine the influence of vitamin D supplementation on proteinuria, cholesterol, triglycerides, C-reactive protein and haemoglobin A1c in patients with Type-2 diabetes mellitus and vitamin D insufficiency/deficiency.

Methods: We included 90 patients with Type-2 diabetes mellitus and vitamin D insufficiency/deficiency in this prospective, cohort study. Patients are divided in 3 equal groups: 30 patients with normal proteinuria, 30 with microproteinuria and 30 with macroproteinuria. Therapy included 6 months of supplementation with cholecalciferol drops: first 2 months with 20000 IU twice weekly, than if level of vitamin D was below normal we proceeded with same dose next 4 months. If the level of vitamin D was normal we proceeded with 5000 IU twice weekly. At the beginning and at the end of the study we measured levels of urea, creatinine, fasting blood glucose, calcium, phosphorus, cholesterol, triglycerides, C-reactive protein, haemoglobin A1c, intact parathyroid hormone, 24-hour urine protein and creatinine clearance. Levels of calcium, phosphorus and vitamin D are also checked 2 months after beginning of therapy due to possible correction of cholecalciferol dose.

Results: The lowest level of vitamin D before therapy is found in patients with macroproteinuria, while at the end of the study we found significantly higher level of vitamin D in all three groups. After 6 months of therapy we found significant decrease of 24-hour urine protein, cholesterol, triglycerides, haemoglobin A1c in all three groups, and C-reactive protein in patients with normal proteinuria and microproteinuria. Significantly negative correlation between vitamin D and 24-hour urine protein, cholesterol and C-reactive protein was found in patients with macroproteinuria. Also, significantly negative correlation was found between vitamin D and haemoglobin A1c, in patients with normal proteinuria, vitamin D and C-reactive protein in patients with microproteinuria.

Conclusion: preventive use of high-dose cholecalciferol supplementation in patients with Type-2 diabetes mellitus (with or without proteinuria) decreases cholesterol, triglycerides, proteinuria, C-reactive protein and haemoglobin A1c.

Keywords: Type-2 diabetes mellitus, diabetic nephropathy, HBA1c, C-reactive protein, cholesterol, triglycerides, vitamin D, proteinuria, cholecalciferol.

Apstrakt

Uvod/Cilj: Nedostatak vitamina D je često prisutan kod pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 i može biti faktor rizika za bržu progresiju dijabetesne nefropatije i veću incidencu kardiovaskularnih događaja. Cilj naše studije je bio da se ispita uticaj supstitucije vitamina D na proteinuriju, holesterol, trigliceride, C-reaktivni protein i hemoglobin A1c kod pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 i nedostatkom vitamina D.

Metode: U prospektivnu, kohortnu studiju smo uključili 90 pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 i nedostatkom (insuficijencija/deficijencija) vitamina D; od toga je 30 pacijenata imalo normalnu proteinuriju, 30 mikroproteinuriju i 30 makroproteinuriju. Sprovedena je šestomesečna nadoknada vitamina D holekalciferol kapima: tokom prva 2 meseca sa 20000 i.j. dva puta nedeljno, a zatim je kod pacijenata kod kojih je nivo vitamina D ostao snižen nastavljeno sa istom dozom još 4 meseca. Kod pacijenata kod kojih se nivo vitamina D normalizovao, nastavljeno sa 5000 i.j. dva puta nedeljno. Na početku i na kraju ispitivanja meren je nivo uree, kreatinina, jutarnje glikemije, kalcijuma, fosfora, holesterola, triglicerida, C-reaktivnog proteina, hemoglobina A1c, intaktnog paratireoidnog hormona, 24-časovne proteinurije i klirensa kreatinina. Vrednosti kalcijuma, fosfora i vitamina D su proverene i dva meseca nakon započinjanja supstitucije zbog eventualne korekcije doze holekalciferola.

Rezultati: Najniži nivo vitamina D pre terapije imali su pacijenti u grupi sa makroproteinurijom, dok je na kraju ispitivanja statistički značajno povišen nivo vitamina D u sve tri grupe. Nakon šestomesečne primene vitamina D, postignuto je statistički značajno sniženje nivoa 24-časovne proteinurije, holesterola, triglicerida i hemoglobin A1c u sve tri ispitivane grupe, a C-reaktivnog proteina u grupi sa normalnom proteinurijom i mikroproteinurijom. Statistički značajna negativna korelacija između vitamina D i 24-časovne proteinurije, holesterola i C-reaktivnog proteina dokazana je u grupi pacijenata sa makroproteinurijom. Statistički značajna negativna korelacija dokazana je između vitamina D i HBA1c u grupi sa normalnom proteinurijom i vitamina D i C-reaktivnog proteina u grupi sa mikroproteinurijom.

Zaključak: Supstitucija vitamina D visokim dozama holekalciferola i njegova preventivna primena kod pacijenata sa DM tip 2 (sa ili bez proteinurije) snižava holesterol, trigliceride, proteinuriju, C-reaktivni protein i hemoglobin A1c.

Ključne reči: dijabetes melitus tip 2, dijabetesna nefropatija, Hemoglobin A1c, C-reaktivni protein, holesterol, trigliceridi, vitamin D, proteinurija, holekalciferol.

Introduction

There were 382 million people with diabetes mellitus (DM) worldwide in 2013, and it is estimated that number will rise to 585 million in 2035¹. It was estimated that more than 700 million people in 2015 had DM or glucose intolerance, but half of it was unrecognized². Approximately one third of the patients with DM will develop diabetes nephropathy (DN) and chronic kidney disease (CKD)¹. The DM and DN are the main causes of end stage renal disease (ESRD) in the USA, with prevalence of 800 million people³. The DN is chronic microvascular complication of DM, presenting as clinical syndrome, manifesting with persistent albuminuria (urine albumin/creatinine ratio (UACR) > 300mg/g), arterial hypertension, decreasing of glomerular filtration rate and increased cardiovascular events⁴. Considering high direct and indirect costs for treating ESRD patients with renal transplantation or hemodialysis, continuous research are conducting to prevent or slow progression of DN.

It is already proved that changed life habits like regular physical exercise, reduction of body weight in obese patients, reduced intake of salt, proteins and alcohol, smoking cessation, tight control of blood pressure and glucose level, slow down DN progression⁴. Certain drugs can have renoprotective effect: angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEI)⁵, Angiotensin II receptor blockers (ARBs)⁵, alsikiren⁶, sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitors⁷, pentoxifylline⁸, nonsteroidal mineralocorticoid receptor antagonist- finerenone⁹, fenofibrate¹⁰, alopurinoll¹¹, spirinolactone¹² and hydrochlorothiazide¹².

Vitamin D is essential hormone obtained from food (10-20%) and skin synthesis. Apart from its primary role on calcium and phosphorus homeostasis, it is believed that

vitamin D has certain renoprotective effect, antifibrotic, anti-inflammatory effect, inhibits renin angiotensin aldosterone system (RAAS), role in maintaining cardiomyocyte health and insulin sensitivity and role in reducing albuminuria in patients with CKD and DM¹³⁻¹⁷.

Studies have confirmed low serum 25(OH)D levels in patient with CKD^{13, 14}. Low vitamin D level seems to be associated with impaired glucose metabolism including DM¹⁸. Risk factors for vitamin D deficiency in patient with DN remain unclear¹⁸. The prevalence of vitamin D deficiency is 25% in lean patients and 35% in obese patients¹⁹.

Proteinuria seems to be the most important target to treat in order to prevent cardiovascular events in patients with DN and CKD^{13, 14, 17, 20, 21}. Paricalcitol and cholecalciferol can decrease proteinuria in patients with CKD or DM²²⁻²⁵. It is assumed that high dose of cholecalciferol like 40000 international units (IU) weekly could decrease albuminuria and urine TGF- β 1 in patients with DM and Vitamin D insufficiency/deficiency²³.

If we take all in consideration, we can conclude that vitamin D supplementation in patients with vitamin D insufficiency/deficiency could have renoprotective effect and potentially slow progression of DN.

Considering that measuring vitamin D level in blood is easy feasible and its supplementation is not expensive, we decided to conduct the study in patients with Type-2 DM and vitamin D insufficiency/deficiency. The aim of our study was to investigate the effect of vitamin D on 24-hour urine protein, cholesterol, triglycerides, C-reactive protein (CRP), fasting blood glucose (FBG) and hemoglobin A1c (HBA1c) in patients with Type-2 diabetes mellitus and vitamin D insufficiency/deficiency. We chose those parameters as possible predictors of progression of DN.

Materials and methods

This is a 6-month prospective, cohort study of patients with Type-2 diabetes mellitus and vitamin D insufficiency/deficiency. We included 90 patients (30 with normal proteinuria, 30 with microproteinuria and 30 with macroproteinuria).

Inclusion criteria: males and females between 18 and 75 years diagnosed with Type-2 diabetes mellitus and vitamin D insufficiency (50-75 nmol/L) or deficiency (< 50 nmol/L), medical therapy for Type-2 DM during three months before screening in stable dose (also

during study), creatinine clearance $> 60\text{ml}/\text{min}/1.73\text{m}^2$, therapy with ACEI or ARBs at least three months before screening in stable dose during that period (also during study).

Exclusion criteria: glomerulonephritis, connective tissue diseases, serum calcium (corrected for albumin) $> 2.45\text{ mmol}/\text{L}$, serum phosphorus $> 1.65\text{ mmol}/\text{L}$, congestive heart failure, previous myocardial infarction, poorly regulated arterial hypertension, malignant disease, liver cirrhosis, hepatitis B/C infection, HIV, currently enrolled in another trial, women who are pregnant/nursing and previous treatment with vitamin D during six months before screening.

Patients were divided into three groups according to initial 24-hour urine protein:

1. Group – patients with normal proteinuria ($< 150\text{ mg}/24\text{h}$);
2. Group – patients with microproteinuria ($150\text{-}500\text{ mg}/24\text{h}$);
3. Group – patients with macroproteinuria ($> 500\text{ mg}/24\text{h}$).

Treatment consisted of cholecalciferol drops (Vigantol[®] 20000 IU/ml oral drops, solution - Cholecalciferol; Merck KgaA, Germany) in period of six months. During first two months patients received cholecalciferol 20000 IU twice weekly. After two months patients with normal level of vitamin D received cholecalciferol 5000 IU twice weekly, and patients with low level of vitamin D received cholecalciferol 20000 IU twice weekly next four months.

The following variables were analyzed in patients: gender, age, body mass, height, body mass index, urea, creatinine, FBG, calcium, phosphorus, total cholesterol, triglycerides, CRP, HBA1c, iPTH and 24-hour urine protein and creatinine clearance (using CKD-EPI formula²⁶).

All parameters are measured at screening and after six months of vitamin D therapy, except calcium, phosphorus and vitamin D, which are measured also after two months of therapy.

Our research was approved by Ethics Committee of Military Medical Academy, Belgrade, Serbia (date of approval 1/21/2016). All patients signed the inform consent.

Statistical analysis

Statistical analysis was conducted using IBM SPSS Statistics 19.0 computer program (IBM, USA, 2011). All continuous variables were described in the form of the median

(interquartile range (IQR): range between 25th and 75th percentile), because the data distribution was not normal (Shapiro-Wilk test; $p < 0.05$). The categorical variables were expressed as percentages and examined using the Chi-square test. Relationship between variables was tested by Spearman's coefficient correlation. Cohen's criteria for correlation are: $r < 0.29$ is small correlation, $r = 0.30-0.49$ is moderate correlation and $r > 0.50$ is strong correlation. Intra-group comparisons of continuous variables were performed by the non-parametric Wilcoxon signed rank test (two groups- before and after vitamin D therapy). Inter-group comparisons of continuous variables were performed by the non-parametric Kruskal Wallis test (three groups according to proteinuria). Comparisons of nonparametric variables between 2 groups were performed by the Mann-Whitney U test. The normality distribution of data was tested with the Shapiro-Wilk test (subject number in the group less than 50). All the analyses were evaluated at the level of statistical significance of $p < 0.05$.

Results

We included 90 patients with Type-2 DM and vitamin D insufficiency/deficiency in our study. Patients were divided in three equal groups according to the basal proteinuria levels, 30 patients had normal proteinuria, 30 had microproteinuria, while 30 had macroproteinuria. All patients were treated with cholecalciferol drops during 6 months. We included 48 male (53.33%) and 42 female patients (46.67%); 22 (24.44%) had vitamin D insufficiency, and 68 patients (75.55%) had vitamin D deficiency. Basic sociodemographic and anthropometric patient characteristics are presented in Table 1 and 2.

Average duration of Type-2 DM in group with normal proteinuria was 10.00 years (5.75-14.25), in group with microproteinuria also 10.00 years (5.75-15.25) and in group with macroproteinuria 15.00 years (10.00-20.00).

Type-2 DM was treated with oral hypoglycemic drugs in 16 patients (53.33%) in the first group, 13 patients (43.33%) in the second group and 11 patients (36.67%) in the third group (Chi square test; $p=0.425$), 13 patients (43.33%) received insulin therapy in the first group, 15 patients (50.00%) in the second group and 17 patients (56.66%) in the third group (Chi square test; $p=0.587$), while one patient (3.33%) received combination therapy

in the first group, two patients (6.66%) in the second group and also two patients (6.66%) in the third group (Chi square test; $p=0.809$).

The lowest level of vitamin D, before therapy, was found in the patients with macroproteinuria, on average 28.49 nmol/L (22.40-47.67). After six months of supplementation significantly increased vitamin D level was found in patients in all three groups (Table 3).

After six months of vitamin D supplementation, significantly decreased CRP level was found in the group with normal proteinuria ($p < 0.001$) and the group with microproteinuria ($p = 0.001$). All three groups had significantly decreased levels of HBA1c and FBG (Table 4).

We performed a correlation between vitamin D level and levels of CRP, FBG and HBA1c after six months of cholecalciferol therapy and we found a moderately negative correlation between increased vitamin D level and decreased CRP level in the group with microproteinuria ($r = - 0.368$; $p = 0.046$), and in the group with macroproteinuria ($r = - 0.375$; $p = 0.041$). We found a moderately negative correlation ($r = - 0.342$; $p = 0.064$) between increased vitamin D level and decreased HBA1c only in group with normal proteinuria.

We found significantly decreased serum creatinine level, after therapy with cholecalciferol, only in the group with macroproteinuria ($p = 0.022$). Increased creatinine clearance level was significant in the group with microproteinuria, 68.60 ml/min (61.00-94.25) at the beginning of the study, after therapy 74.15 ml/min (63.82-90.70) ($p = 0.049$), and in the group with macroproteinuria where we have increase from 63.20 ml/min (60.57-89.97) to 68.80 ml/min (62.00-90.07) ($p = 0.040$) (Table 5).

We did not find calcium level over 2.45 mmol/L and P level over 1.65 mmol/L. The iPTH was significantly decreased after therapy only in the group with normal proteinuria ($p = 0.003$), while in the group with microproteinuria level of iPTH was significantly increased from 5.05 pmol/L (4.00-6.15) to 5.10 pmol/L (3.35-6.22) ($p = 0.021$) (Table 6).

Significantly decreased levels of total cholesterol and triglycerides, after six months of vitamin D supplementation, were achieved in all three groups ($p < 0.001$) (Table 7).

We found significantly decreased 24-hour urine protein in all three groups, after six months of vitamin D supplementation, in the group with normal proteinuria ($p = 0.003$), in

the group with microproteinuria ($p < 0.001$) and in the group with macroproteinuria ($p = 0.015$) (Table 7).

We performed correlation between vitamin D blood level and levels of total cholesterol, triglycerides and 24-hour urine protein, after six months therapy of cholecalciferol, we found strong negative correlation ($r = - 0.570$; $p < 0.001$) only in the group with macroproteinuria, between increased vitamin D level and decreased total cholesterol level, and between increased vitamin D level and decreased 24-hour urine protein ($r = - 0.685$; $p < 0.001$) at the end of the study (Figure 1 and 2).

Discussion

We conducted prospective, cohort study about effect of the six months therapy with cholecalciferol on 24-hour urine protein, lipid status, glycoregulation and parameters of inflammation in the patients with Type-2 DM and vitamin D insufficiency/deficiency. We chose cholecalciferol because it is cheap comparing to others vitamin D drugs.

Based on other experience on vitamin D supplementation, we treated patients with higher dose of cholecalciferol, 20000 IU twice weekly, until normalization of vitamin D level^{23, 27-29}. There were no adverse events particularly meaning hypercalcemia or hyperphosphatemia.

After six-month therapy, level of vitamin D was significantly higher in all three groups. The lowest level of vitamin D, before therapy, was found in the patients with macroproteinuria. These patients had highest level of serum creatinine and lowest level of creatinine clearance at the beginning of the study, which is in correlation with data from other authors that vitamin D deficiency is more often in the patients with Type-2 DM with macroalbuminuria and in CKD^{18, 13, 24, 30}.

In the patients with normal 24-hour urine protein, significantly decreased iPTH level was found. Since all patients had normal iPTH level, it is not clear if this decrease is of clinical importance. Although if we consider positive effect of vitamin D on bone turnover by increased osteoclast activation, which leads to increased bone volume, trabecular thickness and osteoid surface^{13, 24}, probably this iPTH decrease that we found may be clinically important³¹.

We measured HBA1c and FBG as parameters for glycoregulation. All patients had significantly decreased levels of HBA1c and FBG after six months of the therapy with cholecalciferol. We found moderately negative correlation of HBA1c ($r = - 0.342$; $p = 0.064$) between increased vitamin D level and decreased HBA1c level in the patients with normal proteinuria. Better glycoregulation after vitamin D supplementation was confirmed by other authors^{27, 31, 32}. That effect is achieved by increased insulin sensitivity through stimulation of expression of insulin receptors in skeletal muscles and through activation of peroxisome proliferator activator receptor δ (PPAR δ), RAAS (known as inhibitor of insulin action on peripheral tissues) inhibition^{27, 31, 32}. Vitamin D also increases insulin releasing by stimulating intracellular level of calcium in pancreatic beta cells^{13, 31}. Vitamin D probably has direct effect on beta cell function by binding to vitamin D receptor (VDR) expressed on beta cells. It is proved that mice without functional VDR have damaged glucose stimulated insulin secretion^{13-15, 33}.

Chronic inflammation plays crucial role in development of DM and DN^{4, 13, 34, 35} and vitamin D can directly or indirectly diminish that effect^{14, 31, 36}. Anti-inflammatory effect is achieved by reduced releasing of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL-12, IL-8, IL-1 β , IFN- γ), blocking of dendritic cell differentiation, inhibition of lymphocytes proliferation, inhibition of foam cells generation, decreased macrophages cholesterol intake and improved development of regulatory T lymphocytes or increased releasing of anti-inflammatory cytokines, like IL-10^{4, 13, 31, 33, 35, 36}. We chose CRP as biomarker of inflammation. After six months of supplementation with vitamin D we found significantly decreased CRP level in the patients with normal proteinuria and microproteinuria with moderately negative correlation between increased vitamin D level and decreased CRP level in the patients with microproteinuria ($r = - 0.368$; $p = 0.046$) and macroproteinuria ($r = - 0.375$; $p = 0.041$).

Proteinuria is the main target to treat in order to prevent and slow down DN and decrease incidence of cardiovascular events^{20, 21, 24}. Vitamin D decreases proteinuria by RAAS inhibition and reduces renal fibrosis by reduction of TGF- β /SMAD pathway¹⁵⁻¹⁷. Vitamin D, apart of renal RASS inhibition, reduces renin expression in heart thereby decreasing arterial blood pressure^{20, 21}. Vitamin D, by slowing down the fibrosis, slows down progression of left ventricle hypertrophy and development of heart failure, lowers BNP level, reduces gene expression important for atherosclerosis/vascular growth factors

^{20, 21}. All our patients had significantly decreased proteinuria after six-month therapy. Patients with macroproteinuria had strong negative correlation ($r = - 0.685$; $p < 0.001$) between increased vitamin D level and decreased 24-hour urine protein at the end of the study.

We found different data about influence of vitamin D on lipid status in literature ^{13, 29, 37}. All our patients had significantly decreased levels of total cholesterol and triglycerides after therapy. Patients with macroproteinuria have strong negative correlation ($r = - 0.570$; $p < 0.001$) between increased vitamin D and decreased total cholesterol.

We can conclude that after six months of supplementation with vitamin D and correction of vitamin D insufficiency/deficiency all our patients had significantly decreased levels of proteinuria, HBA1c, CRP, total cholesterol and triglycerides. Significantly negative correlation was found between increased vitamin D level and decreased 24-hour urine protein, total cholesterol and CRP in the patients with macroproteinuria. These patients had lowest level of creatinine clearance at the beginning, but at the end of the study we found significantly increased creatine clearance. Based on that we can confirm that vitamin D had renoprotective effect especially in the patients with macroproteinuria and initial CKD. According to our finding of significantly decreased 24-hour urine protein, levels of total cholesterol, triglycerides, HBA1c and CRP in other two groups, but without significant correlation, except in HBA1c in the patients with normal proteinuria and in CRP in the patients with microproteinuria, we can conclude that vitamin D has renoprotective role in Type-2 DM in all patients. Based on our results we can assume that vitamin D, apart of renoprotective effect in Type-2 DM, could prevent cardiovascular events, which was not studied during our research but could be the goal for future studies.

Limitation of the study and future tasks

Considering limited number of patients in all groups, it would be possible to draw conclusion that a higher number of patients and longer follow up would provide us more specific results. We could investigate effect of vitamin D on proinflammatory cytokines which we have not done in our study. Future research could include new urinary and serum biomarkers marked by other authors as early biomarkers of development and progression of DN.

Conclusion

Vitamin D supplementation in higher dose than conventional and its prolonged preventive use in patients with Type-2 DM, has renoprotective effect resulting in decreased 24-hour urine protein, total cholesterol, triglycerides, HBA1c and CRP, especially in the patients with macroproteinuria. If we consider that positive effect is achieved in the patients with normal proteinuria and microproteinuria it is possible that we should treat all patients with Type-2 DM with vitamin D supplementation, but we need further trial to confirm that.

REFERENCES

1. International Diabetes Federation: IDF Diabetes Atlas. 6th edition. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2013.
2. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. 7th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2015.
3. United States Renal Data System. 2016 USRDS Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. Bethesda, MD: National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2016.
4. *Lin YC, Chang YH, Yang SY, Wu KD, Chu TS.* Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease. *J Formos Med Assoc* 2018; 24. pii: S0929-6646(17)30803-3. doi: 10.1016/j.jfma.2018.02.007.
5. *Fried LF, Emanuele N, Zhang JH, Brophy M, Conner TA, Duckworth W, et al.* Combined angiotensin inhibition for the treatment of diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 2013; 369(20): 1892-903.
6. *Parving HH, Brenner BM, McMurray JJ, de Zeeuw D, Haffner SM, Solomon SD, et al.* Cardiorenal end points in a trial of aliskiren for type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2012; 367(23): 2204-13.

7. *Novak JE, Yee J.* Diabetes and the Kidney: Sweet Dreams. *Adv Chronic Kidney Dis* 2018; 25(2): 115-8. doi: 10.1053/j.ackd.2018.01.001.
8. *Navarro-González JF, Mora-Fernández C, Muros de Fuentes M, Chahin J, Méndez ML, Gallego E, et al.* Effect of pentoxifylline on renal function and urinary albumin excretion in patients with diabetic kidney disease: the PREDIAN trial. *J Am Soc Nephrol* 2015; 26(1): 220-9.
9. *Bakris GL, Agarwal R, Chan JC, Cooper ME, Gansevoort RT, Haller H, et al.* Effect of Finerenone on Albuminuria in Patients With Diabetic Nephropathy: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2015; 314(9): 884-94.
10. *Kouroumichakis I, Papanas N, Zarogoulidis P, Liakopoulos V, Maltezos E, Mikhailidis DP.* Fibrates: therapeutic potential for diabetic nephropathy? *Eur J Intern Med* 2012; 23(4): 309-16.
11. *Goicoechea M, Garcia de Vinuesa S, Verdalles U, Verde E, Macias N, Santos A, et al.* Allopurinol and progression of CKD and cardiovascular events: long-term follow-up of a randomized clinical trial. *Am J Kidney Dis* 2015; 65(4): 543-9.
12. *Momeni A, Behradmanesh MS, Kheiri S, Karami Horestani M.* Evaluation of spironolactone plus hydrochlorothiazide in reducing proteinuria in type 2 diabetic nephropathy. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2015; 16(1): 113-8.
13. *Mitri J, Pittas AG.* Vitamin D and diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2014; 43(1): 205-32.
14. *Guan X, Yang H, Zhang W, Wang H, Liao L.* Vitamin D receptor and its protective role in diabetic nephropathy. *Chin Med J (Engl)* 2014; 127(2): 365-69.
15. *Zhang Z, Sun L, Wang Y, Ning G, Minto AW, Kong J, et al.* Renoprotective role of the vitamin D receptor in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2008; 73(2): 163-71.
16. *Ito I, Waku T, Aoki M, Abe R, Nagai Y, Watanabe T, et al.* A nonclassical vitamin D receptor pathway suppresses renal fibrosis. *J Clin Invest* 2013; 123(11): 4579-94.

17. *Liyanage P, Lekamwasam S, Weeraratna TP, Liyanage C.* Effect of Vitamin D therapy on urinary albumin excretion, renal functions, and plasma renin among patients with diabetic nephropathy: A randomized, double-blind clinical trial. *J Postgrad Med* 2018; 64(1): 10-5. doi: 10.4103/jpgm.JPGM_598_16.
18. *Xiao X, Wang Y, Hou Y, Han F, Ren J, Hu Z.* Vitamin D deficiency and related risk factors in patients with diabetic nephropathy. *J Int Med Res* 2016; 44(3): 673-84.
19. *Pereira-Santos M, Costa PR, Assis AM, Santos CA, Santos DB.* Obesity and vitamin D deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 2015; 16(4): 341-9.
20. *Gonzalez-Parra E, Rojas-Rivera J, Tuñón J, Praga M, Ortiz A, Egido J.* Vitamin D receptor activation and cardiovascular disease. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27 Suppl 4: iv17-21.
21. *Humalda JK, Goldsmith DJ, Thadhani R, de Borst MH.* Vitamin D analogues to target residual proteinuria: potential impact on cardiorenal outcomes. *Nephrol Dial Transplant* 2015; 30(12): 1988-94.
22. *de Zeeuw D, Agarwal R, Amdahl M, Audhya P, Coyne D, Garimella T, et al.* Selective vitamin D receptor activation with paricalcitol for reduction of albuminuria in patients with type 2 diabetes (VITAL study): a randomised controlled trial. *Lancet* 2010; 376 (9752): 1543-51.
23. *Kim MJ, Frankel AH, Donaldson M, Darch SJ, Pusey CD, Hill PD, et al.* Oral cholecalciferol decreases albuminuria and urinary TGF- β 1 in patients with type 2 diabetic nephropathy on established renin-angiotensin-aldosterone system inhibition. *Kidney Int* 2011; 80(8): 851-60.
24. *Molina P, Górriz JL, Molina MD, Peris A, Beltrán S, Kanter J, et al.* The effect of cholecalciferol for lowering albuminuria in chronic kidney disease: a prospective controlled study. *Nephrol Dial Transplant* 2014; 29(1): 97-109.
25. *Huang Y, Yu H, Lu J, Guo K, Zhang L, Bao Y, et al.* Oral supplementation with cholecalciferol 800 IU ameliorates albuminuria in Chinese type 2 diabetic patients with nephropathy. *PLoS One* 2012; 7(11): e50510.

26. *Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3rd, Feldman HI, et al. CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). A new equation to estimate glomerular filtration rate. Ann Intern Med 2009; 150(9): 604-12. Erratum in: Ann Intern Med 2011 (20); 155(6): 408.*
27. *Li X, Liu Y, Zheng Y, Wang P, Zhang Y. The Effect of Vitamin D Supplementation on Glycemic Control in Type 2 Diabetes Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. Nutrients 2018 19; 10(3). pii: E375. doi: 10.3390/nu10030375.*
28. *Momeni A, Mirhosseini M, Kabiri M, Kheiri S. Effect of vitamin D on proteinuria in type 2 diabetic patients. J Nephropathol 2017; 6(1): 10-4.*
29. *Liyanage GC, Lekamwasam S, Weeraratna TP, Liyanage CE. Effects of high-dose parenteral vitamin D therapy on lipid profile and blood pressure in patients with diabetic nephropathy: A randomized double-blind clinical trial. Diabetes Metab Syndr 2017; 11 Suppl 2: S767-S770.*
30. *Rafiq S, Jeppesen PB. Is Hypovitaminosis D Related to Incidence of Type 2 Diabetes and High Fasting Glucose Level in Healthy Subjects: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. Nutrients 2018 10; 10(1). pii: E59. doi: 10.3390/nu10010059.*
31. *Garbossa SG, Folli F. Vitamin D, sub-inflammation and insulin resistance. A window on a potential role for the interaction between bone and glucose metabolism. Rev Endocr Metab Disord 2017; 18(2): 243-58.*
32. *Lee CJ, Iyer G, Liu Y, Kalyani RR, Bamba N, Ligon CB, et al. The effect of vitamin D supplementation on glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis of intervention studies. J Diabetes Complications 2017; 31(7): 1115-26.*
33. *Berridge MJ. Vitamin D deficiency and diabetes. Biochem J. 2017; 474(8): 1321-32.*
34. *Wada J, Makino H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. Clin Sci (Lond) 2013; 124(3): 139-52.*
35. *Duran-Salgado MB, Rubio-Guerra AF. Diabetic nephropathy and inflammation. World J Diabetes 2014; 5(3): 393-8.*

36. *Asemi Z, Samimi M, Tabassi Z, Shakeri H, Esmailzadeh A.* Vitamin D supplementation affects serum high-sensitivity C-reactive protein, insulin resistance, and biomarkers of oxidative stress in pregnant women. *J Nutr* 2013; 143(9): 1432-8.
37. *Ramiro-Lozano JM, Calvo-Romero JM.* Effects on lipid profile of supplementation with vitamin D in type 2 diabetic patients with vitamin D deficiency. *Ther Adv Endocrinol Metab* 2015; 6(6): 245-8.

PAPER ACCEPTED

Table 1

Basic characteristics of patients with Type-2 diabetes mellitus according to proteinuria, sociodemographic characteristics of patients

24-hour urine protein	Gender: Male/Female	Age (years)
	n (%)	Median (IQR)
Normal proteinuria	16 (53.3) / 14 (46.7)	62.00 (58.00-69.00)
Microproteinuria	17 (56.7) / 13 (43.3)	62.00 (52.50-69.00)
Macroproteinuria	15 (50.0) / 15 (50.0)	66.00 (62.25-69.50)
p value	p = 0.875*	p = 0.281**

*- Chi-square test; **- Kruskal Wallis test; IQR- interquartile range: 25-75 percentile

Table 2

Anthropometric characteristics of patients with Type-2 diabetes mellitus according to proteinuria

24-hour urine protein	Height (m)	Weight (kg)	Body mass index (kg/m ²)
	Median (IQR)		
Normal proteinuria	1.70 (1.65-1.77)	80.00 (74.25-85.00)	27.50 (25.62-28.70)
Microproteinuria	1.73 (1.70-1.83)	89.00 (79.88-91.25)	27.45 (26.52-30.12)
Macroproteinuria	1.71 (1.68-1.80)	87.50 (79.00-91.00)	28.40 (26.31-31.62)
p value	p = 0.035*	p = 0.010*	p = 0.120*

*- Kruskal Wallis test; IQR- interquartile range: 25-75 percentile

Table 3

Vitamin D level in the patients with Type-2 diabetes mellitus, before and after six months of vitamin D supplementation

24-hour urine protein	Before supplementation	After six months of supplementation	p value
	Vitamin D (nmol/L)		
	Median (IQR)		
Normal proteinuria	42.53 (30.40-46.25)	79.65 (69.09-92.12)	p < 0.001**
Microproteinuria	47.03 (33.18-53.88)	86.65 (70.50-92.85)	p < 0.001**
Macroproteinuria	28.49 (22.40-47.67)	69.22 (54.74-78.04)	p < 0.001**
p value	p = 0.006*	p = 0.009*	

*- Kruskal Wallis test; **- Wilcoxon Signed Ranks test; IQR- interquartile range: 25-75 percentile

Table 4

C-reactive protein, fasting blood glucosae and haemoglobin A1c levels, before and after six months of vitamin D supplementation

24-hour urine protein	Before supplementation	After six months of supplementation	p value
	C-reactive protein (mg/L)		
	Median (IQR)		
Normal proteinuria	1.48 (0.99-3.08)	1.42 (0.87-2.96)	p < 0.001**
Microproteinuria	1.60 (0.95-2.22)	1.16 (0.80-2.15)	p = 0.001**
Macroproteinuria	1.52 (1.01-2.25)	1.22 (0.95-2.16)	p = 0.943**
p value	p = 0.786*	p = 0.809*	
24-hour urine protein	Fasting blood glucose (mmol/L)		p value
	Median (IQR)		
	Normal proteinuria	8.60 (6.85-10.02)	
Microproteinuria	7.50 (6.67-9.35)	7.95 (5.70-8.23)	p = 0.020**
Macroproteinuria	9.40 (7.90-10.60)	8.05 (7.13-8.95)	p = 0.001**
p value	p = 0.036*	p = 0.366*	
24-hour urine protein	Haemoglobin A1c (%)		p value
	Median (IQR)		
	Normal proteinuria	6.97 (6.60-7.80)	
Microproteinuria	7.15 (6.57-8.42)	6.95 (6.40-7.60)	p < 0.001**
Macroproteinuria	7.80 (6.72-8.70)	7.10 (6.80-8.62)	p = 0.016**
p value	p = 0.192*	p = 0.069*	

*- Kruskal Wallis test; **- Wilcoxon Signed Ranks test; IQR- interquartile range: 25-75 percentile

Table 5

Creatinine, creatinine clearance and urea levels, before and after six months of vitamin D supplementation

24-hour urine protein	Before supplementation	After six months of supplementation	p value
	Creatinine ($\mu\text{mol/L}$)		
	Median (IQR)		
Normal proteinuria	76.50 (66.75-90.25)	73.00 (64.00-82.50)	p = 0.273**
Microproteinuria	82.00 (71.00-96.75)	83.50 (70.50-94.25)	p = 0.090**
Macroproteinuria	86.00 (74.75-106.00)	82.00 (71.50-104.75)	p = 0.022**
p value	p = 0.149*	p = 0.136*	
Creatinine clearance (mL/min)			
24-hour urine protein	Creatinine clearance (mL/min)		
	Median (IQR)		
Normal proteinuria	84.30 (64.05-91.55)	86.30 (71.15-95.45)	p = 0.286**
Microproteinuria	68.60 (61.00-94.25)	74.15 (63.82-90.70)	p = 0.049**
Macroproteinuria	63.20 (60.57-89.97)	68.80 (62.00-90.07)	p = 0.040**
p value	p = 0.101*	p = 0.143*	
Urea (mmol/L)			
24-hour urine protein	Urea (mmol/L)		
	Median (IQR)		
Normal proteinuria	5.95 (5.10-7.13)	5.85 (5.15-6.57)	p = 0.032**
Microproteinuria	6.90 (5.47-8.20)	6.20 (5.20-7.95)	p = 0.147**
Macroproteinuria	8.40 (5.37-9.72)	8.15 (5.47-9.22)	p = 0.484**
p value	p = 0.004*	p = 0.003*	

*- Kruskal Wallis test; **- Wilcoxon Signed Ranks test; IQR- interquartile range: 25-75 percentile

Table 6

Calcium, phosphorus and iPTH serum levels, before and after six months of vitamin D supplementation

24-hour urine protein	Before supplementation	After six months of supplementation	p value
	Calcium (mmol/L)		
	Median (IQR)		
Normal proteinuria	2.39 (2.31-2.42)	2.38 (2.32-2.42)	p = 0.628**
Microproteinuria	2.38 (2.29-2.40)	2.34 (2.30-2.40)	p = 0.354**
Macroproteinuria	2.31 (2.26-2.37)	2.35 (2.28-2.40)	p = 0.002**
p value	p = 0.002*	p = 0.401*	
24-hour urine protein	Phosphorus (mmol/L)		p value
	Median (IQR)		
	Normal proteinuria	1.10 (1.01-1.19)	
Microproteinuria	1.10 (0.99-1.17)	1.07 (0.98-1.19)	p = 0.684**
Macroproteinuria	1.16 (1.02-1.30)	1.10 (1.00-1.29)	p = 0.348**
p value	p = 0.123*	p = 0.149*	
24-hour urine protein	Intact parathyroid hormone (pmol/L)		p value
	Median (IQR)		
	Normal proteinuria	3.40 (2.18-5.05)	
Microproteinuria	5.05 (4.00-6.15)	5.10 (3.35-6.22)	p = 0.021**
Macroproteinuria	7.10 (5.48-9.20)	7.02 (5.05-9.70)	p = 0.363**
p value	p < 0.001*	p < 0.001*	

*- Kruskal Wallis test; **- Wilcoxon Signed Ranks test; IQR- interquartile range: 25-75 percentile

Table 7

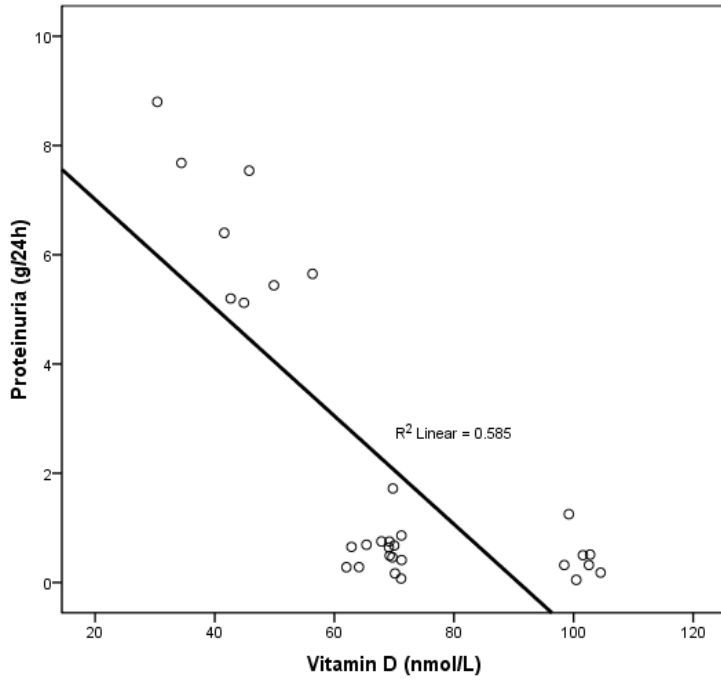
Total cholesterol and triglycerides levels and 24-hour urine protein, before and after six months of vitamin D supplementation

24-hour urine protein	Before supplementation	After six months of supplementation	p value
	Total cholesterol (mmol/L)		
	Median (IQR)		
Normal proteinuria	5.01 (4.36-5.39)	4.45 (3.90-5.10)	p < 0,001**
Microproteinuria	5.52 (4.84-6.32)	4.66 (4.14-5.30)	p < 0,001**
Macroproteinuria	5.66 (4.73-6.36)	4.79 (4.39-5.77)	p < 0,001**
p value	p = 0.032*	p = 0.333*	
24-hour urine protein	Triglycerides (mmol/L)		p value
	Median a (IQR)		
	Before supplementation	After six months of supplementation	
Normal proteinuria	1.81 (1.31-2.41)	1.44 (1.10-1.77)	p < 0,001**
Microproteinuria	2.16 (1.61-2.80)	1.43 (1.16-1.71)	p < 0,001**
Macroproteinuria	1.81 (1.58-2.90)	1.49 (1.40-2.22)	p < 0,001**
p value	p = 0.194*	p = 0.116*	
24-hour urine protein	24-hour urine protein (g/24h)		p value
	Median (IQR)		
	Before supplementation	After six months of supplementation	
Normal proteinuria	0.071 (0.046-0.101)	0.060 (0.026-0.085)	p = 0,003**
Microproteinuria	0.221 (0.182-0.273)	0.136 (0.100-0.200)	p < 0,001**
Macroproteinuria	0.967 (0.707-4.993)	0.664 (0.319-5.140)	p = 0,015**
p value	p < 0.001*	p < 0.001*	

*- Kruskal Wallis test; **- Wilcoxon Signed Ranks test; IQR- interquartile range: 25-75 percentile

Figure 1

Correlation between vitamin D level and 24-hour urine protein in group with macroproteinuria after vitamin D supplementation (Spearman's rho = - 0.685; p < 0.001)

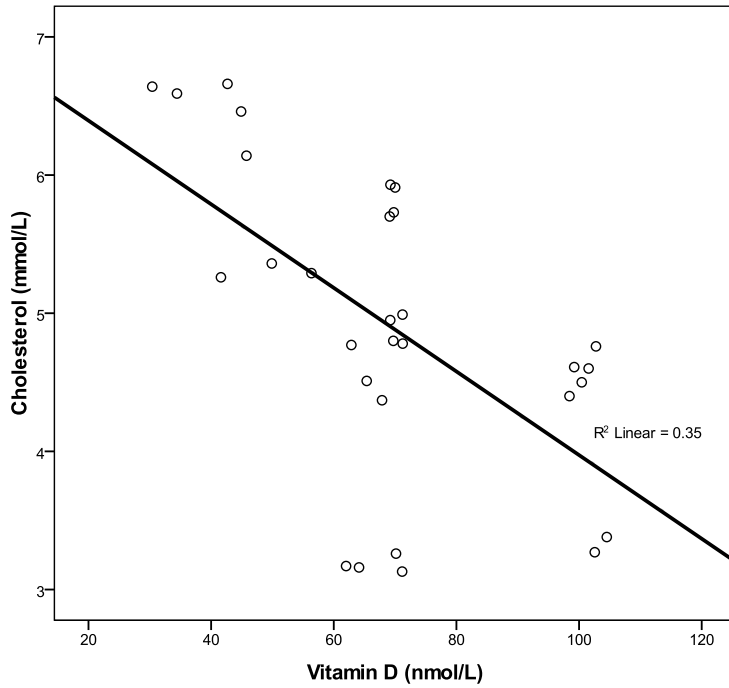


PAPER AC

LED

Figure 2

Correlation between vitamin D level and total cholesterol level in group with macroproteinuria after vitamin D supplementation (Spearman's rho = -0.570; p < 0.001)



Received on May 25, 2018.
Accepted on June 6, 2018.
Online First June 2018.



Erdheim-Chester disease – A case report

Oboljenje Erdhajn-Čester

Stanko Petrović*, Radoje Doder*[†], Nenad Perišić*, Marijana Petrović[‡],
Irina Brčerević*, Branka Roganović*[†]

Military Medical Academy, *Clinic of Gastroenterology and Hepatology; [‡]Clinic of
Nephrology, Belgrade, Serbia; University of Defence, [†]Faculty of Medicine of the
Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

Abstract

Introduction. Erdheim-Chester disease (ECD) is a rare non-Langerhans-cell histiocytosis. About 500 cases are published so far. It is multisystemic disease characterised by bilateral symmetric long bones sclerosis. Main histopathological finding is accumulation of big foamy histiocytes, immunohistochemically positive to CD68, and negative to S-100 and CD1a. There are no guidelines that reliably identify population that requires therapy, but symptomatic ECD, organ failure and central nervous system involvement require treatment. **Case report.** We described a patient with a multisystemic form of ECD affecting long bones, the hypophysis, abdomen, and the peripheral nerves. Five years after initial symptoms ECD was suspected. Prednisone was initiated, 60 mg once a day. After obtaining the diagnosis of ECD, interferon alpha 2A was introduced, but soon after stopped due to severe side effects. Considering that histiocytes were positive to platelet derived growth factor receptor alpha (PDGFR alpha) imatinib mesylate was started, but after two months stopped due to no clinical and radiological improvement. The disease was worsening and the patient died. **Conclusion.** We described the patient with intraperitoneal form of ECD, without cardiac and pulmonary involvement. There are several important issues: the diagnosis of ECD could be difficult to make, three treatment regimens were included and the patient died nine years after the initial symptoms due to indolent course of the disease and unsuccessful treatment.

Key words:
erdheim-chester disease; diagnostic techniques and procedures; immunohistochemistry; diagnosis, differential; drug therapy.

Apstrakt

Uvod. Oboljenje Erdhajn-Čester (Erdheim-Chester, ECD) je redak oblik ne-Langerhansove histiocitoze sa oko 500 bolesnika prikazanih do sada. To je multisistemska bolest koju karakteriše bilateralna simetrična kortikalna skleroza dugih kostiju. Patohistološki, karakteriše se nakupljanjem histiocita imunohistohemijski pozitivnih na CD68 i negativnih na S-100 i CD1a. Nema jasnih preporuka za lečenje, ali bolesnici sa simptomima, disfunkcijom organa ili zahvatanjem centralnog nervnog sistema zahtevaju lečenje. **Prikaz bolesnika.** Prikazali smo bolesnika sa multisistemskim oblikom ECD, sa zahvatanjem dugih kostiju, hipofize, trbušne duplje i perifernih nerava. Pet godina posle prvih simptoma posumnjalo se da se radi o ECD. Lečenje je započeto prednisonom, 60 mg jednom dnevno. Kada je potvrđena dijagnoza ECD uveden je interferon alfa 2A, ali je ubrzo ukinut zbog neželjenih efekata. S obzirom na to da su histiociti bili pozitivni na trombocitni faktor rasta alfa (PDGFR alfa) u terapiju je uveden imatinib mesilat. Nakon dva meseca terapije, imatinib je ukinut zbog nedostatka terapijskog efekta. Zbog pogoršanja bolesti, nastupio je smrtni ishod. **Zaključak.** Prikazali smo bolesnika sa intraperitonealnom lokalizacijom bolesti, bez zahvatanja srca i pluća. Postoji nekoliko ključnih stavki: dijagnoza ECD može biti otežana, bila su uključena tri režima terapije i bolesnik je preminuo devet godina od početnih simptoma zbog sporog toka bolesti i neuspešnog lečenja.

Ključne reči:
erdheim-chesterova bolest; dijagnostičke tehnike i procedure; imunohistohemija; dijagnoza, diferencijalna; lečenje lekovima.

Introduction

Erdheim-Chester disease (ECD) is a rare non-Langerhans-cell histiocytosis of unknown etiology. Around 500 cases have

been published so far, especially in the last 10 years due to increased awareness of this disease. The disease was named after William Chester and Jakob Erdheim who first described two cases with “lipoid granulomatosis”, in 1930¹. It affects adults,

both sexes equally, rarely affects children. The pathogenesis of ECD is not known. Th1 immune response is dominant, thus suggesting it as inflammatory disease, but a recent finding of BRAF V600E mutation suggests it as a clonal disease, dependent on impaired RAS/RAF/MEK/ERK signalling². Activating mutation of NRAS gene is found in 3.7% of patients³. Pathogenic BRAF V600E mutation is found in 54% of patients⁴. The disease is characterized by extensive proliferation and accumulation of histiocytes in tissue, particularly connective and fat ones. It primarily affects long bones leading to bilateral, symmetric cortical sclerosis, sparing epiphysis. Bone lesions could be confirmed on magnetic resonance imaging (MRI), technetium-99m bone scintigraphy, ¹⁸fluoro-2-deoxy-d-glucose (¹⁸FDG) positron emission tomography/computed tomography (PET)/CT scanning, but they are often missed on plain radiographs. FDG PET/CT is also useful for extraskelatal disease and in surveillance⁵. The diagnosis of ECD relies on two criteria, proposed by Veyssier-Belot et al.⁶ and they are typical histological and skeletal findings. Almost 50% of the patients have extraskelatal manifestations, including hypophysis, orbit, heart, lungs, kidneys, retroperitoneum, central nervous system (CNS) and skin. The histology is characterized by the accumulation of big foamy histiocytes with lipid-rich eosinophilic cytoplasm. Histiocytes are immunohistochemically positive to CD68, negative to S-100 and CD1a, lacking Birbeck granules on electronic microscopy. The prognosis depends upon visceral manifestations. Approximately 50–60% of the patients die after 3 years of disease, most often due to cardiac and pulmonary involvement. Treatment regimens include: glucocorticoids, cyclophosphamide, vincristine, cladribine, methotrexate, lenalidomide, imatinib mesylate, anakinra, interferon alpha, sirolimus, infliximab, vemurafenib, canakinumab, autologous hematopoietic-stem cell transplantation, radiotherapy, and surgery^{7–33}.

Case report

A male patient, 58 years old, was diagnosed with central diabetes insipidus of unknown etiology. He was treated with substitution therapy – desmopressin (Minirin® spray). Two years after, surgical ablation of the tumor, affecting soft tissue of the right lower extremity, was done. There was neither bone infiltration, nor distant metastasis. The final histopathological finding showed dedifferentiated liposarcoma or dedifferentiated schwannoma. Following the surgery, the patient was treated with radiotherapy and chemotherapy and scheduled for follow-up. Two years later, due to nausea, abdominal pain and distension, multislice computed tomography (MSCT) of the abdomen was performed. It showed ascites and the thickened peritoneum and mesenteric structures. After that, explorative laparoscopy and biopsy of the omentum, lymph nodes and small bowel mesentery were done. The final histopathological finding confirmed *inflammatio chronica xantogranulomatosa textus adiposus*. A year later, ECD was suspected based on anamnesis, clinical features and examinations performed (increased serum markers of inflammation, plain radiography survey showing bilateral symmetric cortical sclerosis of the lower extremities sparing

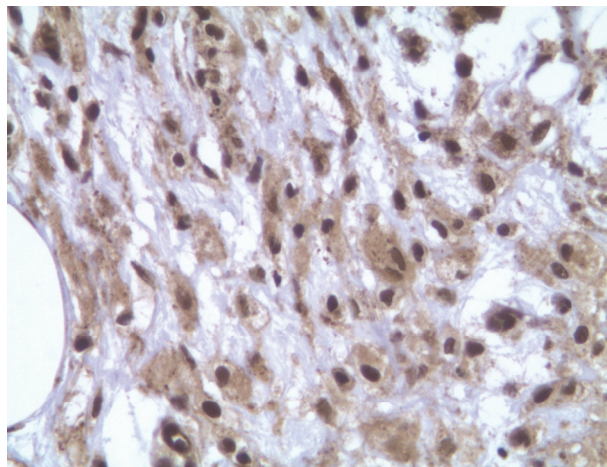
epiphysis), without cardiac and pulmonary involvement. Prednisone was started, 60 mg once a day, tapered to 15 mg once a day which he was taking for the next three years.

Due to paresthesia and weakness of the lower extremities we performed electromyoneurography (EMNG), showing sensory polyneuropathy. Alpha-lipoic acid was introduced, resulting in partial improvement. Few months later, he developed gangrene of the right lower extremity, thus above knee amputation was performed. Eight months later, we performed revision of the histopathological finding of biopsies of the peritoneum, omentum and lymph nodes, done 4 years ago, with immunohistochemical staining that confirmed the ECD (CD68+, CD1a-, S100-, CD14+, CD163+). After evaluation [upper and lower endoscopy, CT of the abdomen, bone scintigraphy, magnetic resonance imaging of the lumbosacral spine (MRLS), bone marrow biopsy, peripheral blood and bone marrow samples testing for clonal rearrangements Ig (immunoglobulin)/TCR (T cell receptor) genes, dual-energy x-ray absorptiometry], progressive disease (PD) was confirmed, along with osteoporosis as sequelae of prednisone therapy (Figures 1 and 2). Interferon alpha 2A was introduced, 3,000,000 IU 3 times weekly subcutaneously. Osteoporosis was treated with bisphosphonates. Three months later interferon alpha 2A was discontinued due to severe side effects (nausea, loss of appetite, fever, abdominal pain, diarrhea, depression), and prednisone was restarted, 20 mg once a day.

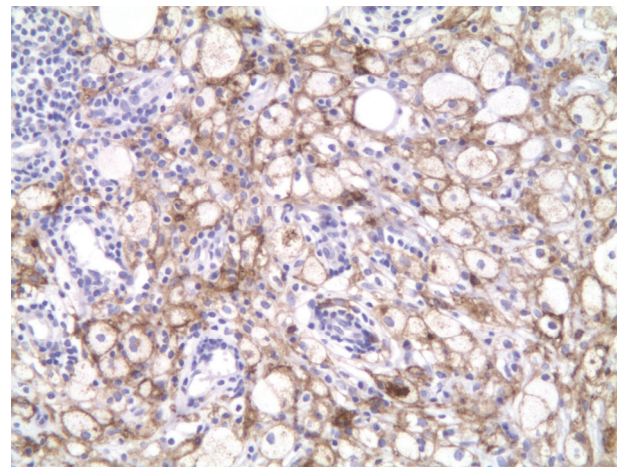
Additional immunohistochemical staining confirmed that histiocytes were positive to PDGFR alpha, so imatinib mesylate was introduced, 400 mg once a day, with tapering off prednisone till discontinuation. After two months of the treatment with imatinib mesylate there was no clinical improvement. Laboratory analysis showed increased serum markers of inflammation, low albumin (21 g/L), so imatinib mesylate was discontinued and prednisone restarted, 20 mg once a day. The introduction of prednisone led to a short-term clinical improvement. The patient's general condition got worse, swelling of the legs was pronounced, he had syncope. The patient was not motivated for hospitalization, and died.



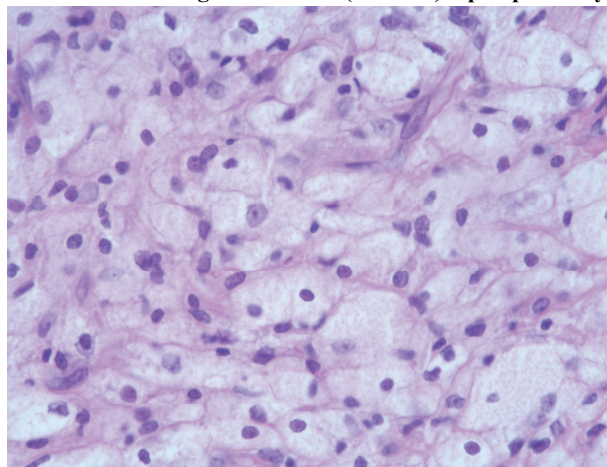
Fig. 1 – Bone scintigraphy – increased accumulation of radiopharmaceutical along the diaphysis of radius, ulna and humerus bilaterally, in the lower part of the left femur and along the left tibia.



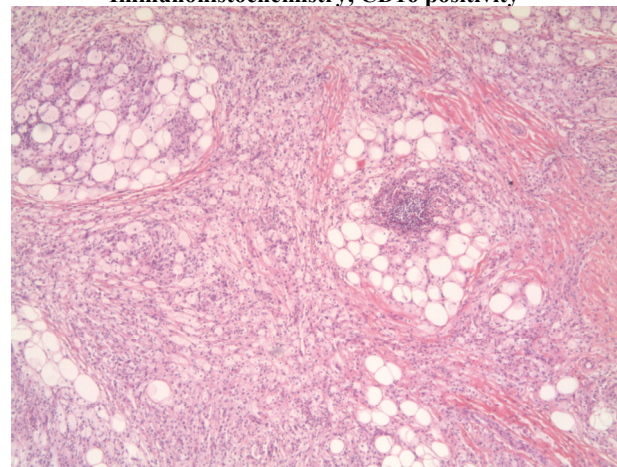
Platelet – derived growth factor (PDGFR) alpha positivity



Immunohistochemistry, CD16 positivity



Hematoxylin – eosin (HE, × 20)



Hematoxylin – eosin (HE, × 5)

Fig. 2 – Patohistological findings

Discussion

ECD is a rare disease. Considering different clinical features and disease activity, varying from asymptomatic to fulminant organ failure, the diagnosis is usually delayed. Patients without cardiac and pulmonary involvement have longer life expectancy. Intraperitoneal localization of ECD is very rare. That is exactly what we want to emphasize with this case report – the diagnosis is delayed, almost every organ can be affected, intraperitoneal localisation is very rare, there are no established guidelines for treatment. Regarding the abdominal form, the most affected is the retroperitoneum³³. There are only few cases of ECD with intraperitoneal involvement published^{16–19}, one case describes histiocytes in ascites fluid¹⁵. The gastrointestinal tract is rarely affected^{20, 21}. Only one case published in the literature describes mucosal findings with histiocyte infiltration found on histology – nodular gastritis of the entire stomach and small hyperpigmented lesions on colonic mucosa²².

Treatment regimen depends on the localization of the disease. Cytotoxic therapy is commonly used, but interferon alpha 2A, 3–9 million units 3 times *per* week, is considered as the first-line therapy²³. The mechanism of action of interferon alpha 2A in ECD is not fully understood: it influences

maturing and activation of dendritic cells, activates the natural killer cells which leads to the destruction of histiocyte and acts cytotoxicly directly to histiocyte²³.

As salvage therapy in six patients with severe multisystemic ECD, refractory to other therapies, and histiocytes positive to PDGFR beta, Haroche et al.²⁴ used imatinib mesylate, 100–800 mg once a day. Autologous hematopoietic-stem cell transplantation in a young patient, after disease progression following a few lines of therapy, has also been described²⁵. In case of bone involvement, zoledronic acid showed promising results²⁶. Mammalian target of rapamycin (mTOR) could be a new target in ECD. Gianfreda et al.²⁹ treated 10 patients with prednison and sirolimus, and achieved stable disease in 8 patients. Tumor necrosis factor alpha (TNF α) is a key regulator of inflammation in ECD. Infliximab was safely used in treating two patients, with clinical improvement³⁰. BRAF inhibitor vemurafenib could be used to treat patients with BRAF mutation³¹. Recent data suggest that canakinumab is a potential new drug for ECD³². Systematic review of 448 patients, published recently, provides detailed clinical features, prognostic and predictive factors. INF α based therapy is a reliable option, but a new therapy is emerging: infliximab, BRAF inhibitors, and mTOR inhibitors³³.

We described a case with the multisystemic form of ECD, affecting long bones, the hypophysis, abdominal cavity, and peripheral nerves. The disease presented with diabetes *insipidus*, then manifested as soft-tissue tumor of the right lower extremity. It was probably histiocytoma, unrecognized histopathologically. Xanthogranulomatous inflammation of fat tissue of the omentum was confirmed with laparoscopic biopsy, while the diagnosis of ECD was made based on clinical features, pathological/immunohistochemical findings and radiological criteria. The differential diagnosis included: Langerhans cell histiocytosis, Rosai-Dorfman disease, multiple myeloma, Whipple's disease, hemophagocytic syndromes. Taking into consideration that the patient was not motivated for chemotherapy, treatment included: prednisone, interferon alpha 2A, imatinib mesylate. Due to disease

progression the patient died, nine years after the initial symptoms (five years after the diagnosis was made).

Conclusion

ECD is a rare form of a non-Langerhans-cell histiocytosis of unknown etiology. It affects elderly, usually is unrecognized in the beginning. It is mainly multisystemic, thus it is necessary to start therapy as soon as possible. The prognosis depends on the extraskelatal manifestations of the disease, especially cardiac and pulmonary involvement. There are no guidelines for treatment of ECD. Interferon alpha is thought to be the first-line therapy. New therapy appears on horizon: infliximab, BRAF inhibitors, mTOR inhibitors.

REFERENCES

1. *Chester W.* Über lipoid Granulomatose. *Virchows Arch Pathol Anat* 1930; 279(2): 561–602.
2. *Cavalli G, Biavasco R, Borgiani B, Dagna L.* Oncogene-induced senescence as a new mechanism of disease: The paradigm of erdheim-chester disease. *Front Immunol.* 2014; 5: 281.
3. *Emile J, Diamond EL, Hélias-Rodzewicz Z, Cohen-Aubart F, Charlotte F, Hyman DM, et al.* Recurrent RAS and PIK3CA mutations in Erdheim-Chester disease. *Blood* 2014; 124(19): 3016–9.
4. *Bosco J, Allende A, Varikatt W, Lee R, Stewart GJ.* Does the BRAF(V600E) mutation herald a new treatment era for Erdheim-Chester disease? A case-based review of a rare and difficult to diagnose disorder. *Intern Med J* 2015; 45(3): 348–51.
5. *Antunes C, Graça B, Donato P.* Thoracic, abdominal and musculoskeletal involvement in Erdheim-Chester disease: CT, MR and PET imaging findings. *Insights Imaging* 2014; 5(4): 473–82.
6. *Veysier-Belot C, Cacoub P, Caparrós-Lefebvre D, Wechsler J, Brun B, Remy M, et al.* Erdheim-Chester disease. Clinical and radiologic characteristics of 59 cases. *Medicine (Baltimore)* 1996; 75(3): 157–69.
7. *Bourke SC, Nicholson AG, Gibson GJ.* Erdheim-Chester disease: Pulmonary infiltration responding to cyclophosphamide and prednisolone. *Thorax* 2003; 58(11): 1004–5.
8. *Yano S, Kobayashi K, Kato K, Tokuda Y, Ikeda T, Takeyama H.* A case of Erdheim-Chester disease effectively treated by cyclophosphamide and prednisolone. *Nihon Kogyaku Gakkai Zasshi* 2007; 45(1): 43–8.
9. *Ho P, Smith C.* High-dose methotrexate for the treatment of relapsed central nervous system erdheim-chester disease. *Case Rep Hematol* 2014; 2014: 269359.
10. *Darstein F, Kirschev S, Heckl S, Rahman F, Schwarting A, Schuchmann M, et al.* Successful treatment of Erdheim-Chester disease with combination of interleukin-1-targeting drugs and high-dose glucocorticoids. *Intern Med J* 2014; 44(1): 90–2.
11. *Myra C, Sloper L, Tighe PJ, McIntosh RS, Stevens SE, Gregson RH, et al.* Treatment of Erdheim-Chester disease with cladribine: A rational approach. *Br J Ophthalmol* 2004; 88(6): 844–7.
12. *Adam Z, Sprláková A, Reháček Z, Koukalová R, Šťurcová P, Krejčí M, et al.* Partial regression of CNS lesions of Erdheim-Chester disease after treatment with 2-chlorodeoxyadenosine and their full remission following treatment with lenalidomide. *Klin Onkol* 2011; 24(5): 367–81.(Czeck)
13. *Broccoli A, Stefoni V, Faccioli L, Agostinelli C, Spinardi L, Pastore TM, et al.* Bilateral orbital Erdheim-Chester disease treated with 12 weekly administrations of VNCOP-B chemotherapy: A case report and a review of literature. *Rheumatol Int* 2012; 32(7): 2209–13.
14. *Haroche J, Amoura Z, Trad SG, Wechsler B, Cluzel P, Grenier PA, et al.* Variability in the efficacy of interferon-alpha in Erdheim-Chester disease by patient and site of involvement: Results in eight patients. *Arthritis Rheum* 2006; 54(10): 3330–6.
15. *Ota M, Sakamoto M, Sato K, Yoshida Y, Funakubo AY, Akijama Y, et al.* Immunopathological analysis of Erdheim-Chester disease with massive ascites. *Intern Med* 2012; 51(19): 2825–30.
16. *Gupta A, Aman K, Al-Babtain M, Al-Wazgan H, Moronf R.* Multisystem Erdheim-Chester disease; a unique presentation with liver and axial skeletal involvement. *Br J Haematol* 2007; 138(3): 280.
17. *Pan A, Doyle T, Schlup M, Lubcke R, Schultz M.* Unusual manifestation of Erdheim-Chester disease. *BMC Gastroenterol* 2011; 11: 77.
18. *Gundling F, Nerlich A, Heitland W, Schepp W.* Biliary manifestation of Erdheim-Chester disease mimicking Klatskin's carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2007; 102(2): 452–4.
19. *Ivan D, Neto A, Lemos L, Gupta A.* Erdheim-Chester disease: A unique presentation with liver involvement and vertebral osteolytic lesions. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127(8): e337–9.
20. *Tevlin R, Cabalane AM, Larkin JO, Treacy A, Connaghan D, Winter DC.* Gastrointestinal Erdheim-Chester disease. *Ir Med J* 2014; 107(5): 149–50.
21. *Vermeiren P, Van Laecke S, Cavelier C, De Loose D, Vanholder R.* Progressive dysphagia caused by Erdheim-Chester disease. *QJM* 2014; 107(12): 1015–7.
22. *Ben-Yaakov G, Munteanu D, Sztarkier I, Fich A, Schwartz D.* Erdheim Chester: A rare disease with unique endoscopic features. *World J Gastroenterol* 2014; 20(25): 8309–11.
23. *Haroche J, Amoura Z, Trad SG, Wechsler B, Cluzel P, Grenier PA, et al.* Variability in the efficacy of interferon-alpha in Erdheim-Chester disease by patient and site of involvement: result in eight patient. *Arthritis Rheum* 2006; 54(10): 3330–6.
24. *Haroche J, Amoura Z, Charlotte F, Salvatierra J, Wechsler B, Graux C, et al.* Imatinib mesylate for platelet-derived growth factor receptor-beta-positive Erdheim-Chester histiocytosis. *Blood* 2008; 111(11): 5413–5.
25. *Boissel N, Wechsler B, Leblond V.* Treatment of refractory Erdheim-Chester disease with double autologous hematopoietic stem-cell transplantation. *Ann Intern Med* 2001; 135(9): 844–5.
26. *Srikulmontree T, Massey DH, Roberts NW.* Treatment of skeletal Erdheim-Chester disease with zoledronic acid: Case report and proposed mechanisms of action. *Rheumatol Int* 2007; 27(3): 303–7.

27. Aouba A, Georgin-Lavialle S, Pagnoux C, Martin SN, Renand A, Galateau-Salle F, et al. Rationale and efficacy of interleukin-1 targeting in Erdheim-Chester disease. *Blood* 2010; 116(20): 4070–6.
28. Miller RC, Villà S, Kamer S, Pasquier D, Poortmans P, Mücke O, et al. Palliative treatment of Erdheim-Chester disease with radiotherapy: A Rare Cancer Network study. *Radiother Oncol* 2006; 80(3): 323–6.
29. Gianfreda D, Nicastrò M, Galetti M, Alberici F, Corradi D, Becchi G, et al. Sirolimus plus prednisone for Erdheim-Chester disease: An open-label trial. *Blood* 2015; 126(10): 1163–71.
30. Dagna L, Corti A, Langheim S, Guglielmi B, De Cobelli F, Doglioni C, et al. Tumor necrosis factor α as a master regulator of inflammation in Erdheim-Chester disease: Rationale for the treatment of patients with infliximab. *J Clin Oncol* 2012; 30(28): e286–90.
31. Tzoulis C, Schwarzmüller T, Gjerde IO, Søfteland E, Neckelmann G, Biermann M, et al. Excellent response of intramedullary Erdheim-Chester disease to vemurafenib: A case report. *BMC Res Notes* 2015, 8: 171.
32. Tran T, Pariente D, Guittou C, Delwail A, Barat-Houari M, Meinzger U. Treatment of Erdheim-Chester disease with canakinumab. *Rheumatology (Oxford)* 2014; 53(12): 2312–4.
33. Cives M, Simone V, Rizzò FM, Dicunzio F, Cristallo Lacalamita M, Ingravallo G, et al. Erdheim-Chester disease: A systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol* 2015; 95(1): 1–11.

Received on October 12, 2015.

Revised on November 17, 2015.

Accepted on November 20, 2015.

Online First May, 2016.

*Prikazi bolesnika/
Case reports*

HAEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL
SYNDROME AND DIABETES MELLITUS –
Case report

HEMORAGIJSKA GROZNICA SA
BUBREŽNIM SINDROMOM I DIJABETES
MELITUS - *Prikaz slučaja*

Correspondence to:

Ass. dr **Marijana Petrović**
Vojnomedicinska akademija,
Klinika za nefrologiju, Beograd,
Crnotravska 17.
e-mail: makystan@yahoo.com
broj telefona: 063 8538 722.
Home: Marijana Petrović,
Crvenih Hrastova 16/13,
Beograd

Marijana Petrović^{1,7}, Stanko Petrović², Katarina
Obrenčević¹, Neven Vavić¹, Dragan Jovanović^{1,7}, Đoko
Maksić^{1,7}, Nemanja Rančić³, Tamara Dragović^{4,7},
Slobodan Obradović^{5,7}, Dejan Pilčević^{1,7}, Jelena Tadić¹,
Biserka Vukomanović-Đurđević^{6,7}, Ljiljana Ignjatović¹,
Mirjana Mijušković^{1,7}, Zoran Čukić¹

- ¹ Clinic for Nephrology, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia,
² Clinic for Gastroenterology and hepatology, Military Medical Academy,
Belgrade, Serbia
³ Centre for Clinical Pharmacology; Faculty of Medicine of the Military
Medical Academy, University of Defence, Belgrade, Serbia,
⁴ Clinic for endocrinology, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia
⁵ Clinic for Emergency and Internal Medicine, Military Medical
Academy, Belgrade, Serbia
⁶ Pathology and Forensic Medicine Institute, Military Medical Academy,
Belgrade, Serbia
⁷ Faculty of Medicine of the Military Medical Academy, University of
Defence, Belgrade, Serbia

Key words

haemorrhagic fever with renal syn-
drome, diabetes mellitus, Belgrade
virus.

Ključne reči

hemoragijska groznica sa renalnim sin-
drom, dijabetes melitus, Beograd virus.

Abstract

Introduction. Haemorrhagic fever with renal syndrome is acute infectious disease, zoonosis, comes in endemic and epidemic form. It is caused by RNA virus from genus Hantavirus of Bunyaviridae family. Clinical feature advances through 5 stages: febrile phase, hypotensive phase, oliguric phase, diuretic phase and convalescent phase. Fever, bleeding and acute renal failure develop in all patients. Severity of the disease depends on the virus species that causes it.

Case Report. A 31 year old patient was admitted to the hospital due to fever, vomiting and diarrhea, 20 days after military activity. On physical examination he was found to have conjunctival hyperemia, somnolence, arterial hypotension, oliguria. He was transferred to the intensive care unit. Due to worsening of acute renal failure and anuria hemodialysis treatment was started. Acute heart failure developed, after several days, together with respiratory failure, necessitating mechanical ventilation. ELISA assay confirmed acute infection with Belgrade virus. Diabetes mellitus developed during treatment, requiring insulin treatment. Percutaneous kidney biopsy was performed twice. Respiratory function recovered after treatment but kidney failure grade III remained.

Conclusion. We presented the case of severe form of haemorrhagic fever with renal syndrome, caused by Belgrade virus. Disease complications were heart and respiratory failure and de novo Diabetes mellitus. Haemorrhagic fever with renal syndrome should be suspected in patients with positive epidemiological data and typical clinical feature, establish diagnosis and start treatment as soon as possible.

INTRODUCTION

Haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) is acute infectious diseases, zoonosis, with endemic and epidemic characteristics (1). It is caused by RNA virus from genus Hantavirus of Bunyaviridae family (2). Typical clinical manifestation consists of fever, bleeding and acute renal failure (3). The reservoirs of Hantavirus are small mammals, mostly vole, field and house mouse, brown and black rat and shrews. Virus is excreted from the host in saliva, feces and urine. People are incidentally infected either by inhalation of aerosols or by ingestion of contaminated water and food. Three epidemiological types are recognized: rural type (typical for our country), urban type and laboratory infections (3,4).

Genus Hantavirus consists of several distinct species; the most common are Hantaan, Puumala, Belgrade/Dobrava and Seoul (1). Hantaviruses shown tropism to vascular endothelium of the kidney, heart, lung, lymphoid organs, rarely central nervous system (5,6). The disease is divided into 5 stages: febrile phase, hypotensive phase, oliguric phase, diuretic phase and convalescent phase. Acute renal failure usually develops in oliguric phase. Pulmonary edema, arterial hypertension with encephalopathy, cardiac arrhythmia and cerebral coma could complicate the course of the disease (3,5,6). Minority of patients develop chronic complications: chronic renal failure, arterial hypertension, hypopituitarism and infertility (7). Diagnosis is obtained considering epidemiological data, typical clinical feature, laboratory analysis and serologic assays, mostly the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA assay) (3,4,8). Kidney biopsy can be performed, in selected cases, showing picture of tubulointerstitial nephritis (4,9,10).

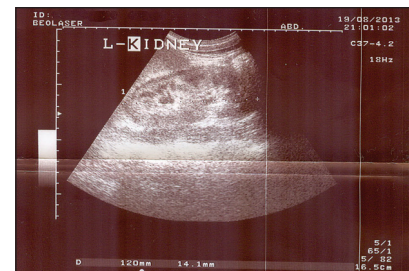
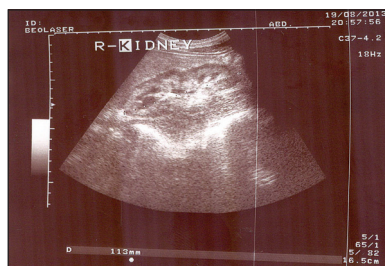
Rapid diagnosis and early hospital treatment predict better outcome. Daily hemodialysis are recommended if serum creatinine is raised above 400 $\mu\text{mol/l}$ (4,7,8). There is no specific treatment, but regarding several clinical trials ribavirin treatment should be initiated in the first 5 days which could reduce morbidity and mortality (11,12). Health education of soldiers, campers and workers with increased professional risk are very important (8,13). Vaccination against Hantavirus is accepted in China for high risk professions, but is not accepted in western countries (4,14).

Case report

A male patient, military person, 31 years old, is admitted to the hospital, 20 days after military exercise, due to fever 40°C, nausea, abdominal pain, vomiting and diarrhea, with worsening in the next few days and development of oliguria. Physical examination revealed injection of the conjunctiva, facial flush, somnolence, and arterial hypotension 100/70 mmHg. He was transferred to intensive care unit in Military Medical Academy (MMA). Laboratory

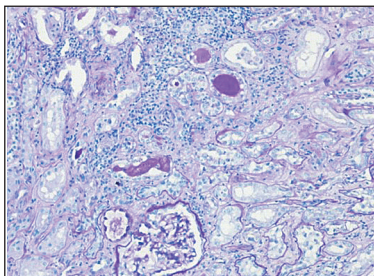
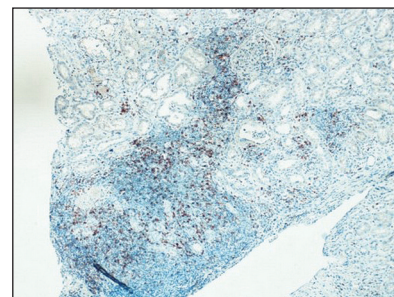
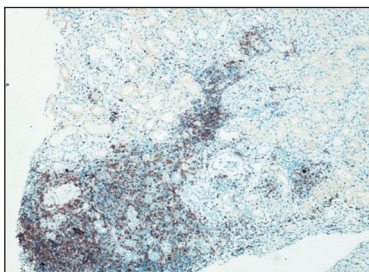
analysis showed low platelet count 13x10⁹/L, leucocytosis 20x10⁹/L, hyperviscosity syndrome (hemoglobin 196 g/L, hematocrit 0.56), serum creatinine (Cr) 200 $\mu\text{mol/l}$, lipase 300 U/L VS. 160 U/L. Due to rapid progression of renal failure (Cr 830 $\mu\text{mol/l}$), hyperkalemia 7.5mmol/L, anuria and hypervolemia, hemodialysis treatment was initiated next day. ELISA assay confirmed positive IgM and IgG antibody to Belgrade virus. After 4 days heart failure developed (brain natriuretic peptide (BNP) 4400 pg/ml (BNP < 100 pg/mL – heart failure unlikely)), probably due to hypervolemia, together with respiratory failure which required mechanical ventilation for 4 days. Severe coagulation abnormalities were verified – decreased antithrombin III, protein C and S, factor IX and X, increased international Normalised Ratio, activated partial thromboplastin time and D dimer.

Patient was treated with antibiotics, fresh frozen plasma, cryoprecipitate, hemodialysis (18 procedures). Respiratory function and diuresis recovered after therapy, but renal failure remained. Diuretic phase was prolonged to 4 weeks. Ultrasound examination of kidneys showed 11,5 cm longitudinal diameter, increased echogenicity of parenchyma (14 mm thickness), with hypoechoic halo, normal finding of the pancreas.



Pictures 1. Right kidney and Pictures 2. Left kidney

Diabetes mellitus developed during hospitalisation, requiring insulin treatment. Due to slow decrease of Cr level and proteinuria 1 gr/24h, percutaneous kidney biopsy was



Pictures 3a, 3b and 3c Light microscopy.

performed, after the patient general condition got better. The final histopathological finding (light microscopy and immunofluorescence microscopy) confirmed chronic tubulointerstitial nephritis.

After 58 days, patient was discharged from hospital, in good condition, diuresis was 4L, Cr 409 $\mu\text{mol/l}$, Hgb 88 g/L. During follow-up, due to urethral stricture (complication of urinary catheter placement), urethrotomy and several urethral dilations were performed, with good outcome. Three months later, control percutaneous kidney biopsy was performed, histopathological finding was unchanged. One year later, laboratory analysis improved, serum Cr 204 $\mu\text{mol/l}$, Hgb 120g/L, kidneys were smaller on ultrasound examination, 9 cm longitudinal diameter and with slightly hyperechoic parenchyma. Due to diabetes mellitus patient is receiving insulin treatment.

DISCUSSION

Taking all this into consideration, we suspected HFRS. ELISA assay confirmed acute infection with Belgrade virus, which causes severe form of the disease (2,3). Complication of the disease was acute heart and respiratory failure. What we want to emphasise with this case report is the development of de novo diabetes mellitus requiring insulin treatment, due to virus pancreatitis. Patient had normal glycemia before (data are taken from routine blood check performed twice annually). Acute pancreatitis, as rare complication of the HFRS, is published in the literature, but there are no published cases of HFRS with de novo developed Diabetes mellitus, so far (15,16,17,18).

Soon after hospital admission hemodialysis treatment started, in the beginning performed daily, according to the guidelines. Early hemodialysis treatment is associated with better disease outcome (7,8). Despite intensive hemodialysis, Cr level was decreasing slowly and diuretic phase was prolonged, complicated with hyperkalemia. Total 18 hemodialysis procedures were performed, which is much higher than

average number (5-6) of hemodialysis procedures performed in 148 patients with HFRS, treated in Clinic for Nephrology MMA, year 1989 to 2015. We performed percutaneous biopsy due to slow decrease in Cr, proteinuria and suspected glomerular disease (9,19,20). But histopathology report confirmed chronic tubulointerstitial nephritis.

It is not always easy to establish the diagnosis despite typical clinical feature. Differential diagnosis included: leptospirosis, measles, rubella, acute poststreptococcal glomerulonephritis, Henoch-Schönlein purpura, hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. Occurrence of fever, petechiae and ecchymosis after staying in country or farm favors HFRS. Serologic assays should be performed immediately, especially ELISA assay. Presence of specific anti – hantavirus IgM or 4x raised specific anti-hantavirus IgG antibody confirms acute infection (3,4,8).

CONCLUSION

In our patient with hemorrhagic fever with renal syndrome, clinical feature was complicated with heart and respiratory failure and de novo diabetes mellitus. Severity of the disease in these patients is dependent on the first place of the Hantavirus species. Belgrade virus, isolated form in our patient, is associated with severe form of the disease. Therefore, early established diagnosis of HFRS, hospital treatment in the intensive care unit and hemodialysis treatment are prognostic factors for better disease outcome.

Sažetak

Uvod: Hemoragijska groznica sa bubrežnim sindromom je akutno infektivno oboljenje, iz grupe zoonoza, endemskog i epidemijskog karaktera. Uzročnik oboljenja je RNA virus iz roda Hantavirusa i familije Bunyaviridae. Kliničku sliku karakteriše pet faza: faza febrilnosti, hipotenzije, oligurije, poliurije i rekonvalescencije. Kod svih bolesnika je prisutna febrilnost, hemoragija i akutna bubrežna insuficijencija, a težina kliničke slike zavisi od soja virusa koji je izazvao oboljenje.

Prikaz slučaja: pacijent star 31 godinu, dvadesetak dana nakon vojne vežbe hospitalizovan zbog febrilnosti, uz povraćanja i dijareju. U fizikalnom nalazu dominira hipertenzija, konjunktiva, somnolencija, hipotenzija i oligurija. Premešten je u jedinicu intenzivne nege. Zbog brze progresije akutne bubrežne insuficijencije i anurije započeto hemodijalno lečenje. Nakon nekoliko dana razvija se akutna kardijalna dekompenzacija sa respiratornom insuficijencijom, što je zahtevalo sprovođenje mehaničke ventilacije. ELISA testom potvrđena akutna infekcija Hantavirusom, soj „Beograd“. Tokom lečenja razvija se i dijabetes melitus, uz potrebu za insulinskom terapijom. U dva navrata učinjena perkutana biopsija bubrega. Respiratorna funkcija se nakon lečenja oporavlja uz zaostajenje bubrežne insuficijencije gradus III.

Zaključak: Prikazan je teški slučaj hemoragijske groznice sa bubrežnim sindromom, koji je izazvao Hantavirus soj „Beograd“. Klinička slika je komplikovana akutnom kardijalnom dekompenzacijom, respiratornom insuficijencijom i razvojem de novo dijabetes melitusa. Kod bolesnika sa pozitivnom epidemiološkom anamnezom i tipičnom kliničkom slikom, trebalo bi posumnjati na hemoragijsku groznicu i što pre postaviti dijagnozu i započeti lečenje.

REFERENCES

1. World Health Organization. Haemorrhagic fever with renal syndrome: memorandum from a WHO meeting. *Bull WHO* 1983; 61: 269-75.
2. Muiyangwa M, Martynova EV, Khaiboullina SF, Morzunov SP, Rizvanov AA. Hantaviral Proteins: Structure, Functions, and Role in Hantavirus Infection. *Front Microbiol* 2015; 6: 1326.
3. Manigold T, Vial P. Human hantavirus infections: epidemiology, clinical features, pathogenesis and immunology. *Swiss Med Wkly*. 2014; 144: w13937.
4. Zou LX, Chen MJ, Sun L. Haemorrhagic fever with renal syndrome: literature review and distribution analysis in China. *Int J Infect Dis* 2016; 43: 95-100.
5. Cosgriff TM. Mechanisms of disease in Hantavirus infection: pathophysiology of hemorrhagic fever with renal syndrome. *Rev Infect Dis* 1991; 13(1): 97-107.
6. Cosgriff TM, Lewis RM. Mechanisms of disease in hemorrhagic fever with renal syndrome. *Kidney Int Suppl* 1991; 35: S72.
7. Kaya S. Prognostic factors in hantavirus infections. *Mikrobiyol Bul*. 2014; 48(1): 179-87. (Turkish)
8. Tkachenko EA, Bernshtein AD, Dzagurova TK, Morozov VG, Slonova RA, Ivanov LI, Trankvilevskii DV, Kruger D. Zh. Actual problems of hemorrhagic fever with renal syndrome. *Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 2013; (1): 51-8. (Russian)
9. Mustonen J, Helin H, Pietilä K, et al. Renal biopsy findings and clinicopathologic correlations in nephropathia epidemica. *Clin Nephrol* 1994; 41: 121.
10. Gnemmi V, Verine J, Vrigneaud L, Glowacki F, Ratsimbazafy A, Copin MC, et al. Microvascular inflammation and acute tubular necrosis are major histologic features of hantavirus nephropathy. *Hum Pathol* 2015; 46: 827-35.
11. Zivković M, Todorović Z, Canović P, Mijanović Z. Application of ribavirin in patients having hemorrhagic fever with renal syndrome. *Med Pregl*. 2009; 62(1-2): 63-7. (Serbian)
12. Moreli ML, Marques-Silva AC, Pimentel VA, da Costa VG. Effectiveness of the ribavirin in treatment of hantavirus infections in the Americas and Eurasia: a meta-analysis. *Virusdisease*. 2014; 25(3): 385-9.
13. Gherasim A, Hjertqvist M, Lundkvist Å, Kühlmann-Berenzon S, Carlson JV, Stenmark S, Widerström M, Österlund A, Boman H, Ahlm C, Wallensten A. Risk factors and potential preventive measures for nephropathia epidemica in Sweden 2011-2012: a case-control study. *Infect Ecol Epidemiol*. 2015; 5: 27698.
14. Zheng Y, Wei J, Zhou BY, Xu Y, Dong JH, Guan LY, Ma P, Yu PB, Wang JJ. Long-term persistence of anti hantavirus antibodies in sera of patients undergoing hemorrhagic fever with renal syndrome and subjects vaccinated against the disease. *Infect Dis (Lond)*. 2015 Dec 11: 1-5.
15. Puca E, Pilaca A, Pipero P, Kraja D, Puca EY. Hemorrhagic fever with renal syndrome associated with acute pancreatitis. *Virolog Sin*. 2012; 27(3): 214-7.
16. Fan H, Zhao Y, Song FC. Acute pancreatitis associated with hemorrhagic fever with renal syndrome: clinical analysis of 12 cases. *Ren Fail*. 2013; 35(10): 1330-3.
17. Yin Zhu, You-Xiang Chen, Yong Zhu, Pi Liu, Hao Zeng, Nong-Hua Lu. A retrospective study of acute pancreatitis in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome *BMC Gastroenterol*. 2013; 13: 171.
18. Kitterer D, Artunc F, Segerer S, Alscher MD, Braun N, Latus J. Evaluation of lipase levels in patients with nephropathia epidemica-no evidence for acute pancreatitis. *BMC Infect Dis*. 2015; 15: 286.
19. Kim S, Sung SH, An HR, et al. A case report of crescentic glomerulonephritis associated with Hantaan virus infection. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25: 2790.
20. Clement J, Mustonen J, Van Damme B, Helin H, Maes P, Van Ranst M. Severe crescentic glomerulonephritis linked to an acute Hantaan virus infection? *Nephrol Dial Transplant*. 2011; 26(4): 1448-9.