

Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet

Vesna M. Ilić

**Uloga polimorfizama gena za
angiotenzinogen, angiotenzin-konvertujući
enzim i AT1 receptor u razvoju nefropatije u
dijabetesu tipa I**

Doktorska disertacija

Beograd, 2013.

University of Belgrade
Faculty of Biology

Vesna M. Ilić

**The role of angiotensinogen, angiotensin-
converting enzyme and AT1 receptor genes
polymorphism in the development of
nephropathy in type I diabetes**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2013.

PODACI O MENTORIMA I ČLANOVIMA KOMISIJE:

Mentori:

Dr Dragana Cvetković

Vanredni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Dr sci. med. Zvonko Magić

Redovni profesor Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta Odbrane u Beogradu

Član komisije:

Dr Marina Stamenković – Radak

Vanredni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane _____ 2013. godine

ZAHVALNICA

REKLA BIH DA JE SVAKO AUTORSKO DELO, BAREM DELOM I KOLEKTIVNO DELO. TO NESPORNO VAŽI I ZA OVU DOKTORSKU DISERTACIJU KOJA SVAKAKO NE BI BILA MOGUĆA BEZ POMOĆI I PODRŠKE RAZLIČITIH OSOBA.

ODBRANA DOKTORSKE TEZE JE VELIKO ZADOVOLJSTVO I OLAKŠANJE JER JE REZULTAT VELIKOG RADA I ZALAGANJA. SEBE SMATRAM PRIVILEGOVANOM JER TEZU DOŽIVLJAVAM KAO DRUGU PROFESIONALNU SATISFAKCIJU. UVOĐENJE MOLEKULSKE DIJAGNOSTIČKE PRAKSE, KOJA JE DOPRINELA PREPOZNATLJIVOSTI LABORATORIJE ZA MOLEKULSKU GENETIKU VMA, KAO I NJENOM ZNAČAJU PO PACIJENTA, ZA MENE JE BIO PRVI VELIKI USPEH I ČAST DA BUDEM DEO EKIPE KOJU SU ČINILE TADA MAGISTRI BIOLOSKIH NAUKA STRELIĆ NATAŠA I CIKOTA BOJANA NA ČELU SA PROF. ZVONKOM MAGIĆEM.

TAKO, PRE SVEGA, VELIKU ZAHVALNOST DUGUJEM SVOM MENTORU, PROFESORU MAGIĆU, KOJI MI JE OMOGUĆIO ULAZAK U OBLAST MOLEKULSKE GENETIKE; ZBOG STRATEŠKIH SAVETA KOJI SU MI ZNATNO OLAKŠALI KONCIPIRANJE TEZE, OSTAVLJAJUĆI MI POTPUNU AUTORSKU SLOBODU. ZBOG PRUŽANJA PUNE PODRŠKE SLOBODNOM RAZVOJU MOJIH STRUČNIH I NAUČNIH INTERESA TOKOM SVOG VIŠEGODIŠNJEG "ŠEFOVANJA" NA PROJEKTU I U INSTITUTU ZA MEDICINSKA ISTRAŽIVANJA VMA.

ZAHVALNOST DUGUJEM SVOJIM PROFESORIMA I MENTORIMA SA BIOLOŠKOG FAKULTETA, PROF. DR. DRAGANI CVETKOVIĆ I PROF. DR. MARINI STAMENKOVIĆ RADA K ZBOG TEMELJNOG I PAŽLJIVOG IŠČITAVANJA DISERTACIJE I DAVANJA KONKRETNIH I KORISNIH SUGESTIJA KOJE SU OVAJ RAD UČINILE BOLJIM.

VELIKU ZAHVALNOST DUGUJEM MOJIM KOLEGINICAMA I DRUGARICAMA: MR. NATAŠI STRELIĆ, DR. BIOL. SCI. BOJANI CIKOTA-ALEKSIĆ, MR. ALEKSANDRI PETKOVIĆ-ĆURČIN I DR. BIOL. SCI. GORDANI ŠUPIĆ, NA NESEBIČNOJ POMOĆI I PODRŠCI TOKOM PISANJA OVOG RADA. HVALA DIPL. BIOHEMIČARU STEVI JOVANDIĆU I DOC. KATARINI ZELJIĆ NA TEHNIČKOJ POMOĆI U OBRADI TEKSTA, NA UVEK POZITIVNOJ I VESELOJ ATMOSFERI. HVALA MOL. BIOL. BOJANI MILIĆEVIĆ KOJA MI JE SVOJIM VREDNIM RADOM U LABORATORIJI OMOGUĆILA VIŠE SLOBODNOG VREMENA ZA PISANJE DISERTACIJE.

HVALA MOJIM RODITELJIMA NA LJUBAVI I BRIZI, MOM BRATU I NJEGOVOJ PORODICI NA BESKRAJNOJ POZITIVNOJ ENERGIJI, MOJIM ROĐACIMA I PRIJATELJIMA KOJI SU UVEK NA MOJOJ STRANI, MOM MARKU, TEI, JANI, IKI I ALEKSI KOJI MOM ŽIVOTU DAJU SMISAO I VOLJU.

NA KRAJU HVALA MOM SUPRUGU,..OVO JE NJEGOVA IDEJA, NJEGOVA OBLAST.. UVEO ME JE U OBIMNU KLINIKU, OBJASNIO PROBLEM I MNOGO MI POMOGAO U RAŠČIŠĆAVANJU VLASTITIH DILEMA. OVAJ RAD BIH POSVETILA NJEMU.

Uloga polimorfizma gena za angiotenzinogen (AGT), angiotenzin-konvertujući enzim (ACE) i AT1 receptor (AT1R) u razvoju nefropatije u tipu I dijabetesa

UVOD: Dijabetesna nefropatija (DN) je jedna od najozbiljnijih mikrovaskularnih komplikacija kako u tipu I, tako i u tipu II dijabetesa. Dva osnovna faktora rizika za pojavu i razvoj DN su hiperglikemija i arterijska hipertenzija. Hemodinamske promene u razvoju komplikacija osnovne bolesti se pokušavaju objasniti promenom aktivnosti RAS sistema. Polimorfizam gena RAS sistema može biti povezan sa kardiovaskularnim poremećajima a brojne studije ukazuju na vezu polimorfizma ovih gena i moguću predispoziciju za razvoj dijabetesne nefropatije. Ovakvo gledište doprinosi konceptu po kom će DN progredirati samo u određenim grupama pacijenata. Nastalu nefropatiju brojni faktori rizika dalje komplikuju. Kako se geni uključeni u regulaciju arterijskog pritiska smatraju odgovornim i za razvoj dijabetesne nefropatije, to analiza gena RAS sistema ima značajnu ulogu u dijagnostici i mogućoj terapiji ovog oboljenja. One mogu pomoći ranoj identifikaciji osoba sa visokim rizikom za razvoj ove bolesti i tako sprečiti dalje komplikacije.

CILJ: Ciljevi ovog rada su: utvrditi učestalost analiziranih genotipova i alela gena za angiotenzinogen (AGT/M235T/T174M polimorfizmi), angiotenzin-konvertujući enzim (ACE I/D polimorfizam) i gena za AT1 receptor (A1166C polimorfizam) kod ispitanika sa insulin-zavisnim dijabetesom bez nefropatije, sa incipijentnom nefropatijom i manifestnom nefropatijom; ispitati povezanost učestalosti ispitivanih genskih varijanti sa stepenom razvoja nefropatije i ostalim komplikacijama dijabetesa; analizirati kliničko demografske podatke ispitanika u odnosu na stepen razvoja nefropatije i utvrditi da li postoji povezanost učestalosti ispitivanih genskih varijanti i drugih relevantnih kliničkih parametara; analizirati postojanje veze identifikovanih haplotipova sa rizikom za nastanak dijabetesne nefropatije.

MATERIJAL I METODE: Istraživanje je obuhvatilo 79 pacijenata sa tipom I dijabetesa, oba pola, starosti 20-40 godina, sa trajanjem dijabetesa dužim od 5 godina, podeljenih prema stepenu razvoja bubrežnih komplikacija u tri grupe: ispitanici bez nefropatije, sa incipijentnom nefropatijom i sa manifestnom nefropatijom

Iz uzorka periferne krvi pacijenata rađene su laboratorijske analize i izolovana DNK. Podaci značajni za istraživanje, i to godine starosti ispitanika, trajanje dijabetesa, porodična anamneza za hipertenziju, dijabetes i kardiovaskularne bolesti, zatim klinički parametri koji su obuhvatili vrednosti hipertenzije, krvnog pritiska, parametre lipidnog statusa (ukupni holesterol, LDL-holesterol, HDL-holesterol, trigliceridi), dugoročne glikoregulacije (24-časovni profil glikemije, HbA1c) i bubrežne funkcije, određivani su po prijemu pacijenata na kliniku. Vrednosti albumina su određivane nefelometrijskom metodom. Utvrđivanje genotipova u genu za angiotenzinogen (AGT M235T i T74M) i AT1 receptor (A1166T) rađeno je PCR-RFLP metodom korišćenjem odgovarajućih restrikcionih enzima. Za detekciju genotipova za angiotenzin-konvertujući enzim (ACE) koristili smo standardni PCR protokol.

U cilju analize dobijenih rezultata korišćen je SPSS statistički paket (Chicago, Illinois). Primenjene su metode deskriptivne statistike i analitičke statistike (Studentov t-test, χ^2 test, Pearson-ov koeficijent korelacije, Mann-Whitney U test, Kruskal-Wallis test i ANOVA). Logističkim regresionim modelom je ispitivana veza nefropatije i drugih analiziranih varijabli. Vrednosti neravnoteže vezanosti (Linkage Disequilibrium – LD) za polimorfizme M235T i T174M, kao i učestalosti haplotipova, računane su pomoću programa SNPStats.

REZULTATI: Analizom kliničko demografskih podataka ispitanika u odnosu na stepen razvoja nefropatije zabeležena je značajna razlika u srednjoj vrednosti životne dobi, trajanju dijabetesa, hipertenziji i vrednostima sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska ($p < 0,001$). U grupi proteinuričnih ispitanika, pojava retinopatije je značajno učestalija ($p < 0,001$) u odnosu na grupu ispitanika sa normoalbuminurijom, dok je učestalost polineuropatije viša, ali ne značajno, u grupi mikroalbuminuričnih ispitanika. Ispitivane grupe se nisu statistički značajno razlikovale u nivou HbA1c. Vrednosti ukupnog holesterola, HDL i LDL holesterola u ispitivanim grupama su slične, dok vrednosti triglicerida pokazuju značajnu razliku između grupe pacijenata sa normoalbuminurijom i proteinuričnih ispitanika ($p < 0,001$).

Analiza učestalosti ispitivanih genotipova ukazala je na značajno češće ($p < 0.05$) prisustvo TT genotipa (AGT M235T) u grupi proteinuričnih ispitanika. Nije dobijena statistički značajna razlika u zastupljenosti ispitivanih alela i genotipova za AGT T174M između ispitivanih grupa. U ispitivanju učestalosti alela u genu za ACE, broj pacijenata sa D alelskom formom je bio veći u grupi sa proteinurijom u odnosu na grupu sa normoalbuminurijom, ali ta razlika nije bila značajna. Učestalost DD genotipa, koji se povezuje sa većim nivoom ACE je najmanja kod pacijenata sa mikroalbuminurijom. Statistički značajne razlike, između grupe normoalbuminuričnih i proteinuričnih pacijenata, nisu nađene niti za učestalost C alela i CC genotipa u genu za AT1 receptor.

Naše istraživanje nije pokazalo povezanost grupisanih genotipova (T/- AGT, D/- ACE i C/- AT1R) sa komplikacijama hipertenzijom, retinopatijom i polineuropatijom kod ispitanika sa tipom I dijabetesa, te oni ne bi mogli da se smatraju markerom rizika za razvoj ovih komplikacija.

Na osnovu multivarijantnog regresionog modela izdvojeni su faktori rizika značajni za nastanak nefropatije. Model je pokazao da su trajanje dijabetesa, prisustvo hipertenzije, i TT polimorfizam AGT gena značajni prediktori za nastanak nefropatije. Korelacija između trajanja dijabetesa i prisustva TT genotipa je visoko statistički značajna ($p < 0.01$).

Analiza procentualne zastupljenosti haplotipova polimorfizama M235T i T174M gena za AGT između analiziranih grupa pokazala je da ovi haplotipovi nisu bili u statistički značajnoj asocijaciji sa rizikom za razvoj nefropatije u poređenju sa najčešće zastupljenim haplotipom MT koji je korišćen kao referentna vrednost. Izvesna tendencija ka značajno sniženom riziku za razvoj mikroalbuminurije i proteinurije je zabeležena za TM haplotip ($OR=0.38, p=0.062$)

ZAKLJUČAK: Analizom polimorfizma M235T AGT gena pokazano je da je učestalost T alelske forme, odnosno TT genotipa, koji nose najveći rizik za razvoj nefropatije kod dijabetičara, statistički značajno veća kod pacijenata sa terminalnom bubrežnom slabošću ($p < 0.05$). Ispitivanjem učestalosti polimorfizma gena za AGT (T174M), ACE i AT1R nismo dobili potvrdu da se prisustvo pretpostavljenih "rizičnih"

varijanti (MM genotip za AGT T174M, DD genotip za ACE gen i CC genotip u genu za AT1 receptor) povećava sa stepenom razvoja nefropatije kod ispitanika sa dijabetesom. Na osnovu rezultata multivarijantnog regresionog modela, za nastanak poremećaja funkcije bubrega kao značajni su se pokazali: trajanje bolesti (DM), hipertenzija i TT genotip AGT M235T (OR od 1,2 do 28). Analizom haplotipova gena za AGT, M235T i T174M, pokazalo se da identifikovani haplotipovi nisu bili u statistički značajnoj asocijaciji sa rizikom za razvoj nefropatije.

Polimorfizam gena RAS sistema se povezuje sa kardiovaskularnim poremećajima, brojne su studije koje ukazuju na povezanost polimorfizma ovih gena i moguće predispozicije za nastanak dijabetesne nefropatije. Isti geni su odgovorni i za regulaciju arterijskog pritiska. U kliničkom smislu to bi značilo da dijabetičari sa MT i TT genotipom za AGT gen imaju veću sklonost ka razvoju dijabetesne nefropatije. Ovakve genetičke analize mogu pomoći ranoj identifikaciji osoba sa povećanim rizikom za razvoj mikrovaskularnih komplikacija dijabetesa. Dalje lečenje ovih pacijenata bi podrazumevalo striktnu kontrolu dijabetesa (odnosno uspostavljanje dobre glikoregulacije), dobru kontrolu arterijskog pritiska što bi uključivalo i ranu primenu antihipertenzivne terapije, normalizaciju lipidnog statusa i prestanak pušenja.

Ključne reči: Dijabetesna nefropatija, renin angiotenzin sistem, genski polimorfizam

Naučna oblast: biologija

Uža naučna oblast: Genetika

UDK: [575.113.2.:[616.379-008.64+616.12-008.331.1]]::616.61-06

The role of angiotensinogen (AGT), angiotensin-converting enzyme (ACE) and AT1 receptor (AT1R) gene polymorphisms in the development of nephropathy in type I diabetes

Introduction: Diabetic nephropathy (DN) is an important chronic complication of long standing type 1 and type 2 Diabetes mellitus associated with considerable morbidity and mortality. Nephropathy affects about one third of all Type 1 diabetes mellitus patients and 15-60% of patients with type 2 diabetes. Important characteristic of DN is increased protein excretion in urine. Early stage is characterized by a small increase in urinary albumin excretion (UAE), also called microalbuminuria or incipient DN. More advanced disease is defined by the presence of macroalbuminuria or proteinuria. The latter is named overt or manifested DN. The two main risk factors for diabetic nephropathy are hyperglycemia and arterial hypertension, but multiple factors contribute to the initiation and progression of diabetic nephropathy including genetic and racial predisposition, glycemic and other metabolic abnormalities, various cytokines and growth factors. The prominent role of the component genes of the RAS in cardiovascular regulation suggest the possibility that polymorphism of the genes of the RAS system might be involved in the genetic predisposition to develop diabetic nephropathy. In this context, genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system (RAS) are attractive candidates to be studied, since inhibition of the activity of this system has shown to prevent the development of diabetic complications, such as nephropathy. The study of those genetic polymorphisms, which might allow identification of groups with high risk of developing diabetic nephropathy, provide novel therapeutic targets or individual treatment strategies for both the prevention and treatment of these complications.

Aim: The aim of study was to: to determine the association of genotype and allel frequency between AGT gene polymorphism ((AGT/M235T/T174M), ACE (I/D) gene polymorphism and AT1 (A1166C) receptor gene polymorphism in type I diabetic patients without nephropathy, with incipient nephropathy and overt nephropathy; to examine the correlation frequency of investigated polymorphisms and the degree of nephropathy

development. Also, the aim was to analyse clinical-demographic values according to diabetic nephropathy progression and possible connection between the frequency of the investigated gene variants and other relevant clinical complications; to determine the presence of haplotype blocks in the examined groups and the association between detected haplotypes and diabetic nephropathy.

Material and methods: The study group considered of 79 patients with diabetes type I, both gender, aged 20-40 years, with duration of diabetes longer than 5 years and separated according to diabetic nephropathy level in three groups: without nephropathy, with incipient nephropathy and manifested nephropathy.

DNA isolation and laboratory tests were performed from peripheral blood samples. Data relevant to the research: the age, duration of diabetes, family history of hypertension, diabetes and cardiovascular disease, then clinical parameters that affected value hypertension, blood pressure, lipid parameters (total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol), long-term glycemic control (24-hour profile of blood glucose, HbA1c) and renal function was determined by admission of patients to the clinic. The values of albumin were measured by nephelometric method. Detection of genotypes and allele frequencies in the gene for angiotensinogen (AGT M235T and T74M) and AT1 receptor (A1166T) was determined by PCR-RFLP using restriction enzymes. For detection of genotypes of angiotensin-converting enzyme (ACE), we used standard PCR protocol.

For the purpose of analysis, we used the SPSS statistical package (Chicago, Illinois). Applied methods of descriptive statistics were (mean, standard deviation, min, max) and analytical statistics (Student's t-test, χ^2 test, Pearson's correlation coefficient, Mann-Whitney U test, Kruskal-Wallis test and ANOVA). Logistic regression model analysed the connection between nephropathy and other analyzed variables.

Values imbalance attachment (Linkage Disequilibrium-LD) were calculated for polymorphisms M235T and T174M using SNPStats.

RESULTS: Demographic analysis of the clinical data of patients according to the degree of development of nephropathy observed a statistically significant difference in the mean age, duration of diabetes, hypertension, systolic and diastolic blood pressure ($p < 0.001$). In the group of proteinuric patients, the frequent occurrence of retinopathy in comparison to the group of subjects with normoalbuminuria was statistically significant ($p < 0.001$), in contrast to the frequency of polyneuropathy, which was higher in microalbuminuric subjects and not statistically significant. Statistically significant differences between groups of patients were not found for HbA1c. Total cholesterol, HDL and LDL cholesterol levels in the examined groups were similar, while triglyceride values show a significant difference between normo and proteinuric group of patients ($p < 0,001$).

Association of investigated polymorphisms and the level of development of nephropathy pointed to the high statistical significance ($p < 0.05$) in the presence of the TT genotype of AGT gene (M235T) polymorphism in a group of proteinuric patients. There was no statistically significant difference in the abundance of the alleles and genotypes of AGT T174M between the studied groups. The frequency of D allele (ACE gene), the number of patients with a form of the D allele of gene was higher in the group with proteinuria than in the normoalbuminuric group, but these values were not statistically significant. Distribution of DD genotype that is associated with increased level of serum ACE is even lower in patients with microalbuminuria. Statistically significant differences between groups of normoalbuminuric and proteinuric patients were not found in the frequency of C allele and CC genotype in the gene for the AT1 receptor

Our research hasn't shown an association of grouping genotypes (T / - AGT, D / - ACE C / - AT1R) and complications: hypertension, retinopathy and polyneuropathy in patients with type I diabetes, and they might not be considered to be the marker of risk for the development of these complications.

Using multivariate regression analysis, we created a model to define predictors for development of the nephropathy. The model showed that the duration of diabetes, presence of hypertension and TT AGT gene polymorphisms were significant predictors for the

development of nephropathy. The correlation between duration of diabetes and the presence of TT genotype was statistically highly significant ($p < 0,01$).

Analysis of the percentage of the haplotype in M235T and T174M AGT gene polymorphisms between analysed groups, showed that these haplotypes were not statistically significant associated with the risk of nephropathy in type I diabetes compared with the most frequent haplotype MT, which was used as a reference value. Certain tendencies towards significantly decreased risk of developing microalbuminuria and proteinuria was observed for TM haplotype ($OR = 0.38, p = 0.062$).

CONCLUSION: The analysis of M235T AGT gene polymorphism has been shown that the frequency of T alleles form or TT genotype, which carry the highest risk for the development of nephropathy in diabetic patients was significantly higher in patients with terminal renal failure ($p < 0,05$. Examining the frequency of polymorphism of AGT (T174M), ACE and AT1R did not receive confirmation that the presence of "high-risk" polymorphisms (AGT MM genotype, DD genotype of the ACE gene and the CC genotype in the gene for the AT1 receptor) increases with the degree of development of nephropathy in patients with diabetes. Based on the results of multivariate regression models for the development of renal dysfunction as important as doing: duration of diabetes (DM), hypertension and AGT M235T TT genotype (OR 1.2 to 28). Haplotype analysis of AGT gene, M235T and T174M, appeared that identified haplotypes were not statistically significant associated with the risk of developing nephropathy.

Key words: Diabetic nephropathy, renin-angiotensin system, gene polymorphisms

Scientific field: Biology

Narrower scientific field: Genetics

UDK: [575.113.2::[616.379-008.64+616.12-008.331.1]]::616.61-06

SADRŽAJ

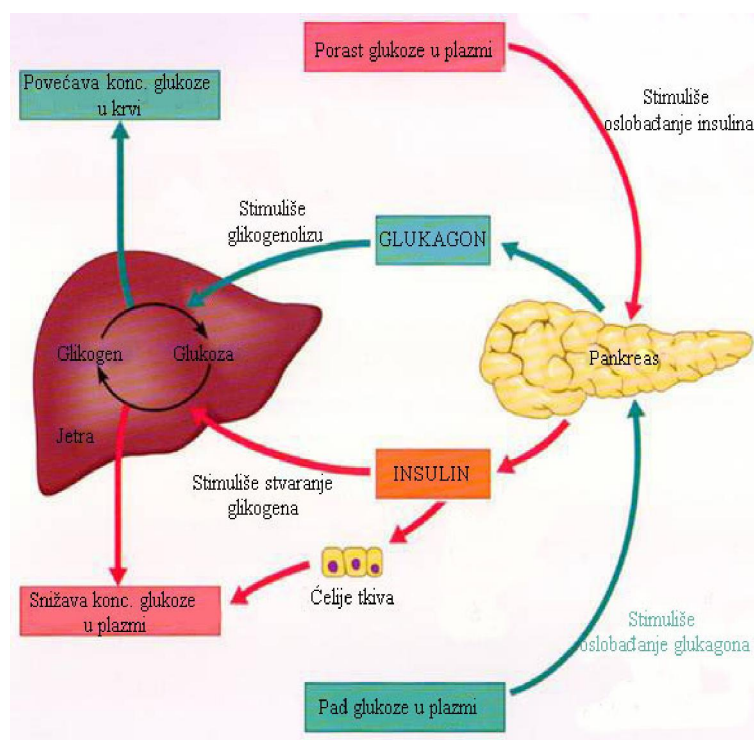
UVOD	1
DIJABETES	2
<i>Dijabetes melitus tip 1</i>	4
<i>Komplikacije dijabetesa</i>	7
Akutne komplikacije.....	7
<i>Dijabetesna ketoacidoza (DKA)</i>	7
<i>Hiperglikemijska, hiperosmolarna, neketonska koma</i>	7
<i>Laktična acidoza</i>	7
<i>Hipoglikemije</i>	7
Hronične komplikacije.....	8
<i>Makrovaskularne komplikacije koje</i>	8
<i>Mikrovaskularne komplikacije</i>	8
<i>Dijabetesna nefropatija</i>	9
Stadijumi razvoja dijabetesne nefropatije.....	10
<i>Rana faza dijabetesne nefropatije</i>	11
<i>Stadijum incipijentne nefropatije:</i>	11
<i>Stadijum manifestne dijabetesne nefropatije:</i>	12
<i>Stadijum terminalne bubrežne insuficijencije kod dijabetičara</i>	13
Patofiziologija smanjenja glomerulske filtracije.....	13
Histopatološke promene kod dijabetesne nefropatije	15
<i>Difuzna glomeruloskleroza</i>	16
<i>Nodularna glomeruloskleroza</i>	17
<i>Eksudativne lezije</i>	17
<i>Hiperglikemija i dijabetes</i>	18
Neenzimaska glikozilacija proteina	19
Stimulacija sinteze proteina.....	20
Glikozna toksičnost.....	20
Poliolski put.....	21
<i>Hipertenzija i dijabetes</i>	22
Patogeneza hipertenzije u dijabetesu	24
<i>Renin-angiotenzin sistem</i>	26
Aktivnost gena renin-angiotenzin sistema.....	27
Renin-angiotenzin kaskada.....	28
Komponente renin-angiotenzin sistema	30
<i>Renin</i>	30
<i>Angiotenzinogen</i>	31
<i>Polimorfizmi gena za angiotenzinogen</i>	34
<i>Angiotenzin konvertujući enzim (ACE)</i>	38
<i>Angiotenzinski receptori</i>	42
<i>RAS POLIMORFIZMI I DIJABETESNA NEFROPATIJA</i>	44
CILJEVI ISTRAŽIVANJA	47
MATERIJAL I METODE	49
<i>LABORATORIJSKE ANALIZE</i>	51
<i>Izolacija DNK</i>	52
<i>Određivanje koncentracije DNK u uzorku</i>	52
<i>Elektroforeza genomske DNK na agaroznom gelu</i>	54

<i>Lančana reakcija polimerizacije DNK (PCR)</i>	55
<i>Analiza polimorfizama restrikcionih mesta (analiza RSP-ova)</i>	59
<i>M235T POLIMORFIZAM AGT GENA</i>	61
<i>T174M POLIMORFIZAM AGT GENA</i>	62
<i>ACE I/D POLIMORFIZAM</i>	63
<i>A1166C POLIMORFIZAM</i>	64
REZULTATI	67
<i>I. KLINIČKO DEMOGRAFSKI PODACI ISPITANIKA U ODNOSU NA STEPEN RAZVOJA NEFROPATIJE</i>	68
<i>II. UČESTALOST ISPITIVANIH POLIMORFIZAMA GENA U GRUPAMA SA RAZLIČITIM STEPENOM RAZVOJA NEFROPATIJE</i>	80
<i>AGT M235T genski polimorfizam</i>	80
<i>AGT T174M genski polimorfizam</i>	82
<i>ACE I/D genski polimorfizam</i>	84
<i>AT1R genski polimorfizam</i>	87
<i>III. POVEZANOST ISPITIVANIH POLIMORFIZAMA GENA ZA AGT(M235T), ACE I AT1R SA NAJČEŠĆIM KOMPLIKACIJAMA DIJABETESA</i>	89
DISKUSIJA	93
ZAKLJUČCI	107
LITERATURA	110
BIOGRAFIJA	124
PRILOZI	126

UVOD

Dijabetes

Dijabetes melitus je po definiciji Svetske zdravstvene organizacije (World Health Organisation - WHO) sindrom koji karakterišu hronična hiperglikemija i poremećaji metabolizma ugljenih hidrata, masti i belančevina, uslovljen apsolutnim ili relativnim nedostatkom sekrecije i/ili delovanja insulina. Dijabetes mellitus (DM) je hronično i doživotno oboljenje koje zahteva stalno praćenje i lečenje. U kliničkoj slici dominiraju simptomi koji su, pre svega posledica hiperglikemije, bez obzira da li je ona nastala usled



Slika 1. Regulacija metabolizma glukoze

(Preuzeto sa: <http://www.pattersonfitness.com/the-science-behind-the-missfits-2-week-fat-loss-jump-start-nutrition-blueprint/>)

ćelije mišića, jetre i adipoznog tkiva. U njima stimuliše sintezu glikogena, masti i proteina a inhibira degradaciju ovih metaboličkih izvora energije. Pored toga, insulin stimuliše apsorpciju glukoze od strane većine ćelija, sa značajnim izuzetkom ćelija jetre i mozga. Tokom gladovanja, kada je nivo glukoze nizak, ili tokom stresa koji zahteva mobilizaciju

potpunog deficita insulina ili njegovog neadekvatnog delovanja. Kod dijabetes melitus-a, nedostatak ili nedovoljna količina insulina, ili neefikasna stimulacija ćelija na koje deluje, dovodi do stanja hiperglikemije. Iako u krvi postoji visok nivo glukoze, ćelije su u stanju gladovanja jer je narušena apsorpcija glukoze.

Insulin je polipeptidni hormon koji se sintetiše u beta ćelijama Langerhansovih ostrvaca pankreasa i predominantno deluje na

energije, sekrecija insulina je suprimirana a stimulirana je sinteza i oslobađanje glukagona od strane pankreasnih α ćelija, što dovodi do oslobađanja glukoze iz energetskih rezervi. Metaboličke efekte insulin ostvaruje delovanjem na receptore eksprimirane na ciljnim tkivima (skeletalnim mišićima, jetri i masnom tkivu) [1]. Kada se nivo glukoze u krvi poveća, insulin se izlučuje iz pankreasa, da bi normalizovao nivo glukoze. U uslovima apsolutnog ili relativnog nedostatka insulina, ulazak glikoze je smanjen kako u ona tkiva koja je koriste posredovano insulinom (mišićno i masno tkivo), tako čak i u onim tkivima koja je mogu koristiti delom i bez insulina, kao što je to slučaj sa hepatocitima.

U slučaju dijabetesa, nedostatak ili nedovoljna produkcija insulina, ili neefikasna stimulacija ćelija na koje deluje, dovodi do stanja hiperglikemije. Kada glikemija bude toliko povećana da prelazi prag tubularne reapsorpcije glikoze (10 mmol/L, odnosno 180mg%) dolazi do osmotske diureze. Tada se javlja pojačano mokrenje a u urinu se konstatuje glikozurija. Povećan gubitak tečnosti izaziva pojačanu žeđ, sklonost ka dehidraciji, pad telesne mase, a bolesnik oseća da nema snage.

Smanjenje telesne mase je uvek pokazatelj loše metaboličke kontrole bolesti. Usled nepravilne iskorišćenosti glukoze, bolesnik može da oseća glad pa iako pojačano unosi hranu, ipak stalno gubi u težini. Gubitak apetita obično nastaje tek u ketoacidozi. Istovremeno sa obilnom diurezom dolazi i do gubitka soli iz organizma, što može dovesti do elektrolitnih disbalansa, mišićne slabosti i grčeva. Vrlo male količine insulina mogu da inhibiraju lipolizu ili uzimanje ugljenih hidrata, što za posledicu ima povećano dopremanje slobodnih masnih kiselina u tkivu gde one postaju glavni izvor energije u procesu beta oksidacije. Kod dece i mladih teži deficit insulina može dovesti do ketoacidoze, dok nešto manji deficit, ako duže traje, dovodi ne samo do pothranjenosti već i do zaostajanja u rastu i razvoju [2].

Različite su kliničke manifestacije bolesti kod različitih tipova dijabetesa. Iz tih razloga je Svetska zdravstvena organizacija predložila podelu i jedinstvenu terminologiju za različite tipove dijabetesa. Postoje četiri osnovne kategorije dijabetesa i specifični oblici bolesti.

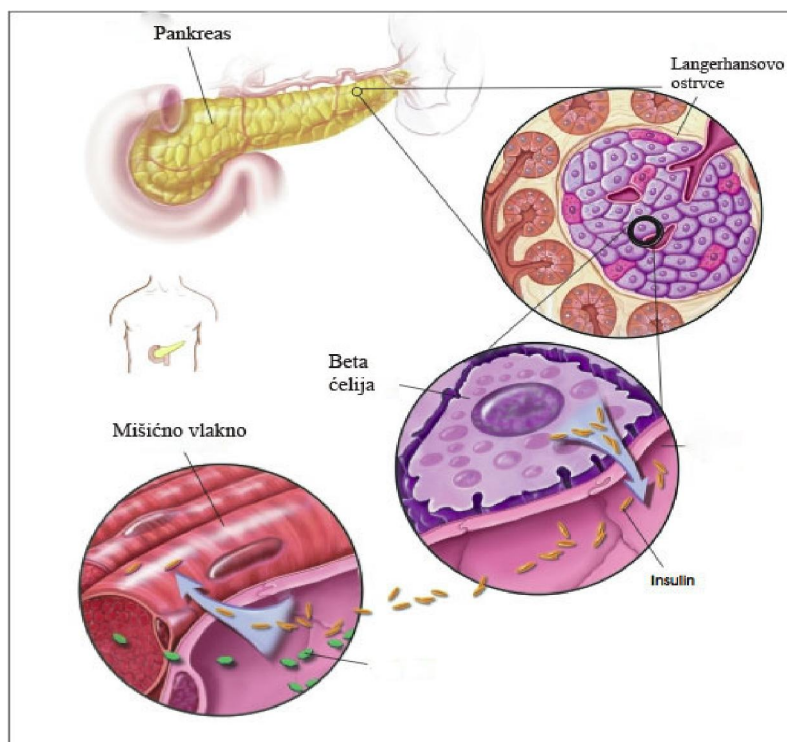
1. Dijabetes melitus tip 1
2. Dijabetes melitus tip 2
3. Malnutricijski dijabetes
4. Gestacijski dijabetes
5. Drugi oblici dijabetesa

Dijabetes melitus tip 1

Insulin zavisni tip dijabetesa ili tip 1 ranije je označavan kao juvenilni tip bolesti. Ova forma dijabetesa prethodno obuhvaćena terminom *insulin zavisni dijabetes* ili *juvenilni dijabetes*, posledica je autoimunske posredovane destrukcije β ćelija pankreasa [3]. Javlja se u detinjstvu, adolescenciji i ranom zrelom dobu. Tip 1 dijabetesa se javlja kod dece koja su starija od 4 godine, obično naglo, sa vrhom incidence nastanka od 11-13 godina, što se poklapa sa pubertetom i ranom adolescencijom [4]. Deca i adolescenti najčešće imaju ketoacidozu kao prvu manifestaciju bolesti. Visoka učestalost javlja se i kod ljudi u kasnim 30-im i ranim 40-im godinama života, i tada se bolest razvija sa blažim simptomima.

Dijabetes tip 1 je katabolički poremećaj u kom je insulin u cirkulaciji vrlo nizak ili odsutan, koncentracija glukagona je povećana, a beta ćelije ne odgovaraju na stimulse za sekreciju insulina. Pacijenti moraju svakodnevno unositi egzogeni insulin, pa se zbog toga ovaj oblik dijabetesa ranije nazivao insulin zavisni dijabetes. Oboleli od dijabetesa tip 1 čine oko 20-25% svih dijabetičara. [5].

Dokazana je i povezanost između sistema HLA antigena i incidence tipa 1 dijabetesa.



Slika 2. Shematski prikaz delovanja insulina

(Preuzeto sa: <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/pages/chapter7.aspx>)

antigena HLA: DR3-DQ2 ili DR4-DQ8, DR gena, koji kodira MHC II proteine glavnog histokompatibilnog kompleksa (Major Histocompatibility Complex) [6].

DR gen se nalazi na hromozomu 6 zajedno sa ostalim genima uključenim u sintezu MHC proteina. Autoimunski napad na beta ćelije je indukovano stranim agensom, npr. virusom, koji imunološki liči na neku od komponenti beta ćelija. MHC II proteini, kodirani ovim alelima, vezuju antigen i stimulišu imunski sistem da otpočne neobično dug i intenzivan napad. Neke od aktiviranih ćelija imunskog sistema dospevaju do pankreasa, gde pokreću napad na beta ćelije, zbog sličnosti stranog antigena i neke od komponenti tih ćelija. Agensi okoline za koje se pretpostavlja da indukuju napad na beta ćelije mogu biti virusi (paramiksovirus, rubeola, koksaki B virus), toksične hemikalije, citotoksini. Kumulativni rizik za dijabetes tip 1 za nosioce DR3/DR4 alela je 5,11%, a za ukupno stanovništvo 1,05% [4].

Dijabetes tip 1 je autoimunsko oboljenje. U pankreasu je primećena infiltracija limfocita i destrukcija beta ćelija Langerhansovih ostravaca, što uzrokuje nedostatak insulina. U cirkulaciji 85% pacijenata obolelih od ovog tipa dijabetesa su primećena antitela na dekarboksilazu glutaminske kiseline beta ćelija pankreasa. Približno 95% obolelih imaju mutiran najmanje jedan od dva alela humanog leukocitnog

Uticaj životnog doba na incidencu dijabetesa tip I je značajan. Tip 1 dijabetesa se retko javlja pre šestog meseca života. Zatim se broj obolelih povećava progresivno (slika 3) a na grafikonu postoje dve pika: manji oko pete i veći oko dvanaeste godine života, u doba puberteta. Posle tridesete godine, pojava dijabetesa tipa 1 je znatno ređa. Incidenca pojavljivanja insulin zavisnog dijabetesa u odnosu na duži vremenski period može biti takođe značajna. Sve do 1940. godine incidenca je bila konstantana (oko 5-6%), a zatim je počeo njen znatan porast u mnogim zemljama pa se incidenca popela i na 20% obolelih na 100.000 stanovnika po godini. Učestalost oboljevanja od tipa 1 šećerne bolesti pokazuje etničke odnosno geografske varijacije, sa najvišom stopom prevalence u skandinavskim zemljama tj. na severu Evrope, a najmanja u južnim delovima Evrope, sa učestalošću manjom od 1% od svih obolelih od dijabetesa [7].

Dijabetes tip1 je povezan sa visokim morbiditetom i ranim mortalitetom, što je rezultat komplikacija bolesti koje mogu dovesti do: srčane ishemije, cerebralne vaskularne bolesti, perifernih vaskularnih bolesti i gangrene na donjim ekstremitetima, hroničnog oboljenja bubrega, redukcije vida, slepila i neuropatije.

Broj bolesnika koji oboljevaju od šećerne bolesti progresivno raste tokom poslednjih decenija, zbog čega ovo oboljenje predstavlja pretnju svetskom zdravlju. Svetska zdravstvena organizacija i Međunarodna federacija za dijabetes (International Diabetes Federation) procenjuju da je 2007. godine u svetu od oba tipa šećerne bolesti bolovalo 246 miliona ljudi, a da će se broj obolelih do 2025. povećati na 380 miliona [8]. Mada se najviša incidenca registruje u razvijenim zemljama, najveći porast broja obolelih se očekuje u zemljama u razvoju.

Prema istim izvorima u Republici Srbiji od dijabetesa boluje približno 500.000 osoba ili 6,7% populacije. Prema Američkom centru za kontrolu i prevenciju bolesti u SAD od dijabetesa trenutno boluje 20,8 miliona osob, što iznosi 7% ukupnog stanovništva. Smatra se takođe da će ova bolest postati jedan od vodećih uzroka morbiditeta i mortaliteta u narednih 25 godina [9].

Komplikacije dijabetesa

Dijabetes je hronična bolest sa mnogobrojnim komplikacijama koje se mogu podeliti na akutne i hronične.

Akutne komplikacije

Dijabetesna ketoacidoza (DKA): težak metabolički poremećaj koji označava krajnje neregulisani dijabetes praćen (apsolutnim i/ili relativnim) nedostatkom insulina. Najveći broj pacijenata sa DKA ima tip 1 dijabetesa. Međutim, i pacijenti sa tipom 2 dijabetesa takođe su u riziku za dobijanje DKA zbog kataboličkog stresa u akutnim bolestima. DKA je češća kod odraslih nego kod dece. Smatra se da je stopa mortaliteta 2–5%. Ovakvim hormonskim disbalansom narušava se ravnoteža između anaboličkih i kataboličkih procesa.

Hiperglikemijska, hiperosmolarna, neketonska koma: značajna karakteristika ovog stanja je hiperglikemija bez acidoze, dehidracija sa prerenalnom uremijom, depresija funkcije nervnog sistema, češći i teži poremećaji svesti nego u toku DKA, pretežno se javlja kod starih ljudi i kod DM tip 2. Karakteriše se izuzetno visokim vrednostima glikemije, najčešće većim od 33,3 mmol/L (po nekim autorima i preko 40 mmol/L), povećanom osmolarnošću plazme, normalnim acidobaznim stanjem. Incidencija je skoro desetostruko manja u odnosu na ketoacidozu, ali je mortalitet visok (30-60%).

Laktična acidoza: metabolička acidoza koju karakteriše povećano stvaranje laktata i smanjenje pH arterijske krvi. Stopa smrtnosti je vrlo visoka, čak 70-80%.

Hipoglikemije: uzroci i predisponirajući faktori za pojavu hipoglikemije - disbalans između utroška glukoze (propušten obrok) i njenog korišćenja (intenzivan fizički napor), relativni višak insulina (egzogenog), povećanje stimulacije sekrecije (endogenog) insulina (preparati sulfonilureje), promena farmakodinamskih dejstva insulina zbog promene vrste insulina (humani vs. svinjski), prečišćenosti preparata insulina, promena anatomskog mesta aplikacije insulina, promena insulinske senzitivnosti, gubitak telesne težine, hipokalorijska

dijeta, uklanjanje insulin-kontra regulatornih efekata (prekid terapije steroidnim hormonima), ozbiljno oštećenje jetre, anoreksija, unos alkohola.

Hronične komplikacije

Hronične komplikacije dijabetesa su dobile naziv po svom toku koji je hroničan i progresivan. Javljaju se posle više godina trajanja dijabetesa posebno kod bolesnika sa lošom metaboličkom kontrolom. Hronične komplikacije su podeljene na:

Makrovaskularne komplikacije koje se odnose na velike krvne sudove i predstavljaju agresivniju formu ateroskleroze. One dovode do povećane učestalosti infarkta miokarda, bolesti krvnih sudova centralnog nervnog sistema (šlog) i gangrene stopala kod dijabetičara. U nastanku ateroskleroze značajnu ulogu igraju abnormalnosti u zidu krvnog suda, trombocitima, eritrocitima i metabolizmu lipida.

Mikrovaskularne komplikacije koje zahvataju najmanje krvne sudove, kapilare i pre kapilarne arteriole i glavna manifestacija im je zadebljanje kapilarne bazalne membrane. Mikroangiopatije obuhvataju morfološke promene na sitnim krvnim sudovima retine, glomerula bubrega, stopala i mišića. Postoje sledeći oblici mikroangiopatija: retinopatija, neuropatija i nefropatija.

Retinopatija se javlja kod osoba koje su imale dijabetes najmanje 5 godina. Obuhvata sledeće promene: mikroaneurizme, povećanje propustljivosti zida i suženje lumena kapilara, proliferaciju novih krvnih sudova praćenu proliferacijom fibroznog tkiva u retini. Ove promene su obimne, i konačno dovode do slepila.

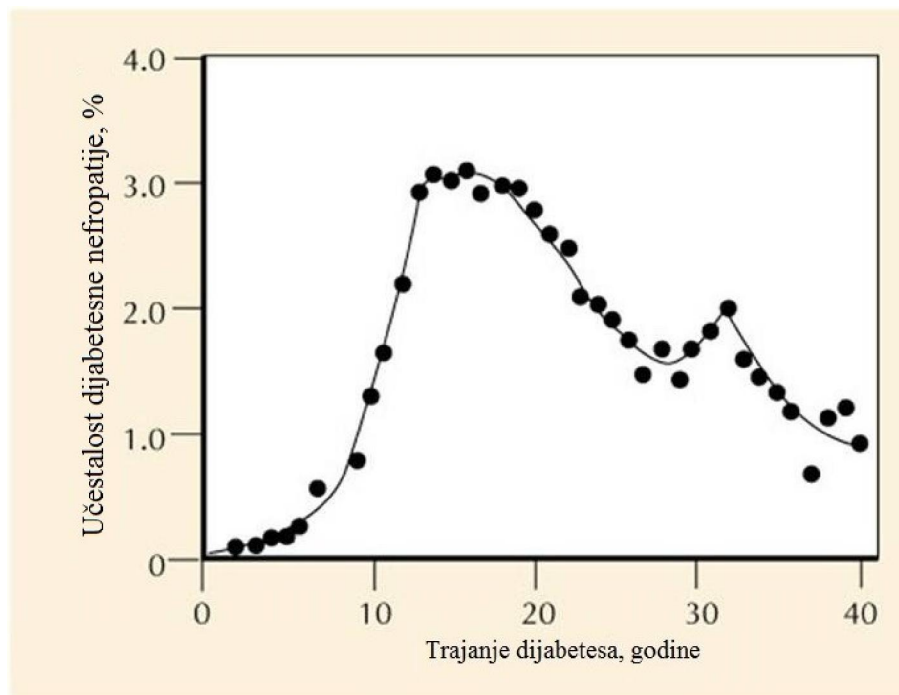
Dijabetes je najčešći uzrok slepila u odraslih osoba, sa učestalošću od preko 50 na 100000 dijabetičara godišnje [8]. Hipertenzija može ubrzati nastanak i progresiju retinopatije. Postoje dva osnovna stadijuma razvoja dijabetesne retinopatije, neproliferativna i proliferativna.

Neuropatija je takođe posledica oboljenja malih krvnih sudova, pri čemu je ograničen dotok krvi u nerve što dovodi do njihovog oštećenja i degeneracije. Može dovesti do gubitka senzitivnosti, ulceracija, gangrena i drugih poremećaja.

Učestalost komplikacija zavisi od brojnih faktora. Slepilo se javlja u oba tipa dijabetesa, kao i dijabetesna nefropatija [4]. Bubrežna insuficijencija je glavni uzrok smrti kod pacijenata sa dijabetesom tip 1, a makrovaskularna kod pacijenata sa tipom 2.

Dijabetesna nefropatija

Dijabetesna nefropatija je jedna od najvažnijih hroničnih komplikacija dijabetesa. Razvija se kod jedne trećine pacijenata sa insulin-zavisnim i u 15 do 60% pacijenata sa insulin-nezavisnim dijabetesom [10]. Dijabetesna nefropatija je klinički sindrom koji se karakteriše postojanom albuminurijom, povećanim arterijskom pritiskom, smanjenjem glomerulske filtracije i povećanim rizikom od kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta [11]. Rana pojava mikroalbuminurije ukazuje na sklonost prema razvoju dijabetesne nefropatije. Raniji podaci ukazuju da se veliki značaj u razvoju nefropatije pridavao genetičkim faktorima sa jedne strane i tipu dijabetesa sa druge. Interakcija između loše glikoregulacije i genetičkih faktora može da dovede do razvoja mikrovaskularnih komplikacija dijabetesa [12]. U poslednje vreme veliki značaj se pridaje faktorima rizika za razvoj kardiovaskularnih komplikacija i hipertenzije. Veliki je broj faktora rizika koji dovode do početka i progresije dijabetesne nefropatije uključujući genetičku predispoziciju, poremećaj glikoregulacije, druge metaboličke poremećaje, hipertenziju, promene u sistemske i renalnoj hemodinamici, različite citokine i faktore rasta [13]. Početak dijabetesne nefropatije i progresija oboljenja zavise od prisutnih faktora rizika i glikoregulacije.



Slika 3. Grafički prikaz progresije dijabetesne nefropatije u tipa I dijabetesa
(Preuzeto sa: <http://www.technokraftsolutions.com>)

Incipijentna nefropatija, kao početna faza razvoja nefropatije se manifestuje povećanom ekskrecijom albumina. Kako razvoj nefropatije napreduje dolazi do sve veće akumulacije toksičnih produkata u krvi tako da terminalni stadijum bolesti zahteva primenu dijalize i eventualnu transplantaciju bubrega.

Stadijumi razvoja dijabetesne nefropatije

Uobičajeno je da se razvoj dijabetesne nefropatije klasifikuje u tri stadijuma:

1. Stadijum incipijentne nefropatije se deli na tri faze:
 - inicijalna hiperfiltracija,
 - tzv. nemi stadijum,
 - incipijentna nefropatija
2. Stadijum manifestne nefropatije
3. Stadijum hronične bubrežne insuficijencije.

Kod osoba sa genetičkom predispozicijom za razvoj nefropatije se dosta dugo, čak godinama, razvijaju diskretne promene koje su u početku vidljive samo elektronskim, a zatim i svetlosnim mikroskopom, a koje nisu praćene nekim kliničkim simptomima. Taj period se obično naziva ranom fazom i obuhvata prva tri stadijuma. Prve promene se mogu otkriti posebnim ispitivanjem, pre svega određivanjem GFR-a i merenjem albuminurije.

Rana faza dijabetesne nefropatije

Za ovu fazu su karakteristične promene u glomerulskoj filtraciji-GFR, a potom pojava mikroalbuminurije.

Stadijum incipijentne nefropatije: karakteriše je povećana glomerulska filtracija (Glomerular Filtration Rate - GFR). Ovo povećanje glomerulske filtracije se javlja u oko 25% bolesnika, češće kod onih sa stalnom hiperglikemijom [3]. U ovoj fazi nefropatije povećan je protok krvi kroz bubreg (Renal Plasma Flow – RPF) što dovodi do uvećanja bubrega. Rana faza razvoja nefropatije uključuje inicijalnu hiperfiltraciju, nemi stadijum i incipijentnu nefropatiju. Prva dva stadijuma traju različito, u proseku 5-10 godina i u tipu 1 dijabetesa nisu praćeni izraženim kliničkim znacima "nemi stadijum". Promene koje karakterišu ovu fazu nefropatije su reverzibilne. Pojava malih molekula albumina u urinu predstavlja jedan od najranijih nalaza u razvoju dijabetesne nefropatije. Perzistentna mikroalbuminurija (30-300 mg/24h) je pouzdan znak incipijentne nefropatije. I kod zdravih osoba i kod dijabetičara ekskrecija proteina je veća preko dana za 25% u odnosu na noć, a varijacije u albuminuriji od dana do dana mogu biti i do 40%. Iz tih razloga se mikroalbuminurija mora određivati tri puta u toku 6 meseci.

Brojne studije su pokazale da je mikroalbuminurija veoma važan prognostički znak za budući razvoj klinički manifestnog oblika nefropatije. Takođe je pokazano da su histološke promene kod bolesnika sa perzistentnom mikroalbuminurijom ozbiljnije. Obzirom da je perzistentna mikroalbuminurija u prvih pet godina trajanja dijabetesa retka, ona tada ne može poslužiti kao prognostički znak, ali kasnije se može smatrati pouzdanim

znakom razvoja klinički manifestne dijabetesne nefropatije . Nije definitivno utvrđeno da li pojava mikroalbuminurije posle teže fizičkog napora ima nekakav značaj za budući razvoj nefropatije.

Stadijum manifestne dijabetesne nefropatije: smatra se da je došlo do druge faze razvoja nefropatije, koja se naziva i faza klinički manifestne nefropatije, kada se ustanovi perzistentna mikroalbuminurija veća od 300mg na 24 h, odnosno kada je ekskrecija albumina veća od 200 µg/min.

Kod bolesnika kod kojih se razvija perzistentna proteinurija dolazi do progresivnog pada GFR sve do razvoja terminalne bubrežne insuficijencije. Pad GFR je linearan, progresivan, ali se kod svih bolesnika ne odigrava jednako brzo i za sada nije poznato šta utiče na tu progresiju. Razlog može biti veza između progresije dijabetesne nefropatije (DNF) i loše metaboličke kontrole dijabetesa. Takođe je utvrđeno da postoji korelacija između progresije nefropatije i dijastolnog pritiska. Na ovome se između ostalog i zasniva pokušaj prevencije brze progresije nefropatije kod bolesnika sa hipertenzijom tako što se aktivno uključuje antihipertenzivna terapija. Samo oko 25% dijabetičara sa perzistentnom proteinurijom ima pritisak u granicama normale, ali i tada obično postoji lagan porast od trenutka kada se konstatuje prelaz iz mikroalbuminurije u fazu perzistentne proteinurije. Obično u daljoj progresiji nefropatije ka terminalnoj bubrežnoj insuficijenciji svi bolesnici postaju hipertonični.

Brzina progresije manifestne nefropatije ka terminalnoj bubrežnoj insuficijenciji je danas mnogo manja zahvaljujući antihipertenzivnoj terapiji i boljoj metaboličkoj kontroli dijabetesa. Ranije je obično posle oko 7 godina od manifestne proteinurije dolazilo do terminalne bubrežne insuficijencije, dok je danas taj period barem dvostruko duži.

U fazi manifestne nefropatije kod većine dijabetičara se ispoljavaju i druge komplikacije. Tako je pokazano da praktično svi pacijenti sa tipom 1 dijabetesa sa nefropatijom imaju i retinopatiju. Zbog toga, ako neki dijabetičar ima perzistentnu proteinuriju a nema retinopatiju, moramo razmotriti mogućnost da postoji neki drugi uzrok lezije bubrega, odnosno da se ne radi o dijabetesnoj nefropatiji. Potrebno je naglasiti i to da

bolesnici sa retinopatijom, pa čak ni oni sa proliferativnom retinopatijom, ne moraju imati i nefropatiju [2].

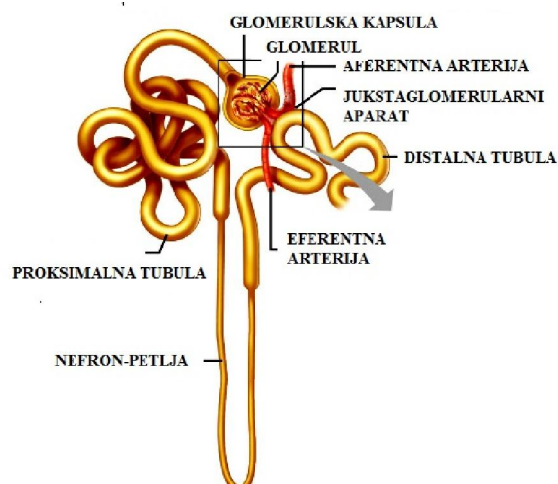
Stadijum terminalne bubrežne insuficijencije kod dijabetičara, karakteriše dalje oštećenje glomerula. GFR se progresivno smanjuje zbog čega dolazi do povećanja koncentracije štetnih produkata metabolizma u krvi i na kraju pojave azotemije [14]. Skoro svi pacijenti u ovom stadijumu imaju hipertenziju koja doprinosi daljem ubrzanom razvoju DNF. U terminalnom stadijumu GFR opada na 10ml/min zbog čega je potrebno započeti sa hemodijalizom ili peritonealnom dijalizom.

Kod većine dijabetičara sa terminalnom fazom renalne bolesti postoje teška oštećenja krvnih sudova. Ona su posledica delovanja više faktora kao što su: arterijska hipertenzija, lipidni poremećaji, uremija. Posledice svega ovoga su visoki rizik za razvoj infarkta, cerebralnih tromboza i krvarenja, ali i perifernih vaskularnih lezija sa razvojem gangrene, što kasnije zahteva amputaciju. Pokazatelj početne nefropatije je nivo albumina u urinu < 30 mg dnevno. U periodu mikroalbuminurije, hiperglikemija i povišen arterijski pritisak su dominantni faktori rizika za dalju progresiju bolesti.

Patofiziologija smanjenja glomerulske filtracije

Glomerulska filtracija (GFR) je snižena kod bolesnika sa manifestnom nefropatijom. U toku razvoja dijabetesne nefropatije posle značajnog porasta GFR koji se konstatuje kod novootkrivenih dijabetičara dolazi do umerenog pada, ali se on zadržava još dugi niz godina na nešto višim vrednostima iznad normale. Posle uspostavljanja perzistentne mikroalbuminurije (obično posle desetak godina) GFR je još uvek povišen, ali kada dođe do uspostavljanja makroproteinurije, obično posle 15 i više godina trajanja dijabetesa, dolazi i do smanjenja GFR i to skoro linearno i brzo sve do ispoljavanja terminalne bubrežne insuficijencije. Jačina glomerulske filtracije (JGF) je široko prihvaćena kao najbolji pokazatelj funkcije bubrega [15].

Kasni stadijumi razvoja dijabetesne nefropatije su udruženi sa progresivnom mezangijalnom ekspanzijom i kapilarnim okluzijama. Na taj način se smanjuje površina preko koje se vrši filtracija, što kasnije dovodi do pada GFR. Smatra se da je u vreme nastajanja manifestne dijabetesne nefropatije, glomerulski filter na maksimalnom ili približno maksimalnom kapacitetu. U prilog toj činjenici ide i podatak da davanje proteina kod ovih bolesnika ne dovodi do povećanja GFR kao kod zdravih osoba. Ovde se zapravo radi o gubitku renalne funkcione rezerve, sto se može smatrati uzrokom dalje progresije renalnog oštećenja. Ipak mora se imati u vidu da to nije potpuni gubitak renalne rezerve, jer na primer davanje glukoze kod ovih bolesnika može da dovede do porasta GFR za oko



Slika 4. Glomerul (shema)
(Preuzeto sa http://www.scoopweb.com/Loop_of_Henle)

20 mL/min, povećava se filtracija IgG u odnosu na filtraciju albumina koji su pre takvog stanja bili najviše filtrirani. Novija ispitivanja su pokazala da u krajnjim stadijumima nefropatije proteinurija nastaje kao posledica defekta u glomerulskoj membrani koja bi inače, morala da bude nepropustljiva za molekule određene veličine. Na osnovu nalaza profiltriranih neutralnih molekula prečnika oko 4,6 nm najverovatnije se radi o takvom defektu bazalnih membrana koje odgovaraju uspostavljanju šantova u samom kapilarnom

50%. Ovo se objašnjava delovanjem glukoze na produkciju prostaglandina. Međutim, ovo ne znači da se hiperglikemijom može u podmaklim stadijumima nefropatije održati bolja renalna funkcija. Pokazalo se da u takvim stanjima obaranje hiperglikemije nije praćeno promenama u renalnoj insuficijenciji, odnosno nije bilo efekta na dalju progresiju bolesti.

Sa progresijom nefropatije nastaju promene u tipu proteinurije od visoko selektivne ka nisko selektivnom tipu proteinurije. Kada se GFR smanji na 10-

zidu. Zapravo u bazalnim membranama se uvećava broj inače normalno prisutnih ali u malom broju, takozvanih neselektivnih pora, neselektivnih za veličinu čestica koje mogu da prolaze kroz membranu. Međutim, sigurno je da i u ovom stadijumu postoji defekt u kontroli filtracije molekula u zavisnosti od njihovog naelektrisanja kao što je to bilo u samom početku razvoja nefropatije, kao i ranije opisani hemodinamski poremećaji. Osim toga i u poodmaklim i krajnjim stadijumima dijabetesne nefropatije utvrđeno je sniženje sijalinskih komponenti u glomerulskoj barijeri, kao i smanjenje sinteze heparan sulfata u glomerulskim bazalnim membranama, koji je veoma važan za održavanje negativnog naelektrisanja glomerulskog zida.

Sa progresijom nefropatije proteinurija nije samo glomerulska nego i tubularna. Snižavanjem GFR na oko 40 mL/min ili manje, značajno raste ekskrecija beta 2 mikroglobulina što bi moglo da predstavlja znak tubularnog oštećenja, ali bi moglo da bude i posledica zasićenja kapaciteta za reapsorpciju beta 2 mikroglobulina u proksimalnim tubulima.

U stanju poodmakle dijabetesne nefropatije uz sve pomenute promene se javlja poremećaj u lipidima, tako da se može utvrditi povećanje koncentracije holesterola, LDL holesterola kao i triglicerida, dok je nivo HDL holesterola snižen [14]. Ove promene bi mogle da pogoršaju razvoj sklerotičnih promena u glomerulima. To znači da bi bilo veoma važno da se ovi poremećaji leče čim se konstatuju.

Histopatološke promene kod dijabetesne nefropatije

Dijabetesna nefropatija je mikrovaskularna komplikacija dijabetesa koja se odlikuje zadebljanjem bazalne membrane glomerula, mada zadebljanje bazalne membrane takođe može postojati i u malim prekapilarnim arteriolama, postkapilarnim venulama kao i u avaskularnim strukturama (bubrežnim tubulima). Promene u strukturi bazalne membrane su posledica nagomilavanja hijalinskog materijala koji može da bude difuzno raspoređen i da da homogeno zadebljanje bazalne membrane ili kao višeslojno, laminarno zadebljanje. Novije studije ukazuju na to da je sinteza materijala bazalne membrane povećana, a

degradacija smanjena. Povećana je sinteza kolagena tipa IV i laminina, a smanjena sinteza proteoglikana. Kolagen tipa VI je najviše zastupljen i u bazalnim membranama glomerula čini oko 98% suve supstance. On obezbeđuje strukturnu stabilnost i selektivnu propustljivost čestica određene veličine. U obolelih od dijabetesa povećava se njegova količina u bazalnim membranama. Laminin određuje adhezivnost endotelnih ćelija i podocita za bazalnu membranu i propustljivost čestica u zavisnosti od naelektrisanja. On je u povećanoj količini nađen kod dijabetičara i to kako u bazalnoj membrani glomerula tako i u tubulima i mezangijumu, ali kada se razvije poodmakla nefropatija i glomeruloskleroza, on se smanjuje. Fibronektin takođe određuje adhezivnost ćelija i propustljivost ćelija u zavisnosti od naelektrisanja, a izgleda da je povećan u ranim fazama nefropatije u mezangijumu, a ne u bazalnim membranama. Heparan sulfat je proteoglikan koji određuje propustljivost čestica u zavisnosti od naelektrisanja i smanjuje umnožavanje ćelija mezangijuma. On je u obolelih od dijabetesa snižen i to u zavisnosti od hiperglikemije čak i za 70% [16].

Na ovaj način nastaje visokoselektivna proteinurija, pa se povećava ekskrecija samo elektronegativnih albumina, ali ne i elektronegativnih proteina veće molekulske mase [17]. Promene u arterijama i arteriolama imaju za posledicu različite stepene skleroze, što znatno doprinosi bubrežnoj insuficijenciji. Međutim, najuočljivija i najznačajnija promena u dijabetesnoj nefropatiji je mikroangiopatija. Glomerularne promene u dijabetesu podrazumevaju difuznu glomerulosklozu, nodularnu glomerulosklozu i eksudativne lezije.

Difuzna glomeruloskleroza je najčešća glomerularna promena koja se viđa kod dijabetičara. Smatra se da postoji u oko 75% pacijenata sa nefropatijom. Lezije se karakterišu difuznim zadebljanjem glomerularne bazalne membrane, kao i difuznim povećanjem mezangijalnog matriksa. Napredovanjem procesa mogu biti zahvaćeni čitavi glomeruli. Mezangijalni matriks, koji je proširen, može pokazivati krupne, acelularne, eozinofilne nodule koji se nalaze unutar centra glomerularnih lobulusa, dajući tako lezije koje se nazivaju nodularna glomeruloskleroza.

Nodularna glomeruloskleroza je lezija patognomonična za dijabetes i nalazi se u 40-50% pacijenata sa dijabetesnom nefropatijom, a udružena je sa difuznom glomerulosklerozom. Nodusi obojeni srebrom pokazuju karakterističnu koncentričnu laminaciju na periferiji, dok krupni nodusi u centru pokazuju strukturu kolagena. U jednom nodusu može biti i više nodularnih lezija. Mada je nodularna lezija najspecifičniji indikator dijabetesne nefropatije, ona nije u korelaciji sa težinom kliničke slike i bubrežne bolesti, ali je zato difuzna glomeruloskleroza najbolji pokazatelj rasprostranjenosti i težine bubrežnog oštećenja. Nodularne lezije mogu se naći u slučajevima gde je očuvana funkcija bubrega, a ne mora ih biti kod pacijenata sa uznapredovalom glomerulosklerozom i znatnim oštećenjem bubrežne funkcije.

Eksudativne lezije se takođe mogu naći u glomerulima pacijenata sa dijabetesnom nefropatijom. One su predstavljene kao homogene, eozinofilne strukture koje leže između bazalnih lamina na periferiji glomerularnih lobulosa. Vaskularni prostor je u predelu eksudativne lezije tipično obliterated, dok lezija ima karakterističan hijalini izgled, ali pošto može da sadrži i lipide lezija pokazuje i penušav izgled. Ove lezije su PAS-pozitivne i potpuno acelularne, mogu da se jave u obliku fibrinske kape ili kapsularne kaplje u zavisnosti od položaja u kome se nalaze. U novijoj literaturi ova promena se često naziva i hijalino-fibrinoidna i za nju je karakteristično da se može javiti i kod pacijenata koji nemaju dijabetes, ali samo u slučajevima teško oštećene bubrežne funkcije

Etiopatogeneza dijabetesne nefropatije

Prva saznanja o lezijama na malim krvnim sudovima u obolelih od dijabetesa potiču od patologa Kimelstila (Kimmelstiel) i Vilsona (Wilson) koji su još 1936. godine prvi opisali posebne promene u građi kapilara glomerula kod dijabetičara. Mikroangiopatske komplikacije su u obolelih od dijabetesa veoma čest uzrok težeg invaliditeta i bitno utiču na dužinu života dijabetičara.

Elektronskim mikroskopom je utvrđeno da se glavne promene u obolelih od dijabetesa dešavaju na kapilarima bazalnih membrana. Promene se odvijaju na svim malim krvnim sudovima, ali su najkarakterističnije one na retini (dijabetesna retinopatija),

bubrezima (dijabetesna nefropatija), perifernim nervima (dijabetesna polineuropatija) i kapilarima skeletnih mišića.

Danas se veruje da su promene na malim krvnim sudovima posledica sadejstva više faktora i mehanizama. Genetička predispozicija, hiperglikemija, hemodinamske promene (povećan protok) i hipertenzija su verovatno udruženi činioci koji dovode do oštećenja malih krvnih sudova.

Hiperglikemija i dijabetes

Brojna ispitivanja su se bavila mehanizmima uticaja poremećene glikoregulacije na razvoj oštećenja bubrežne strukture i funkcije u pacijenata sa dijabetesom. Hiperglikemija ima nesumnjiv značaj u razvoju dijabetesne nefropatije, kao i ostalih mikrovaskularnih komplikacija. Ona je neophodan ali ne i dovoljan uslov za razvoj nefropatije. Da je to tako postoje brojni dokazi, a pre svega u prilog tome je zapažanje da ne razvijaju svi dijabetičari nefropatiju, kao i da je brzina razvoja dijabetesne nefropatije i vreme potrebno da se ispolji manifestna nefropatija različito od bolesnika do bolesnika. Tako na primer nisu mogle biti utvrđene značajne razlike u nivou HbA1c kada je bila upoređena grupa pacijenata sa manifestnom nefropatijom i onih koji više od 40 godina boluju od dijabetesa ali nemaju nefropatiju, što je pokazalo da moraju postojati dodatni faktori koji su bitni za razvoj nefropatije. U tom smislu, što je već pomenuto, neophodno je postojanje sklonosti za razvoj nefropatije i da je ona najverovatnije pod genetičkom kontrolom. Samo u onih pacijenata kod kojih je genetički determinisano prisustvo takvih izoenzima N-deacetilaze (koja učestvuje u metabolizmu heparan-sulfata i u održavanju normalne funkcije bazalne membrane i mezangijuma) koji su osetljivi na prisustvo hiperglikemije i inhibirani visokim nivoom glikemije, ispoljiće se kritično smanjenje količine heparan-sulfata u bubregu koje je karakteristično za dijabetesnu nefropatiju.

Podaci dobijeni tokom brojnih istraživanja su pokazali da postoji značajan uticaj hiperglikemije na razvoj mikroangiopatskih promena, uključujući i nefropatiju. Na osnovu epidemioloških i kliničkih ispitivanja, svi dijabetičari se mogu prema reakciji na

hiperglikemiju i njihov ishod podeliti u tri grupe. U prvoj grupi je oko 5% dijabetičara koji bez obzira na dobru metaboličku kontrolu dijabetesa, veoma brzo razvijaju mikrovaskularne komplikacije. Drugu grupu čini oko 20% bolesnika koji veoma dobro podnose hiperglikemiju u dužem periodu i ne razvijaju komplikacije. Treću grupu čini većina bolesnika (oko 75%) koji pokazuju različit stepen osetljivosti prema hiperglikemiji, ali se ipak može reći da se u uslovima duže loše metaboličke kontrole, brže razvijaju komplikacije [20,21]. Na osnovu nekih ranijih iskustava i multicentrične DCCT studije, pokazano je da je kod bolesnika iz ove grupe moguće u uslovima održavanja glikemije u skoro normalnim vrednostima tokom više godina, kao i regulisanja arterijskog pritiska, uspešno prevenirati pojavu mikrovaskularnih komplikacija. Osim toga, pokazano je da, ako su one već postojale, dobra metabolička kontrola može usporiti njihovu progresiju, pa čak kod početnih stadijuma i dovesti do regresije nekih promena.

Mehanizmi kojim hiperglikemija oštećuje krvne sudove su različiti:

Neenzimska glikozilacija proteina

Prvi mehanizam kojim hiperglikemija može biti od značaja za razvoj vaskularnih komplikacija kod dijabetičara je pojava neenzimske glikozilacije proteina. Ona se dešava u uslovima dugotrajne hiperglikemije i može da utiče na razvoj komplikacija, jer se tako može menjati prostorna organizacija proteina, kako onih u ćelijama i bazalnim membranama, tako i onih u cirkulaciji, zbog čega je poremećena njihova funkcija. Tako na primer, glikoziranje hemoglobina u eritrocitima povećava njegov afinitet prema kiseoniku, pa ga zato on teže otpušta u perifernim tkivima, zbog čega se ispoljava tkivna hipoksija. Pored toga, glikoziranje proteina u membranama eritrocita čini te eritrocite manje elastičnim, zbog čega oni teže prolaze kroz male, a još teže kroz sužene krvne sudove. Povećava se sklonost da se adheriraju i da prave agregate, pa time tkivna hipoksija postaje još teža.

Povećano glikoziliranje proteina može imati za posledicu povećano nagomilavanje glikoziliranih produkata sličnih proteinima kako u bazalnoj membrani glomerula tako i u

mezangijumu. Sve ovo može biti od značaja za mezangijalnu ekspanziju i razvoj glomerulskih okluzija što pospešuje razvoj dijabetesne nefropatije [22].

Stimulacija sinteze proteina

Drugi način uticaja hiperglikemije na razvoj mikroangiopatije je njen uticaj na stimulaciju sinteze nekih proteina krvi, naročito glikoproteina, kao što je fibrinogen. Sličan efekat ima i na neke proteine u bazalnim membranama, kao što je to na primer kolagen IV, što ima za posledicu povećanje njegovog sadržaja u bazalnim mebranama kapilara, zbog čega one postaju popustljivije [23]. Hiperglikemija može da smanjuje nivo nekih proteina. Tako na primer, smanjuje nivo heparan sulfata, proteoglikana koji normalno sprečava proliferaciju ćelija mezangijuma. Zato u uslovima duže hiperglikemije dolazi u srazmeri sa hiperglikemijom do takvog pada ove materije da je proliferacija ćelija mezangijuma jako ubrzana. Istovremeno je povećana propustljivost kapilara.

Glikozna toksičnost

Glikoza sama po sebi može imati toksične efekte na ćelije. Kultura ljudskih endotelnih ćelija koja je hronično izložena visokim koncentracijama glukoze pokazuje značajne poremećaje u ćelijskom funkcionisanju, koje se ne mogu pripisati promenjenoj aktivnosti poliolnog puta. Visoki nivo glikoze remeti ćelijski ciklus i njihovu proliferaciju i vode ka povećanoj sintezi kolagena, fibronektina i laminina, što delimično može objasniti ekspanziju ekstracelularnog matriksa [24]. Mezangijalne ćelije podvrgnute povećanim koncentracijama glikoze sintetišu manje heparan sulfata i ovo teoretski može doprineti redukciji preostalog elektronegativnog naelektrisanja na baznoj membrani, što normalno ograničava transkapilarni fluks cirkulišućih albumina. Ovakve promene na samoj bazalnoj membrani bi moglo da podstaknu povećanje proteinurije. Štaviše u mezangijalnim ćelijama visoki nivo glikoze indukuju transkripciju i sekreciju TGF- β koji stimuliše sintezu matriksa, a inhibira njenu degradaciju.

Ipak se i pored svega sa sigurnošću ne može reći koliki je značaj direktnog toksičnog delovanja glikoze na endotel ćelija, ali je sigurno da ona uzrokuje poremećaje u funkcionisanju endotelnih ćelija, što je od značaja za ispoljavanje većeg rizika za kardiovaskularne bolesti koje se inače veoma često javljaju kod dijabetičara sa nefropatijom. Među tim poremećajima u funkcionisanju endotelnih ćelija kod dijabetičara je pokazana povećana koncentracija von Willenbrand-ovog faktora i trombomodulina (proteina, koji se sintetišu u endotelnim ćelijama i čije oslobađanje može da odslikava oštećenja endotela) i smanjeno oslobađanje tkivnog plazminogen aktivatora u odgovoru na fizičku aktivnost koje je nađeno i pre ispoljavanja manifestne nefropatije [25,26].

Poliolski put

U uslovima nedostatka insulina u nekim tkivima koja imaju enzim aldozo reduktazu, glikoza se metaboliše poliolskim putem. Glikoza se može ovako koristiti i bez posredovanja insulina, redukovanjem do sorbitola koji se nakuplja u tim ćelijama sa istovremenim smanjenjem mioinozitola. Prekomerna aktivnost poliolskog puta i nagomilavanje sorbitola može da dovede do oštećenja tkiva izazivajući poremećaje u osmotskoj regulaciji. Hronična hiperglikemija može dovesti do akumulacije sorbitola u različitim tkivima. U bubrezima se enzim aldozo-reduktaza nalazi u papilama, glomerulskim epitelijalnim ćelijama, ćelijama distalnih tubula i mezangijalnim ćelijama. Povećano stvaranje sorbitola kao organskog, omotski aktivnog jedinjenja u bubrezima je odgovor na visok salinitet u medularnom intersticijumu, čime se prevenira osmotski stres [27]. Međutim u dijabetesu bi povećano metabolisanje glukoze poliolskim putem i smanjenje nivoa mioinozitola moglo da bude od značaja za razvoj nefropatije, zbog poremećaja u ćeliskoj osmoregulaciji. Sorbinil može takođe da ima vazokonstriktivni efekat, smanjuje sintezu renalnih prostaglandina i tako može da modifikuje renalnu hemodinamiku nezavisno od poliolskog puta.

U eksperimentima na pacovima kod kojih je indukovan dijabetes je pokazano da se u glomerulima povećava metabolisanje glukoze poliolskim putem sa nagomilavanjem sorbitola, gubitkom mioinozitola i redukovanjem aktivnosti Na/k ATP-aze. Ovo se može blokirati primenom inhibitora enzima aldozo-reduktaze poznatim pod imenom Sorbinil.

Nekoliko studija je pokazalo da inhibitori ovog enzima mogu da redukuju inače povećan GFR i ekskreciju albumina kod bolesnika sa dijabetesom tip 1, ali nisu potvrđeni efekti na mikroalbuminuriju u tipu 2 dijabetesa [28].

Hipertenzija i dijabetes

Arterijska hipertenzija je dosta česta u obolelih od dijabetesa, bez obzira na njegov tip. Procenjuje se da je oko dva puta češća u dijabetičara nego u nedijabetičara. Ona je češća u insulin zavisnom tipu dijabetesa nego u insulin nezavisnom dijabetesu, a u istim godinama starosti bolesnika. Učestalost hipertenzije sa povećava sa godinama starosti. Udruženost pojave hipertenzije i dijabetesa ima uticaj na ubrzan proces razvoja mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija, a pre svega ishemijske bolesti srca i cerebrovaskularnog insulta. Osim toga i mortalitet je četiri puta veći kod dijabetičara sa hipertenzijom (većom od 160 mmHg) nego u dijabetičara bez hipertenzije. Takođe se procenjuje da je 35% - 75% dijabetesnih komplikacija nastalo zbog udružene hipertenzije sa dijabetesom [29].

Uzroci pojave hipertenzije kod dijabetičara mogu biti različiti, kao i mehanizmi koji do nje dovode. Iz tih razloga je jako vazno da se upoznaju mehanizmi koji dovode do hipertenzije u toku trajanja dijabetesa. Oni zavise od tipa dijabetesa, ali i od drugih komplikacija ove bolesti, pre svega od toga da li postoji ili ne nefropatija. Zapravo, posle 15 godina trajanja dijabetesa jedan od troje bolesnika sa tipom 1 dijabetesa imaće nefropatiju kao uzrok hipertenzije. Hipertenzija udružena sa nefropatijom odgovara nefrogenoj hipertenziji, sa retencijom soli i tečnosti, povećanom perifernom rezistencijom i povećanim kardijalnim otporom.

Izolovana sistolna hipertenzija se javlja mnogo češće među dijabetičarima nego među nedijabetičarima. Sa druge strane postoje neka ispitivanja koja su pokazala da se granična dijastolna hipertenzija može konstatovati u vreme kada se javi mikroalbuminurija, kao znak početne nefropatije.

Takođe je važno istaći da dijabetičari sa hipertenzijom, češće imaju i renalna oštećenja, ali i udružene druge faktore rizika za arteriosklerozu.

Sve ovo ukazuje da pravovremeno dijagnostikovanje hipertenzije u obolelih od dijabetesa i njeno energično lečenje predstavlja način da se smanji rizik od ispoljavanja makrovaskularnih komplikacija kao što su ishemijska bolest srca i moždani udar.

Prema kriterijumima Svetske Zdravstvene Organizacije (WHO) hipertenzija se definiše kao arterijski pritisak koji prelazi 160/95mmHg, ali su kao granične ipak uzete vrednosti od 140/90mmHg. Pošto hipertenzija predstavlja nezavisni faktor rizika za nastajanje komplikacija kod pacijenata sa dijabetesom, granična vrednost arterijskog pritiska za postavljanje dijagnoze je niža. Pragom se smatra arterijski pritisak koji premašuje 130 mmHg (za sistolni) i/ili 80mmHg (za dijastolni) pritisak, a to odgovara srednjem arterijskom pritisku (SAP) od 97 mmHg (SAP=dijastolni+1/3 razlike između sistolnog i dijastolnog pritiska).

Dijagnoza hipertenzije se ne može postaviti samo na osnovu jednog merenja. Ako se utvrdi da je sistolna tenzija veća od 130 mmHg, a dijastolna veća od 80 mmHg, potrebno je da se ove i veće vrednosti potvrde još u najmanje dva merenja tokom nedelju dana. Ovo se mora posebno poštovati kod dijabetičara jer je poznato da kod njih mogu postojati veće oscilacije tenzije i često samo povišene vrednosti sistolne tenzije.

Kao što je napomenuto, kod dijabetičara se može u početku naći izolovana sistolna hipertenzija, ali ona kasnije prelazi u pravu hipertenziju, umereno tešku ili izraženu. Kod bolesnika sa dugotrajnim dijabetesom autonomnom neuropatijom, može se javiti hipertenzija sa ortostatskom hipotenzijom. Hipertenzija se može klasifikovati ne samo po težini i stabilnosti nego i na osnovu tipa poremećaja koji je do nje doveo.

Pojedini uzroci hipertenzije se razlikuju po učestalosti. U tipu I dijabetesa najčešći uzrok nefropatije je hipertenzija. Bolesnici sa ovim tipom dijabetesa koji u porodičnoj anamnezi imaju esencijalnu hipertenziju češće razvijaju nefropatiju.

Patogeneza hipertenzije u dijabetesu

Uzroci i mehanizmi koji dovode do hipertenzije u obolelih od dijabetesa nisu jednostavni. Bolesti bubrega imaju značaja kod mnogih bolesnika ali ne kod svih. Sa druge strane promene na krvnim sudovima, kao što je ateroskleroza su veoma važni. Povećan volumen ekstracelularne, odnosno cirkulišuće tečnosti je sigurno od značaja. Promene u funkcionisanju sistema renin-angiotenzin-aldosteron, kao i izmenjena osetljivost pre svega arteriola na kateholamine ili angiotenzin II, sigurno u izvesnom broju bolesnika može biti od presudnog značaja za razvoj hipertenzije. Poseban značaj za razvoj hipertenzije ima hiperinsulinizam zato što insulin kao hormon može dovesti do retencije tečnosti [30].

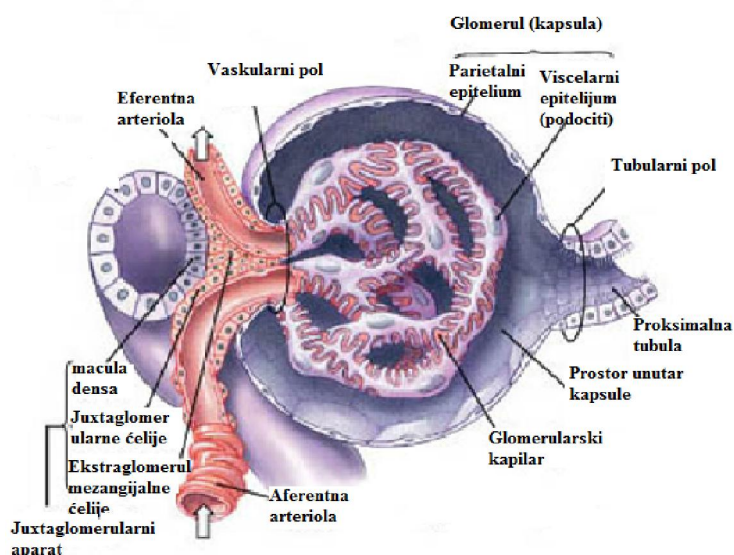
U oba tipa dijabetesa se oboljenja bubrega mogu u značajnom broju bolesnika smatrati uzrokom hipertenzije. Pojava mikroalbuminurije kao znaka početne dijabetesne nefropatije je obično praćena padom glomerulske filtracije (GFR) i laganim porastom tenzije, ali ne obavezno i hipertenzijom.

Funkcija sistema renin-angiotenzin-aldosteron u dijabetičara je u osnovi normalna, ali je nivo renina u odnosu na ukupni izmenjivi natrijum povišen. Sa druge strane u bolesnika sa početnom nefropatijom postoji snižen nivo angiotenzina II. Kao što je poznato, angiotenzin II dovodi do vazokonstrikcije eferentne arteriole u glomerulu u cilju održanja normalne funkcije glomerula. Relativno niži nivo renina može biti posledica ne samo hipervolemije nego i hijalinizacije eferentne arteriole, ali kasnije i oštećenja juksta-glomerulskog aparata usled poodmaklog razvoja nefropatije i hijalinizacije glomerula. Kod bolesnika sa autonomnom neuropatijom bi se moglo razmatrati kao uzrok smanjenog oslobađanja renina i neadekvatno, odnosno smanjeno stvaranje kateholamina koji zato slabo vrše adrenergičnu stimulaciju stvaranja i oslobađanja renina. Renin je u ketoacidozi povišen kao posledica pada vaskularnog volumena usled dehidracije.

Takođe je interesantno kako metaboličko stanje utiče na funkciju sistema renin-angiotenzin-aldosteron u obolelih od dijabetesa. Poznato je da se nivo renina povećava u dehidraciji i ketoacidozi. Međutim čak i kad nema dehidracije, loša metabolička kontrola

utiče na ovaj sistem. Tako je utvrđeno da se popravljajem metaboličke kontrole u grupi dijabetičara bez hipertenzije dolazi do značajnog redukovanja plazmatske aktivnosti renina, angiotenzina II i aldosterona.

Nefropatija može biti uzrok hipertenzije ali i sama hipertenzija, kao nezavisni faktor rizika može da ubrza razvoj nefropatije. Incidencija hipertenzije među bolesnicima sa tipom I dijabetesa je veća kada se javi mikroalbuminurija, a još veća ako postoji proteinurija, ali je to i u saglasnosti sa dužinom trajanja dijabetesa. Dijastolna hipertenzija se može konstatovati i u ranim fazama nefropatije. Ona može da pogorša mikroalbuminuriju jer se sa povećanjem glomerulske tenzije povećava i filtracija albumina. Još je upadljiviji efekat hipertenzije na opadanje GFR. Tako je nađeno da u



Slika 5. Glomerul (Preuzeto sa: http://www.profelis.org/amc/ap2/ipegs/hamwege/martini_7e_26-8a_r49.jpeg)

bolesnika sa tipom I dijabetesa pad GFR korelira sa hipertenzijom. Izgleda da redukcija tenzije može da smanji, bar donekle i mikroalbuminuriju. Na osnovu toga bi se moglo zaključiti da neki reverzibilni hemodinamski poremećaji imaju značaja u nastanku mikroalbuminurije, nefropatije i hipertenzije. Predpostavlja se da redukcija glomeruskog kapilarnog hidrostatskog pritiska nastala posle redukovanja arterijske tenzije, smanjuje albuminuriju i progresiju nefropatije.

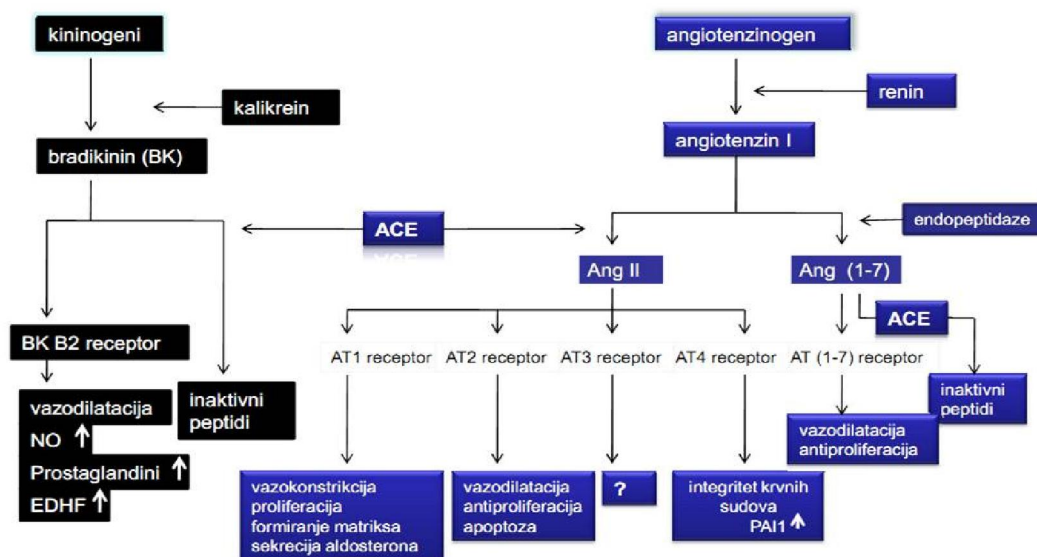
Stopa opadanja funkcije bubrega se značajno razlikuje među različitim osobama, čak i između osoba koje imaju isti tip oboljenja bubrega. Sa druge strane, stopa gubitka funkcije bubrega kod jedne osobe je relativno konstantna. Može se pretpostaviti da genetičke determinante imaju važnu ulogu u gubitku funkcije bubrega. Veliki uticaj etničke

priпадности na rizik od progresivnog gubitka bubrežne funkcije, podržava ovu hipotezu. Pošto i dijabetesna nefropatija i hipertenzija koja joj često prethodi, pokazuje tendenciju nasleđivanja u porodicama, RAS geni su primarni kandidati za proučavanje uloge u razvoju dijabetesne nefropatije. Geni koji su uključeni u razvoj hipertenzije, verovatno utiču i na razvoj dijabetesne nefropatije. Takođe, blokada renin-angiotenzin sistema se primenjuje u terapiji dijabetesne nefropatije što je još jedna potvrda uloge produkata RAS gena u razvoju ove bolesti.

Renin-angiotenzin sistem

Hipertenzija predstavlja jedan od najvažnijih činilaca koji ubrzavaju razvoj nefropatije, tako što u glomerulu, u uslovima visokog sistemskog arterijskog pritiska dolazi do vazodilatacije aferentne a vazokonstrukcije eferentne arteriole što za posledicu ima povećanje intraglomerulskog pritiska. Glomerularna hipertenzija ima važnu ulogu u pojavi i razvoju nefropatije. Sistemska i glomerularna hipertenzija indukuje hemodinamske povrede vaskularnog endotelijuma i glomerula [31].

Brzina smanjenja funkcije bubrega se značajno razlikuje među različitim osobama, pa i između osoba koje imaju isti tip oboljenja bubrega. Može se pretpostaviti da genetičke determinante imaju važnu ulogu u brzini gubitka bubrežne funkcije. Hemodinamske promene koje prate razvoj dijabetesne nefropatije mogu se delimično objasniti promenom aktivnosti renin-angiotenzinskog sistema. Uloga gena renin-angiotenzinskog sistema u regulaciji kardiovaskularnog sistema je značajna. Prisutni polimorfizmi ovih gena mogu uticati na promenu toka kardiovaskularne bolesti. Polimorfizam gena renin-angiotenzinskog sistema može biti povezan sa kardiovaskularnim poremećajima i mnoge studije upućuju na mogućnost da polimorfizam ovih gena može odrediti predispoziciju za razvoj dijabetesne nefropatije. Već pomenuta blokada renin-angiotenzin sistema, koja se primenjuje u terapiji dijabetesne nefropatije, je takođe potvrda uloge RAS gena u razvoju ove bolesti [32].

Aktivnost gena renin-angiotenzin sistema

Slika 6. Komponente i osnovni mehanizmi dejstva renin angiotenzin sistema

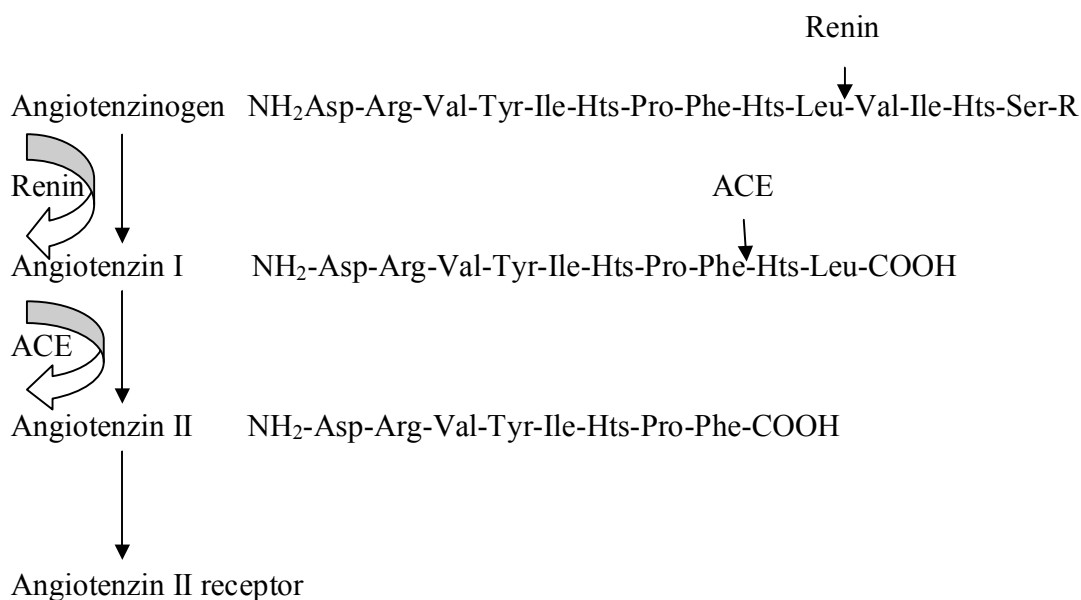
Renin-angiotenzinski sistem učestvuje u regulaciji arterijskog pritiska, tečnosti i homeostaze elektrolita, a uključen je u više organskih sistema. Renin je glikoprotein koji se stvara u jukstaglomerularnom aparatu bubrega, konvertuje angiotenzinogen u dekaeptid angiotenzin I. Angiotenzin-konvertujući enzim (ACE) je karboksi-terminalna dipeptidil endopeptidaza, uglavnom prisutna u endotelnim ćelijama, koja cepa angiotenzin I i prevodi ga u oktapeptid angiotenzin II ali istovremeno inaktivira vazodilatator bradikinin (slika 6). Angiotenzin II je glavna efektorna supstanca ovog sistema. Njegovo dejstvo uključuje vazokonstrikciju, stimulaciju sinteze aldosterona, povećanu apsorpciju soli, stimulaciju žeđi i direktnu inhibiciju oslobađanja renina u bubregu [33].

Novije studije su pokazale da se sva dejstva angiotenzina II ne ostvaruju samo preko cirkulišućeg peptida, već da postoje i lokalni renin-angiotenzinski sistemi u nekim tkivima (tkivni RAS) [34]. Cirkulišući i lokalno stvoreni angiotenzin II se vezuju za specifične receptore, dva peptida koji su nađeni u različitim tkivima. AT1 receptori su uglavnom prisutni u krvnim sudovima, jetri i bubregu, dok su AT2 receptori nađeni u meduli

nabubrega, mozgu, uterusu i ovarijumima. Vezivanje angiotenzina II za AT1 receptore aktivira brojne signalne transdukcijske puteve preko različitih G proteina. U bubregu angiotenzin II povećava tonus eferentne arteriole u glomerulu i dovodi do glomerularne hipertenzije [35]. Dominantni vazokonstriktorni efekat angiotenzina II na postglomerularne arteriole je povezan sa smanjenjem bubrežnog protoka plazme, povećanjem hidrostatskog pritiska u kapilarima glomerula i povećanjem frakcije filtracije. Angiotenzin II izaziva hipertrofiju i hiperplaziju mezangijalnih ćelije [36].

Renin-angiotenzin kaskada

Renin–angiotenzin kaskada počinje hidrolizom angiotenzinogena, čime se oslobađa angiotenzin I (angiotenzin 1-10) (Slika 7). Ovaj biološki neaktivni dekaeptid se konvertuje u vazokonstriktorni hormon, oktapeptid angiotenzin II (angiotenzin 1-8), tako što ACE od angiotenzina I otkida dipeptid His-Leu. Aminopeptidaza A hidrolizuje angiotenzin II pa nastaje manje aktivan heptapeptid, angiotenzin III. Navedeni aktivni peptidi se daljom hidrolizom pretvaraju u manje aktivne ili neaktivne peptidne fragmente [37].



Slika 7. Renin-angiotenzin kaskada

Komponente renin-angiotenzin sistema sintetišu se u različitim organima i dopremaju do mesta delovanja krvotokom. Akumulirani dokazi biohemijskih i molekularnih studija pokazuju postojanje lokalnog/tkivnog RAS-a kao posebnog sistema sa različitim regulatornim mehanizmima. To znači da se sve komponente neophodne za lokalnu sintezu Ang II nalaze u tkivu. Lokalni RAS postoji i funkcioniše u mozgu, bubrezima, srcu, nadbubrežnoj žlezdi, pankreasu, zidovima krvnih sudova, reproduktivnom, limfnom i masnom tkivu. Funkcije lokalnog RAS-a su: ćelijski rast i remodelovanje srca, regulacija krvnog pritiska, stimulacija unosa vode i hrane, sekrecija hormona u pankreasu [38].

Intrarenalni RAS

Bubreg je organ koji ima sve elemente RAS sistema koji su akumulirani u ćelijama ili raspoređeni u tubularnoj i intersticijalnoj mreži. Intrarenalna AGT iRNK i proteini su lokalizovani u ćelijama proksimalnih tubula ukazujući na mogućnost da se intratubularni Ang II može dobiti od lokalno formiranog i sekretovanog AGT-a. Tako formirani AGT se sekretuje u tubularnu tečnost dospeva do distalnog nefrona omogućavajući intraluminalno formiranje kontinuirano kroz nefron. Povišena renalno specifična ekspresija AGT-a prouzrokuje sistemsku hipertenziju bez promena u količini sistemskog Ang II.

Biološki aktivni peptidi koji se formiraju od AGT-a uključuju Ang II i Ang 1-7. Balans između vazokonstriktorne uloge Ang II posredovane AT_1 receptorom održava se uz pomoć vazodilatatorne uloge Ang II preko AT_2 receptora i Ang 1-7 koji deluje preko G kuplovanog receptora Mas. Formiranje Ang II zavisi od dostupnosti AGT i Ang I i aktivnosti renina, ACE, ACE2 i ACE nezavisnih enzimskih puteva koji uključuju serin proteazu, tonin, katepsin G, tripsin i kalikrein. Renalni RAS je jedinstven zbog toga što su sve komponente neophodne za sintezu lokalnog Ang II prisutne duž nefrona, intratubularno i u intersticijumu [39].

Komponente renin-angiotenzin sistema

Renin

Renin je enzim koji spada u grupu karboksil-proteinaza, koja katalizuje hidrolitičko oslobađanje deka-peptida angiotenzina I iz angiotenzinogena. Humani genom sadrži samo jedan gen za renin (ren-1), koji se nalazi na 1. hromozomu na poziciji 1q32 i sadrži 10 egzona i 9 introna čija je dužina 12kb. Na 5' kraju gena su smešteni glavni kontrolni elementi koji uključuju promotore, pojačivače i regulatorne elemente u koje spadaju receptorna mesta za estrogen, glukokortikosteroide i indukciona mesta za cAMP. Kombinovanim delovanjem ovih elemenata dolazi do tkivno-specifične ekspresije i regulacije gena za renin. Ekspresija Ren-1 gena varira u različitim tkivima, ali jedino bubrezi sadrže veliku količinu aktivnog renina, koji može biti lako otpušten u cirkulaciju.

Renin iz plazme proizvode jukstaklomerularne ćelije (JG) bubrega. To su specijalizovane ćelije nastale iz ćelija glatkih mišića krvnih sudova, koje se nalaze na kraju aferentne arteriole. U JG ćelijama mRNA renina se prvo prevodi u pre-pro-renin. Nakon sečenja pre-sekvence u dužini od 43 aminokiseline, prorenin odlazi u *cis*-Goldžijevim cisternama, odakle može biti odmah sekretovan konstitutivnim putem ili se može pakovati u granule velike gustine koje se oslobađaju regulisanom egzocitozom. Oslobađanje renina konstitutivnim putem zavisi od genske aktivacije i transkripcione efikasnosti svake JG ćelije.

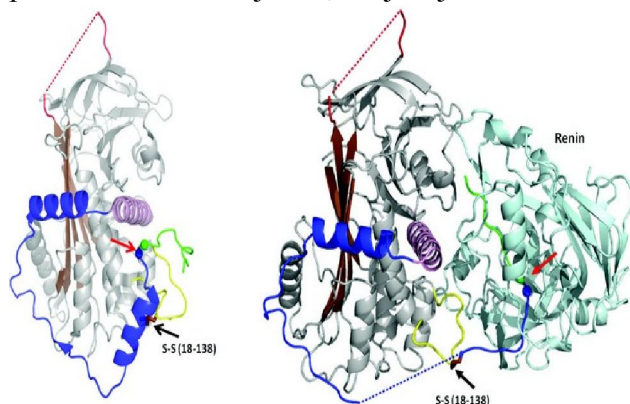
Na ćelijskom nivou brojni sistemski i lokalni faktori mogu uticati na oslobađanje renina interagujući sa tri intraćelijska sistema sekundarnih glasnika: cAMP, Ca²⁺ i cGMP.

Dok je cAMP glavni stimulator oslobađanja renina, slobodni citosolni Ca²⁺ se smatra glavnim inhibitorom. Nasuprot tome, efekti cGMP su mnogo kompleksniji jer on može i da stimuliše i da inhibira sekreciju renina [40].

Sekreciju renina kontrolišu četiri mehanizma: dva su lokalna (mehanizam makule dense i intrarenalni baroreceptori), treći se odvija putem β 1 adrenergičkih receptora, koje aktivira noradrenalin oslobođen stimulacijom simpatikusa, a četvrti je negativna povratna sprega kojom Ang II direktno inhibira JG ćelije [41]. Pored renina, jukstaklomerularne

ćelije luče i prorenin; u plazmi prorenin predstavlja 70-90% od totalnog cirkulišućeg renina kod zdravih osoba, dok kod dijabetičara on čini 95% [42]. Prorenin u plazmi je renalnog i ekstrarenalnog porekla, a konverzija prorenina u renin se, izgleda, jedino dešava u bubregu.

(Pro)reninski receptor koji se eksprimira u srcu, mozgu, placenti, jetri, bubrezima i mrkom masnom tkivu vezuje prorenin a sa manjim afinitetom i renin. Vezujući se za ovaj receptor prorenin menja svoju konformaciju i postaje enzimatski aktivan bez prethodne proteolize. Ovaj mehanizam može doprineti lokalnom formiranju AngII a posebno u onim tkivima koja nemaju gen za renin a koja proizvode Ang II kao što su srce i zidovi krvnih sudova i koja se zbog toga snabdevaju reninom iz cirkulacije. Aktivacija (pro)reninskog receptora dovodi do aktivacije MAPK kinaze, ERK puta i povećava aktivnost nekoliko profibrotičkih medijatora, uključujući transformišući faktor rasta β (TGF- β), plazminogen



aktivator inhibitor-1 (PAI-1) i ekstracelularne komponente matriksa fibronektin i kolagen-1[43]. Tako da, aktivacija (pro) reninskog receptora u mezanglijskim ćelijama povišenim nivoom prorenina, što se dešava u dijabetesu, može doprineti razvoju glomeruloskleroze.

Slika 8. Humani angiotenzinogen i njegov kompleks sa reninom (Preuzeto sa: www.diamond.ac.uk)

Angiotenzinogen

Angiotenzinogen je globularni glikoprotein molekularne mase između 55-65 kD u zavisnosti od stanja glikozilacije (Slika 4). Zreli protein predstavlja jedan polipeptidni lanac dug 452 aminokiseline. Prvih deset aminokiselina ulazi u sastav angiotenzina I (Agt I) dok veći deo molekula odgovara des(AngI)AGT-u čija je funkcija nepoznata. On se konstitutivno sekretuje u cirkulaciju nakon sinteze u hepatocitima.

Sadrži četiri moguća mesta glikozilacije (Asn-*X*-Ser/Thr. Prvo mesto (Asn₁₄-Lys₁₅-Ser₁₆) je najbliže mestu sečenja renina (Leu₁₀-Val₁₁) i može imati ključnu ulogu u prepoznavanju od strane renina. Pokazano je da mutacija Asn₁₄ ima veliki efekat na kinetiku renina sa angiotenzinom [44].

AGT visoke molekulske mase prisutan je u humanoj plazmi, naročito kod trudnica, gde čini 15% totalnog AGT. On je predominantna forma proteina u amnionskoj tečnosti.

Struktura pokazuje da M235, najčešći polimorfizam AGT gena koji je povezan sa hipertenzijom ima prilično produžen bočni lanac koji je smešten na spoljašnjoj petlji (hF-s3A) udaljenoj od glavnog funkcionalnog mesta molekula. Ovo doprinosi ubedljivosti prethodnih zaključaka koji nam govore da predispozicija za hipertenziju pre rezultuje iz malog povećanja koncentracije polimorfnog AGT nego u promeni njegove funkcije.

Angiotenzinogen se sekretuje u predominantno oksidovanoj formi disulfidnih mostova, nakon prolaska kroz endoplazmatični retikulum (ER) a koji će zatim biti redukovano interakcijom sa selektivnim tiol sistemom u plazmi. Odnos oksidovane i redukovane forme u plazmi je konstantan i iznosi 60:40 i nezavisan je od pola i godina. Kritična interakcija između renina i angiotenzina javlja se u bubrežnom tkivu i tubulima. Na ovim mestima, treća komponenta, membranski vezan proreninski receptor vezuje renin i značajno doprinosi katalitičkom sečenju angiotenzinogena [45].

Uloge angiotenzinogena:

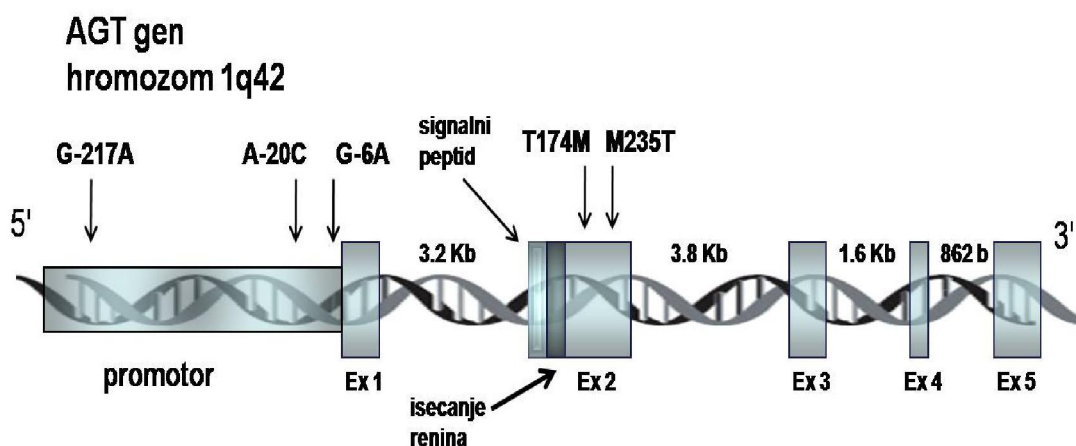
1. Prvi korak u RAS kaskadi je isecanje AGT-a reninom. AGT se u plazmi nalazi u mikromolarnim koncentracijama dok je koncentracija renina 1000 puta manja. Pored prisustva u plazmi i u ekstracelularnoj tečnosti AGT se može detektovati i u cerebrospinalnoj tečnosti. Kratkotrajna regulacija renin-angiotenzin sistema ne zavisi od promena AGT u cirkulaciji. Brza adaptacija u slučaju unosa visoke količine Na⁺ posredovana je promenom u količini oslobođenog renina iz JG ćelija. Postoji ograničavajuća uloga plazma AGT u stvaranju AngI.

2. AGT pripada superfamiliji inhibitora serin proteaza (serpini) u koju spadaju i α 1-antitripsin, α 1-antihimotripsin i antitrombin III. Strukturna sličnost između AGT i ovih proteina (oko 20% identičnih aminokiselina) u broju egzona, veličine i mesta splajsovanja je dovela do pretpostavke da su geni serpinske superfamilije evoluirali od zajedničkog predačkog gena. AGT je verovatno jedan od najudaljenijih članova serpinske superfamilije i verovatno da je izgubio inhibitornu serin proteaznu aktivnost.

3. Kod pacova koncentracija AGT se povećava velikom brzinom u toku inflamatornih procesa i povreda tkiva i on pripada proteinima akutne faze. Kod ljudi AGT može da stimuliše renin-angiotenzin lokalno u toku groznice izazivajući vazodilataciju da bi se održao stalni krvni pritisak.

AGT se sintetiše u hepatocitima odakle se konstitutivno izlučuje. Takođe, AGT se može sintetisati i u mozgu, velikim arterijama, bubrezima i masnom tkivu čineći deo ekstravaskularnog renin-angiotenzin sistema. Druge proteaze u tkivu mogu da hidrolizuju AGT do Ang I ili direktno u Ang II. Ang II proizveden lokalno na ovaj način može imati parakrinu i autokrinu funkciju. Ovaj tkivni sistem može biti regulisan lokalno nezavisno od cirkulatornog sistema.

In situ hibridizacija i imunohistohemijske metode pokazale su da su glijalne ćelije najvažniji izvor AGT u mozgu. Pretpostavlja se da se AGT sintetiše od strane glijalnih ćelija, sekretuje, a zatim preuzima od strane neurona formirajući parakrini RAS [46]. AGT je prisutan u adventiciji i središnjem sloju glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova. iRNK AGT je detektovana i u bubrezima, uglavnom u ćelijama proksimalnih tubula. Promene u unosu Na^+ utiču na količinu iRNK AGT u ćelijama proksimalnih tubula. Niska količina Na^+ povećava količinu iRNK AGT. Belo masno tkivo, bogat izvor AGT-a produkuje AGT tokom diferencijacije iz preadipocita u adipocit. AGT je detektovan još i u nadbubrežnim žlezdama gde može doprineti zajedno sa lokalno produkovanim reninom, parakrinom stvaranju Ang II i regulaciji sekrecije aldosterona. Koncentracija AGT-a i u plazmi i u cirkulaciji doprinosi ukupnoj količini Ang I i Ang II. Promene u ovim koncentracijama su važne pošto one direktno utiču na stepen aktivacije RAS sistema.

Polimorfizmi gena za angiotenzinogen

Slika 9. Shematski prikaz strukture gena za angiotenzinogen sa najčešćim polimorfizmima u regionu promotora i drugom egzonu

Nivo angiotenzinogena u plazmi koji predstavlja supstrat za enzim renin je važna komponenta u sintezi angiotenzina II. Gen za angiotenzinogen, koji se nalazi na 1. hromozomu, na poziciji 1q42-43 i sastoji se od 5 egzona i 4 introna je usko povezan sa esencijalnom hipertenzijom i ispoljava se u 15 polimorfnihi formi. Među najvažnijim su dva polimorfizma, M235T (metionin zamenjen treoninom na poziciji 235) i T174M (treonin zamenjen metioninom na poziciji 174). Ovakva zamena na egzonu 2 dovodi do promene redosleda aminokiselina. Osobe homozigoti za izmenu na poziciji 235 angiotenzinogena (TT) imaju viši nivo angiotenzinogena u plazmi, što se može dovesti u vezu sa uticajem ovog proteina na povećanje arterijskog pritiska. Haplotipovi koji nose 235T alel, u prisustvu ili odsustvu T174M polimorfizma su češće nađeni kod osoba sa hipertenzijom nego kod zdravihi kontrola. Brojne studije su kasnije ukazale na vezu između 235T alela sa esencijalnom hipertenzijom ili koronarnom bolešću. Prvi put se ukazalo na pozitivnu korelaciju M235T alela sa koncentracijom angiotenzinogena u plazmi, 1992 [47] u studiji porodica iz Francuske i Jute, sa oko 20% povećanja koncentracije angiotenzinogena u plazmi kod osoba koje su nosile 235T alel.

Sklonost prema dijabetesnoj nefropatiji se povezuje sa promenom pritiska i promenom u renalnoj hemodinamici kao posledici prisustva 235T alela koji direktno utiče na povećanje arterijskog pritiska i sledstveno tome, povezuje sa predispozicijom za dijabetesnu nefropatiju [48]. Gen za angiotenzinogen je jedan od nekoliko gena koji se povezuju sa regulacijom arterijskog pritiska preko angiotenzina II kao krajnjeg produkta renin-angiotenzinskog sistema. Povezanost između gena za angiotenzinogen i hipertenzije je potvrđena u više studija. Polimorfizam u egzonu 2 sa dve alelske forme koje određuju prisustvo aminokiseline metionina ili treonina na poziciji 235 se smatra odgovornim za ova dešavanja. Treoninska forma (235T) je značajno češća kod osoba sa hipertenzijom nego kod normotenzivnih i povezana je sa višim nivoom serumskog angiotenzinogena [48]. M235T polimorfizam AGT gena se smatra markerom za esencijalnu hipertenziju i povećanu koncentraciju angiotenzinogena u plazmi. Uticaj genetičkih faktora na razvoj oboljenja kakva je dijabetesna nefropatija je kompleksan i multifaktorijalan. Ipak, Lovati i sar. (2001) su utvrdili da je progresija terminalne bolesti bubrega bila brža kod pacijenata sa TT genotipom u odnosu na pacijente sa MM genotipom. Pokazano je da je T alel povezan sa većom aktivnošću RAS sistema, odnosno povećanom reapsorpcijom soli i vode. Tako su. Žnemetri i sar. (1999) pokazali da je T235 alel daleko češći u zdravoj afričkoj populaciji [100]. S druge strane, postoje hipoteze da učestalost heterozigota u umereno-kontinentalnom klimatu ukazuje na selektivnu prednost, jer obezbeđuje umerenu aktivnost RAS sistema, pa prema tome i umerenu retenciju vode i soli.

Uticaj M235T polimorfizma AGT gena na esencijalnu hipertenziju i nefropatiju nije izolovan. Polimorfizmi T174M, G-6A, A-20C koji su u gametskoj neravnoteži sa M235T, kao i ostali geni RAS sistema, mogu imati ulogu u progresiji terminalne bolesti bubrega.

Postoje dva načina regulacije sinteze i sekrecije AGT-a:

-Regulacija na nivou ekspresije AGT gena: sinteza AGT-a je verovatno većim delom regulisana kontrolom transkripcije AGT gena.

-Endokrina regulacija: glukokortikoidi, estrogen, Ang II i tireoidni hormoni stimulišu sintezu i sekreciju AGT-a. O stimulaciji sinteze AGT-a angiotenzinogenom II se i dalje raspravlja. U kulturi ćelija Ang II stimuliše sintezu AGT-a mada to nije potvrđeno in vivo, na eksperimentalnim životinjama.

Angiotenzinski peptidi: Ang II je najaktivniji biološki produkt RAS-a iako postoje i drugi bioaktivni peptidi uključujući Ang III (angiotenzin 2-8), Ang IV (angiotenzin 3-8) i Ang 1-7 koji se dobija sečenjem Ang II sa ACE 2 ili od Ang I sečenjem od strane neprilizina.

Ang II je jedan od najpotentnijih poznatih vazokonstriktora, oko 40 puta više nego noradrenalin. On deluje pozitivno inotropno, stimuliše sekreciju/sintezu aldosterona i vazopresina, a promotor je ćelijske proliferacije. Ovaj oktapeptid je uključen u mehanizme hipertenzije, hronične insuficijencije srca, koronarne i renalne insuficijencije i druge patološke procese. Pored toga, angiotenzin II stimuliše simpatički nervni sistem, dovodi do nadražaja centra za žeđ, povećanog lučenja antidiuretičkog hormona (ADH ili vazopresin) i do retencije natrijuma i vode.

Skoro je otkriveno da je nivo lokalnog Ang II regulisan na drugačiji način u bubregu. Zbog toga što često ne postoji jasan dokaz o značajno povećanoj koncentraciji cirkulišućeg Ang II, identifikacija lokalne aktivnosti RAS-a je od suštinskog značaja za razumevanje mehanizama koji posreduju u patofiziološkim procesima. Sada je očigledno da je intrarenalni nivo Ang II regulisan na drugačiji način od cirkulišućeg Ang II. Takođe je otkriveno da Ang II proizveden lokalno u bubregu ispoljava važan regulatorni uticaj na hemodinamiku bubrega i funkcioniše kao parakrini faktor.

Aplikacija egzogenog Ang II u zavisnosti od primenjene doze izaziva smanjenje protoka krvi u bubregu i smanjenu bubrežnu filtraciju. Iako postoji saglasnost da Ang II

ispoljava značajne direktne efekte na renalnu mikrovaskulaturu i glomerularni mezangijum, postoje kontroverze u vezi sa intenzitetom delovanja na različitim mestima i relativnom doprinosu sistemskog i intrarenalno formiranog Ang II u ukupnoj regulaciji bubrežne hemodinamike.

Neprekidno povećanje koncentracije Ang II indukuje proteinuriju, praćenu progresivnim oštećenjem glomerularne filtracione barijere koja se sastoji od glomerularnog endotelijuma kapilara, glomerularne bazalne membrane i podocita koji obavijaju spoljašnju površinu bazalne membrane kapilara. Lokalno produkovani Ang II direktno izaziva oštećenje podocita aktivacijom preko AT₁ receptora, nezavisno od hemodinamičkih promena.

Pored svojih direktnih efekata na glomerularne arteriole i mezangijum, Ang II takođe reguliše i renalnu hemodinamiku modulišući osetljivost tubuloglomerularnog feedback mehanizma. Ovaj mehanizam omogućava održavanje ravnoteže između reapsorpcione sposobnosti tubula i filtracionog opterećenja putem regulisanja brzine glomerularne filtracije. Kada dođe do promena u koncentraciji tubularnog rastvora u nivou *maculae densae* završnog dela Henlejeve petlje, signali se prenose na aferentne arteriole i glomerularni mezangijum da bi se vazokonstrikcijom ili vazodilatacijom održalo filtraciono opterećenje. Ovi efekti su posredovani pomoću glatkih mišićnih ćelija kapilara i mezanglijskih ćelija kao i modulacijom jonske razmene Na⁺ i H⁺ jona ćelija *maculae densae*.

Ang II je jedan od najvažnijih regulatora hormona aldosterona, koji stimuliše reapsorpciju Na⁺ primarno preko mineralokortikoidnih receptora u kortikalnim delovima sabirnih kanalića. Ang II direktno povećava koncentrovanje urina u sabirnim tubulima i kanalićima.

Postoje i brojni dokazi o ulozi Ang II kao parakrinog faktora. Pored svoje fiziološke uloge lokalno proizvedeni Ang II indukuje inflamaciju, ćelijski rast, ćelijsku deobu, apoptozu, migraciju i diferencijaciju, reguliše gensku ekspresiju biološki aktivnih supstanci, aktivira veći broj intracelularnih signalnih puteva, što sve može dovesti do oštećenja tkiva.

Kliničke i prekliničke studije podržavaju činjenicu da Ang II ima ključnu ulogu u razvoju hipertenzije i oštećenja bubrega aktivacijom AT₁ receptora na neadekvatan način. Zbog toga što bubrezi imaju ključnu ulogu u razvoju hipertenzije, hipertenzija je i uzrok i posledica bolesti bubrega [49].

Angiotenzin konvertujućí enzim (ACE)

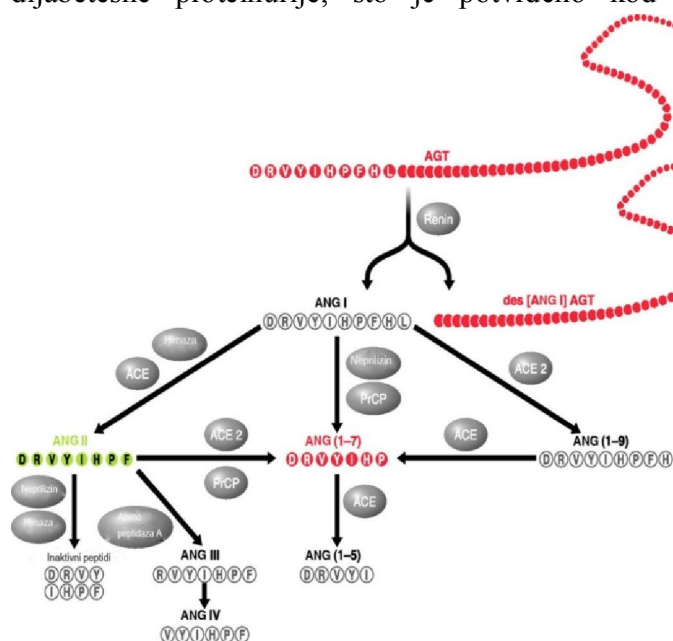
Angiotenzin konvertujućí enzim (ACE), konvertaza angiotenzina, kininaza II ili dipeptidil karboksipeptidaza otkriven je u plazmi, ali je danas poznato da se on nalazi u različitim ćelijama endotela, epitela i neuroepitela. Ovaj enzim igra važnu ulogu u RAS kaskadi konvertujućí Ang I u Ang II. Gen za ACE se nalazi na poziciji 17q23.3 i sastoji se od 26 egzona i 25 introna. Pokazano je da u ACE genu postoje dva alternativna promotora: somatićki promotor koji se nalazi na 5' kraju 1. egzona i germinativni promotor na 5' kraju specifičnog završetka germinativne iRNK. Somatićka mRNK se transkribuje od 1. do 26. egzona ali se 13. egzon iseca tokom maturacije mRNK. Germinativna mRNK se transkribuje od 13. do 26. egzona. 13. egzon je specifičan za testikularnu ACE mRNK. Postoje dve izoforme ACE proteina u ljudskom organizmu: somatićka forma (primarno se eksprimira u endotelijalnim ćelijama) i testikularna (primarno se eksprimira u testisima). Somatićki ACE protein se sastoji od 1306 aminokiselinskih ostataka, molekulske mase od 149714 Da, a testikularni ACE ima 732 aminokiseline i molekulsku masu 83330 Da. [50].

Trodimenzionalna struktura ACE pokazuje da je u najvećem delu sastavljen od α heliksa i da inkorporiše jon cinka i dva jona hlora, što znači da je ACE cink-metalopeptidaza. Somatski ACE se sastoji od dva domena nazvane N- i C- domeni, sa različitim funkcijama, a danas poznati ACE inhibitori deluju na oba domena. Novoopisana struktura testikularnog ACE će poslužiti kao matrica za dizajn nove generacije lekova selektivnih prema domenu [50].

ACE spada u grupu peptidil dipeptidaza A. On konvertuje angiotenzin I u angiotenzin II potentni vazokonstriktor i degraduje bradikinin, potentni vazodilatator, čime

reguliše vaskularni tonus i srčane funkcije. Identifikovani su i drugi prirodni supstrati ACE, koji proširuju njegovu funkciju u mnogim fiziološkim procesima, kao što su : neuronalni metabolizam, hematopoeza, digestija i reprodukcija.

ACE je prisutan kako u vaskularnom endotelijumu (najvećim delom u endotelu plućnih kapilara) tako i na membranama mnogih drugih ćelija. Visok nivo ACE u ćelijama proksimalnih tubula može lokalno proizvoditi visoku koncentraciju Ang II i tako pospešiti reapsorpciju natrijuma. Prisustvo ACE u inflamatornim ćelijama takođe može imati uticaj na kardiovaskularna oboljenja [51]. Dalje, visok nivo ACE može doprineti razvoju dijabetesne proteinurije, što je potvrđeno kod miševa dijabetičara sa genetičkom



Slika 10. RAS kaskada i alternativni putevi sinteze angiotenzinogena II i drugih vazoaktivnih peptida (Preuzeto sa: <http://0-physrev.physiology.org.library.pcc.edu/content/89/4/1177/F3.large.jpg>)

jednu C-terminalnu aminokiselinu od različitih peptida, uključujući angiotenzin II i angiotenzin I; tako nastaju angiotenzin 1-7 i angiotenzin 1-9. Vaskularna dejstva angiotenzina 1-7 su suprotna aktivnosti angiotenzina II uključujući vazodilataciju i antiproliferativni efekat [52]. ACE 2 potencira i efekte bradikininina jer oslobađa NO i arahidonsku kiselinu. Zato se smatra da angiotenzin 1-7 pruža ravnotežu povećanoj aktivnosti angiotenzina II, pa bi se ACE 2 mogao svrstati u kardioprotektivne enzime.

predispozicijom za visoki nivo ACE, i kod ljudi sa inserciono-delecionim polimorfizmom ACE gena.

Angiotenzin I konvertujućí enzim 2 (ACE2), karboksipeptidaza srodna ACE, nazvana ACE2 je oko 42% identična sa katalitičkim mestom somatskog ACE. Taj enzim se stvara u ćelijama vaskularnog endotela srca, bubrega i testisa i on, za razliku od ACE, otkida samo

Prve studije koje su ispitivale povezanost ACE I/D genotipa (inserciono/delecionog) sa rizikom za infarkt srca ukazali su na značaj molekularne biologije u proceni genetičkih faktora rizika u kardiovaskularnim bolestima i bolestima bubrega [53].

Primena metode lančane reakcije polimeraze (PCR) za detekciju I/D polimorfizma ACE gena od strane Rigata ubrzala je pojavu brojnih studija koje su se bavile ovim problemom [54]. Skorije dobijeni podaci ukazuju na oprečne rezultate koji mogu biti posledica velike genetičke heterogenosti. Pripadnost određenoj etničkoj grupi može biti važan parametar koji bitno utiče na kliničko tumačenje dobijenog oblika ACE polimorfizma. Alelska učestalost polimorfizma ACE gena varira u različitim etničkim grupama. Etnička različitost se ogleda ne samo u genotipu nego i u nivou ACE u plazmi, što je potvrđeno u novijim studijama [55].

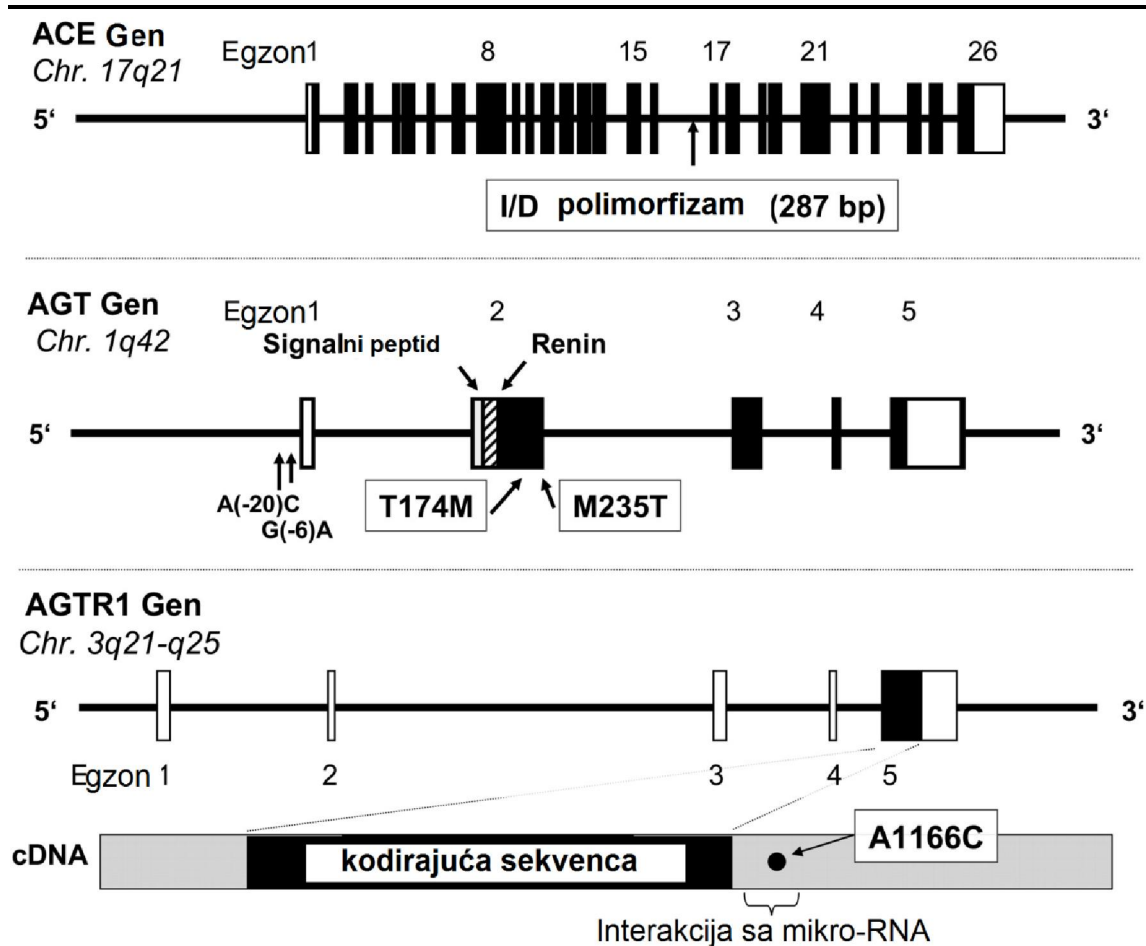
Godine 1990., Rigat je odredio pomoću Southern blot tehnike i koristeći ACE cDNA kao probe, učestalost I/D polimorfizma određenog prisustvom ili odsustvom 287 bp duge sekvence u intronu 16. Nađeni polimorfizam je dao objašnjenje za neslaganje između fenotipskih karakteristika i nivoa ACE u serumu u velikom broju slučajeva. Srednji nivo serumskog ACE je veći kod homozigotnih osoba sa delecijom (DD genotip) u poređenju sa osobama kod kojih je prisutna insercija gena (I). Heterozigoti (I/D genotip) pokazuju intermedijerni nivo serumskog ACE, dok najniži nivo ACE u serumu pokazuju osobe sa II genotipom [56]. Rigat je zaključio da I/D polimorfizam ima najveći značaj u proceni nivoa cirkulišućeg ACE [57].

Gen za angiotenzin-konvertujući enzim (ACE) je među prvim genima kandidatima analiziran u dijabetesnoj nefropatiji iz više razloga. Povećana aktivnost ovog enzima doprinosi pojačanom dejstvu angiotenzina II koji povećava intraglomerularni pritisak dovodeći do glomeruloskleroze. Pokazano je da nivo ACE u serumu ima kritičnu ulogu u stvaranju angiotenzina i kinina intrarenalno, pri čemu je njegov nivo genetički determinisan. Pokazalo se da nivo ACE-a u serumu ima kritičnu ulogu u intrarenalnom stvaranju angiotenzina i kinina, pri čemu je njegov nivo genetički determinisan. I/D polimorfizam u intronu 16 ACE gena je od značaja za individualne varijacije u nivou

ACE). Dijabetičari sa II polimorfizmom ACE gena (II genotip) imaju niži novo ACE u serumu i manji rizik za pojavu nefropatije [58].

ACE inhibitori su supstance koje se vezuju za ACE i sprečavaju njegovu interakciju sa supstratom (Ang I) i na taj način zaustavljaju sintezu Ang II. Pošto je ACE relativno nespecifičan enzim, ACE inhibitori redukuju degradaciju bradikinina, što vodi povećanju njegovog nivoa u cirkulaciji, a on deluje vazodilatatorno i proinflamatorno. Pokazano je da upotreba ACE inhibitora efektivno smanjuje krvni pritisak kod pacijenata sa hipertenzijom, zbog čega se koristi u terapiji kardiovaskularnih oboljenja i drugih oboljenja povezanih sa hipertenzijom, kao što je dijabetesna nefropatija.

ACE genotip može značajno uticati na ishod terapije ACE inhibitorima. Pacijenti sa DD genotipom su rezistentni na ovu renoprotektivnu terapiju, dok osobe sa ID ili II genotipom reaguju značajnim smanjenjem nivoa proteinurije [58]. Konsenzus vezan za primenu ACE inhibitora na osnovu ACE genotipa kod dijabetesne i nedijabetesne nefropatije još nije postignut, s obzirom na to da su do sada izvršena ispitivanja na relativno malim grupama ispitanika.



Slika 11. Shematski prikaz strukture gena za angiotenzinogen (AGT), angiotenzin-konvertujući enzim (ACE) i gena za AT1 receptor

(Preuzeto sa: http://www.springerimages.com/Images/RSS/1-10.1007_s00210-007-0133-2-12)

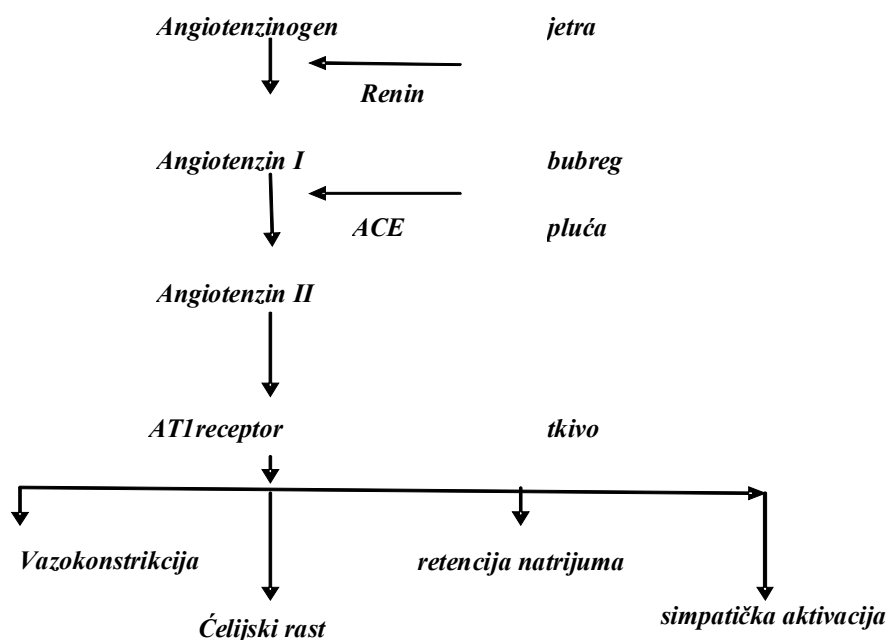
Angiotenzinski receptori

Tehnikama molekularne biologije je pokazano da postoje dva tipa receptora za Ang II: AT₁ i AT₂. Ovi receptori pripadaju superfamiliji receptora koji vezuju G protein (guanil nukleotid vezujući protein). Oni imaju oko 34% homologe aminokiselinske sekvence [59] i vezuju angiotenzin II i srodne peptide, ali aktiviraju sasvim različite enzimske sisteme. AT1 vezuju intracelularne glasnike: fosfolipazu, kalcijum i protein kinazu. Ang II i drugi ligandi se vezuju za istu aminokiselinsku sekvencu u oba receptora. AT1 receptor je posrednik u svim glavnim funkcijama AngII (vazokonstrikcija, retencija natrijuma, rast, proliferacija). AT1 se eksprimira u različitim organima uključujući: srce, skeletne mišiće, mozak, jetru,

pluća i adrenalne žlezde. Gen za AT1 receptor se nalazi na poziciji 3q24, dug je oko 60kb i sastoji se od 5 egzona i četiri introna.

Peti egzon je najveći i samo on kodira protein, a prva četiri egzona kodiraju 5' iRNK region koji se ne translira (UTR). AT1R se sastoji od četiri ekstracelularna, sedam transmembranskih i četiri intracelularna domena.

AT₂ receptori se uglavnom ekspimiraju u fetalnim tkivima i njihov broj se smanjuje u postnatalnom periodu, a povećava posle povrede tkiva. AT2 receptori potenciraju vazodilataciju, ćelijsku diferencijaciju, inhibiciju rasta ćelija i apoptozu, pa je njihova uloga suprotna ulozi AT1 receptora. AT₂ receptor je visoko ekspimiran u velikom broju tkiva u toku embrionalnog razvića, ali se njegova ekspresija naglo smanjuje nakon rođenja.



Slika 12. Efekti AT1 receptora

U kaskadi reninsko angiotenzinskog sistema važnu ulogu ima polimorfizam gena AT1 receptora. CC genotip AT1-A1166C polimorfizma je povezan sa hipertenzijom. Novije studije su pokazale vezu C alelske forme sa izraženom stenozom arterija kod bolesnika sa koronarnom bolešću [60].

Polimorfizam gena za tip 1 receptora za angiotenzin II sadrži izmenu tipa A-C tranzicije na poziciji 1166 (A1166C) u nivou 3' regiona. Podaci govore da osobe sa 1166C formom alela imaju jači odgovor vaskularnog tkiva bubrega posle infuzije sa angiotenzinom II [61].

Hiperglikemija i hiperinsulinemija su važni regulatori ekspresije i funkcije AT receptora, što može imati važnu ulogu u AT receptor-posredovanim kardiovaskularnim funkcijama povezanim sa otpornošću na insulin ili dijabetesom [62]. Brown i sar. su 1996 godine pokazali da se gustina AT receptora značajno povećava u srcu i jetri pacova dijabetičara, dok se u bubrezima smanjuje [110].

Antagonisti AT1 receptora omogućuju specifičnu blokadu prema mestu efekata Ang II, tako što direktno kompetiraju sa Ang II za mesto na receptoru. Inhibicija Ang II na receptorskom nivou vodi ka stimulaciji sekrecije dodatne količine renina i na taj način do povećanja koncentracije Ang II u plazmi. Ako je AT1 receptor blokiran, AT2 receptor je izložen dejstvu Ang II. Korišćenjem antagonista AT1 receptora u terapiji kardiovaskularnih oboljenja i dijabetesa, na receptorskom nivou se blokiraju glavni efekti povećane sekrecije Ang II.

RAS polimorfizmi i dijabetesna nefropatija

Efikasnost ACE inhibitora i AT1 blokatora je bila polazna tačka za studije u kojima su proučavani polimorfizmi RAS gena, pre svega AGT, ACE i AT1 gena i njihova uloga u razvoju dijabetesne nefropatije. Od značaja je što ova istraživanja mogu koristiti za predviđanje odgovora pacijenata na terapiju. Ako se pretpostavi da nivo ACE-a u plazmi utiče na konverziju Ang I u Ang II u glomerularnoj cirkulaciji, može se testirati uloga

polimorfizma gena ACE u razvoju dijabetesne nefropatije. Takođe, genetički determinisan nivo AGT može uticati na nivo Ang II a samim tim i na ukupnu aktivnost RAS sistema.

Pacijenti sa tipom I dijabetesa čine grupu koja ima povećan rizik za razvoj ozbiljnih komplikacija kakve su dijabetesna nefropatija, retinopatija i kardiovaskularne bolesti. Među genima koji su povezani sa razvojem komplikacija na krvnim sudovima, geni renin-angiotenzinskog sistema su do sada najviše ispitivani. Nivo prorenina, renina, angiotenzin-konvertujućeg enzima i angiotenzina II je povišen u dijabetesnoj nefropatiji. Geni renin-angiotenzinskog sistema su takođe i genetičke determinante za hipertenziju i kardiovaskularne bolesti koje su češće prisutne kod pacijenata sa dijabetesnom nefropatijom [63].

Još 1994. godine, Marre i saradnici prvi su objavili rezultate pozitivne asocijacije ACE-D alela sa razvojem dijabetesne nefropatije. ACE I/D polimorfizam je definisan prisustvom/odsustvom Alu repetitivne sekvence duge 287 baznih parova u intronu 16. Oko 50% varijanse u nivou ACE u serumu se može objasniti ovim polimorfizmom. Pacijenti homozigoti za D alel su imali dvostruko povećanje nivoa ACE u serumu u poređenju sa homozigotnim pacijentima za I alel [56]. DD genotip je takođe bio povezan sa višim nivoom ACE u serumu.

Ipak, asocijacija između ACE polimorfizama i esencijalne hipertenzije je kontroverzna. U mnogim studijama nije pronađena korelacija između nivoa ACE u plazmi i hipertenzije niti između ACE-DD genotipa i hipertenzije. Odgovor na ACE inhibitore kod hipertenzivnih pacijenata se smatra, bar delom, determinisan ACE genotipom, što nije potvrđeno u svim studijama [111]. Zee i sar. su 1992 godine ukazali na pozitivnu asocijaciju između ACE polimorfizma i hipertenzije, sa većom frekvencom I alela kod hipertenzivnih pacijenata sa porodičnom istorijom hipertenzije, u poređenju sa normotenzivnim ispitanicima [112].

Takođe, praćena je redukcija albuminurije posle terapije ACE inhibitorima kod obolelih od dijabetesa tip I sa dijabetesnom nefropatijom. Kod pacijenata sa II genotipom,

albuminurija je redukovana za 61% u poređenju sa samo 31% redukcije kod pacijenata sa DD genotipom [58].

A1166C polimorfizam AT1 receptora je posledica transverzije adenina u citozin na 1166. nukleotidnom mestu. Uloga ovog polimorfizma je takođe ispitivana u dijabetesnoj nefropatiji ali su opet dobijeni kontroverzni rezultati [11]. U nekim studijama pokazana je pozitivna asocijacija CC genotipa sa hipertenzijom, dok u drugima nije [64,65,66]. Prethodne studije su ukazale na ulogu polimorfizma AGT gena, pre svega M235T, u povećanju nivoa angiotenzinogena u plazmi i esencijalnoj hipertenziji. Uloga ovog polimorfizma je takođe ispitivana u razvoju dijabetesne nefropatije, ali opet su dobijeni kontroverzni rezultati. Pored činjenice da je TT genotip značajan u brzini progresije terminalne bolesti bubrega u odnosu na MM genotip, analizirana je i brzina progresije terminalne bolesti bubrega kod osoba sa kombinacijom genotipova. Studija iz 2003. je pokazala da su pacijenti sa kombinacijom genotipova imali najveći rizik od oštećenja bubrega indukovano hipertenzijom. Takođe su Jacobsen i sar. (2003) [106] pratili veliku grupu pacijenata obolelih od tipa 1 dijabetesa sa dijabetesnom nefropatijom i ispitivali uticaj polimorfizma RAS sistema na opadanje stope glomerulske filtracije i razvoj terminalne bolesti bubrega. Postavljena je hipoteza da varijable kao što su: trajanje dijabetesa, porodična anamneza za hipertenziju, dijabetes i kardiovaskularne bolesti, klinički parametri (vrednost krvnog pritiska, hipertenzija, parametri lipidnog statusa, dugoročne glikoregulacije i bubrežne funkcije), utiču na ubrzano opadanje stope glomerularne filtracije.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su bili sledeći:

- 1) Odrediti učestalosti genotipova i alela gena za angiotenzinogen (AGT M235T i T174M polimorfizmi), angiotenzin-konvertujući enzim (ACE I/D polimorfizam) i gena za AT1 receptor (A1166C polimorfizam) kod ispitanika sa insulin-zavisnim dijabetesom bez nefropatije, sa incipijentnom nefropatijom i manifestnom nefropatijom.
- 2) Ispitati da li postoji povezanost učestalosti ispitivanih polimorfizama gena sa stepenom razvoja nefropatije.
- 3) Odrediti haplotipove polimorfizama M235T i T174M gena za AGT i ispitati da li postoji povezanost haplotipova sa stepenom razvoja nefropatije.
- 4) Utvrditi da li postoji povezanost učestalosti ispitivanih polimorfizama gena sa ostalim komplikacijama dijabetesa.
- 5) Analizirati kliničko demografske podatke ispitanika u odnosu na stepen razvoja nefropatije i utvrditi da li postoji povezanost učestalosti ispitivanih polimorfizama i relevantnih kliničkih parametara.

MATERIJAL I METODE

Ispitivanje, u vidu prospektivne kliničko eksperimentalne studije, sprovedeno je na Odeljenju za molekulska medicinu Instituta za Medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije u Beogradu i u saradnji sa Klinikom za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog Centra Srbije gde su pacijenti bili hospitalizovani. Izvođenje ove studije je odobreno od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu u skladu sa odredbama Helsinške deklaracije o zaštiti ljudskih prava (Br. 1131)

Istraživanje je obuhvatilo 79 pacijenata sa tipom I dijabetesa, oba pola, starosti 20-40 godina, sa trajanjem dijabetesa dužim od 5 godina. Pacijenti su podeljeni prema stepenu razvoja bubrežnih komplikacija u tri grupe:

- ispitanici bez nefropatije (mikroalbuminurija manja od 30 mg/24h)
- sa incipijentnom nefropatijom (mikroalbuminurija 30-300mg/24h)
- sa manifestnom nefropatijom (mikroalbuminurija veća od 300mg/24h)

Uzorak periferne krvi pacijenata sa antikoagulansom, koji se inače koristi za hematološke analize, a u ovom slučaju za molekularno-genetička istraživanja, uziman je istovremeno sa uzorkovanjem za laboratorijske analize. Prikupljeni su i podaci značajni za istraživanje: godine starosti ispitanika, trajanje dijabetesa, porodična anamneza za hipertenziju, dijabetes i kardiovaskularne bolesti, zatim klinički parametri koji su obuhvatili vrednosti hipertenzije, krvnog pritiska, parametre lipidnog statusa (ukupni holesterol, LDL-holesterol, HDL-holesterol, trigliceridi), dugoročne glikoregulacije (24-časovni profil glikemije, HbA1c) i bubrežne funkcije, određivan je po prijemu pacijenata na kliniku. Vrednosti albumina mereni su nefelometrijskom metodom. Detekcija genotipova i učestalosti alela u genu za angiotenzinogen (AGT M235T i T74M) i AT1 receptor (A1166T) rađena je PCR-RFLP metodom korišćenjem restrikcionih enzima. Za analizu genotipova i učestalosti alela za angiotenzin-konvertujući enzim (ACE), koristili smo standardni PCR protokol.

U cilju statističke analize dobijenih rezultata korišćen je SPSS statistički paket (Chicago, Illinois). Primenjene su metode deskriptivne statistike (srednja vrednost,

standardna devijacija, MIN, MAX) i analitičke statistike (Studentov t-test, χ^2 test, Pearson-ov koeficijent korelacije, Mann-Whitney U test, Kruskal-Wallis test i ANOVA). Logističkim regresionim modelom je ispitivana veza nefropatije i drugih analiziranih varijabli.

Vrednosti neravnoteže vezanosti (Linkage Disequilibrium-LD) su računane za polimorfizme M235T i T174M pomoću programa SNPStats (Sole et al., 2006) [109]. LD vrednost za analizirani par polimorfizama je izražen preko koeficijenta D' . SNPStats program omogućava i računanje učestalosti haplotipova u analiziranoj grupi –populaciji nesrodnika, kao i analizu asocijacije identifikovanih haplotipova sa ishodom (u našem slučaju, sa nastankom mikroalbuminurije i proteinurije).

Funkcionalni status bubrega je procenjivan na osnovu laboratorijskih parametara nivoa uree i kreatinina u serumu, klirensa uree i kreatinina i merenja nivoa albumina u dvadesetčetvoročasovnom urinu. U cilju procene uloge u progresiji dijabetesne nefropatije određivani su parametri lipidnog statusa, trigliceridi, holesterol i serumska koncentracija LDL i HDL frakcije

U cilju procene regulisanosti dijabetesne bolesti određivani su sledeći parametri:

1. Serumska koncentracija glikoze
2. Nivo hemoglobina A 1c (HbA1c)

Svim ispitanicima je izvršen oftalmološki pregled u cilju utvrđivanja prisustva dijabetesne retinopatije i neurološki pregled u cilju utvrđivanja polineuropatije na Oftalmološkoj Klinici i Klinici za neurologiju Kliničkog Centra Srbije.

Laboratorijske analize

1. Albuminurija je određivana iz uzorka 24h urina uz korišćenje komercijalnih NycoCard testova (Oslo, Norveška) na NycoCard čitaču. Nakon vezivanja albumina iz

uzorka za anti-albuminska antitela, kao i za antitela iz dodatog konjugata (sendvič reakcija), dolazi do promene boje na membrani (na kojoj se odigrava reakcija) čiji je intenzitet srazmeran koncentraciji albumina u uzorku. Gornja granica referentnih vrednosti je 30 mg/dU.

2. Parametri lipidnog statusa određivani su standardnim biohemijskim analizama. Ukupni holesterol i trigliceridi određivani su standardnim enzimskim postupkom uz korišćenje reagenasa firme BIOMERIEUX. Holesterol u HDL-frakciji je određivan nakon izolovanja ove frakcije metodom po Bursteinu i sar. (1970). LDL holesterol se izračunavao po formuli Friedewalda i sar. (1972). Referentne vrednosti za lipidni status su uzete iz Odeljenja za specijalizovanu laboratorijsku dijagnostiku, Centra za laboratorijsku medicinu.

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

Izolacija DNK

DNK je izolovana iz periferne krvi pacijenata korišćenjem komercijalnog kita Flexi Gene DNA Kit (QIAGEN, Nemačka) ili na aparatu ABI PRISM 6100 Nucleic Acid Prep Station (Applied Biosystems, SAD) prema uputstvu proizvođača.

Određivanje koncentracije DNK u uzorku

Koncentracija DNK u uzorku je određivana spektrofotometrijskom metodom. Koncentracija rastvora određene supstance se određuje na osnovu količine svetlosti određene talasne dužine koju dati rastvor apsorbuje. Količina apsorbovanog zračenja naziva se

apsorbanca (A) i ona je, prema Lambert-Beerovom zakonu proporcionalna koncentraciji supstance koja apsorbuje zračenje i debljini sloja te supstance:

$$A = \epsilon \times c \times d,$$

ϵ - molarni apsorpcioni koeficijent (konstanta koja zavisi od prirode supstance)

c - koncentracija rastvora

d - dužina svetlosnog puta kroz rastvor

Apsorbanca DNK izolovane iz uzoraka periferne krvi je merena na Gene Quant spektrofotometru (Pharmacia LKB, Švedska). Na osnovu izmerene apsorbance je određivana koncentracija DNK u uzorku i količina uzorka koja se stavlja u smešu za PCR reakciju.

Koncentracija DNK u uzorku, izražena u $\mu\text{g/mL}$, izračunava se prema formuli:

$$c (\mu\text{g/mL}) = (A_{260} \times R \times 50 \times OP) / 1000$$

gde je:

A_{260} - apsorbanca izmerena na talasnoj dužini od 260 nm

R - razblaženje, koje u ovom slučaju iznosi 100

50 - faktor konverzije dvolančane DNK (koeficijent za jednolančanu

DNK je 37, a za RNK 40),

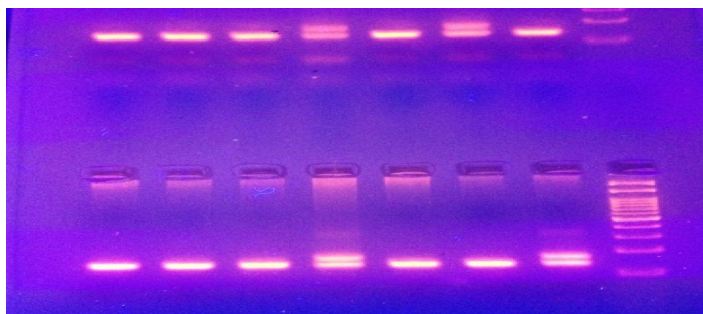
OP - optički put, tj. debljina kivete; $OP = 1 \text{ cm}$

U cilju određivanja stepena kontaminacije DNK proteinima, vrše se dodatna merenja optičke gustine na talasnoj dužini od 280 nm (λ_{max} za proteine). Šum instrumenta se meri na talasnoj dužini od 320 nm. Računa se odnos A_{260} / A_{280} . Za čistu DNK, A_{260} / A_{280} je veće ili jednako 1.8, a manje vrednosti pokazuju da je DNK kontaminirana proteinima. Za kvalitetan PCR, zadovoljavajuća vrednost čistoće se nalazi u opsegu od 1.6- 2.0.

Elektroforeza genomske DNK na agaroznom gelu

Kvalitet izolovane DNK je proveravan elektroforezom na 2% agaroznom gelu, u 0.5 x TBE puferu (0.89 M Tris, 0.89 M Borna kiselina, 25mM EDTA).

U bunariće formirane na gelu, nanosi se 5 μ L rastvora izolovane DNK i 2 μ L boje (6x Loading Buffer: 0.25 % brom-fenol plavo, 0.25% ksilen-cijanol i 20% ficol 400). Elektroforeza (PEQLAB EV231, UK) se odvija 30 min u 0.5xTBE puferu, pri naponu od 80V i jačini stuje od 25-40 mA. Negativno naelektrisana DNK u električnom polju, koje se prostire duž gela na neutralnom pH, migrira u smeru anode.



Slika 13. Provera PCR amplifikata AGT gena na 2% agaroznom gelu. Na dnu bunarića su vidljive fluorescentne trake amplifikovane DNK. Zadnji bunarić na gelu je marker molekulske težine

Gel se analizira pod svetlošću transiluminatora (Pharmacia LKB, Švedska). Ako je izolovana DNK dobrog kvaliteta, tj. nije fragmentisana, na dnu bunarića gela se vidi jaka traka genomske DNK (Slika 13), koja je isuviše velike mase da bi mogla da prođe kroz pore gela pa se zadržava u bunariću. Ako je došlo do fragmentacije DNK ispod bunarića uočavamo razmaz.

Faktori koji utiču na stepen migracije DNK u agaroznom gelu su: molekulska masa, konformacija i bazni sastav DNK, koncentracija agaroze, primenjena voltaža, smer električnog polja, temperatura, prisustvo interkalirajućih boja i sastav i jačina pufera za elektroforezu.

Lančana reakcija polimerizacije DNK (PCR)

Lančanu reakciju polimerizacije (eng. *Polymerase Chain Reaction*- PCR) PCR je *in vitro* amplifikacija definisane DNK sekvence i predstavlja imitaciju *in vivo* procesa DNK replikacije uz pomoć termostabilne DNK polimeraze. Prednost PCR-a nad drugim tehnikama je visoka senzitivnost ove metode koja se odnosi na minimalnu količinu materijala neophodnu za amplifikaciju određenog fragmenta. Visoka specifičnost, određena je selektivnom hibridizacijom prajmera sa komplementarnim DNK sekvencama koje ograničavaju DNK fragment koji se amplifikuje.

Ova metoda je otvorila nova polja istraživanja u fundamentalnoj nauci i u praksi omogućila brzu i preciznu dijagnostiku naslednih i infektivnih oboljenja. PCR se primenjuje ne samo u bazičnim istraživanjima, već i u kliničkoj dijagnostici i forenzici, agronomiji, antropologiji i mnogim drugim oblastima. PCR se koristi u dijagnostici naslednih oboljenja, za koje je poznat poremećaj u odgovarajućem genu a koji je odgovoran za nastanak bolesti. Ovakve analize se mogu koristiti za potvrdu bolesti, pre pojave prvih simptoma, za detekciju nosilaca mutiranog gena prenatalno ili pre implantacije embriona, za selekciju zdravih embriona.

PCR reakcija se odvija u mikrotubi zapremine 0.2-0.5 mL gde se podvrgava preciznim, cikličnim promenama temperature što ima za posledicu amplifikaciju tačno određenog gena ili dela gena. Broj umnoženih fragmenata u PCR-u eksponencijalno raste, jer svaki novosintetisani lanac u sledećem ciklusu služi kao matrica za sintezu novog molekula DNK. Specifičan fragment se za približno dva sata amplifikuje 10^6 - 10^9 puta.

PCR amplifikacija se sastoji iz:

Denaturacije: temperatura na kojoj se vrši i dužina trajanja inicijalne denaturacije zavise od GC sadržaja određene DNK. Denaturacija se efikasno vrši na temperaturama 92-96 °C a zagrevanje uzorka na temperaturi od 95 °C u trajanju od 30 sekundi do jednog minuta je najčešće dovoljan period za denaturaciju dvolančanog DNK molekula.

Hibridizacije (aniling) prajmera: uspostavljanje vodoničnih veza između prajmera i komplementarne sekvence matrice je korak od koga zavisi specifičnost PCR-a. Verovatnoća da prajmer nađe komplementarnu ciljnu sekvencu, kao i temperatura i vreme potrebni za hibridizaciju zavise od baznog sastava, dužine i koncentracije prajmera.

Elongacija prajmera: optimalna temperatura za aktivnost Taq polimeraze iznosi 72°C i predstavlja sukcesivno dodavanje dezoksiribonukleotida na 3'OH kraj, redosledom koji je dirigovan sekvencom matrice.

Finalne elongacije prajmera: sledi nakon poslednjeg PCR ciklusa koja se izvodi na temperaturi elongacije u trajanju od 10 minuta. Dolazi do kompletiranja parcijalno sintetisanih PCR produkata. Nakon ovog koraka, PCR smeša se inkubira na sobnoj temperaturi 20-30 minuta, što omogućava hibridizaciju komplementarnih jednolančanih PCR produkata.

Za PCR reakciju koriste se sledeće komponente:

1. Jednolančana DNK matrica koja se dobija toplotnom denaturacijom native dvolančane DNK. Za genetičke analize se koristi obično 100-500 ng genomske DNK. Za detekciju infektivnog agensa treba koristiti maksimalnu količinu uzorka DNK;

2. Prajmeri za PCR, su sintetički jednolančani DNK fragmenti, oligonukleotidi, neophodni za započinjanje sinteze DNK. Za reakciju su neophodna dva prajmera koji definišu dužinu amplifikovanog regiona. Dužina prajmera je 14-40 nukleotida. G/C sadržaj se kreće od 40 do 75% što utiče na optimalnu temperaturu hibridizacije. Tačka topljenja prajmera je od 42-65°C i set prajmera se bira tako da oba prajmera imaju sličnu tačku topljenja. Optimalne koncentracije prajmera u PCR reakcionoj smeši su od 0.1-0.6 μM.

3. dNTP (dezoksiribonukleotidi): obično se koriste štokovi 10 mM rastvora svakog dNTP-a koji se čuvaju na -20°C. U standardnoj PCR reakcionoj smeši svaki nukleotid je zastupljen u koncentraciji od 20-200 μM, što obezbeđuje optimalan balans prinosa, specifičnost i vernost amplifikacije. Povećanje koncentracije dNTP-ova smanjuje

koncentraciju slobodnih Mg^{2+} , te uvek treba da bude praćeno povećanjem koncentracije Mg^{2+} u reakcionoj smeši.

4. Taq polimeraza: izolovana iz bakterije *Thermus aquaticus* koja živi u toplim izvorima Jeloustonskog parka, prvi je predstavnik termostabilnih polimeraza. Ovaj polipeptid je visoko procesivna 5'-3' DNK zavisna DNK polimeraza bez 3'-5' egzonukleazne aktivnosti. Optimalna koncentracija DNK polimeraze u PCR reakcionoj smeši od 50 μ L iznosi od 0.5-2.5 U.

5. Joni Mg^{2+} : grade komplekse sa dNTP-ovima, koji su kao takvi supstrat za Taq polimerazu. Neophodni su i za rad same Taq polimeraze, koja je metaloprotein i za svoju aktivnost zahteva prisustvo slobodnih Mg^{2+} jona.

6. PCR pufer: obezbeđuje pH optimalan za rad termostabilnih polimeraza, koji iznosi od 8.3 do 9.2 u zavisnosti od tipa polimeraze. Oni takođe mogu uticati na stabilnost DNK matrice.

7. PCR aditivi: imaju višestruku funkciju kao što je omogućavanje kompletnije denaturacije molekula DNK, eliminišu sekundarne strukture ciljne sekvence, snižavaju tačke topljenja prajmera, stabilišu Taq polimerazu. Tu spadaju: dimetilsulfoksid (DMSO), formamid, glicerol, goveđi serum albumin (BSA), želatin, Tween20, Triton X100.

PCR reakcija za umnožavanje M235T i T174M regiona AGT gena odigravala se u 25 μ L reakcione smeše, koja se sastojala od:

150 ng genomske DNK, 12.5 μ L AmpliTaq Gold PCR MasterMix-a 2x: AmpliTaq Gold DNA Polymerase (0.05U/ μ l), GeneAmp PCR Gold Buffer 30 mM TRIS/HCl, pH 8.05; 100 mM KCl; dNTP 400 μ l svaki, $MgCl_2$ 5mM; stabilizatori (Applied Biosystems), 0.1 μ M "sense" i "antisense" prajmera i sterilne redestilovane vode. Reakcija se odvijala u aparatu Mastercycler Gradient (Eppendorf, Nemačka).

Sekvence prajmera za umnožavanje M235T i T174M regiona AGT gena su:

- M235T** sense: 5'- CCG TTT GTG CAG GGC CTG GCT CTC T- 3'
antisense: 5'- CAG GGT GCT GTC CAC ACT GGA CCC C-3'
- T174M** sense: 5' TGG CAC CCT GGC CTC TCT CTA TCT 3'
antisense: 5' CAG CCT GCA TGA ACC TGT CAA 3'
- ACE (I/D)** sense :5'- CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3'
antisense: 5'- GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T-3'

PCR reakcija za umnožavanje ACE (I/D) genotipa odigravala se u 50 µl reakcione smeše, koja se sastojala od:

100 ng genomske DNK, 12.5 µl AmpliTaq Gold PCR MasterMix-a 2x: AmpliTaq Gold DNA Polymerase (1.2 U/µl), GeneAmp PCR Gold Buffer 10 mM TRIS/HCl, pH 8.05; 50 mM KCl; dNTP 0,5mM svaki, MgCl₂ 5mM; stabilizatori (Applied Biosystems), 0.2µM "sense" i "antisense" prajmera i sterilne redestilovane vode [67]. Reakcija se odvijala u aparatu Mastercycler Gradient (Eppendorf, Nemačka).

- A1166C** sense :5'- GCAGCACTTCACTACCAAATGGGC-3'
antisense:5'- CAGGACAAAAGCAGGCTAGGGAGA-3'

PCR reakcija za umnožavanje A1166C regiona u genu za AT1 receptor odigravala se u 50 µl reakcione smeše, koja se sastojala od:

250 ng genomske DNK, 12.5 µl AmpliTaq Gold PCR MasterMix-a 2x: AmpliTaq Gold DNA Polymerase (2 U/µl), GeneAmp PCR Gold Buffer 10 mM TRIS/HCl, pH 8.05; 50 mM KCl; dNTP 200mM svaki, MgCl₂ 5mM; stabilizatori (Applied Biosystems), 0.2µM "sense" i "antisense" prajmera i sterilne redestilovane vode [68]. Reakcija se odvijala u aparatu Mastercycler Gradient (Eppendorf, Nemačka).

Uspešnost PCR amplifikacije se proverava elektroforezom na 2% agaroznom gelu.

Analiza polimorfizama restrikcionih mesta (analiza RSP-ova)

Razlike koje postoje u određenom DNK lokusu između individua jedne vrste označene su kao DNK polimorfizmi, dok su različite forme postojanja jednog DNK lokusa označene kao aleli. Postoje dva tipa DNK polimorfizama: (1) polimorfizmi nukleotidne sekvence, vezani za varijabilnost tipa bazne zamene (tačkasti polimorfizmi ili SNPs) ili za inserciju ili deleciju određenog niza nukleotida (inserciono-delecioni polimorfizmi) i (2) polimorfizmi dužina sekvence, vezani za različit broj ponovaka u mini- i mikrosatelitskim lokusima. Polimorfizmi nukleotidne sekvence su bialelski markeri jer stvaraju dva alela koji se razlikuju u prisustvu odnosno odsustvu određenog nukleotida ili niza nukleotida, dok polimorfizmi dužina predstavljaju multialelske markere, s obzirom da stvaraju veliki broj alela koji se razlikuju u broju ponovaka. DNK polimorfizmi su postali nezamenljivi markeri u bazičnim istraživanjima molekularne genetike, a takođe su našli i praktičnu primenu u medicinskoj dijagnostici i humanoj identifikaciji.

Polimorfizmi za restrikciono mesto (eng. *Restriction Site Polymorphisms*-RSPs) su polimorfizmi nukleotidne sekvence koji nastaju mutacijom (tačkastom mutacijom ili malom insercijom ili delecijom) u okviru sekvence koju prepoznaje neki restrikcioni enzim. Analiza RSP-ova se primenjuje u slučajevima kada se mutacijom kreira ili ukida određeno restrikciono mesto. RSP-ovi se mogu detektovati analizom polimorfizama dužine restrikcionih fragmenata (eng. *Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP) ili restrikcionom digestijom PCR produkata. Ukoliko je mutacija takva da ukida određeno restrikciono mesto detektovaće se duži restrikcioni fragment koji se vidi na gelu kao traka koja sporije migrira.

Restrikcioni enzimi koji se koriste su endonukleaze tipa II. U bakterijskim ćelijama ovi enzimi imaju ulogu da štite ćeliju od stranih molekula DNK koji u bakterijsku ćeliju mogu da dospeju virusnom infekcijom ili transformacijom. Za svaki od njih je karakteristično da vrlo specifično prepoznaje samo određeni niz nukleotida obično dugačak 4–8 bp i na tom mestu preseca molekul DNK. Nizovi nukleotida koje ovi enzimi prepoznaju nazivaju se restrikciona mesta i najčešće su palindromski. Palindromi su dvostruko simetrični nizovi

nukleotida u dvolančanoj DNK, koji su identični kada se u oba lanca čitaju u istom smeru (npr. 5'→3'). Pored restrikcionih endonukleaza bakterije sadrže i odgovarajuće modifikujuće enzime koji metiluju baze (C ili A) u okviru restrikcionih mesta i na taj način štite sopstveni genom od delovanja restrikcionih enzima. Detekcija RSP-ova PCR-om podrazumeva dizajniranje prajmera koji okružuju dati RSP, amplifikaciju te sekvence iz genomske DNK, digestiju dobijenih PCR produkata sa odgovarajućim restrikcionim enzimom i proveru veličine produkata digestije agaroznom ili poliakrilamidnom gel elektroforezom. Nakon vizuelizacije na osnovu dužine i broja fragmenata dobija se direktna informacija o prisustvu/odsustvu mutacije.

Detekcija M235T i T174M polimorfizma u genu za angiotenzinogen je izvršena restrikcionim enzimom *Psy I* i *NcoI* (Fermentas, Livanija) koji je izolovan iz bakterije *Nocardia corallina*. U reakcionu smešu zapremine 25 µl stavljeno je 10 µl PCR reakcione smeše, 18 µl *nuclease-free* vode, 2 µl 10X Tango pufera i 1 µl *NcoI* enzima. Rastvor je stavljen na inkubaciju 16 časova na 37° C. U M235T regionu dva specifična mismatch-a su inkorporirana na pozicije 4 i 5 od 3' kraja "antisense" prajmera i ako je prisutan T 235 alel, formira se specifično restrikciono mesto (Ishigami et al. 1995). Ova inkorporacija nije uticala na amplifikaciju DNK. Restrikcioni enzim *Psy I* prepoznaje sledeće restrikciono mesto:

5'-G A C N*N N G T C -3'

3' -C T G N N*N C A G -5'

Restrikcioni enzim *NcoI* (za T174M polimorfizam) prepoznaje sledeće restrikciono mesto

5' -C*C A T G G -3'

3' -G G T A C*C -5'

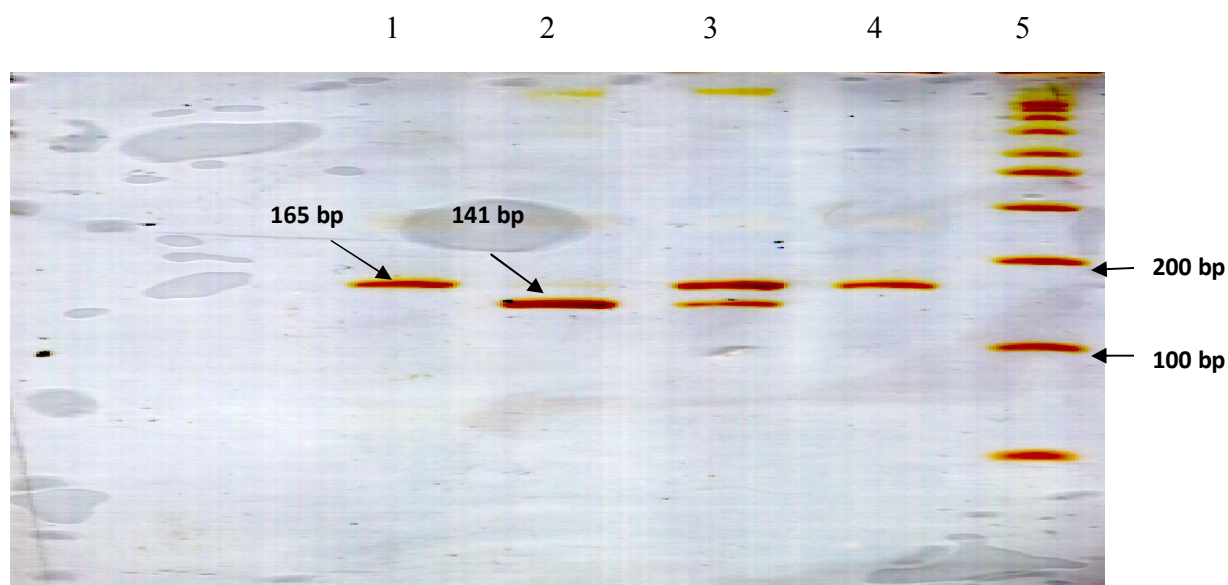
A1166C polimorfizam smo detektovali primenom restrikcione endonukleaze *Hae III* (Fermentas, Livanija). Restrikcioni enzim prepoznaje sledeće restrikciono mesto.

5' -G G* C C -3'

3' -G G* C C -5'

M235T polimorfizam AGT gena

Produkti amplifikacije i fragmenti dobijeni posle digestije restrikcionim endonukleazama, odvojeni su elektroforezom, na osnovu dužine na 10% poliakrilamidnom gelu i obojeni srebronitratom (Slika 14).

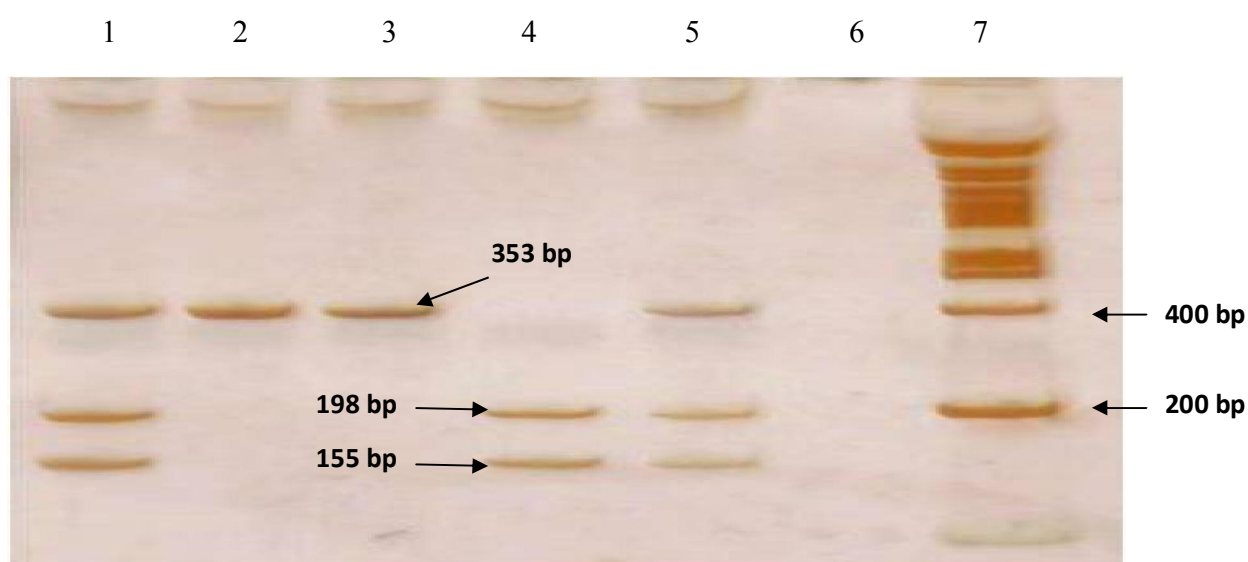


Slika 14. Analiza polimorfizama gena za angiotenzinogen (AGT M235T) u odnosu na dužinu restrikcionih fragmenata (RFLP) na 10% poliakrilamidnom gelu obojenom srebro nitratom. Kolona 1 (M235 alel - homozigot) od 165bp, kolona 2 (T235 alel - homozigot) težine 141bp. Kolona 3 - M/T 235 alel AGT gena -heterozigot. U koloni 5 je marker molekulske mase.

Duži fragmenti putuju kraće, zbog veće molekulske mase, a kraći fragmenti duže. Wild type M235 alel, koji nije digeriran enzimom Pst I, daje fragment od 165 baznih parova (bp), a mutirani 235T alel daje dva fragmenta od 141 i 24 bazna para. Kod osoba koje su homozigoti za M235 alel, na gelu se vidi jedna traka koja odgovara fragmentu od 165 bp; kod homozigota za T235 alel, vidi se traka od 141bp a kod heterozigota (M235/T235) na gelu su приметne dve trake od 165 i 141 bp. Poslednja kolona na gelu je marker molekulske mase.

T174M polimorfizam AGT gena

Amplifikovani segment AGT gena isečen je restrikcijom enzimom NcoI. Supstitucija C→T formira specifično restrikciono mesto, koje prepoznaje NcoI i seče segment od 353 bp na dva fragmenta od 198 i 155 bp. Ako nije došlo do supstitucije, enzim neće naći svoje restrikciono mesto i fragment neće biti isečen (Slika 15).

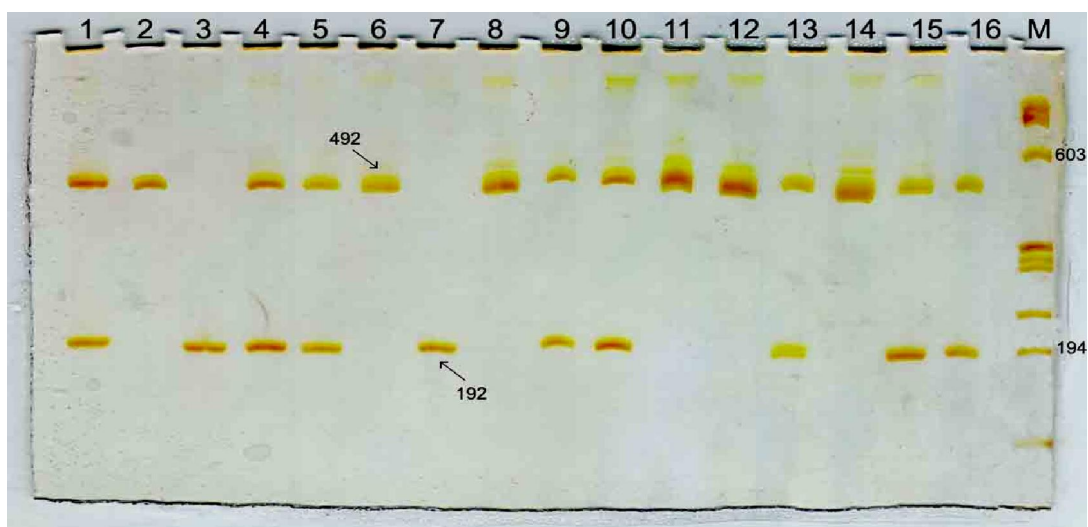


Slika 15. Analiza polimorfizama gena za angiotenzinogen (AGT T174M) u odnosu na dužinu restrikcijonih fragmenata (RFLP) na 10% poliakrilamidnom gelu obojenom srebro nitratom. Kolona 1 i 5 predstavlja heterozigotni oblik T174M AGT gena, kolona 2 i 3 je wt T174 alel, kolona 4 je mutiran 174M alel. Kolona 7 je marker molekulske mase.

Ako ispitivana osoba ima wild type T174 alel, tada se na gelu uočava fragment od 353 bp, koji nije isečen. Mutirani 174M alel, na gelu daje dva fragmenta od 198 i 155 bp. U prisustvu heterozigota T174/174M, na gelu su tri fragmenta, jedan od 353bp i druga dva na od 198bp i 155bp. Poslednja kolona na gelu je marker molekulske mase.

ACE I/D polimorfizam

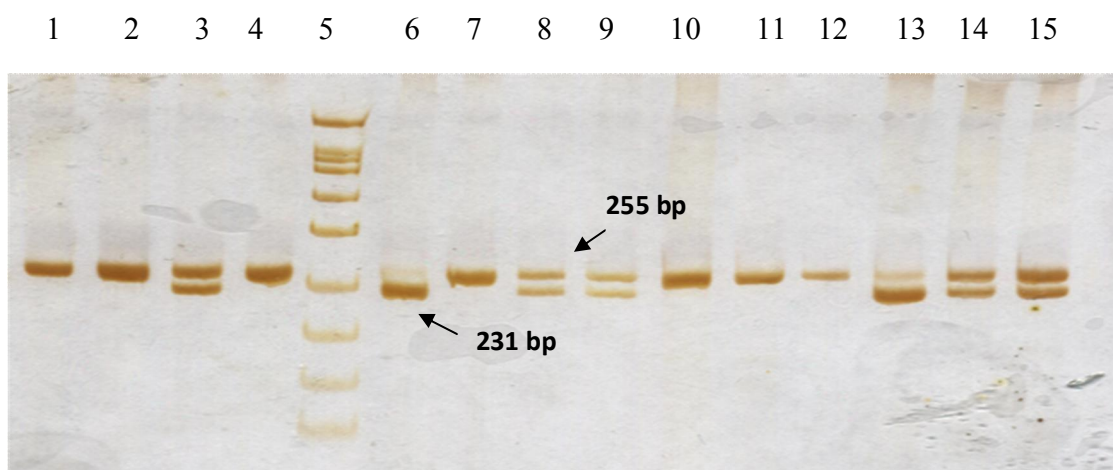
Inserciono-delecioni polimorfizam ACE gena je definisan prisustvom/odsustvom Alu repetitivne sekvence duge 287 baznih parova u intronu 16. Ovaj polimorfizam takođe vizuelizujemo na 10% poliakrilamidnom gelu. Traka koja odgovara insercionom polimorfizmu je dužine 492 bp dok traka od 192bp odgovara delecionom polimorfizmu. Kolona M je marker molekulske mase (Slika 16).



Slika 16. Analiza polimorfizama gena za angiotenzin-konvertujući enzim (ACE) na 10% poliakrilamidnom gelu obojenom srebro nitratom. II genotip, kolona 6, odgovara molekulskej masi od 492bp, DD polimorfizam, kolona 7 (192bp), kolona 5 I/D genotip (492/192 bp). Kolona M, marker molekulske mase.

A1166C polimorfizam

A1166C polimorfizam AT1 receptora je posledica transverzije adenina u citozin na 1166 nukleotidnom mestu što prepoznaje restrikciona endonukleaza Hae III. Normalan alel A1166 daje nedigeriran fragment od 255 bazna para dok mutiran alel 1166C daje fragmente od 231 i 24 bazna para (Slika 17).



Slika 17. Analiza polimorfizama gena za angiotenzin receptor tip 1 (AT1R) u odnosu na dužinu restrikcionih fragmenata (RFLP) na 10% poliakrilamidnom gelu obojenom srebro nitratom. U koloni 7 je homozigot AA od 255bp, u koloni 6 je homozigot za 1166C alel od 231bp. Kod heterozigota (A/C 1166) na gelu se vizuelizuju dve trake (255/231). Kolona 5, marker molekulske mase.

Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (PAGE)

Zbog mogućnosti visoke rezolucije, PAGE (PolyAcrilamide Gel Electrophoresis) je jedna od najboljih metoda za razdvajanje i vizuelizaciju fragmenata DNK. Prednost PAGE-a u odnosu na agarozni gel je veća rezolucija (moguće je razdvojiti molekule čija je razlika u dužini samo nekoliko baznih parova (bp)). U prisustvu slobodnih radikala, koje obezbeđuje amonijum persulfat (APS), a koji su stabilizovani TEMED-om (N, N, N', N'-tetrametilen-diamin), inicira se lančana reakcija u kojoj se monomeri akrilamida polimerizuju u duge lance. Kada se u reakciju polimerizacije uključi N, N'-metilenbisakrilamid, lanci se umrežavaju i formiraju gel, čija je poroznost određena dužinom lanaca i stepenom njihove međusobne povezanosti. Variranjem poroznosti gela, jačine pufera i dužine trajanja elektroforeze, dobija se željena specifičnost razdvajanja.

Za analizu polimorfizama dužine restrikcionih fragmenata analiziranih gena, korišćena je 10% poliakrilamidna gel elektroforeza u 0.5xTBE puferu.

Za pripremu 30 ml 10% poliakrilamidnog gela je potrebno:

- 10 ml 30% štoka nedenaturišućeg akrilamida (29g akrilamida: 1g N, N'-metilenbisakrilamida, doliveno do 100ml H₂O);
- 18.2 ml destilovane vode;
- 1.5 ml 10xTBE pufera
- 28 µl TEMED-a
- 400 µl 10% amonijum persulfata (1g amonijum persulfata, doliveno do 10 ml destilovane vode)

Po 10 µl uzorka i 2 µl boje nanosi se u bunariće, dok se u poslednji bunarić nanosi 5 µl markera i 2 µl boje. Vertikalna poliakrilamidna gel elektroforeza (Pharmacia LKB, Švedska)

se odvijala u 0.5xTBE puferu 1.5-2 sata, pri naponu od 150V i jačini struje od 20 mA, na sobnoj temperaturi.

Nakon završene elektroforeze, gel je bojen srebrom:

- 10 min u 10% etanolu (fiksiranje DNK)
- 3 min u 1% HNO₃ (ispiranje boje)
- Dva puta po 1 min u dH₂O (ispiranje gela)
- 20 min u 0.2 % AgNO₃ u mraku (bojenje gela)
- Dva puta po 1 min u dH₂O
- 5-10 min 0.1M Na₂CO₃ + 0.02% formaldehida (razvijač boje)

Za 5-10 min se pojavljuju trake

- Gel je fiksiran sa 10% CH₃COOH
- Sledećeg dana gel se ispere u dH₂O

Poliakrilamidna gel elektroforeza dala je odgovarajuću rezoluciju razdvajanja fragmenata dobijenih restrikcionom digestijom produkata PCR amplifikacije. Na osnovu prisustva i položaja traka u odnosu na marker molekulske težine DNK moguće je bilo odrediti genotip (Slika 14, 15, 16 i 17).

REZULTATI

I. Kliničko demografski podaci ispitanika u odnosu na stepen razvoja nefropatije

Studija je obuhvatila 79 pacijenata sa tipom I dijabetesa hospitalizovanih na Institutu za dijabetes i bolesti metabolizma u periodu od 2008-2010 godine. U tabeli 1. dat je prikaz demografskih podataka pacijenata.

Tabela 1. Prikaz demografskih podataka ispitanika sa tipom I dijabetesa

Stadijumi razvoja dijabetesne nefropatije	NA	MA	P	<i>p</i>
Broj ispitanika po grupama (<i>n</i>)	<i>n</i> =33	<i>n</i> =21	<i>n</i> =25	
Starost (godine)	28,1 ± 5,8	25,8 ± 6,8	34,2 ± 6,8	<0,001
Distribucija po polu (m/ž)(%)	42,4 / 57,6	47,6 / 52,4	36 / 64	NS ^c
Trajanje DM (godine)	9,6 ± 4,6	11,3 ± 4,4	21,9 ± 5,8	<0,001
Porodična anamneza za HTA <i>n</i> (%)	22 (66,7)	14 (66,7)	16 (64)	NS ^c
Porodična anamneza za DM <i>n</i> (%)	11 (33,3)	14 (66,7)	6 (24)	NS ^c
Porodična anamneza za KVB <i>n</i> (%)	16 (48,5)	13 (61,9)	8 (32,0)	NS ^c
Pušači(<i>n</i>)	14 (34,1)	12 (29,3)	15 (36,6)	NS ^c

DM-diabetes melitus, NA-normoalbuminurija, MA-mikroalbuminurija, P-proteinurija, HTA-hipertenzija, KVB-kardiovaskularne bolest, *n*- broj pacijenata u ispitivanim grupama; ^aANOVA, ^bKruskal Wallis, ^cχ² test

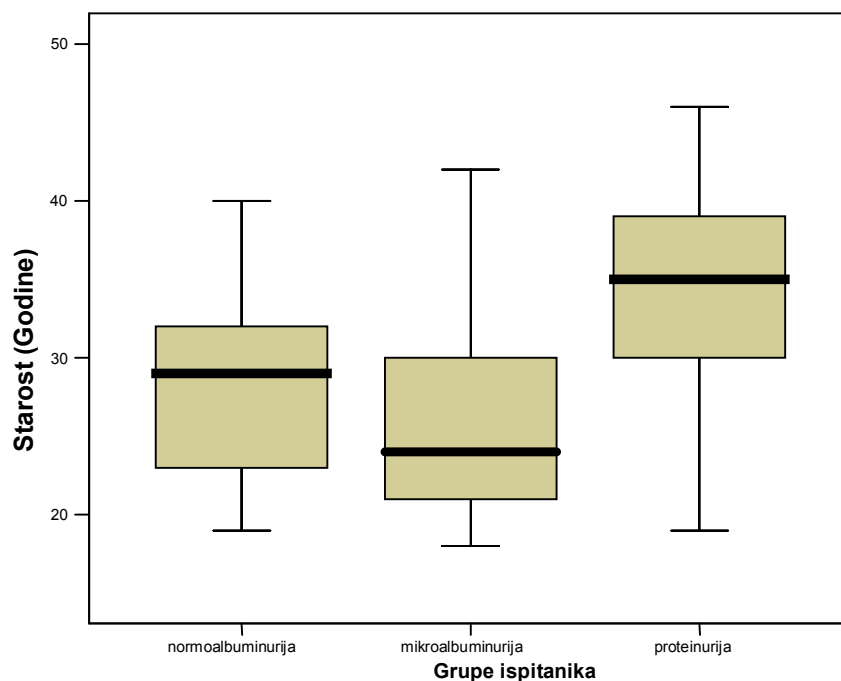
Tabela 2. Prikaz ispitivanih kliničkih parametara kod pacijenata sa tipom I dijabetesa.

Stadijumi razvoja dijabetesne nefropatije	NA	MA	P	<i>p</i>
Broj ispitanika po grupama (<i>n</i>)	<i>n</i> =33	<i>n</i> =21	<i>n</i> =25	
TA (mmHg)	121 ± 12	126 ± 14	148 ± 26	<0,001
Sistolni/dijastolni	79 ± 7	85 ± 9	92 ± 15	<0,001
Hipertenzija (<i>n</i> / %)	9 (27,3)	9 (42,8)	19 (76)	<0,001
Polineuropatija (<i>n</i> / %)	13 (39,4)	14 (66,7)	16 (64)	NS
Retinopatija (<i>n</i> / %)	7 (21,2)	11 (52,4)	19 (76)	<0,001
HbA1c (%)	9,3 ± 2,4	9,7 ± 3,6	10,4 ± 3,2	NS
Holesterol (<i>n</i> > 5,2 mMoL/L) (%)	11 (33,3)	7 (33,3)	10 (40)	NS
HDL (mMoL/L)	1,25 ± 0,39	1,18 ± 0,44	1,28 ± 0,38	NS
LDL (mMoL/L)	3,14 ± 1,06	3,05 ± 1,07	4,00 ± 1,58	NS
Trigliceridi (mMoL/L)	1,2 ± 0,6	1,8 ± 0,5	2,1 ± 0,8	<0,001

TA-krvni pritisak, HbA1c- hemoglobin A1c, HDL-high density lipoprotein, LDL- low density lipoprotein, *n*- broj pacijenata u ispitivanim grupama, **P* < 0.05 su predstavljene u bold/italic, korišćen ^aANOVA, ^bKruskal Wallis, ^cχ² test

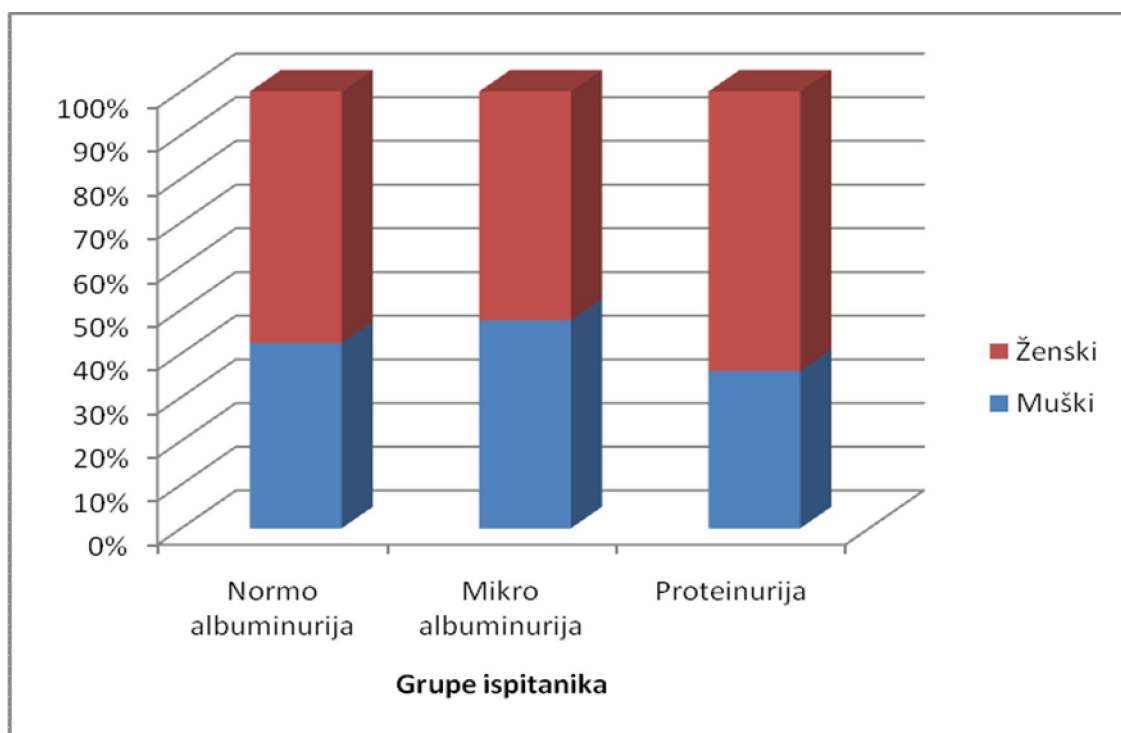
Od ukupnog broja pacijenata, 33 su bila normoalbuminurična (nivo albumina ispod 30 mg/24h), 21 pacijent je imao mikroalbuminuriju (albuminurija 30-300mg/24h) a 25 pacijenata je bilo sa proteinurijom (albuminurija iznad 300mg/24h) (Tabele 1 i 2). U tabeli 2 su navedeni klinički značajni parametri i faktori rizika za koje se pretpostavlja da doprinose ubrzanju opadanja stope glomerulske filtracije i razvoju terminalne bolesti bubrega.

Ispitivanjem starosne strukture ispitanika (Tabela 1, Slika 18) u rasponu od 20 do 40 godina, dobijena je značajna razlika između grupa pacijenata; prosečna starost bila je značajno veća u grupi pacijenata sa proteinurijom u odnosu na ostale pacijente.



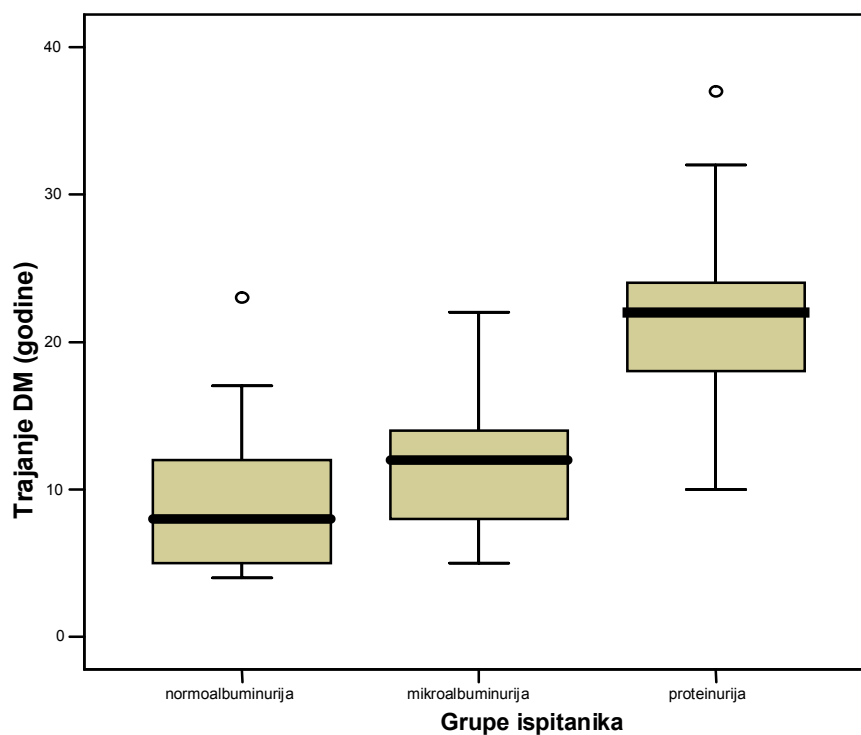
Slika 18. Srednje vrednosti i standardne devijacije godina starosti pacijenata u ispitivanim grupama

Na slici 19 je prikazana procentualna distribucija polova u grupi normoalbuminuričnih, mikroalbuminuričnih i proteinuričnih ispitanika. Odnos polova u grupama je sličan, a razlike koje postoje nisu statistički značajne ($\chi^2=0,643$; $p=0,725$).



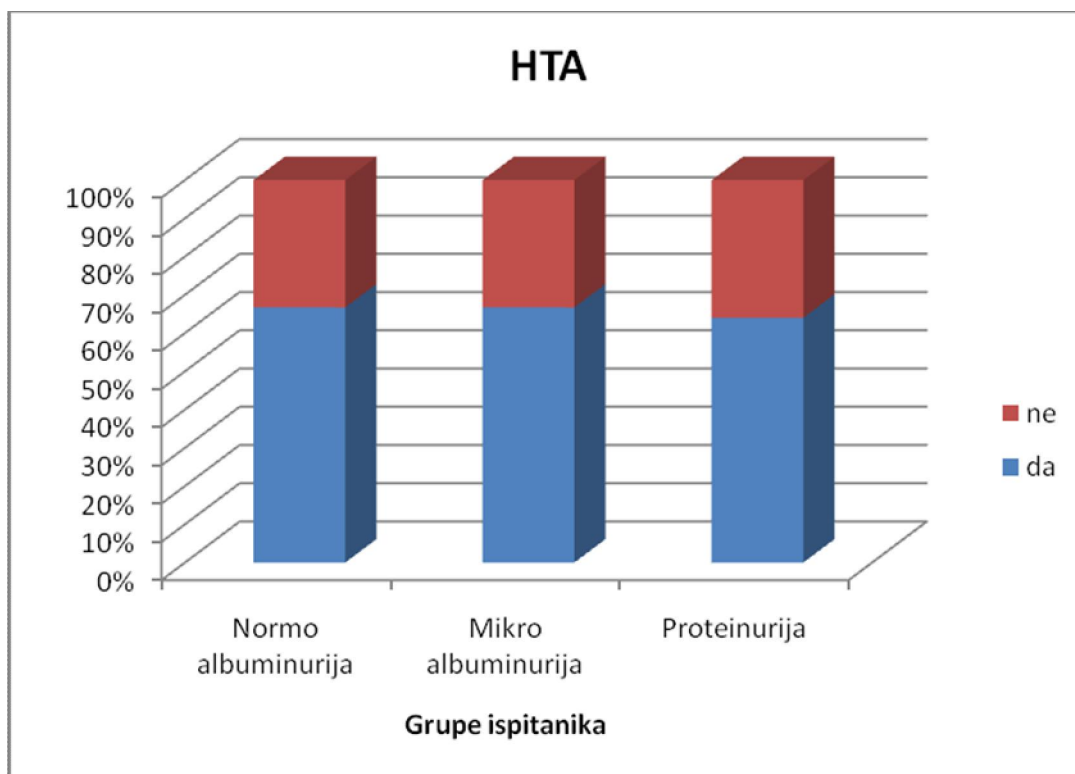
Slika 19. Procentualna distribucija po polu u tri ispitivane grupe pacijenata

Na slici 20. i u tabeli 1 prikazane su srednje vrednosti sa standardnom devijacijom dužine trajanja dijabetesa u ispitivanim grupama. Srednja vrednost trajanja dijabetesa u normoalbuminuričnih pacijenata bila je $9,6 \pm 4,6$ godina, mikroalbuminuričnih $11,3 \pm 4,4$ godine, a kod proteinuričnih $21,9 \pm 5,8$ godina, što je značajno duže u odnosu na ostale grupe ($p < 0,001$).



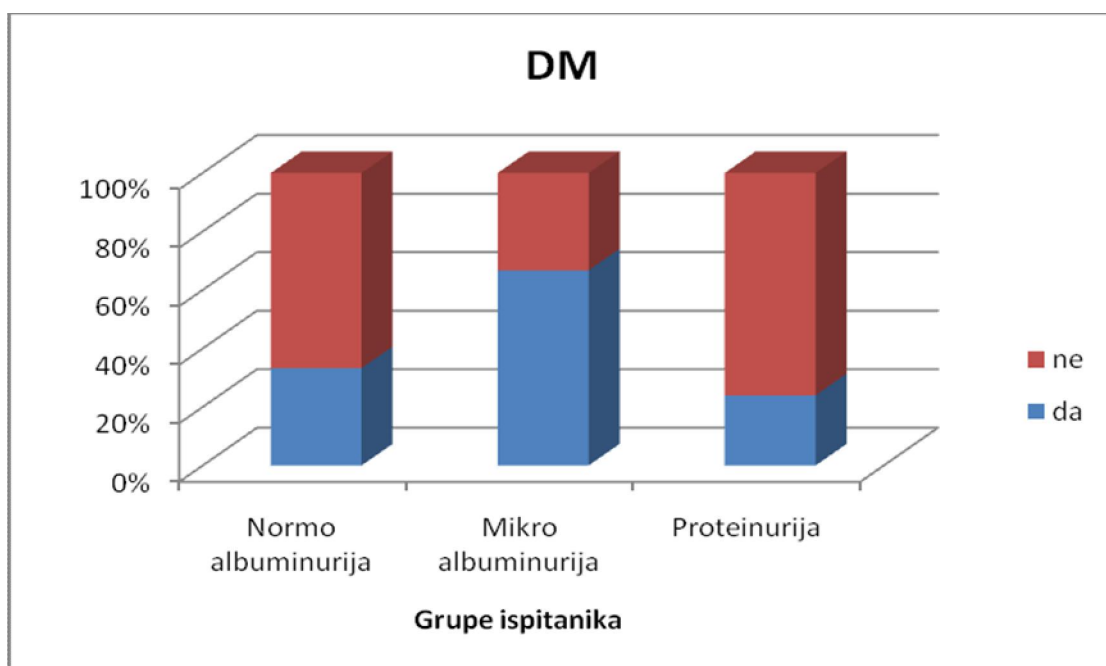
Slika 20. Srednje vrednosti i standardne devijacije dužine trajanja dijabetesa u ispitivanim grupama pacijenata.

Slika 21 prikazuje porodično opterećenje za pojavu hipertenzije u ispitivanim grupama pacijenata. Vrednosti pozitivne porodične anamneze za hipertenziju su gotovo izjednačene u ispitivanim grupama (66.7% : 66.7% : 64%).

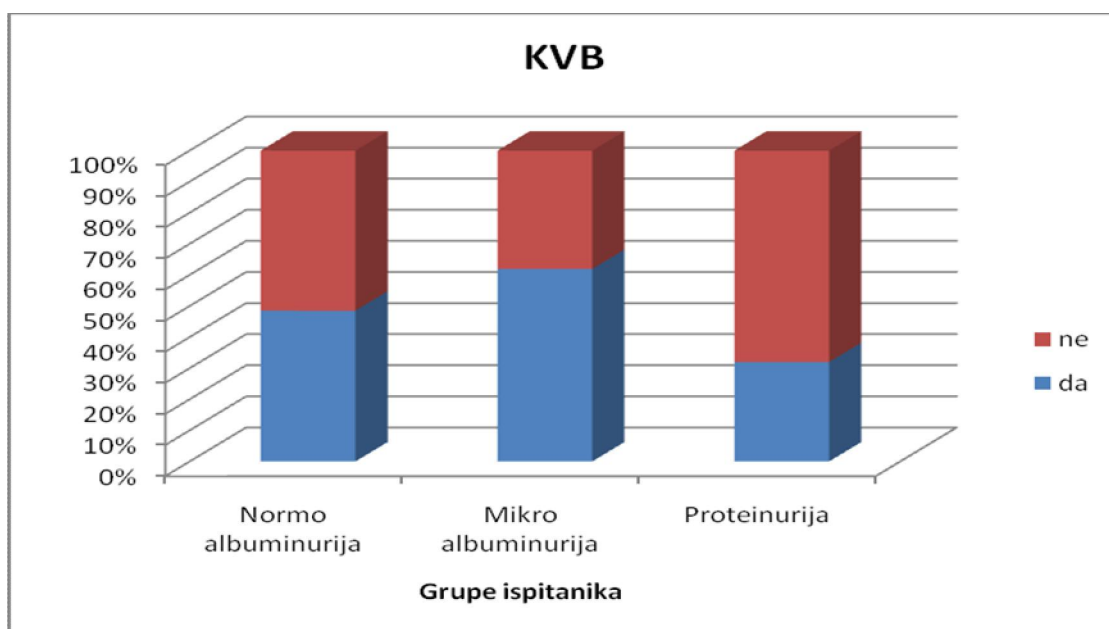


Slika 21. Procentualna distribucija pozitivne porodične anamneze za hipertenziju u ispitivanim grupama pacijenata.

Vrednosti porodičnog opterećenja za dijabetes i kardiovaskularne bolesti su veće u grupi mikroalbuminuričnih ispitanika u odnosu na normo i proteinurične ispitanike, ali razlike nisu statistički značajne (Slika 22 i 23).

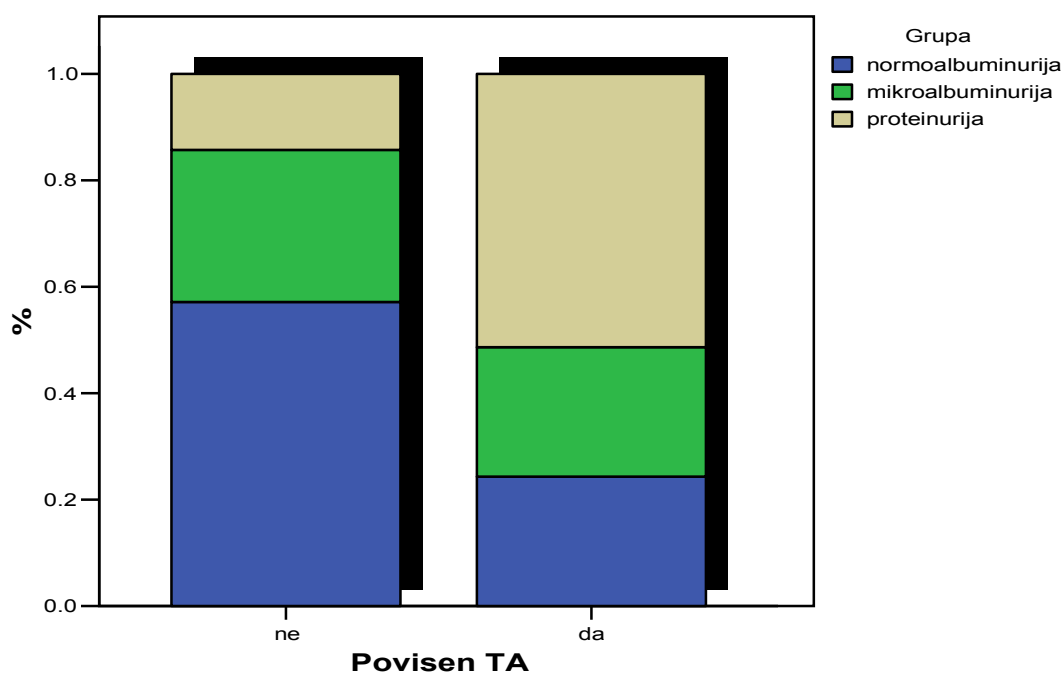


Slika 22. Procentualna distribucija pozitivne porodične anamneze za dijabetes u tri ispitivane grupe pacijenata.



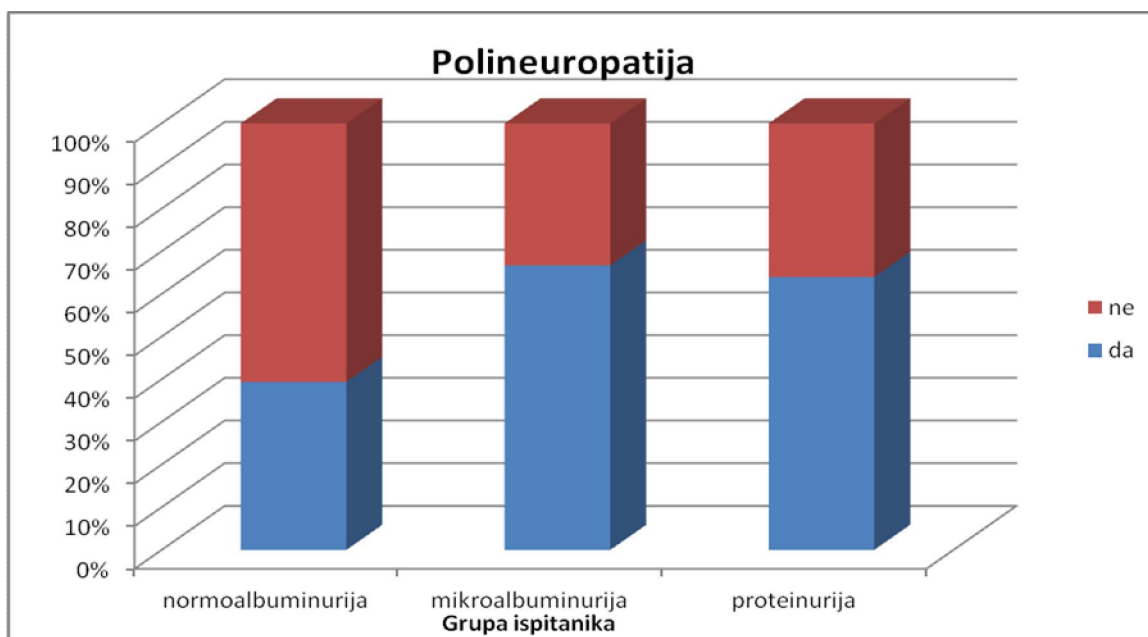
Slika 23. Prikaz procentualne distribucije pozitivne porodične anamneze za kardiovaskularne bolesti u ispitivanim grupama pacijenata

Vrednosti hipertenzije u ispitivanim grupama se statistički razlikuju i najviše su kod pacijenta sa terminalnom bubrežnom slabošću (Slika 24). Vrednosti krvnog pritiska su merene po prijemu pacijenata tokom uzimanja opšte anamneze bolesti. Visina sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska (mmHg) pokazuje statistički značajnu razliku između proteinuričnih (148 ± 26 ; 92 ± 15) i normoalbuminuričnih ispitanika (121 ± 12 ; 79 ± 7) ($p < 0,001$).

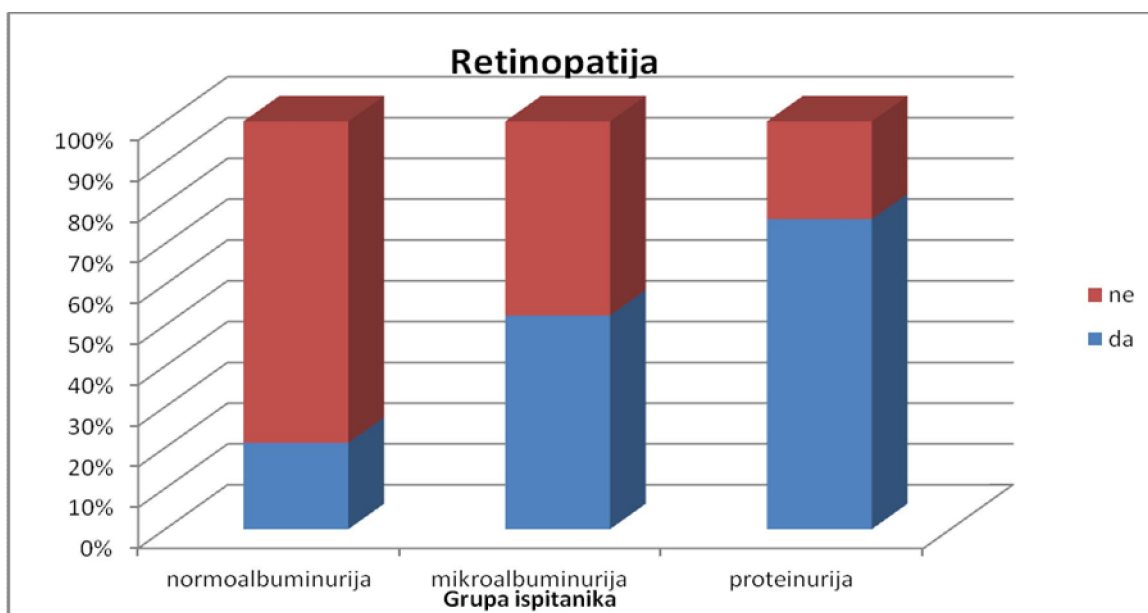


Slika 24. Procentualna distribucija ispitanika sa hipertenzijom u ispitivanim grupama

Na slici 25 i 26 prikazana je učestalost pojave mikrovaskularnih komplikacija u praćenim grupama. U grupi proteinuričnih, učestalija je pojava retinopatije u odnosu na grupu ispitanika sa normoalbuminurijom (76% /21,2%), za razliku od učestalosti polineuropatije, koja je viša u grupi mikroalbuminuričnih ispitanika (66,7%). u odnosu na normoalbuminurične (39,4%). Ovako dobijeni podaci pokazuju značajnu razliku u učestalosti retinopatije ($p < 0,001$) između ispitivanih grupa.

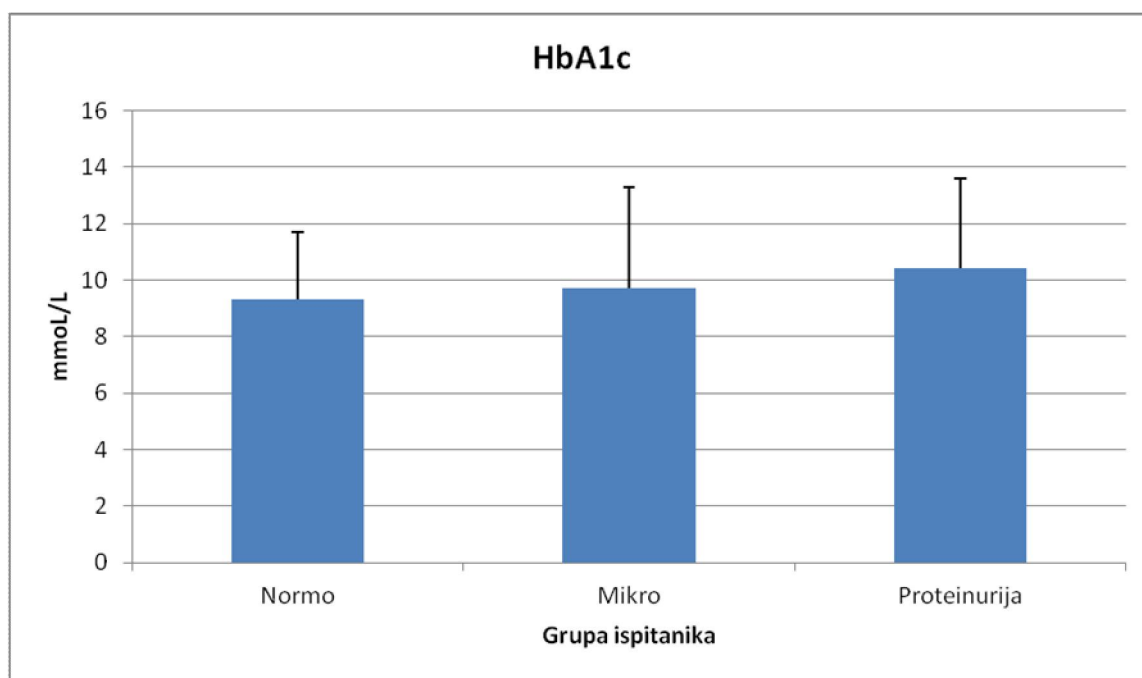


Slika 25. Procentalna zastupljenost mikrovaskularnih komplikacija (polineuropatije) u ispitivanim grupama pacijenata.



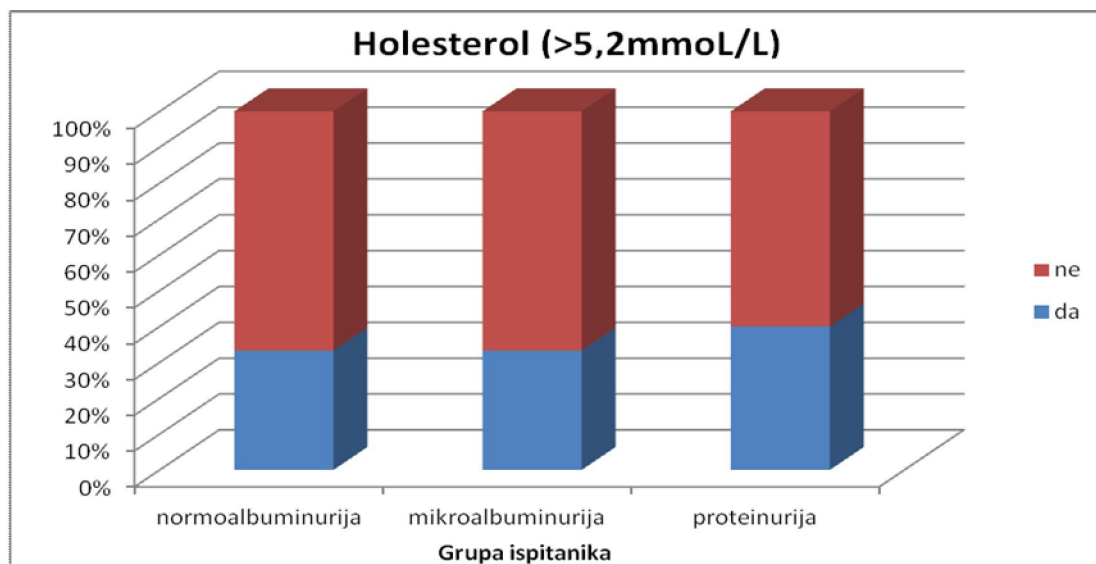
Slika 26. Procentalna zastupljenost mikrovaskularnih komplikacija (retinopatije) u ispitivanim grupama pacijenata

Statistički značajne razlike, između grupe normoalbuminuričnih i proteinuričnih ispitanika nisu nađene za vrednosti HbA_{1c} (Slika 27).



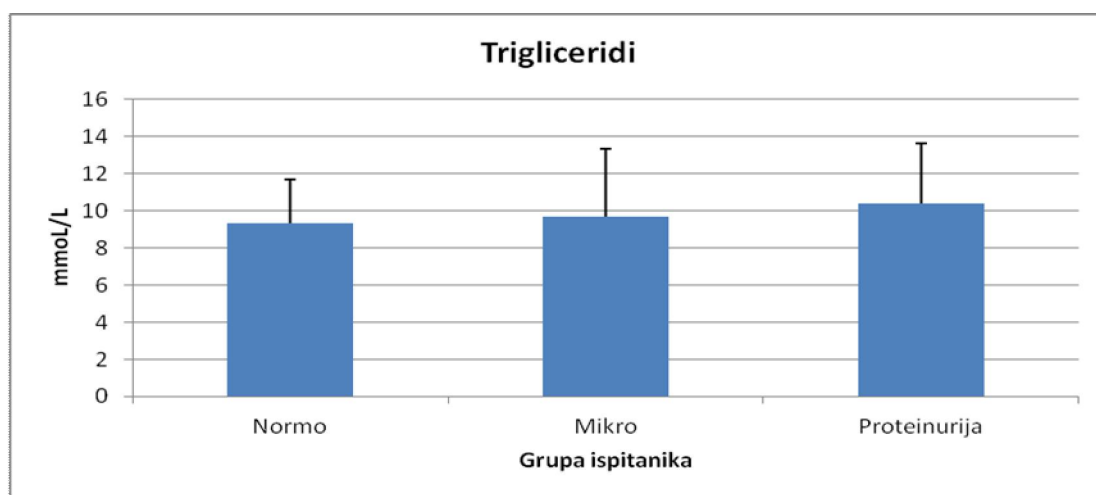
Slika 27. Vrednosti HbA_{1c} (%) u grupi pacijenata sa normoalbuminurijom, mikroalbuminurijom i proteinurijom.

Na slici 28 (i tabeli 2) prikazani su parametri lipidnog statusa za sve tri ispitivane grupe pacijenata. Dobijene vrednosti ukupnog holesterola u ispitivanim grupama pacijenata su grupisane u vrednosti manje od 5,2 i vrednosti iznad 5,2mmol/L. Vrednosti ukupnog holesterola, HDL i LDL holesterola su gotovo ujednačene u našim analiziranim grupama, pa tako za ova tri ispitivana parametra nije nađena statistički značajna razlika između grupa. Takođe je nađeno da parametri lipidnog statusa (ukupni holesterol, LDL) pozitivno korelišu sa HbA_{1c} u ispitivanim grupama.



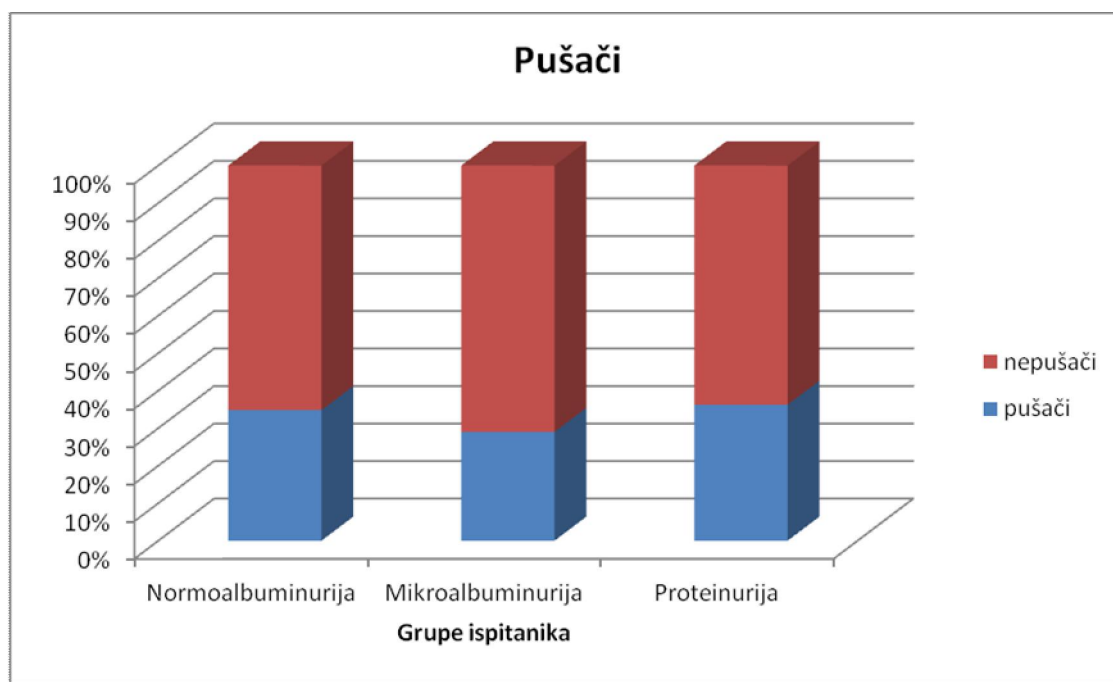
Slika 28. Vrednosti ukupnog holesterola (<math><5,2;5,3+Mmol/L</math>) u sve tri ispitivane grupe pacijenata

Za razliku od vrednosti ukupnog holesterola, HDL i LDL holesterola u ispitivanim grupama, vrednosti triglicerida pokazuju statistički značajnu razliku ($p < 0,001$) Značajnost postoji između grupe pacijenata sa normoalbuminurijom i proteinuričnih ispitanika (Slika 29, Tabela 2).



Slika 29. Vrednost triglicerida u grupi normo, mikro i proteinuričnih ispitanika

Zastupljenost pušača je u svim ispitivanim grupama bila slična, bez statistički značajne razlike (Slika 30).



Slika 30. Prikaz zastupljenosti pušača u ispitivanim grupama

II. Učestalost ispitivanih polimorfizama gena u grupama sa različitim stepenom razvoja nefropatije

Analizirali smo distribuciju genotipova i alela u genu za AGT (M235T, T174M), ACE i AT1 receptor u grupi normo, mikro i proteinuričnih pacijenata.

AGT M235T genski polimorfizam

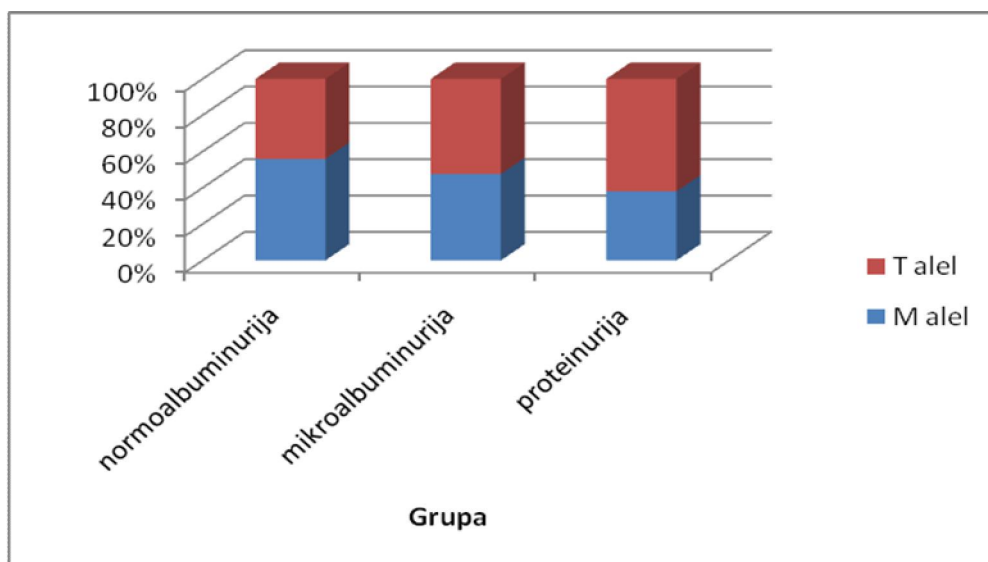
U tabeli 3 i na slikama 31-33 prikazana je distribucija genotipova i alela u genu za angiotenzinogen (AGT M235T) u odnosu na stepen razvoja nefropatije.

Tabela 3. Procentualna zastupljenost alela i genotipova u genu za angiotenzinogen AGT M235T u ispitivanim grupama pacijenata.

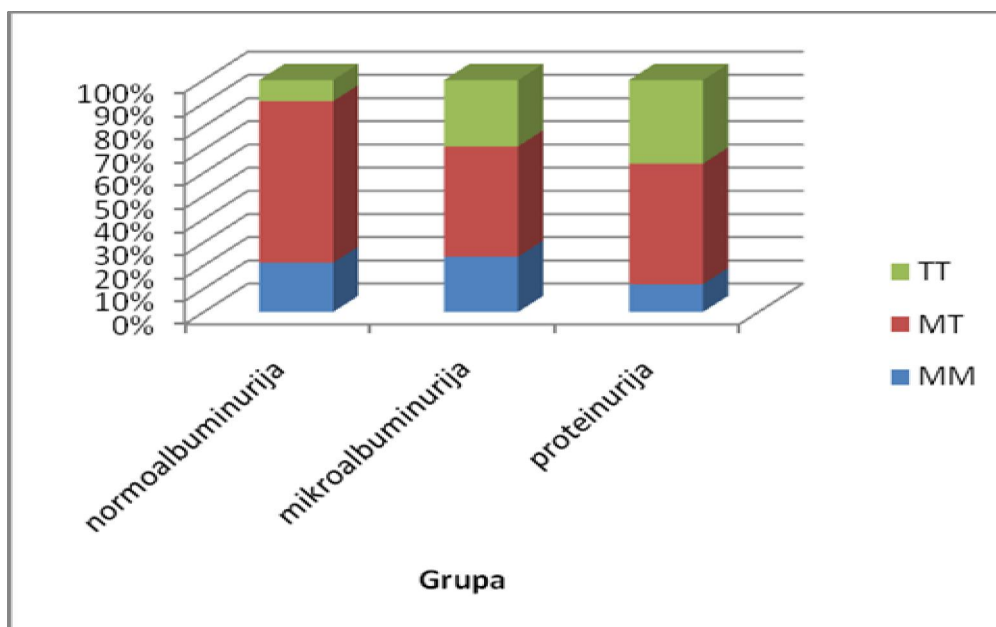
Genotip	NA n(%)	MA n(%)	P n(%)	P
AGT (M235T)	<i>n</i> =33	<i>n</i> =21	<i>n</i> =25	
MM	7 (21,2)	5 (23,8)	3 (12,0)	<0,05
MT	23 (69,7)	10 (47,6)	13 (52,0)	
TT	3 (9,1)	6 (28,6)	9 (36,0)	
MM+MT	30 (90,1)	15 (71,4)	16 (64)	<0,05
TT	3(9,9)	6(28,6)	9 (36)	
Alel				
M alel	37 (56)	20 (47,6)	19 (38)	NS
T alel	29 (44)	22 (52,4)	31 (62)	

NA-normoalbuminurija, MA-mikroalbuminurija, P-proteinurija

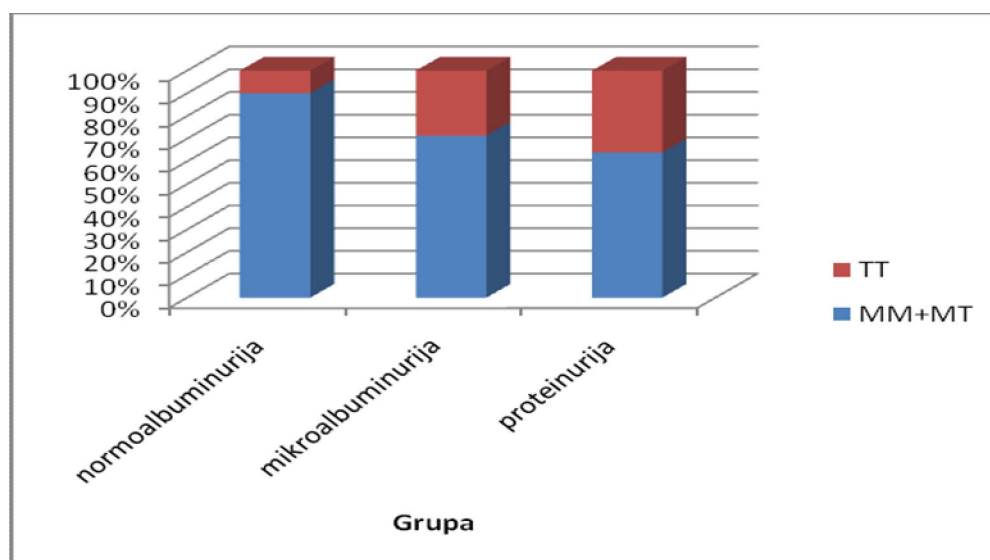
Dobijeno je da je učestalost TT genotipa gena za AGT značajno veća ($p < 0.05$) u grupi proteinuričnih pacijenata. U slučaju mikroalbuminuričnih ispitanika takođe zapažamo veću učestalost T alelskog oblika, ali nije bilo statistički značajne razlike u odabranom modelu ispitivanja.



Slika 31. Procentualna zastupljenost M i T alela u genu za *AGT M235T* u ispitivanim grupama pacijenata.



Slika 32. Procentualne zastupljenosti MM, MT i TT genotipa *AGT M235T* gena u ispitivanim grupama pacijenata



Slika 33. Procentualne zastupljenosti MM+MT/TT genotipova AGT M235T gena u ispitivanim grupama pacijenata

AGT T174M genski polimorfizam

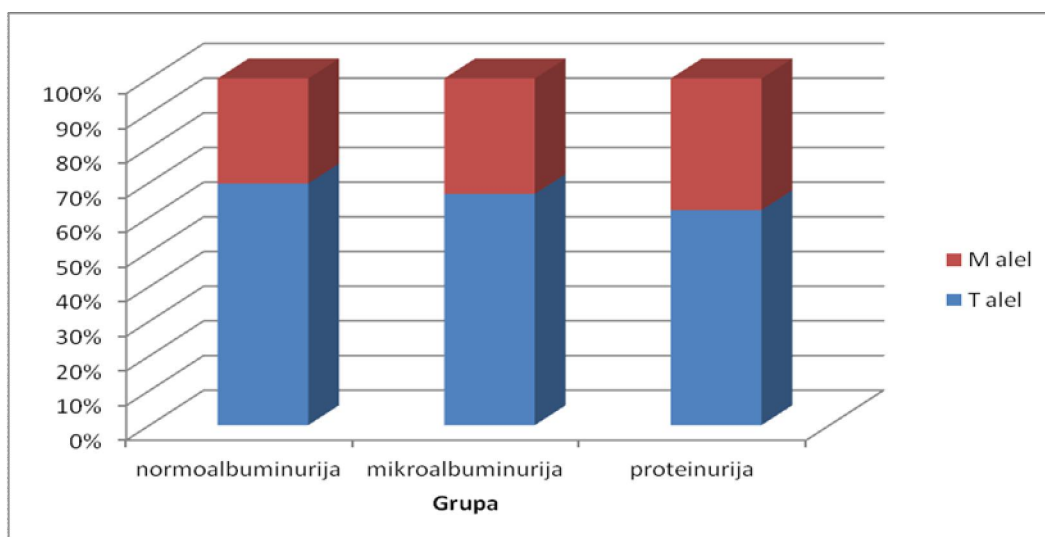
U tabeli 4 i na slikama 34-36 prikazana je distribucija genotipova i alela u genu za angiotenzinogen (AGT T174M) u odnosu na stepen razvoja nefropatije.

Tabela 4. Procentualna zastupljenost alela i genotipova u genu za angiotenzinogen AGT (T174M) u ispitivanim grupama pacijenata.

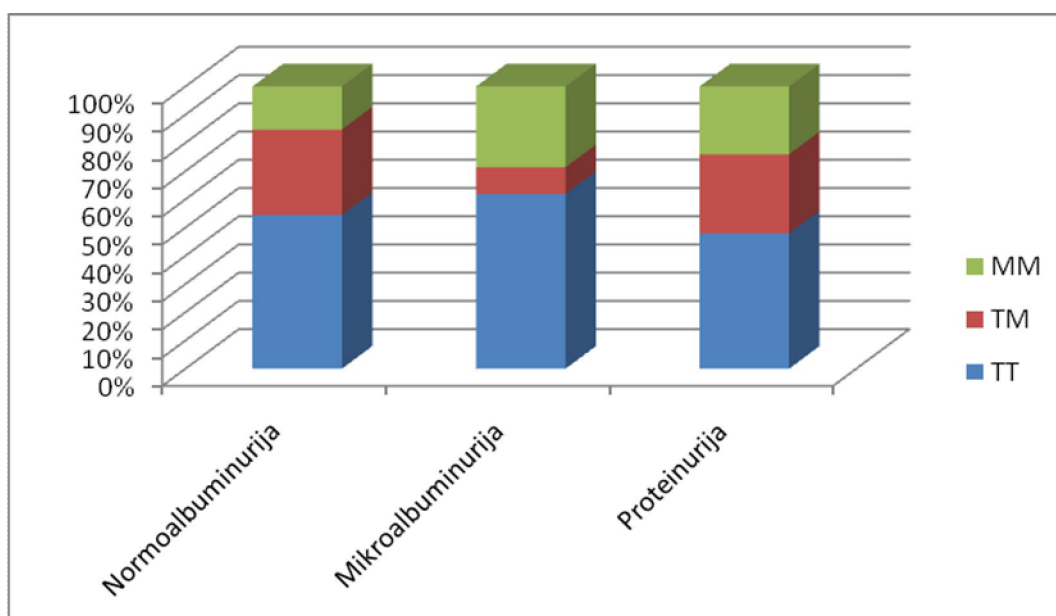
Genotip	NA n(%)	MA n(%)	P n(%)	P
AGT (T174M)	n=33	n=21	n=25	
TT	18 (54,5)	13 (61,9)	12 (48)	NS
TM	10 (30,3)	2 (9,5)	7 (28)	
MM	5 (15,2)	6 (28,6)	6 (24)	
TT+TM	28 (84,5)	15 (71,4)	19 (76)	NS
MM	5 (15,5)	6 (28,6)	6 (24)	
Alel				
T alel	46 (69,7)	28 (66,7)	31 (62)	NS
M alel	20 (30,3)	14 (33,3)	19 (38)	

NA-normoalbuminurija, MA-mikroalbuminurija, P-proteinurija

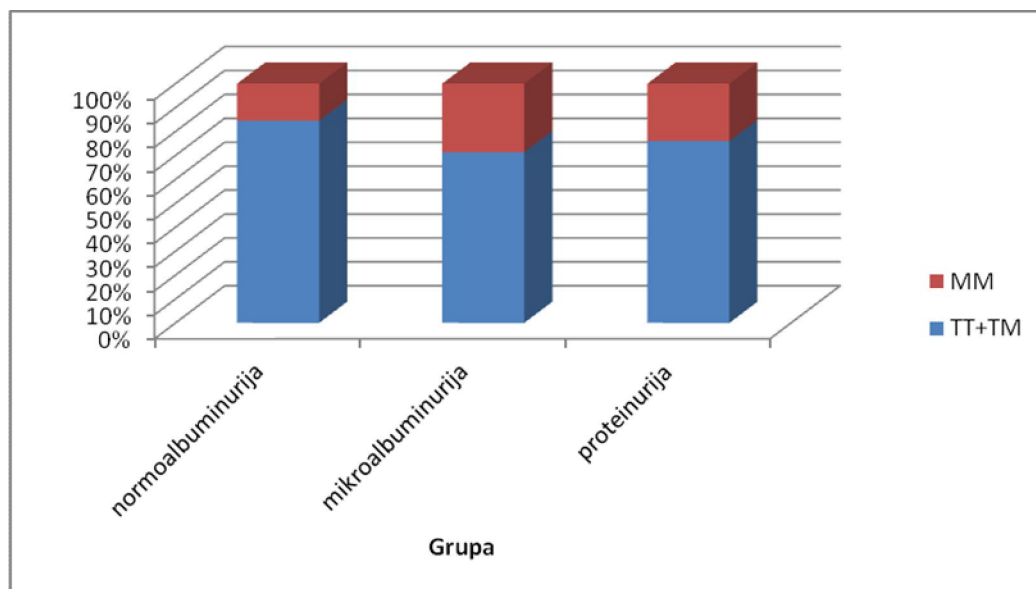
Statističkom obradom podataka nije dobijena značajna razlika u zastupljenosti alela i genotipova za AGT T174M između ispitivanih grupa.



Slika 34. Prikaz procentualne zastupljenosti M i T alela u genu za AGT T174M u ispitivanim grupama pacijenata



Slika 35. Prikaz procentualne zastupljenosti TT, TM i MM genotipa AGT T174M gena u ispitivanim grupama pacijenata



Slika 36. Procentualna zastupljenosti *TT+TM/MM* genotipova *AGT T174M* gena u ispitivanim grupama pacijenata

ACE I/D genski polimorfizam

Tabela 5 i slike 37-39 prikazuju distribuciju genotipova i alela gena za angiotenzin-konvertujući enzim (*ACE I/D* polimorfizam) u odnosu na stepen razvoja nefropatije.

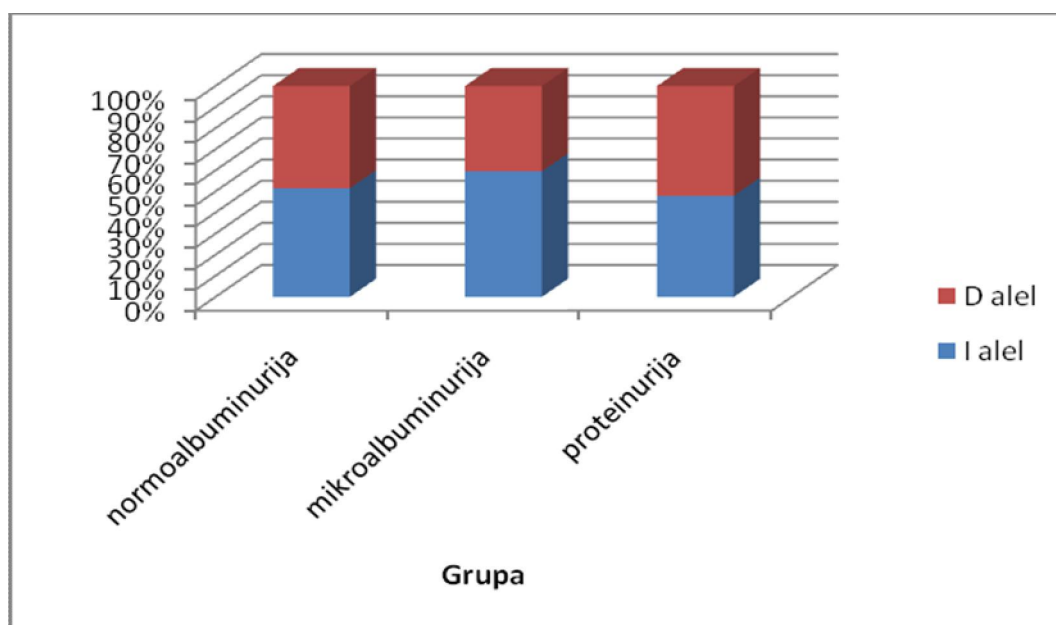
Tabela 5. Procentualna zastupljenost alela i genotipova u genu za *ACE* u ispitivanim grupama pacijenata.

Genotip	<i>NA</i> n(%)	<i>MA</i> n(%)	<i>P</i> n(%)	<i>P</i>
ACE (<i>I/D</i>)	<i>n</i> =33	<i>n</i> =21	<i>n</i> =25	
II	11 (33,3)	7 (33,3)	6 (24,0)	NS
ID	12 (36,4)	11 (52,4)	12 (48,0)	
DD	10 (30,3)	3 (14,3)	7 (28,0)	
II+ID	23 (69,7)	18 (85,7)	18 (72)	NS
DD	10 (30,3)	3 (14,3)	7 (28)	
Alel				
I alel	34 (51,5)	25 (59,5)	24 (48)	NS
D alel	32 (48,5)	17 (40,5)	26 (52)	

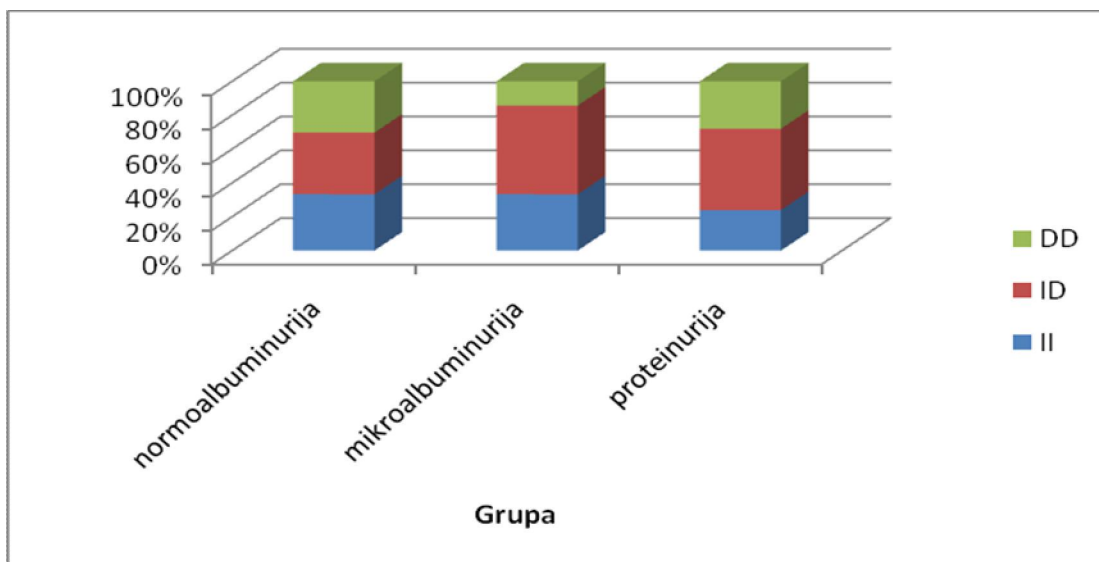
NA-normoalbuminurija, *MA*-mikroalbuminurija, *P*-proteinurija

U ispitivanju I/D polimorfizma gena za ACE, učestalost D alelske forme je bila nešto veća u grupi sa proteinurijom (52%) u odnosu na grupu sa normoalbuminurijom (48,5%), ali te razlike nisu imale statistički značaj (tabela 5).

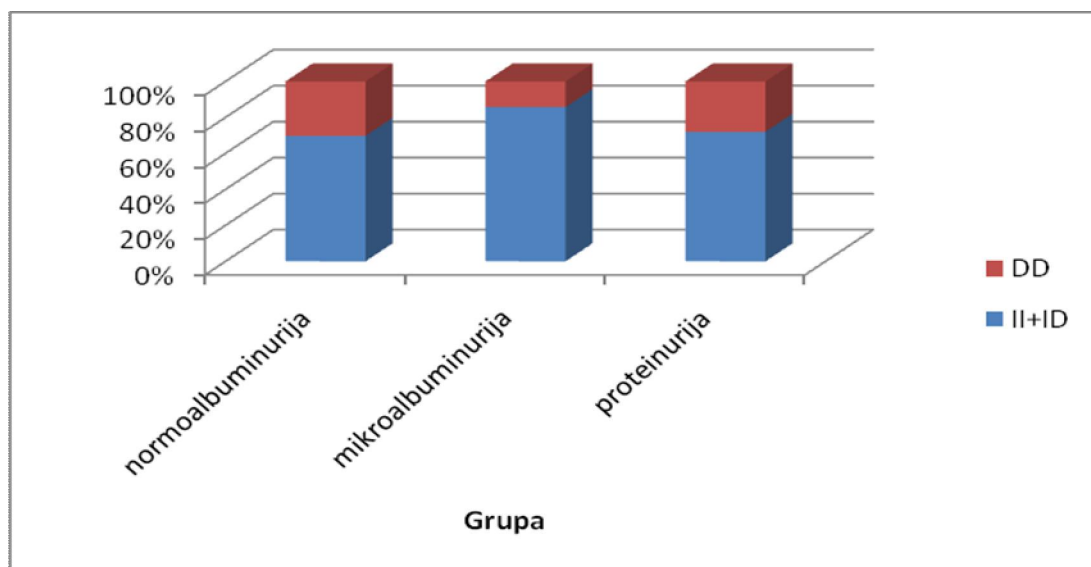
Učestalost DD genotipa, koji je povezan sa povećanjem nivoa serumskog ACE, je najmanja kod pacijenata sa mikroalbuminurijom(14,3%) u odnosu na sve tri ispitivane grupe (tabela 5).



Slika 37. Procentualna zastupljenost **I** i **D** alela u genu za **ACE** u ispitivanim grupama pacijenata.



Slika 38. Prikaz procentualne zastupljenosti genotipova ACE gena u ispitivanim grupama pacijenata



Slika 39. Procentualna zastupljenost II-ID/DD genotipa ACE gena u ispitivanim grupama pacijenata

AT1R genski polimorfizam

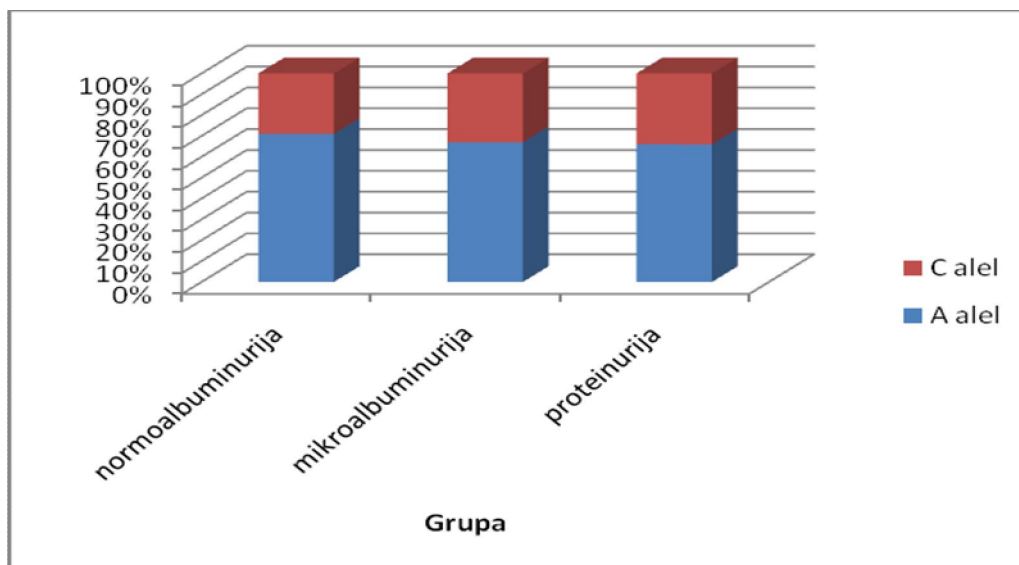
U tabeli 6 i na slikama 40-42 prikazana je distribucija genotipova i alela u genu za AT1 receptor (A1166C) u odnosu na stepen razvoja dijabetesne nefropatije.

Tabela 6. Procentualna zastupljenost alela i genotipova u genu za AT1R u ispitivanim grupama pacijenata.

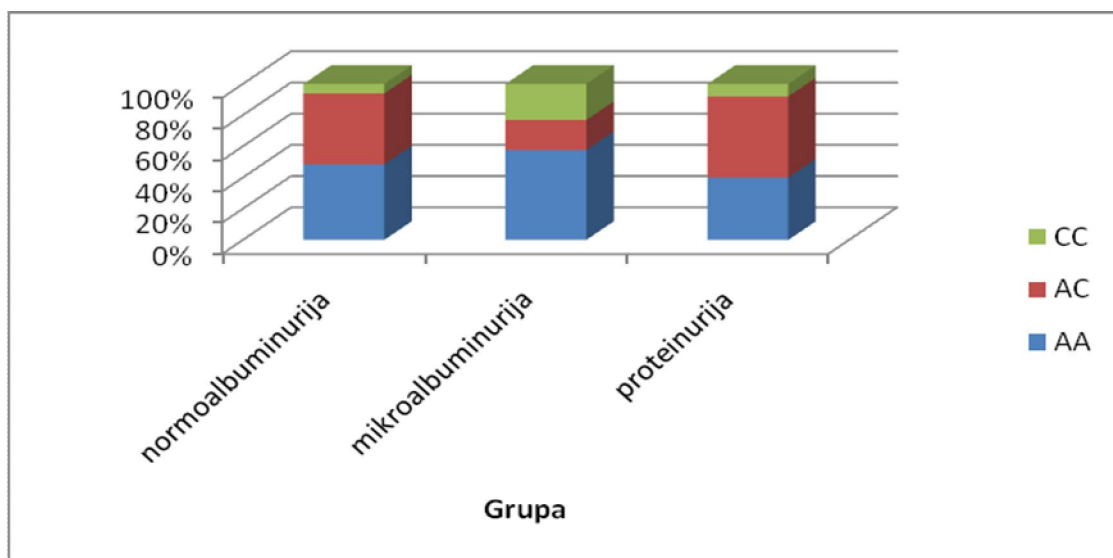
Genotip	NA n(%)	MA n(%)	P n(%)	P
AT1R (A1166C)	n=33	n=21	n=25	
AA	16(48,5)	12(57,1)	10(40,0)	NS
AC	15(45,5)	4(19)	13(52)	
CC	2(6,1)	5(22,8)	2(8,0)	
AA+AC	31(93,9)	16(76,2)	23(92)	NS
CC	2(6,1)	5(23,8)	2(8)	
Alel				
A alel	47(71)	28(67)	33(66)	NS
C alel	19(29)	14(33)	17(34)	

NA-normoalbuminurija, MA-mikroalbuminurija, P-proteinurija

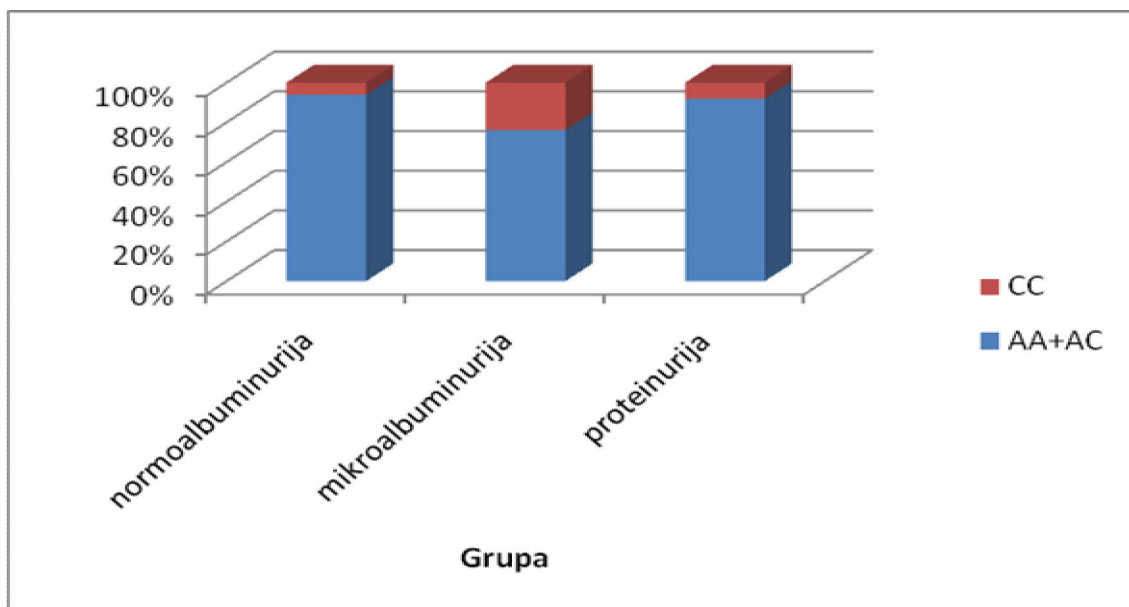
Statistički značajne razlike između grupe normoalbuminuričnih i proteinuričnih pacijenata, nisu nađene ni za učestalost C alela (29%/34%) niti CC genotipa (6,1%/8%) u genu za AT1 receptor (tabela 6).



Slika 40. Procentualna zastupljenosti C i A alela u genu za AT1R (A1166C) u ispitivanim grupama pacijenata



Slika 41. Prikaz procentualne zastupljenosti genotipova u genu za *AT1R* (*A1166C*) u ispitivanim grupama pacijenata



Slika 42. Prikaz procentualne zastupljenosti AA+AC/CC genotipa u genu za *AT1R* (*A1166C*) u ispitivanim grupama pacijenata

III. Povezanost ispitivanih polimorfizama gena za *AGT(M235T)*, *ACE* i *AT1R* sa najčešćim komplikacijama dijabetesa.

U tabeli 7 prikazana je procentualna distribucija MM i MT/TT genotipova (grupisani genotipovi sa T alelom koji se povezuje sa povećanom aktivnošću renin-angiotenzin sistema i većom sintezom angiotenzinogena), II i ID/DD genotipova (grupisani nosioci D alela koji je povezan sa višim nivoom ACE u plazmi), kao i AA i AC/CC genotipova (grupisani nosioci C alela) u zavisnosti od prisustva hipertenzije. Analize su pokazale da nema statistički značajne razlike (χ^2 test, NS) u učestalosti *AGT*, *ACE* i *AT1R* genotipova između normotenzivnih i hipertenzivnih pacijenata.

Tabela 7. Distribucija genotipova gena *AGT (M235T)*, *ACE* i *AT1R* u ispitivanim grupama pacijenata u odnosu na prisustvo hipertenzije

<i>Hipertenzija</i>				
<i>Gen</i>		DA (%)	NE (%)	<i>p</i>
<i>AGT</i>	MM	8 (53,3)	7(46,7)	NS
	MT/TT	34 (53,1)	30(46,9)	
<i>ACE</i>	II	13(54,2)	11(45,8)	NS
	ID/DD	29(52,7)	26 (47,3)	
<i>AT1R</i>	AA	20(52,6)	18(47,4)	NS
	AC/CC	22(53,7)	19(46,3)	

Analiza odnosa zastupljenosti genotipova za *AGT(M235T)*, *ACE* i *AT1R* i prisustva polineuropatije (tabela 8) nije pokazala statistički značajnu razliku (χ^2 test, NS).

Tabela 8. Distribucija genotipova gena *AGT (M235T)*, *ACE* *AT1R* u ispitivanim grupama pacijenata u odnosu na prisustvo polineuropatije

<i>Polineuropatija</i>				
<i>Gen</i>		DA (%)	NE (%)	<i>p</i>
<i>AGT</i>	MM	8(53,3)	7(46,7)	NS
	MT/TT	28(43,8)	36(56,3)	
<i>ACE</i>	II	10(41,7)	14(58,3)	NS
	ID/DD	26(47,3)	29(52,7)	
<i>AT1R</i>	AA	16(42,1)	22(57,9)	NS
	AC/CC	20(48,8)	21(51,2)	

Takođe, distribucija genotipova za *AGT(M235T)*, *ACE* i *AT1R* nije bila značajno različita ni kada je u pitanju prisustvo retinopatije (tabela 9).

Tabela 9. Distribucija genotipova gena *AGT (M235T)*, *ACE* *AT1R* u ispitivanim grupama pacijenata u odnosu na prisustvo retinopatije

<i>Retinopatija</i>				
<i>Gen</i>		DA (%)	NE (%)	<i>p</i>
<i>AGT</i>	MM	5(33,3)	10(66,7)	NS
	MT/TT	37(57,8)	27(42,2)	
<i>ACE</i>	II	14(58,3)	10(41,7)	NS
	ID/DD	28(50,9)	27(49,1)	
<i>AT1R</i>	AA	19(50,0)	19(50,0)	NS
	AC/CC	23(56,1)	18(43,9)	

Korišćenjem multivarijantne regresione analize kreirali smo model koji bi izdvojio prediktore od značaja za nastanak nefropatije (Tabela 10).

Tabela 10. *Rezultati multivarijantnog regresionog modela - analize prediktora nefropatije*

Prediktor	<i>p</i>	OR (95% CI)
Trajanje dijabetesa	<0.01	1.192 (1.057-1.345)
HTA	<0.05	5.200 (1.301-20.790)
Retinopatija	<0.05	2.840 (1.288-6.261)
AGT polimorfizam	MM	-
	MT	1.358 (0.234-7.885)
	TT	28.389 (2.422-332.724)
ACE polimorfizam	II	-
	ID	2.113 (0.435-10.258)
	DD	0.307 (0.053-1.780)

Model je pokazao da su trajanje dijabetesa, prisustvo hipertenzije, retinopatija i TT polimorfizam AGT gena značajni prediktori za nastanak nefropatije. Trajanje dijabetesa i prisustvo TT genotipa pokazali su visoku značajnost ($p < 0.01$). Univarijantna analiza podataka nije pokazala statistički značajnu vezu ACE/II genotipa sa povećanjem bubrežnih komplikacija.

Za našu grupu pacijenata, analizirani polimorfizmi M235T i T174M su nađeni u slaboj neravnoteži vezanosti ($D^2 = 0.3763$). Distribucija analiziranih haplotipova unutar normoalbuminurične, mikroalbuminurične i proteinurične grupe udruženo je prikazana u tabeli 10. Najzastupljeniji haplotip u grupi pacijenata sa normoalbuminurijom, kao i u grupi mikro i proteinuričnih pacijenata združeno je bio MT haplotip (37.5%). MM haplotip je u obe grupe bio najređe zastupljen (9.9%).

Analizirano je postojanje veze identifikovanih haplotipova sa rizikom za nastanak albuminurije. Analiza OR pokazala je da identifikovani haplotipovi nisu u statistički značajnoj asocijaciji sa rizikom za nastanak povišene količine albumina u poređenju sa najčešće zastupljenim haplotipom MT koji je korišćen kao referentna vrednost. Izvesna tendencija ka sniženom riziku za razvoj mikroalbuminurije i proteinurije je zabeležena za TM haplotip (OR=0.38, p=0.062) (Tabela 11).

Tabela 11. *Procentualne zastupljenosti identifikovanih haplotipova polimorfizama M235T i T174M gena za AGT između analizarnih grupa pacijenata i asocijacija haplotipova sa rizikom za razvoj nefropatije kod dijabetesa tipa I.*

<i>Haplotipovi</i>	<i>Ukupno</i>		<i>Normo</i>		<i>Mikro + Prot</i>		<i>Odds Ratio CI (95%)</i>	<i>p</i>
	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>		
MT	30	37,5	13	41,2	16	34	Referentna vrednost	
TT	23	29	10	28,5	14	30,1	0,74 (0,29 – 1,91)	0,54
TM	19	23,6	5	15,5	13	28,6	0,38 (0,14 – 1,03)	0,062
MM	7	9,9	5	14,8	3	7,3	2,53 (0,59 – 10,90)	0,22

DISKUSIJA

Dijabetesna nefropatija je jedna od najozbiljnijih komplikacija šećerne bolesti, podrazumeva širok spektar bubrežne disfunkcije, a porast albumina, od blagog stepena do značajne proteinurije, vodi ka daljem progresivnom padu funkcionalne rezerve bubrega [69]. Obično se javlja deset i više godina od pojave dijabetesa kao kasna komplikacija osnovne bolesti.

Bolesnici sa tipom I dijabetesa imaju povećan rizik za nastanak kardiovaskularnih bolesti koji se povećava sa progresijom bubrežne slabosti [70]. U desetogodišnjoj prospektivnoj studiji Brunove i sar. [71], u kojoj je praćeno 1400 ispitanika sa dijabetesom, i normoalbuminurijom, mikroalbuminurijom i proteinurijom, ukazano je na izrazito visoku stopu mortaliteta kod obolelih koji dostignu terminalni stadijum bubrežne insuficijencije. Dijabetes i dalje predstavlja jedan od vodećih uzroka terminalnog stadijuma bubrežnih komplikacija.

U dijabetesnih bolesnika sa nefropatijom, bez obzira na tip dijabetesa, postoje značajne individualne razlike u stopi redukcije funkcionalne rezerve bubrega [72]. Zabrinjavajuće je da, i pored svih terapijskih mera koje se trenutno koriste u lečenju osoba obolelih od dijabetesa, kod značajnog broja dolazi do terminalne bubrežne insuficijencije [73]. Ovo upućuje na potrebu za utvrđivanjem dodatnih faktora rizika za progresiju bubrežne disfunkcije, kako pre tako i u početnim fazama nefropatije, a u cilju sprovođenja pravovremenih i adekvatnih terapijskih mera za sprečavanje ili odlaganje progresije bubrežne bolesti.

Usavršavanjem laboratorijskih dijagnostičkih metoda omogućeno je detektovanje ekskrecije albumina u urinu (mikroalbuminurije) pre ispoljavanja proteinurije (koja se utvrđuje klasičnim laboratorijskim metodama), što je omogućilo otkrivanje osoba sa sklonošću za razvoj manifestne nefropatije. Kod pacijenata sa dijabetesom povećano izlučivaje albumina u urinu ukazuje na postojanje kako funkcionalnih tako i morfoloških promena u bubregu [72]. Vrednosti albuminurije su bile i osnovni kriterijum u formiranju naših ispitivanih grupa. Ovaj "rani" gubitak albumina u grupi naših normoalbuminuričnih ispitanika bio je 13.1 ± 5.2 mg/24h, dok je visina albuminurije u grupi proteinuričnih

pacijenata bila 368.3 ± 223.8 mg/24h. Razlika u vrednosti albuminurije između ove dve ispitivane grupe pacijenata bila je visoko statistički značajna ($p < 0.001$).

Prevalenca mikroalbuminurije je 8% kod pacijenata sa tipom I dijabetesa sa samo 1-3 godine trajanja bolesti, što je 10 puta više od 0,8% koliko je nađeno kod ispitanika bez dijabetesa [92]. Ovako visoka prevalenca mikroalbuminurije kod pacijenata sa kratkim trajanjem dijabetesa potvrđena je i u drugim studijama [93]. Visoka prevalenca persistentne mikroalbuminurije posle 30 godina je u skladu sa podacima dobijenih pre nekog vremena u studiji Epidemiologija dijabetesnih komplikacije - Pitsburg [94].

Komplementarne studije su pokazale da je, u toku incipijentne nefropatije, održavanjem optimalne glikoregulacije, arterijskog pritiska i drugim postupcima moguće smanjiti ekskreciju albumina. Ova činjenica ukazuje da bi u ovom stadijumu bilo moguće zaustaviti ili sprečiti nefropatiju.

U RENNAL studiji [90] utvrđeno je da je proteinurija najsnažniji prediktor renalne disfunkcije kod obolelih od dijabetesa (OR 6.2), dok je u studiji Bruna i sar. [71], ukazano da je rizik za progresiju hronične bubrežne insuficijencije 4 puta veći u proteinuričnih, odnosno 2 puta veći u mikroalbuminuričnih u odnosu na normoalbuminurične bolesnike. Ovo ukazuje da su albuminurija, odnosno proteinurija, značajni faktori rizika za progresiju bubrežne bolesti. Naime, povećana količina filtriranih proteina (kroz glomerulske kapilare), dovodi do povećane renalne toksičnosti, koja u sadejstvu sa drugim faktorima (npr. hipertenzija) doprinosi progresiji renalnog oštećenja

Hipertenzija i loša glikoregulacija su najznačajnijih faktori koji dovode do slabljenja bubrežne funkcije u bolesnika sa dijabetesom. Sa druge strane faktori koji dovode do pojave hipertenzije su brojni, ali se po značaju izdvajaju promene na glomerulima (skleroza mikrovaskularne odnosno kapilarne mreže glomerula) bubrega, ateroskleroza velikih krvnih sudova bubrega (ateroskleroza renalnih arterija) i povećan volumen ekstracelularne tečnosti (usled neadekvatnog funkcionisanja renin - angiotenzinskog sistema koji ima za posledicu i povećan volumen cirkulišuće tečnosti u vaskularnom sistemu što predstavlja dodatno opterećenje za bubrege).

Uticaj hipertenzije na razvoj dijabetesne nefropatije je i dalje predmet istraživanja, kako u incipijentnoj tako i u manifestnoj fazi bolesti [113]. Kod pacijenata sa tipom I dijabetesa, hipertenzija je blisko povezana sa nefropatijom i različitim stepenima proteinurije, tako da su bubrežni mehanizmi za razvoj hipertenzije od posebne važnosti. Ovo se pre svega odnosi na zadržavanje tečnosti i natrijuma, smanjenje natriuretskog kapaciteta i mikrovaskularne promene. Iako je hipertenzija nesumnjivo povezana sa bubrežnim oštećenjima bilo kog uzroka, ona se javlja u ranim stadijumima dijabetesne nefropatije. Arterijski pritisak obično počinje da se povećava kada mikroalbuminurija premaši granicu od 30 mg/24h i u mnogim slučajevima dostiže prag hipertenzije u vreme kada mikroalbuminurija dostigne vrednosti od 300mg/24h.

U rezultatima istraživanja Uede i sar. [80], jedan od nezavisnih prediktivnih faktora za progresiju dijabetesne nefropatije bio je srednji arterijski krvni pritisak, dok je u studiji Brunove i sar. [71], to bio dijastolni pritisak. U studiji Američke Asocijacije za Dijabetes iz 2004. godine utvrđeno je da ispitanici sa sistolnim pritiskom iznad 130mmHg imaju oko 5 puta veći rizik za progresiju bubrežne bolesti od ispitanika sa nižim sistolnim pritiskom, dok dijastolni krvni pritisak nije imao prediktivnu ulogu za progresiju gubitka bubrežne funkcije. Slični podaci dobijeni su i u ostalim studijama [78,79]. Iz navedenih podataka može se zaključiti da je od velikog značaja pravovremeno započinjanje antihipertenzivne terapije, jer, kako je u kliničkim studijama potvrđeno, pravilna i pravovremena terapija dovodi do redukcije rizika za razvoj i progresiju bubrežne disfunkcije. Preporuke su da ciljne vrednosti krvnog pritiska kod dijabetesnih bolesnika upravo budu vrednosti ≤ 130 mmHg za sistolni, odnosno ≤ 80 mmHg za dijastolni krvni pritisak.

Poslednjih godina veliki broj istraživanja je usmeren na ispitivanje povezanosti genetičkih faktora i razvoja dijabetesne nefropatije. Potvrđeno je da je nasledna predispozicija za dijabetesnu nefropatiju i esencijalnu hipertenziju zajednička [95]. Geni uključeni u regulaciju arterijskog pritiska se smatraju za gene kandidate koji su odgovorni za pojavu i razvoj nefropatije. Sa druge strane genetička predispozicija za komplikacije na

bubrežima kod dijabetičara može biti nezavisna od sistemskog pritiska. Lokalne promene kao posledica prisustva različitih polimorfizama gena renin-angiotenzinskog sistema se ispoljavaju kao promene u bubrežnoj hemodinamici, povećanju intraglomerularnog pritiska i nivoa glomerularne filtracije, kao značajnih determinanti bubrežne funkcije.

Genetičkim faktorima se može objasniti bliska povezanost između dijabetesne nefropatije i hipertenzije kod dijabetesa tipa I. Sugerise se da je sklonost ka hipertenziji određena sa dva faktora za esencijalnu hipertenziju, pozitivnom porodičnom anamnezom za hipertenziju i povećanim natrijumskolitijumskim kotransportom u eritrocitima. Nađeno je da je arterijski pritisak bio značajno viši kod pacijenata čiji su roditelji imali proteinuriju. Takođe, relativni rizik za razvoj manifestne proteinurije je povećan ako je bar jedan roditelj imao hipertenziju [95].

Eksperimentalni podaci i klinička ispitivanja jasno pokazuju da je renin-angiotenzin sistem (RAS) važan regulator kardiovaskularnih i bubrežnih oboljenja, pa prema tome, analize gena RAS sistema imaju važnu ulogu u razumevanju molekularne patogeneze dijabetesne nefropatije, dijagnostici i terapiji. One mogu pomoći u ranoj identifikaciji osoba koje imaju visok rizik da razviju dijabetesnu nefropatiju.

Hipertenzija i povećana aktivnost renin-angiotenzin sistema uz prisustvo određenih varijanti gena RAS-a – gena za angiotenzinogen (AGT), angiotenzin-konvertujući enzim (ACE) i za angiotenzin receptor tip I (AT1R) – mogu da ukažu na povećanu sklonost ka razvoju dijabetesne nefropatije.

Cilj naše studije je bio da ispita prisustvo polimorfizama gena RAS sistema u grupi pacijenata obolelih od dijabetesa tip I u odnosu na stepen razvoja nefropatije, definisane kliničke parametre i faktore rizika.

Renin-angiotenzin sistem ima ključnu ulogu u parakrinoj regulaciji bubrežne funkcije [96]. RAS ima jednu od najvažnijih uloga u patogenezi komplikacija dijabetes melitusa. Studije koje su ispitivale ulogu RAS u progresiji bubrežnih bolesti ukazale su da je inhibicija ovog sistema kritičan momenat u tretmanu dijabetesne nefropatije [97].

M235T polimorfizam AGT gena smatraju markerom za esencijalnu hipertenziju i povećanu koncentraciju angiotenzinogena u plazmi. Ipak, uticaj genetičkih faktora na razvoj oboljenja kao što je dijabetesna nefropatija je kompleksan. U progresiju ovog oboljenja je uključeno više gena, ne samo gena koji pripadaju RAS sistemu, mada se njihova uloga smatra ključnom. Efekti "major" gena koji imaju veći uticaj na razvoj oboljenja, među kojima je možda i AGT, su modifikovani "minor" genima sa malim pojedinačnim doprinosima, intragenskim i intergenskim interakcijama, kao i interakcijama gena i faktora sredine. M235T polimorfizam AGT gena može poslužiti kao marker za predispoziciju na esencijalnu hipertenziju i dijabetesnu nefropatiju, ali njegov uticaj na razvoj ovog kompleksnog oboljenja nije jedini. Polimorfizmi T174M, G-6A, A-20C za koje je pokazano da su u gametskoj neravnoteži sa M235T i njihove interakcije sa M235T, takođe mogu biti odgovorni za razvoj dijabetesne nefropatije.

Mnoge studije se bave proučavanjem povezanosti RAS polimorfizama sa hipertenzijom i dijabetesnom nefropatijom. Neke studije nisu pronašle asocijaciju između AGT M235T polimorfizma i razvoja dijabetesne nefropatije. Marre et al.[101] su pokazali da pacijenti sa D alelom ACE gena i MM genotipom imaju manji rizik za razvoj nefropatije od onih sa D alelom i TT genotipom. U svakom slučaju, urađeno je mnogo studija ali se nije došlo do jedinstvenog zaključka. Neke od kontroverzi mogu biti objašnjene ograničenom statističkom moći, izborom kriterijuma i odabira metodologije, epistatičkim interakcijama gena. Uglavnom su sve dosadašnje studije zanemarivale distribuciju polimorfizama RAS gena u odnosu na strukturu populacije. Da bi se izbegli lažno pozitivni i lažno negativni rezultati, treba proučavati distribuciju ovih polimorfizama u različitim etničkim grupama u analiziranim populacijama. Tako je u jednoj od studija utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji D alela ACE gena i T alela AGT gena u podgrupama belaca i crnaca. Grupisanje DD i TT genotipova, je bilo statistički značajno u podgrupi crnih ispitanika [113].

Analizom AGT M235T polimorfizma kod naših ispitanika zapaža se da je učestalost T alelske forme veća u grupama sa većim stepenom bubrežnih komplikacija (u grupi proteinuričnih 62%, normoalbuminurični 44%), iako ova razlika nije imala statistički

značaj. TT genotip koji se vezuje sa najvećom sintezom angiotenzinogena, prisutan je u samo 9% ispitanika sa normoalbuminurijom, i u čak 36% ispitanika u grupi sa proteinurijom. Dobijeno je da je učestalost TT genotipa gena za AGT statistički značajno veća ($p < 0.05$) u grupi proteinuričnih pacijenata. Veću učestalost T alela, kao i TT genotipa zapažamo takođe i u grupi ispitanika sa mikroalbuminurijom, ali bez statistički značajne razlike.

T alelska forma se dovodi u vezu sa rizikom za razvoj nefropatije kod dijabetičara. Pokazano je da je T alel povezan sa većom aktivnošću RAS sistema, odnosno povećanom reapsorpcijom soli i vode. Podaci navode da je T235 alel daleko najzastupljeniji u afričkoj populaciji (0.90-0.95) [100], što predstavlja dobar adaptacioni mehanizam čiji je krajnji cilj zadržavanje vode i soli u organizmu, a samim tim i sprečavanje brze dehidracije u uslovima dugotrajne izloženosti visokim temperaturama spoljne sredine koja je karakteristična za područje Afrike.

Sa druge strane, pokazana je visoka učestalost heterozigotnih genotipova MT u grupi normoalbuminuričnih ispitanika, ali i u zdravoj populaciji južne Evrope, što ukazuje da u uslovima umereno - kontinentalne klime MT genotip obezbeđuje umerenu aktivnost RAS sistema pa prema tome i umeren stepen retencije vode i soli. U jednoj genetičko - epidemiološkoj studiji [121], potvrđena je razlika u distribuciji MM/MT i TT genotipa, sa značajno manjom učestalošću MM genotipa u afroameričkoj i azijskim populacijama u odnosu na srednje evropsku populaciju.

Daljim istraživanjem smo pokušali odrediti povezanost između polimorfizma T174M za AGT gen i stepena napredovanja dijabetesne nefropatije obolelih od DM tip 1.

Analizom polimorfizma T174M AGT gena utvrđeno je da je najviše nosilaca TT, a najmanje nosilaca MM genotipa u ukupnom uzorku pacijenata sa DM. Značajna razlika u zastupljenosti alela i genotipova za AGT T174M između ispitivanih grupa nije dobijena. Učestalost alela (79% T) su u skladu sa učestalostima dobijenim kod belaca kavkaskog i ne - kavkaskog porekla, a odstupaju od učestalosti ovih alela kod crnaca afričkog porekla [102,103].

T174M polimorfizam može biti asociran sa povećanim rizikom od hipertenzije, iako u različitim istraživanjima ovo nije uvek potvrđeno [104]. Efekat T174M varijante na nivoe plazma AGT nije dovoljno poznat, tako da uticaj T174M na podložnost hipertenziji treba dodatno ispitati.

I pored nedostatka jedinstvenog zaključka, dijabetesnu nefropatiju, proliferativnu retinopatiju i povišen nivo ekskrecije albumina mnoge studije dovode u vezu T 235 polimorfizmom. Neki radovi upućuju na značaj interakcije T i D alela ACE gena u progresiji slabosti bubrega, ali i mogućem protektivnom značaju ACE II polimorfizma u kardiovaskularnim komplikacijama kod dijabetičara sa nefropatijom [105] što naši rezultati nisu potvrdili obzirom da je učestalost I i D alela u ispitivanim grupama gotovo podjednaka.

Druga dva ključna gena RAS sistema za koje je takođe pokazano da učestvuju u razvoju dijabetesne nefropatije (ACE I/D i AT1R A1166C), imaju sinergistički efekat sa polimorfizmima AGT gena i njihove međusobne interakcije, geni kinin - kalikrein sistema, takođe mogu učestvovati u razvoju nefropatije. Ranije studije su analizirale uticaj pojedinačnih gena RAS sistema, ali se vrlo brzo došlo do stanovišta da na napredovanje bolesti ravnopravno utiču količina funkcionalnog angiotenzinogena, količina i aktivnost angiotenzin konvertujućeg enzima i broj i afinitet receptora za Ang II [106].

Dijabetesna nefropatija je, sledstveno tome, poligeno oboljenje, zbog čega je teže utvrditi koliko gena učestvuje u njenom razvoju i koliki je pojedinačni uticaj svakog gena. Jedan gen se ne može posmatrati izvan konteksta drugih gena.

Analizom podataka za ACE gen, nismo dobili potvrdu da učestalost "rizičnih" varijanti raste sa stepenom razvoja nefropatije kod ispitanika sa tipom I dijabetesa. Učestalost D alela se nije značajno razlikovala među ispitivanim grupama pacijenata. Time se značaj DD genotipa, kao i primena terapije ACE inhibitorima u terapiji hipertenzije posredno dovodi u pitanje. Važno je, međutim, determinacijom genotipa gena RAS sistema odrediti aktivnost sistema u celini i tako odrediti odgovarajuću terapiju. Prisustvo TT genotipa AGT gena povezano je sa produženom proizvodnjom angiotenzinogena I koji i

pored niske aktivnosti ACE enzima održava visoku proizvodnju angiotenzinogena II i povišenu aktivnost celog RAS sistema. U tom slučaju, i pored II genotipa u genu za angiotenzin - konvertujući enzim, razumno je povećavati terapiju ACE inhibitorima i time smanjivati aktivnost celog sistema.

Izučavanjem distribucije genotipova i alela u genu za ACE i AT1R nismo našli značajnu asocijaciju sa stepenom razvoja dijabetesne nefropatije. U ispitivanju I/D polimorfizma gena za ACE, učestalost D alelske forme je bila nešto veća u grupi sa proteinurijom (52%) u odnosu na grupu sa normoalbuminurijom (48,5%), ali te razlike nisu imale statistički značaj. Učestalost DD genotipa, koji je povezan sa povećanjem nivoa serumskog ACE, je najmanja kod pacijenata sa mikroalbuminurijom (14,3%) u odnosu na sve tri ispitivane grupe.

Učestalost D alela ACE gena dobijena u ovom ispitivanju nešto je niža od vrednosti dobijenih za našu populaciju u ranijim studijama. Tako je, na primer, u studiji Balkanske endemske nefropatije (BEN) dobijena učestalost D alela 0.62 kod zdravih osoba i 0.67 kod BEN pacijenata. Znatno veća učestalost (0.88) dobijena je u grupi pacijenata sa drugim tipovima nefropatije, kod kojih je utvrđena i značajna asocijacija sa zastupljenošću DD genotipa (OR 5.4, $p < 0.01$) [114]. Slične vrednosti za učestalost D alela u našoj populaciji dobijene su i u studiji asocijacije sa aneurizmom abdominalne aorte – kod kontrola (zdravih osoba) učestalost D alela je bila 0.60, a u grupi pacijenata 0.71 [115].

Učestalost C alela gena za AT1 receptor u našem uzorku pacijenata je nešto viša u odnosu na prethodne podatke za našu populaciju - u navedenoj studiji [114] učestalost u kontrolnoj grupi zdravih osoba bila je 0.20, dok se u grupama pacijenata sa nefropatijama kretala od 0.23 do 0.31.

Poznato je da u proseku oko 30% insulin zavisnih dijabetičara razvije nefropatiju. Stoga bi bilo važno rano prepoznati dijabetičare koji imaju genetičku sklonost ka razvoju nefropatije i preduzeti mere u smislu održanja optimalne glikoregulacije, uključujući ranu upotrebu malih doza ACE inhibitora zbog renoprotektivnog dejstva, regulacije holesterola i

triglicerida, prestanak pušenja (iako naša studija nije dobila značajnost vezanu za pušačke navike) sa ciljem odlaganja početka ili usporavanja razvoja nefropatije.

Analizom demografskih parametara ispitanika sa tipom I dijabetesa, ustanovili smo statistički značajnu razliku u srednjoj vrednosti starosti (životne dobi) između ispitivanih grupa pacijenata. Prosek godina ispitanika u definisanim grupama je bio najveći u grupi ispitanika sa proteinurijom i ove vrednosti su bile statistički značajne ($p < 0,001$).

Grupe pacijenata – bez nefropatije, sa incipijentnom i sa manifestnom nefropatijom (normoalbuminurični, mikroalbuminurični i proteinurični) su se statistički značajno razlikovale po dužini trajanja osnovne bolesti ($p < 0,001$). Srednja vrednost trajanja dijabetesa u ispitivanim grupama bila je najniža u grupi normoalbuminuričnih a najviša u grupi proteinuričnih ispitanika. Dobijeni rezultati potvrđuju da je dužina trajanja dijabetesa faktor koji, udružen sa drugim činiocima (genetičkom predispozicijom, lošom metaboličkom kontrolom dijabetesa, hipertenzijom), igra važnu ulogu u nastajanju i razvoju nefropatije.

Generalno, većina studija ukazuje na veću zastupljenost muškaraca među bolesnicima sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom [74], odnosno sa dijabetesnom nefropatijom [75]. U studiji Ritza i sar. [76], utvrđeno je da kod muškaraca, u odnosu na žene, pored veće prevalencije značajniji je i stepen progresije dijabetesne nefropatije. Britanska prospektivna studija (UKPDS 64) [77] koja je obuhvatila oko 5100 ispitanika, ukazala je da je zastupljenost muškaraca među obolelim od dijabetes melitusa nešto veća (59%) u odnosu na žene, što je najverovatnije objašnjenje za veću učestalost DN među muškarcima. Međutim, pored navedenih studija, postoje i one u kojima pol nije imao prediktivnu vrednost u progresiji bubrežne disfunkcije kod dijabetičara [78], kao i studije u kojima je ženski pol bio rizičnija grupa za razvoj nefropatije [79]. U našoj studiji, zastupljenost žena i muškaraca je bila gotovo jednaka u grupi normo i mikroalbuminuričnih ispitanika ali ne i u grupi ispitanika sa proteinurijom (36 žena / 64 muškarca).

Rezultati naših istraživanja, koji se odnose na nasledno opterećenje za pojavu hipertenzije, dijabetesa i kardiovaskularnih bolesti u ispitivanim grupama se donekle

uklapaju sa rezultatima sličnih studija. Vrednosti pozitivnog porodičnog opterećenja za hipertenziju mogu biti i 40% u grupi mikroalbuminuričnih pacijenata, dok neki rezultati govore o čak 54 % ispitanika sa pozitivnom porodičnom anamnezom za dijabetes [76]

Naši podaci pokazuju da čak 66,7% normoalbuminuričnih i mikroalbuminuričnih ispitanika ima pozitivnu porodičnu anamnezu za hipertenziju, a visok procenat je prisutan i u grupi pacijenata sa proteinurijom (64%). Analizom prisustva pozitivne porodične anamneze za dijabetes i kardiovaskularne bolesti, najveći procenat je dobijen u grupi pacijenata sa mikroalbuminurijom (66,7% /61,9%). Dobijene vrednosti su visoke i ne razlikuju se značajno među grupama pacijenata.

Pušenje se i dalje smatra jednim od značajnijih faktora rizika za razvoj i progresiju dijabetesne nefropatije, nezavisno od pola, godina, trajanja dijabetesa, nivoa HbA1c. Više studija podržava to stanovište [116]. Međutim, nije bilo statistički značajne razlike u zastupljenosti pušača u našim ispitivanim grupama.

Jedan od ciljeva našeg istraživanja bilo je utvrđivanje povezanosti učestalosti ispitivanih polimorfizama gena renin-angiotenzin sistema u razvoju komplikacija kod tipa I dijabetesa. Najčešće prisutne komplikacije u dijabetesu su hipertenzija, polineuropatija i retinopatija. Pređašnje studije [117] iznose kontradiktorne rezultate o povezanosti RAS sistema i komplikacija u tipu I dijabetesa.

Mikrovaskularne komplikacije su u obolelih od dijabetesa često uzrok težeg invaliditeta i bitno utiču na dužinu života dijabetičara. Promene se odvijaju na svim malim krvnim sudovima ali su najkarakterističnije promene na retini (dijabetesna retinopatija), bubrezima (dijabetesna nefropatija), perifernim nervima (dijabetesna polineuropatija) i kapilarima skeletnih mišića. Danas se smatra da su promene na malim krvnim sudovima posledica delovanja više faktora i mehanizama i to pre svega genetičke predispozicije, hiperglikemije, hemodinamskih promena i tzv. hormonske modulacije.

Neka ispitivanja [119] su pokazala da je učestalost retinopatije u insulin zavisnih dijabetičara sa trajanjem bolesti do 5 godina niska. Međutim, posle 10 godina trajanja bolesti čak i do 60% ima retinopatiju, a posle 15 godina i do 80%.

Naši rezultati su ukazali da je učestalost pojave retinopatije najveća (76%) u grupi ispitanika sa proteinurijom, kod ispitanika sa mikroalbuminurijom 52,4%, dok je u grupi normoalbuminuričnih, navedene komplikacije imalo 21,2% ispitanika. Dobijene razlike su statistički značajne ($p < 0,001$).

Dijabetesna polineuropatija je posledica insulinskog deficita i/ili hiperglikemije. Postoji direktna povezanost sa trajanjem šećerne bolesti ali i sa izraženošću hiperglikemije tokom trajanja bolesti i to se pokazalo kod insulin zavisnih i kod insulin nezavisnih dijabetičara. Iz naših rezultata se vidi da je zastupljenost polineuropatije najveća u grupi pacijenata sa mikroalbuminurijom (66,7%) a u grupi normoalbuminuričnih pacijenata (39,4%), ali razlika nije statistički značajna.

Hemoglobin A1c je marker regulisanosti glikemija koji je u najširoj upotrebi u kliničkoj praksi, iako se poslednjih godina vodi polemika o ulozi ovog markera u prisustvu hroničnih komplikacija dijabetesne bolesti [84]. Preporuke su da se nivo HbA1c kod obolelih od dijabetesa održava na vrednostima ispod 7% [85], odnosno 6,5% [86]. Studije ukazuju da je broj pacijenata koji je postigao tzv. AB preporuku (HbA1c < 7%, krvni pritisak < 130/80 mmHg i nivo ukupnog holesterola < 5,2 mmol/L) relativno nizak, ali da raste. U CBEP studiji [87], između ispitanika obolelih od dijabetesa ne uočava se značajna razlika u nivou HbA1c. Analiza dugoročnih parametara glikoregulacije (HbA1c) ni u našoj studiji, nije pokazala značajnu razliku u nivou HbA1c između ispitivanih grupa pacijenata.

U studiji Rossinga i sar.[78], ukazano je da hiperglikemija ima značajnu ulogu u progresiji bubrežne disfunkcije u ranim stadijumima nefropatije, kao i da se taj uticaj smanjuje sa većom progresijom bubrežne bolesti, kada dolazi do značajnijeg uticaja ostalih faktora progresije (albuminurije, krvnog pritiska), što se vidi i u rezultatima naše studije uprkos relativno malom broju analiziranih ispitanika.

Poznato je da se u dijabetesu često javljaju poremećaji u metabolizmu lipida, naročito se često sreću povišene vrednosti triglicerida.

U prospektivnoj studiji Ravida i sar. [88] ukazano je da je serumska koncentracija ukupnog holesterola, ali ne i triglicerida, jedan od značajnih prediktora redukcije funkcionalne rezerve bubrega. U istoj studiji je utvrđen i uticaj LDL holesterola na bubrežnu disfunkciju. Takođe je u studiji Cardosoove [90] zaključeno da je serumska koncentracija ukupnog holesterola nezavisni prediktor razvoja nefropatije u bolesnika sa dijabetesom.

Vrednosti koje smo dobili analizom parametara lipidnog statusa, ukupnog holesterola, HDL i LDL holesterola, u našim ispitivanim grupama se nisu ni statistički značajno razlikovale. Vrednosti triglicerida, naprotiv, pokazuju značajnu razliku između grupe normoalbuminuričnih i grupe proteinuričnih ispitanika ($p < 0,001$).

Poznato je stanovište da se u stanju poodmakle dijabetesne nefropatije uz sve pomenute promene javlja poremećaj u lipidima, tako da se može utvrditi porast holesterola, LDL holesterola kao i triglicerida, dok je nivo HDL holesterola snižen [120]. Ove promene bi mogle da pogoršaju razvoj sklerotičnih promena u glomerulima. To znači da bi bilo veoma važno da se ovi poremećaji leče čim se konstatuju.

Korišćenjem multivarijantne logističke regresione analize, kreiran je model u koji su ušle varijable koje su se pokazale značajnim za nastanak nefropatije na osnovu dosadašnjih rezultata i iskustva. Model je pokazao da su trajanje dijabetesa, prisustvo hipertenzije, retinopatija i TT polimorfizam AGT gena značajni prediktori za nastanak nefropatije. Na osnovu dobijenih podataka, može se zaključiti da duže trajanje dijabetesa značajno uvećava šansu (približno 1,2 puta) za nastanak nefropatije. Učestalost nefropatije je 5.2 puta veća kod dijabetičara sa hipertenzijom, dok TT genotip ukazuje na značajno veću sklonost ka razvoju nefropatije u odnosu na MM genotip. Time se hipertenzija i TT genotip u genu za angiotenzinogen (AGT) kod pacijenata u terminalnom stadijumu nefropatije, mogu smatrati značajnim u određivanju markera procene rizika za nastanak komplikacija u tipu I dijabetesa.

Dijabetesna nefropatija (DN) je osnovni uzrok terminalnih bubrežnih komplikacija u tipu I i tipu II dijabetesa. Dva osnovna faktora rizika kod DN su hiperglikemija i arterijska hipertenzija. Hemodinamske promene u razvoju komplikacija osnovne bolesti se pokušavaju objasniti promenom aktivnosti RAS sistema. Polimorfizam gena RAS sistema može biti povezan sa kardiovaskularnim poremećajima a brojne studije ukazuju na vezu polimorfizma ovih gena i moguću predispoziciju za razvoj dijabetesne nefropatije. Ovakvo gledište doprinosi konceptu po kom će DN progredirati samo u određenoj grupi pacijenata. Nastalu nefropatiju brojni faktori rizika dalje komplikuju. Kako se geni uključeni u regulaciju arterijskog pritiska smatraju odgovornim i za razvoj dijabetesne nefropatije, to analiza gena RAS sistema ima značajnu ulogu u dijagnostici i mogućoj terapiji ovog oboljenja. U kliničkom smislu to bi značilo da dijabetičari sa MT i TT genotipom za AGT gen imaju veću sklonost ka razvoju dijabetesne nefropatije. Ovakve genetičke analize mogu pomoći u ranoj identifikaciji osoba sa visokim rizikom za razvoj ove bolesti i tako sprečiti dalje komplikacije. Rezultati dobijeni genetičkim ispitivanjem mogu biti polazna osnova rutinskoj godišnjoj proveri mikroalbuminurije koja se u konvencionalnoj praksi primenjuje za identifikaciju bolesnika sa nefropatijom na početnom stepenu razvoja ove bolesti. Preporuka bi bila da se nakon uspostavljanja dijagnoze, analizira genotip pacijenata za ključne komponente RAS sistema i da se na osnovu tako dobijenih informacija, u skladu sa najnovijim istraživanjima, prilagodi terapija pacijentu. Ovakva individualizovana terapija je terapija budućnosti, i imaće punog efekta tek kada se budu razjasnili svi mehanizmi koji dovode do pojave nefropatije, čemu značajan doprinos daju genetička istraživanja.

ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata ove doktorske disertacije, izvedeni su sledeći zaključci:

-Analizirana su dva polimorfizma AGT gena (M235T/T174M) kod naših ispitanika, podeljenih prema stepenu razvoja nefropatije na normoalbuminurične, mikroalbuminurične i protenurične. Polimorfizam M235T AGT gena pokazao je značajnu asocijaciju sa razvojem dijabetesne nefropatije. Utvrđeno je da je učestalost T alelske forme veća u grupama sa većim stepenom bubrežnih komplikacija. TTgenotip, koji se povezuje sa većom sintezom angiotenzinogena, prisutan je u samo 9% ispitanika sa normoalbuminurijom, i u čak 36% ispitanika u grupi sa proteinurijom ($p < 0.05$).

- Nasuprot tome, naši rezultati nisu pokazali da postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti alela i genotipova za AGT T174M između ispitivanih grupa.

- Ispitivanje učestalosti alela i genotipova ACE i AT1R gena nije pokazalo da je učestalost pretpostavljenih „rizičnih“ varijanti (DD genotip za ACE gen i CC genotip u genu za AT1 receptor) veća kod ispitanika sa većim stepenom razvoja nefropatije. Učestalost D alela u ispitivanim grupama pacijenata se nije statistički značajno razlikovala među ispitivanim grupama pacijenata, dok je učestalost DD genotipa bila manja u grupi proteinuričnih nego u grupi normoalbuminuričnih pacijenata.

-Analizom demografskih parametara ispitanika sa tipom I dijabetesa, ustanovili smo statistički značajnu razliku u srednjoj vrednosti starosti (životne dobi) između ispitivanih grupa pacijenata. Prosečna starost ispitanika u definisanim grupama je bila najveća u grupi ispitanika sa proteinurijom. Vrednosti porodičnog opterećenja za pojavu hipertenzije, trajanje dijabetesa i kardiovaskularnih bolesti nisu pokazale značajnu razliku između grupa.

-Navedene grupe su se statistički značajno razlikovale po dužini trajanja osnovne bolesti. Ovaj rezultat potvrđuje da je dužina trajanja dijabetesa važan faktor koji udružen sa drugim činiocima (genetičkom predispozicijom, lošom metaboličkom kontrolom dijabetesa, hipertenzijom) ima važnu ulogu u nastajanju i razvoju nefropatije.

- Učestalost hipertenzije u ispitivanim grupama se statistički značajno razlikuje i najviša je kod pacijenata sa terminalnom bubrežnom slabošću.

- Učestalost pojave retinopatije (ali ne i polineuropatije) bila je značajno veća u grupi proteinuričnih ispitanika u odnosu na grupu pacijenata sa normoalbuminurijom.

-Vrednosti ukupnog holesterola, HDL holesterola i LDL holesterola nisu pokazale statistički značajnu razliku između grupa, dok vrednosti triglicerida pokazuju statistički značajnu razliku između grupe pacijenata sa normoalbuminurijom i proteinurijom. Nađeno je, takođe, da parametri lipidnog statusa (ukupni holesterol, LDL) pozitivno korelišu sa HbA_{1c} u ispitivanim grupama

- Jedan od ciljeva našeg istraživanja bilo je utvrđivanje povezanosti polimorfizama ispitivanih gena sa razvojem komplikacija kod dijabetesa tipa I, kao što su hipertenzija, retinopatija i polineuropatija. Analize su pokazale da nema statistički značajne razlike u učestalosti grupisanih genotipova (T/- AGT, D/- ACE i C/- AT1R) u odnosu na prisustvo/odsustvo navedenih komplikacija, te oni ne bi mogli da se smatraju markerom rizika za razvoj komplikacija.

-Analiza procentualne zastupljenosti haplotipova polimorfizama M235T i T174M gena za AGT između analiziranih grupa pokazala je da identifikovani haplotipovi nisu bili u statistički značajnoj asocijaciji sa rizikom za razvoj nefropatije kod tipa I dijabetesa u poređenju sa najčešće zastupljenim haplotipom MT koji je korišćen kao referentna vrednost. Izvesna tendencija ka sniženom riziku za razvoj mikroalbuminurije i proteinurije je utvrđena za TM haplotip.

-Na osnovu rezultata multivarijatnog regresionog modela, za nastanak poremećaja funkcije bubrega kao značajni su se pokazali: trajanje bolesti (DM), hipertenzija i TT genotip AGT M235T (OR od 1,2 do 28).

LITERATURA

1. Dobretsov M, Romanovsky D, Joseph R Stimers: Early diabetic neuropathy: Triggers and mechanisms. *World J Gastroenterol* 2007; 13(2):175-191.
2. Medić-Zamaklar M, Đorđević BP. Diabetes mellitus i bolesti metabolizma. *Interna medicina. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva* 2003; 8:1250-1254.
3. Diabetes mellitus: Report of the WHO study group. *Tech Rep Ser* 1985; 727:1-113.
4. Đorđević BP. Diabetes mellitus i bolesti metabolizma. *Interna medicina. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva*, 2003; 8:1230-1233.
5. Hussain AN. Vincent MT. Diabetes mellitus, Type I, eMedicine.com, Inc.2005.
6. Gillespie KM. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. *Canad Med Assoc J* 2006; 175(2).
7. Đorđević BP. Epidemiologija diabetes mellitusa. U: *Interna medicina*, Prosveta 1994; 552-554.
8. Sicree R, Shaw JE, Zimmet PZ. The global burden of diabetes. In: Gan D, editor. *Diabetes Atlas*. 3rd ed. Brussels: International Diabetes Federation 2006; 150-3.
9. Grant JF, Hicks N, Taylor AW, Chittleborough CR, Phillips PJ. The North West Adelaide Health Study Team. Gender- specific epidemiology of diabetes: a representative cross-sectional study. *Int J Equity Health* 2009; 8(1):6.
10. Orisio S. Gene polymorphism of the renin-angiotensin system and progresion of diabetic nephropathy. *J Nephrol* 1999; 12,1:9-17.
11. Dragović T, Ajdinović B, Hrvačević R, Ilić V, Magić Z, Anđelković Z, Kocev N. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism could influence renoprotective response to losartan treatment in type I 1 diabetic patients with high urinary albumin excretion rate. *Vojnosanit Pregl* 2010; 67(4):273-8.

12. Ilić V, Ilić M, Magić Z. Polimorfizam gena renin-angiotenzin sistema u prevenciji i lečenju dijabetesne nefropatije. MD- Medical Data 2012; 4(1):043-049.
13. Medić-Zamaklar M, Đorđević BP. Diabetes mellitus i bolesti metabolizma. Interna medicina. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva 2003; 8:1273-1325.
14. Brewster UC, Perazella MA: The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects of the kidney disease. Am J Med 2004; 4:263-72.
15. Levey A, Stevens L, Schmid C, Zhang Y, Castro A, Feldman H, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. Ann Intern Med 2009; 150:604-12.
16. Deckert T, Feldt-Rasmussen B, Borch-Johnsen K, Jensen T, Kofoed-Enevoldsen A. Albuminuria reflects widespread vascular damage. The steno hypothesis. Diabetologia 1989; 32:219-226.
17. Viberti GC, Wiseman MJ, Redmond S. Microalbuminuria: its history and potential for prevention of clinical nephropathy in diabetes mellitus. Diab Nephrol 1984; 3:79-82.
18. Fioretto P, Maner M. Histopathology of diabetic nephropathy. Semin Nephrol 2007; 27(2):195-207.
19. Teravest TW, Mooyaart AL, Amann K, Cohen AH, Cook HT et al. Pathologic Classification of diabetic nephropathy. J Am Soc Nephrol 2010; 21(4):556-63.
20. Viberti G, Bilous R, Mackintosh D, Bending J, Keene H. Long term correction of hyperglycaemia and progression of renal failure in insulin dependent diabetes. BMJ 1983; 286:598-602.
21. Borwnlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation and-product in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. New Engl J Med 1988; 318:1315-1321.
22. Cohen MP, Saini R, Klepsen H, Vasanthil LG. Fibronectin binding to glomerular basement membrane is altered in diabetes. Diabetes 1987; 36:758-763.

23. Osterby R. Glomerular structural changes in type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia* 1992; 35:803-12.
24. Cagliero E, Maiello M, Boeri D, Roy S, Lorenzi M. Increased expression of basement membrane components in human endothelial cells cultured in high glucose. *J Clin Invest* 1988; 82:735-738.
25. Jensen T. Increased plasma level of von Willebrand factor in type 1 diabetic patients with incipient nephropathy. *Br Med J* 1989; 298:27-27.
26. Jensen T, Feldt-Rasmussen B, Bjerre-Knudsen J, Deckert T. Features of endothelial dysfunction in early diabetic nephropathy. *Lancet* 1989; i:461-463.
27. Burg MB. Role of aldose reductase and sorbitol in maintaining the medullary intracellular milieu. *Kidney Int* 1988; 33:635-641.
28. Pederson MM, Christiansen J.S, Mogensen C.E. Renal effects of an aldose reductase inhibitor (Statil) during 6 month treatment in type 1 diabetic patients. *Diabetologia* 1989; 32:516.
29. Simonson DC. Etiology and prevalence of hypertension in diabetic patients. *Diabetes Care* 1988; 11:821-7.
30. Weidmann P, Boehler LM, de Courten M. Pathogenesis and treatment of hypertension associated with diabetes mellitus. *Am Heart J* 1993; 125:1498-513.
31. Brewster UC, Perazella MA. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. *Am J Med* 2004; 116(4):263-72.
32. Petrović D, Nikolić A, Stojmirović B. Uloga renin-angiotenzin sistema u progresiji hronične slabosti bubrega. *PONS Med J* 2008;2:13-21.
33. Brown N, Vaughan D. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation* 1998; 97:1411-1420.

34. Leung PS, Carlsson PO. Tissue renin-angiotensin system: its expression, localization, regulation and potential role in the pancreas. *J Mol Endocrinol* 2001; 26:155-164.
35. Mehta KP, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: Physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Cell Physiol* 2007; 292:C82-C97.
36. Orth SR, Weinrecht T, Bonisch S, Weih M, Ritz E. Angiotensin II induces hypertrophy and hyperplasia in adult mesangial cells. *Exp Nephrol* 1995; 3,1:23-33.
37. Paul M, Royan MA, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 2006; 86,747–803.
38. Montani JP, Van Vliet BN. General Physiology and Pathophysiology of the Renin-Angiotensin System. Department of Medicine/Division of Physiology, University of Fribourg, Switzerland; Division of Basic Medical Sciences, Faculty of Medicine, Memorial University of Newfoundland, Canada, 2003.
39. Urushihara M, Kagami S. Urinary Angiotensinogen as a Biomarker of Nephropathy in Childhood. *Int J Nephrol* 2011; Volume 2011, Article ID 206835.
40. Tamura K, Umemura S, Fukamizu A, Ishii M, Murakami K. Recent Advances in the Study of Renin and Angiotensinogen Genes: From Molecules to the Whole Body. *Hypertens Res* 1995; 18(1):7-18.
41. Atlas SA. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm* 2007;13: 9–20.
42. Nguyen G. Renin/prorenin receptors. *Kidney Int* 2006; 69,1503–1506.
43. Huang Y, Wongamorntham S, Kasting J, Mc-Quillan D, Owens RT, Yu L et al. Renin increases mesangial cell transforming growth factor-1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms. *Kidney Int* 2006; 69:105–113.
44. Gimenez-Roqueplo AP, Giulio Lucarelli, Pierre Corvol, Xavier Jeunemaitre. Role of N-Glycosylation in Human Angiotensinogen. *J Biol Chem* 1998; 27(33):21232–21238.

45. Zhou A, Carrell WR, Murphy MP, Wei Z, Yahui Y, Peter LD. et al. A redox switch in angiotensinogen modulates angiotensin Release. *Nature* 2010; 468(7320):108–111.
46. Deschepper CF, Bouhnik J, Ganong WF. Colocalization of angiotensinogen and glial fibrillary acidic protein in astrocytes in rat brain. *Brain Res* 1986; 374:195–198.
47. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotevtsew YU, Lifton RP, Williams CS, Charry A, Hunt SC et al. Molecular basis of human hypertension, role of angiotensinogen. *Cell* 1992; 7(1): 169-80.
48. Lovati E, Richard A, Frey MB, Frey JF, Ferrari P. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system in the end stage renal disease. *Kidney Int* 2001; 60:46.
49. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The Intrarenal Renin-Angiotensin System: From Physiology to the Pathobiology of Hypertension and Kidney Disease. *Pharmacol Rev* 2007; 59:251–287.
50. Natech R, Schwager SLU, Sturrock ED, Acharya KR. Human Angiotensin I Converting Enzyme Structure Revealed. *Nature* 2003; 421:551.
51. Dzau VJ. Molecular studies of human renin-structure and synthesis using monoclonal antibodies. *Clin Exp Hypertens A* 1987; 9(8-9):1291-304.
52. Ferrario CM. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1–7): an evolving story in cardiovascular regulation. *Hypertension* 2006; 47:515–521.
53. Zelmanovitz T, Gerchman F, Balthazar A, Thomazelli F, Matos J, Canani L. Diabetic nephropathy. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 2009; 1:10.

54. Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene. *Nucl Acids Res* 1992; 20:1433.
55. Mc Kenzie CA, Julier C, Forrester T et al. Segregation and Linkage Analysis of Serum Angiotensin I Converting Enzyme Levels: Evidence for Two Quantitative-Trait Loci. *Am J Hum Genet* 1995; 57:1426-1435.
56. Ramesh Prasad GV, Scholey WJ. Gene polymorphisms of the renin angiotensine system in renal disease. *Nephrol Rounds* 2001; 2:3.
57. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F. et al. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86(4):1343-1346.
58. Andersen S. Angiotensine II receptor blockade in diabetic nephropathy. *Dan Med Bull* 2004; 51: 274-294.
59. Abdollahi MR, Gaunt TR, Syddall HE, Cooper C, Phillips DIW et al. Angiotensin II type I receptor gene polymorphism: anthropometric and metabolic syndrome traits. *J Med Genet* 2005; 42:396-401.
60. Assali A, Behravan J, Paydar R et al. Association between angiotensin II type 1 receptor A1166C polymorphism and the presence of angiographically defined coronary artery disease in an Iranian population. *Asian Biomed* 2010; 4:307-314.
61. Spiering W, Kroon AA, Fuss-Lejeune MM et al. Angiotensine II Sensitivity is associated with the ang II type 1 receptor A(1166)C polymorphism in essential hypertension on a high sodium diet. *Hypertension* 2000; 36:411-416.

62. Castrop H, Ho Cherl K, Kurtz A, Schweda F, Todorov V, Wagner C: Physiology of Kidney Renin. *Physiol Rev* 2010; 90:607–673.
63. Marre M. Genetics and the Prediction of Complications in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 1999; 22:B53-B58.
64. Stehouwer, van Ittersum, de Man, Thijssen, de Knijff, Slagboom et al. Genetic polymorphism of renin-angiotensin system and complications of insulin-dependent diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* July 2000; 15(7):1000-1007(8).
65. Hilgers KF, Langenfeld MR, Schlaich M, Veelken R, Schmiedcr RE. 1166 A/C polymorphism of the angiotensin II type 1 receptor gene and thr response to short-term infusion of angiotensin II. *Circulation* 1999; 100:1394-9.
66. Assali A, Behravan J, Paydar R. Association between angiotensin II type 1 receptor A1166C polymorphism and the presence of angiographically defined coronary artery disease in an Iranian population. *Asian Biomed* 2010; 4:307-314.
67. Sery O, Vojtova V, Zvolsky P. The Association Study of DRD2, ACE and AGT Gene Polymorphism and Metamphetamine Dependence. *Physiol Res* 2001; 50:43-50.
68. Bonnardeaux A, Davies E, Jeunematre X. Angiotensin type II 1 receptor gene polymorphism in human essential hypertension. *Hypertension* 1994; 24,63-69.
69. Slade H. High-risk diabetic nephropathy patients: The outcome of evidence-based clinical practice in an outpatient clinic. *Diab Res Clin Pract* 2011; 02:22.
70. Parving HH, Mauer M, Ritz E. Diabetic nephropathy. U: Brenner and rectors *The kidney*. 7 ed., Filadelfija, WB Saunders 2004; 1777-818.

71. Bruno G, Biggeri A, Merleti F, Bargerò G, Ferrero S, Pagano G. Low incidence of end-stage renal disease and chronic renal failure in type 2 diabetes. A 10-year prospective study. *Diabetes Care* 2003; 26:2353-8.
72. Trevisan R, Vedovato M, Mazzon C, Coracina A, Iori E, Tiengo A, et al. Concomitance of diabetic retinopathy and proteinuria accelerates the rate of decline of kidney function in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2002; 25:2026-35.
73. Vupputuri S, Nichols G, Lau H, Joski P, Thorp M. Risk of progression of nephropathy in a population-based sample with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2011; 91:246-52.
74. Taal M, Brenner B. Predicting initiation and progression of chronic kidney disease: developing renal risk scores. *Kidney Int* 2006; 70:1694-705.
75. Van der Zijl N, Hanemaaijer R, Tushuizen M, Schindhelm R, Boerop J, Rustemeijer C, et al. Urinary matrix metalloproteinase-8 and -9 in type 2 diabetic subjects: A marker of incipient diabetic nephropathy. *Clin Biochem* 2010; 43:635-9.
76. Ritz E, Orth SR. Nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *N Eng J Med* 1999; 341:1127-33.
77. Adler A, Stevens R, Manley S, Bilous R, Cull C, Holman R (UKPDS group). Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: The United Kingdom prospective diabetes study (UKPDS 64). *Kidney Int* 2003; 63:225-32.
78. Rossing K, Christensen P, Hovind P, Tarnow L, Rossing P, Parving H- H. Progression of nephropathy in type 2 diabetic patients. *Kidney Int* 2004; 66:1596-605.
79. Yokoyama H, Kanno S, Takahashi S, Yamada D, Itoh H, Saito K, et al. Determinants of decline in glomerular filtration rate in nonproteinuric subjects with or without diabetes and hypertension. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4:1432-40.

80. Ueda H, Ishimura E, Shoji T, Emoto M, Morioka T, Matsumoto N, et al. Factors affecting progression of renal failure in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26:1530-4.
81. Schrier RW, Estacio RO, Esler A, Mehler P. Effects of aggressive blood pressure control in normotensive type 2 diabetics on albuminuria, retinopathy, and strokes. *Kidney Int* 2002; 61:1086-97.
82. Fowler JM. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clinical Diabetes* 2008; 2: 26.
83. Zorena K, Raczynska D, Raczynska K. Immunological Risk Factors for the Development and Progression of Diabetic Retinopathy. Medical University of Gdansk, 2012.
84. Montori V, Gandhi G, Guyatt G. Patient-important outcomes in diabetes-time for consensus. *Lancet* 2007; 370:1104-6.
85. American Diabetes Association. Implication of the United Kingdom Prospective Diabetes Study. *Diabetes Care* 2007; 30:4-41.
86. American Diabetes Association: Nephropathy in diabetes. *Diabetes Care* 2007; 27:79-83.
87. Varma S, Boyle LL, Varma MR, Patt GA. Controlling the ABCs of diabetes in clinical practice: a community-based endocrinology practice experience. *Diabetes Res Clin Pract* 2008; 80:89-95.
88. Ravid M, Brosh D, Ravid-Safran D, et al. Main risk factors for nephropathy in type 2 diabetes mellitus are plasma cholesterol levels, mean blood pressure, and hyperglycemia. *Arch Intern Med* 1998; 158:998-1004.
89. Cardoso C, Salles G. Predictors of development and progression of microvascular complications in a cohort of Brazilian type 2 diabetic patients. *J Diabetes Compl* 2008; 22:164-70.

90. Kaene W, Brenner B, Zeeuw D, Grunfeld J-P, McGill J, Mitch W, et al. The risk of developing end-stage renal disease in patients with type 2 diabetes and nephropathy: The RENAAL Study. *Kidney Int* 2003; 63:1499-1507.
91. Bruno G, Bigger A, Merleti F, Bargero G, Ferrero S, Pagano G. Low incidence of end-stage renal disease and chronic renal failure in type 2 diabetes. A 10-year prospective study. *Diabetes Care* 2003; 26:2353-8.
92. Warram JH, Gearin G, Laffel L, Krolewski AS. Effect of duration of Type 1 diabetes on the prevalence of stages of diabetic nephropathy defined by urinary albumin/creatinine ratio. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7:930-7.
93. Stephenson JM, Fuller JH. Microalbuminuria is not rare before 5 years of IDDM. *J Diabet Compl* 1994; 8:166-73.
94. Orchard TJ, Dorman JS, Maser RE et al. Pittsburgh epidemiology of diabetes complication study. II. Prevalence of complications in IDDM by sex and duration. *Diabetes* 1990; 39:245-9.
95. Krolewski AS, Canessa M, Warram J. Predisposition to hypertension and susceptibility to renal disease in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1988; 318:140-5.
96. Navar LG, Harrison-Bernard LM, Imig JD, Wang CT, Cervenka L, Mitchell KD. Intrarenal angiotensin II generation and renal effects of AT 1 receptors blockade. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:266-72.
97. Hsueh W. Treatment of type 2 diabetic nephropathy by blockade of the renin-angiotensin system: a comparison of angiotensin-converting-enzyme inhibitors and angiotensin receptor antagonists. *Curr Opin Pharmacol* 2002; 2:182-8.
98. Ahmad J. Renin-angiotensin system blockade in diabetic nephropathy. *Diabetes Metab Syndrome: Clin Res Rev* 2008; 2:135-58.
99. Jaimer EA, Galceran JM, Raj L. Angiotensin II induces superoxide anion production by mesangial cells. *Kidney Int* 1997; 51:664-71.

100. Jeunemaitre X, Gimenez-Roqueplo A, Celerier J, Corvol P. Angiotensinogen variants and human hypertension. *Current Hypertension Reports*, 1999; 1:31-41.
101. Marre M. Genetics and the Prediction of Complications in type I Diabetes. *Diabetes Care* 1999; 22:53-58.
102. Basak AA, Sipahi T, Ustundag S, Ozgen Z, Budak M, Sen S, Sener S. Association of Angiotensinogen T174M and M235T Gene Variants with Development of Hypertension in Turkish Subjects of Trakya Region. *Biotechnol & Biotechnol*, 2008.
103. Roskopf D, Martin CM: Pharmacogenomics of G Protein-Coupled Receptor Ligands in Cardiovascular Medicine. *Pharmacol Rev* 2008; 60:513–535.
104. Renner W, Nauck M, Winkelmann BR, Hoffmann MM, Scharnagl H, Mayer V, Boehm OB, Marz W. Association of angiotensinogen haplotypes with angiotensinogen levels but not with blood pressure or coronary artery disease: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *J Mol Med* 2005; 83:235–239.
105. van Ittersum FJ, de Man AME, Thijssen S, de Knijff P, Slagboom E. et al. Genetic polymorphisms of renin-angiotensin system and complication of insulin-dependent diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1000-1007.
106. Jacobsen P, Tarnow L, Carstensen B, Hovind P, Poirier O. Genetic Variation in the Renin-Angiotensin System and Progression of Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:2843 -2850.
107. Miyata N, Park F, Li XF, Cowley Jr AW. Distribution of angiotensin AT1 and AT2 receptors sub types in the rat kidney. *Am J Physiol* 1999; 277:437-46.
108. Kagami S, Kuhara T, Okada K, Kuroda Y, Border NA, Noble NA. Dual effects of angiotensin II on the plasminogen/plasmin system in rat mesangial cells. *Kidney Int* 1997; 51:664-71.
109. Xavier Sole, Elisabet Guino, Joan Valls, Raquel Iniesta, Victor Moreno. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 2006; 22 (15): 1928-1929.

110. Brown DC, Steward LJ, Barnes NM, Ability of angiotensin II to modulate striatal dopamine release via the AT1 receptors in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1996; 118 (2):414-20.
111. Bleumink GS, Schut AF, Strukenboom MC, van Dujin CM, Deckers JW, Mortality in patients with hypertension in angiotensin I converting enzyme (ACE)-inhibitor treatment is influenced by the ACE insertion/deletion polymorphisms. *Pharmacogenomics* 2005; 15 (2):75-81.
112. Zee RY, Lou YK, Griffiths LR, Morris BJ. Association of a polymorphism of the angiotensin I convertong enzyme gene with essential hypertension. *Biochem Biophys Res Comm* 1992; 184:9-15.
113. Pereira AC, Mota GA, Bennsenor PA, Lotufo PA, Krieger JE. Efect of race, genetic population structure and genetic models in two locus association studies: clustering of functional renin-angiotensin system gene variants in hypertension association studies, genetic polymorphisms and ethnicity . *Brasilian Journal of Medical and Biological Res* 2001; 34:1421-1428.
114. Krcunović Z, Novaković I, Maksimović N, Bukvić D, Simić-Ogrizović S et al. Genetic clues to the etiology of Balkan Endemic Nephropathy: Investigating the role of ACE and AT1R polymorphisms. *Arch Biol Sci* 2010; 62 (4):957-965.
115. Novaković I, Maksimović N, Cvetković S, Cvetković D. Gene polymorphisms as markers of disease susceptibility. *J Med Biochem* 2010; 29:135-138.
116. Tonstad S. Cigarette smoking, smoking cesation, and diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2009; 85:4-13.
117. Chowdhury TA, Dyer PH, Kumar S, Barnett AH, Bain SC. Genetic determinants of diabetic nephropathy. *Clin Sci* 1999; 96(3):221-30.

118. Nosadini R, Velussi M, Brocco E, Bruseghin M, Abaterusso C, et al. Course of renal function in type 2 diabetic patients with abnormalities of albumin excretion rate. *Diabetes* 2000; 49:476-84.
119. Nakajima M, Cooney MJ, Tu AH, Chang KY, Cao J. Normalisation of retinal Vascular Permeability in experimental Diabetes with Gemistein. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42(9):2110-2114.
120. Krolewski AS, Warram JH, Christlieb AR. Hypercholesterolemia-a determinant of renal function loss and deaths in IDDM patients with nephropathy. *Kidney Int* 1994; 45:S125-31.
121. Mettimano M, Ianni A, Migneco A, Specchia ML, Romano-Spica V. Angiotensin-related genes involved in essential hypertension: allelic distribution in an Italian population sample. *Ital Heart J* 2001; 2(8):589-593.

BIOGRAFIJA

Vesna Ilić je rođena 20.08.1965. godine u Beogradu. Godine 1984/85 upisala Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Beogradu, studijska grupa biologija. Diplomirala sa opštim uspehom 7,71 u toku studija i ocenom 8 na diplomskom ispitu iz mikrobiologije.

Prvi radni odnos je zasnovala 1991. godine u Zavodu za preventivnu medicinu Vojnomedicinske akademije na Institutu za epidemiologiju, a 1996. je primljena na radno mesto diplomiranog biologa u Institutu za medicinska istraživanja VMA. Poslediplomske specijalističke studije na smeru molekularna biologija i biohemija, upisala 1997. godine. Doktorske studije, smer genetika, upisala 2009. godine. Tokom 1996. godine završila PCR školu na Biološkom fakultetu u Beogradu, a 2006. godine bila na obuci za Real-Time PCR i sekvenciranje u Voringtonu, V. Britanija. Učestvovala na dva projekta VMA-06-09/a5, VMA 06-11/a1 i trenutno je angažovana na projektu MFVMA/14/12-14.

Član je dva naučna društva, i autor i koautor u više radova: 10 radova u časopisima međunarodnog značaja, 4 rada u časopisima nacionalnog značaja, 3 saopštenja sa međunarodnog skupa štampano u izvodu i 20 saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampanog u izvodu.

PRILOZI

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Весна Илић

број уписа ГБ070006

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Улога полиморфизама гена за ангиотензиноген, ангиотензин-конвертујући ензим и АТ1 рецептор у развоју нефропатије у дијабетесу типа I

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 26.08.2013 године



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Весна Илић

Број уписа ГБ070006

Студијски програм Биологија, Модул генетика

Наслов рада Улога полиморфизма гена за ангиотензиноген, ангиотензин-конвертујући ензим и АТ1 рецептор у развоју нефропатије у дијабетесу типа I

Ментор проф. др. Драгана Цветковић, проф. др. сци. мед. Звонко Магић

Потписани Весна Илић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 26.08.2013 године



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Улога полиморфизма гена за ангиотензиноген, ангиотензин-конвертујући ензим и АТ1 рецептор у развоју нефропатије у дијабетесу типа I

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 26.08.2013 године



1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.