

# Koštani morfogenetski protein-7 u dijabetičkoj nefropatiji

---

Ivanac Janković, Renata

Doctoral thesis / Disertacija

2015

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:433059>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-11**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Renata Ivanac Janković**

**Koštani morfogenetski protein-7 u  
dijabetičkoj nefropatiji**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2015.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Renata Ivanac Janković**

**Koštani morfogenetski protein-7 u  
dijabetičkoj nefropatiji**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2015.**

Disertacija je izrađena u Djelatnosti za unutrašnje bolesti Opće bolnice Bjelovar i u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Voditelj istraživanja: Prof.dr.sc. Petar Kes

*Zahvaljujem mentoru prof.dr.sc. Petru Kesu na podršci i stručnoj potpori.*

*Veliko Hvala prof. dr.sc. Nikolini Bašić-Jukić koja mi je svesrdno pomagala, hrabrila me i poticala u cjelokupnom mom znanstvenom i stručnom radu.*

*Zahvaljujem svojoj obitelji; suprugu i sinu na bezuvjetnoj podršci koju mi pružaju, i vremenu koje su mi svakodnevno stvarali kako bih privela kraju izradu ove Disertacije.*

*Hvala Bogu koji me vodi putem uzanim...*

# SADRŽAJ

## Popis oznaka i kratica

<b>1.UVOD</b> .....	1
1.1.Bubreg.....	2
1.1.1.Anatomija.....	2
1.1.2.Fiziologija.....	4
1.1.3.Ispitivanje bubrežne funkcije.....	5
1.1.4.Zatajivanje bubrežne funkcije .....	7
1.1.4.1.Akutna ozljeda bubrega.....	7
1.1.4.2.Liječenje akutne ozljede bubrega.....	8
1.1.4.3.Kronična bubrežna bolest.....	11
1.1.4.4.Liječenje kronične bubrežne bolesti.....	16
1.2.Šećerna bolest.....	20
1.2.1. Epidemiologija šećerne bolesti.....	20
1.2.2. Etiološka klasifikacija.....	20
1.2.3. Akutne komplikacije.....	22
1.2.4. Kronične komplikacije.....	24
1.2.5. Dijabetička nefropatija.....	25
1.2.5.1. Definicija i epidemiologija.....	25
1.2.5.2. Patogeneza i patologija.....	26
1.2.5.3. Stadiji i kliničke osobitosti.....	30
1.2.5.4. Liječenje.....	31
1.3. Koštani morfogenetски proteini.....	34
1.3.1.Definicija i podjela.....	34
1.3.2.Stanični mehanizmi djelovanja.....	37
1.3.3.Koštani morfogenetски protein-7 .....	39
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	41
<b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	43

<b>4. ISPITANICI I METODE</b> .....	45
4.1.1. Prvi dio istraživanja-ELISA test.....	46
4.1.2. Drugi dio istraživanja-Imunohistokemijsko bojanje.....	48
4.1.3. Statistička analiza.....	49
<b>5. REZULTATI</b> .....	51
5.1. Rezultati ELISA testa.....	52
5.1.1. Raspodjela uzorka.....	52
5.1.2. Demografski podaci ispitanika.....	53
5.1.3. Udio pojedinih skupina lijekova u liječenju visokog krvnog tlaka, hiperlipoproteinemije i pridruženih bolesti.....	57
5.1.4. Raspodjela bolesnika prema nalazu fundusa.....	68
5.1.5. Testiranje razlike između skupina po kvalitativnim parametrima.....	70
5.1.6. Analiza laboratorijskih parametara, trajanja ŠB i vrijednosti krvnog tlaka.....	72
5.1.7. Testiranje razlike prema kliničkim obilježjima ispitanika u odnosu na BMP-7.....	77
5.2. Rezultati imunohistokemijskog bojanja.....	89
5.2.1. Izražaj BMP-7 u proksimalnim kanalićima.....	89
5.2.2. Izražaj BMP-7 u podocitima.....	92
<b>6. RASPRAVA</b> .....	93
<b>7. ZAKLJUČAK</b> .....	100
<b>8. SAŽETAK</b> .....	102
<b>9. SUMMARY</b> .....	105
<b>10. LITERATURA</b> .....	108
<b>11. ŽIVOTOPIS</b> .....	121

## POPIS OZNAKA I KRATICA

ACE	angiotenzin konvertirajući enzim (od engl.angiotensin converting enzyme)
ADQI	engl. Acute Dialysis Quality Initiative
AGEs	krajnji produkti glikozilacije (od engl. advanced glycosilation endproducts)
AKIN	engl. Acute Kidney Injury Network
ALK	engl. Activin receptor Like Kinase
ARB	blokatori receptora angiotenzina (od engl. angiotensin receptor blocker)
BMP-7	koštani morfoogenetski protein-7 (od engl.bone morphogenetic protein-7)
CKD – EPI	engl. Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration
CRRT	kontinuirano nadomještanje bubrežne funkcije (od engl. Continuous Renal Replacement Therapy)
CTGF	čimbenik rasta vezivnog tkiva (od engl.connective tissue growth factor)
CVVH	kontinuirana venovenska hemofiltracija (od engl. Continuous VenoVenous Hemofiltration)
CVVHD	kontinuirana venovenska hemodijaliza (od engl. Continuous VenoVenous Hemodialysis)
CVVHDF	kontinuirana venovenska hemodijafiltracija (od engl. Continuous VenoVenous HemoDiaFiltration)
DAG	diacilglicerol
DCCT	engl. Diabetes Control and Complications Trials
ERK	kinaze regulirane izvanstaničnim signalom (od engl. extracellular signal–regulated kinases)
FGF	čimbenik rasta fibroblasta (od engl. fibroblast growth factor)
GADA	protutijela na membranski protein (od engl. glutamic acid decarboxylase autoantibodies)
GDNF	neurotropni čimbenika nastao iz gliadina (od engl. gliadin derived neurotropic factor)
Hb	hemoglobin

HbA1c	hemoglobin A1c
IAA	protutijela na endogeni inzulin (od engl. insulin autoantibodies)
ICA	protutijela na antigen citoplazme Langerhansovih stanica (od engl. islet cell antibodies)
IDNT	engl. Irbesartan Diabetic Nephropathy Trial
IHD	intermitentna hemodijaliza
JNK	C-jun N-terminalna kinaza (od engl. C-Jun amino-terminal kinases)
KBB	kronična bubrežna bolest
KDIGO	engl. Kidney Disease: Improving Global Outcomes
KIM1	engl. kidney injury molecule-1
MAPK	kinaza aktivirana mitogenom (od engl. mitogen-activated protein kinase)
MDRD	engl. Modification of Diet in Renal Disease
NGAL	neutrofilni gelatinaza pridruženi lipocelin (od engl. neutrophil gelatinase-associated lipocalin)
PAI-1	inhibitor aktivatora plazminogena (od engl. plasminogen activator inhibitor-1)
PEM	proteinsko-energetska pothranjenost (od engl. protein-energy malnutrition)
PKC	protein kinaza C
PTH	paratireoidni hormon
RAAS	renin-angiotenzin-aldosteronski sustav
RIFLE	engl. Risk, Injury, Failure, Loss, End stage renal disease
RPS	engl. Renal Pathology Society
SCUF	polagana kontinuirana ultrafiltracija (od engl. Slow Continuous Ultrafiltration)
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija
ŠB	šećerna bolest
TGF-beta	transformirajući čimbenik rasta beta (od engl. transforming growth factor beta)
UKPDS	engl. United Kingdom Prospective Diabetes Study



## **1. UVOD**

## **1.1.BUBREG (lat.ren)**

### **1.1.1. Anatomija**

Bubrezi su parni organi koji uz mokraćovode, mokraćni mjehur i mokraćnu cijev čine mokraćni sustav. Smješteni su uz stražnju trbušnu stijenku, retroperitonealno, tako da je desni, obzirom na doticaj s desnim jetrenim režnjem položen nešto niže od lijevoga. U njihovom gornjem polu smještena je nadbubrežna žlijezda. Prosječne su dužine oko 110 mm, širine 50 mm, i težine 120 - 200 grama, crvenkastoplavkaste boje. Oblikom podsjećaju na zrno graha pri čemu se uz udubljeni, medijalni dio nalazi hilus - mjesto u kojemu u bubrež ulazi bubrežna arterija, a izlaze bubrežna vena i mokraćovod. Gornji prošireni kraj mokraćovoda naziva se bubrežna nakapnica, a dijeli se u dva do tri velika bubrežna vrča, koji se potom dijele u još nekoliko malih bubrežnih vrčeva (1).

Bubreg je prekriven vezivnom čahurom oko koje se nalazi ovojnica od masnog tkiva. Unutrašnju strukturu bubrega čine kora i srž. Srž sačinjavaju bubrežne piramide koje imaju oblik stožca čiji je širi dio na samoj granici između srži i kore i iz kojega sržni tračci prodiru u koru, dok je uži dio usmjeren prema malim bubrežnim vrčevima. Oni se nastavljaju u velike bubrežne vrčeve te spajaju u bubrežnu nakapnicu koja je anatomske prošireni gornji dio mokraćovoda. Između pojedinih piramida nalaze se tračci kore. U kori se nalaze bubrežna tjelešca ili glomeruli, čiji je promjer oko 200  $\mu\text{m}$  (nazivaju se i Malpighijeva tjelešca). Glomeruli se sastoje od mreže kapilara okružene epitelnom ovojnicom dvostruke stijenke nazvanom Bowmanova čahura. Unutrašnja se stijenka čahure naziva visceralnim listom i obavija kapilare glomerula, dok vanjska stijenka ili parijetalni list predstavlja vanjsku granicu bubrežnog tjelešca. Stanice koje sačinjavaju visceralni list nazivaju se podociti. Podociti su građeni od staničnog trupa od kojega polaze primarni izdanci koji se dalje dijele u sekundarne izdanke ili nožice koje obavijaju kapilare glomerula i izravno dodiruju bazalnu laminu kapilara, za razliku od staničnih trupova podocita i primarnih izdanaka koji ju ne dodiruju. Prostor koji omeđuju nožice podocita veličine je oko 25 nm i naziva se filtracijska pukotina. Filtracijska pukotina prekrivena je debelom opnom koja međusobno povezuje nožice podocita (2).

Krajem 90-tih godina prošlog stoljeća otkriven je mutirani gen, NPHS1, koji kodira protein nefrin izražen u podocitima, važan u održavanju cjelovitosti filtracijske membrane (3). Mutacije nefrina povezane su s teškim kongenitalnim nefrotskim sindromom Finskog tipa. Rezultati novijih istraživanja ukazuju na povezanost smanjenog izražaja nefrina s

napredovanjem albuminurije u dijabetičkoj nefropatiji (4,5).

Podociti i bazalna lamina kapilara stvaraju bazalnu membranu koja je ujedno i filtracijska membrana, a dijeli mokraćni prostor od krvi u kapilarama. Bazalna membrana je građena od fibronektina, kolagena tipa 4, laminina i heparan-sulfat proteoglikana koji priječi prolaz kationskim molekulama. Takova građa bazalne membrane omogućuje joj da djeluje poput selektivnog filtera (6). Parijetalni list Bowmanove čahure građen je od jednoslojnog pločastog epitela, bazalne lamine i uskog sloja retikulinskih vlakana koji na mokraćnom polu (dijelu glomerula od kojega polazi proksimalni kanalić) prelazi u jednoslojni kubični ili niski cilindrični epitel. Između parijetalnog i visceralnog lista nalazi se mokraćni prostor u koji se iz glomerula kroz stijenku kapilara i visceralni list filtrira tekućina. Tekućina koja se naziva glomerularni filtrat iz Bowmanove čahure ulazi u proksimalni zavijeni kanalić koji je dio mokraćnog pola bubrežnog tjelešca. Iz proksimalnog kanalića tekućina teče u Henleovu petlju koja ulazi u srž, a sastoji se od silaznog i uzlaznog dijela, odnosno od tankog i debelog kraka ovisno o debljini stijenke. Tanki krak se nalazi u silaznom, i dijelu uzlaznog odsječka petlje koji na povratnom putu u koru postaje debeli uzlazni krak petlje. Bubrežna tjelešca, proksimalni zavijeni kanalić, tanki i debeli krak Henleove petlje, distalni zavijeni kanalić, te po nekima autorima i sabirne cjevčice i cijevi čine funkcionalnu jedinicu bubrega koja se naziva nefron. U svakom bubregu ima oko 1 do 4 milijuna nefrona, pri čemu je funkcija svakoga nefrona stvaranje mokraće. Ne mogu se ponovno stvarati radi čega im se broj postupno smanjuje bilo da je u pitanju bubrežna bolest ili normalno starenje. Predmnijeva se da se nakon četvrtog desetljeća života svakih 10-ak godina njihov broj smanjuje za oko 10 %, a njihovu funkciju postupno se prilagođavajući preuzimaju preostali nefroni. Svi nefroni imaju jednake sastavne dijelove uz manje razlike u građi ovisno u kojem su dijelu bubrežne kore smješteni. Nefroni čiji su glomeruli smješteni u vanjskom dijelu kore nazivaju se kortikalni nefroni. Oni imaju kraće Henleove petlje koje plitko ulaze u srž, za razliku od nefrona čiji se glomeruli nalaze dublje u kori, u blizini srži i koji imaju dugačke Henleove petlje koje prodiru duboko u bubrežnu srž. Njih nazivamo jukstamedularnim nefronima i njihova je najvažnija uloga stvaranje hipertoničnog gradijenta koji je odgovoran za nastanak hipertonične mokraće. Nakon što debeli uzlazni krak Henleove petlje uđe u koru postaje zavijeni kanalić i naziva se distalni zavijeni kanalić. On priliježe uz žilni pol (naziv za dio glomerula u kojemu ulazi dovodna arteriola, a izlazi odvodna arteriola) svoga glomerula i nefrona. Na mjestu samoga dodira mijenjaju se i dovodna arteriola i distalni zavijeni kanalić; dovodna arteriola obložena je epiteloidnim stanicama u kojima se nalaze sekretna zrnca, a

stanice distalnog zavijenog kanalića postaju cilindrične i nazivaju se macula densa te imaju ulogu u otpuštanju enzima renina u krvotok koji pak sudjeluje u regulaciji krvnoga tlaka. To je područje poznato još pod nazivom jukstaglomerularni aparat (2). Renin se luči u situacijama niskoga arterijskog tlaka i djeluje na angiotenzinogen od kojega se odvaja angiotenzin I. Angiotenzin I posjeduje blaga vazokonstriktorna svojstva i nema značajnijega utjecaja na regulaciju tlaka dok se djelovanjem enzima za pretvorbu u plućima ne pretvori u angiotenzin II. Angiotenzin II posjeduje snažna vazokonstriktorna svojstva kojima podiže arterijski tlak. Također ima veliku ulogu u smanjenju izlučivanja soli i vode bubrežima čime povećava volumen izvanstanične tekućine što u konačnici također podiže tlak (7).

### **1.1.2.Fiziologija**

Uloge bubrega u organizmu su mnogobrojne. Osnovna funkcija bubrega je uklanjanje štetnih i otpadnih tvari iz organizma filtracijom tekućine iz plazme, metaboličkih nusprodukata ureje, kreatinina, mokraćne kiseline, metabolita nekih hormona, te toksina unesenih u organizam slučajno ili namjerno prilikom npr. trovanja. Uz to neizostavna je uloga bubrega u održavanju ravnoteže vode i elektrolita te acidobaznog statusa. Bubrezi imaju i endokrinu ulogu proizvodnjom eritropoetina u mezangijskim stanicama bubrega kao odgovor na smanjenu opskrbu tkiva kisikom tkiva. Eritropoetin djeluje na koštanu srž stimulirajući ju na proizvodnju eritrocita i tako sudjeluje u održavanju uredne crvene krvne slike. Oko 90 % eritropoetina se stvara u bubrežima, a 10 % u jetri tako da je u uvjetima teške bubrežne bolesti kao i u bolesnika u kojih se bubrežna funkcija nadomješta dijalizom uvijek prisutna teška anemija. U bubrežima se također stvara aktivni oblik vitamina D koji je potreban za apsorpciju kalcija iz probavnog sustava i odlaganje u kosti, a sudjeluju i u glukoneogenezi (uz jetru). Osobito je važna aktivna uloga bubrega u regulaciji arterijskog tlaka održavanjem ravnoteže tjelesnih tekućina i renin-angiotenzin-aldosteronskim sustavom (7).

Osnovni procesi koji se odvijaju u nefronu su glomerularna filtracija, tubularna reapsorpcija i tubularna sekrecija. Krv za filtraciju u bubreg dolazi bubrežnom arterijom, koja nakon višestrukog grananja tvori interlobarne, arkuatne, interlobularne arterije te aferentne arteriole. One se nastavljaju u glomerularne kapilare. Glomerularne kapilare se nalaze u glomerulima gdje započinje filtriranje tekućine, osim bjelančevina, čime i započinje stvaranje mokraće. U tubulima se nastavljaju odvijati procesi reapsorpcije i sekrecije nakon čega nastaje konačni urin koji se iz bubrega odvodi mokraćovodom u mokraćni mjehur (7).

U proksimalnom se kanaliću iz filtrata vrši apsorpcija glukoze i aminokiselina, oko 85 % natrijeva klorida i vode, te fosfata i kalcija. Apsorpcija aminokiselina, natrija i glukoze vrši se aktivnim prijenosom pomoću natrij/kalij-ATPazne crpke. Natrij/kalij-ATPazna crpka je glavna sila pomoću koje se reapsorbira natrij, klorid i voda u cijelom proksimalnom kanaliću. Kada poraste razina glukoze u filtratu iznad mogućnosti apsorpcije, počinje se izlučivati u mokraći. U koncentriranju mokraće glavnu ulogu imaju odvodni kanali sabirnih cijevi koji se nalaze u srži bubrega. Njihov je epitel pod utjecajem antidiuretskog hormona koji izlučuje stražnji režanj hipofize, u uvjetima smanjenoga unosa tekućine, te čini sabirne cijevi propusnima za vodu koja se potom apsorbira iz glomerularnog filtrata i prenosi u kapilare te se na taj način zadržava u tijelu (7).

### 1.1.3. Ispitivanje bubrežne funkcije

Glomerularna filtracija je najvažniji pokazatelj bubrežne funkcije, i koristi se za određivanje stadija kronične bubrežne bolesti (KBB) (8). Određena je brzinom kojom se plazma filtrira kroz glomerule. Referentni interval za žene iznosi 90-100 mL/min, a za muškarce 115-125 ml/min (9). Napredovanjem bubrežnog oštećenja glomerularna filtracija se snižava, pa se stoga koristi za procjenu tijeka bolesti. Ne može se mjeriti izravno, već se procjenjuje prema vrijednostima serumskog kreatinina ili klirensa kreatinina i ureje. Povećana vrijednost kreatinina uglavnom ukazuje na bubrežnu bolest, uz iznimke određenih skupina za koje se zna da imaju nižu osnovnu razinu kreatinina u serumu, neovisno o glomerularnoj filtraciji. To su djeca, žene, osobe starije životne dobi i osobe koje su pothranjene, odnosno imaju manju mišićnu masu (10).

Klirens kreatinina jeste mjera kojom se u kliničkoj praksi određuje glomerularna filtracija, a dobiva se izračunavanjem vrijednosti kreatinina dobivenih iz 24-satnog urina uz istovremeno određivanje razine kreatinina u serumu. Za pretragu je od iznimne važnosti sakupljanje kompletnog 24-satnog urina, jer ukoliko je uzorak nepotpun analiza može dati lažne rezultate (10).

Kada se ne može odrediti klirens kreatinina, neizravno se određuje iz serumskih vrijednosti kreatinina Cockroft-Gaultovom formulom (11):

$$\text{Klirens kreatinina} = \frac{((140 - \text{dob u godinama}) \times (\text{TT u kg})) \times 1,23}{(\text{serumski kreatinin u } \mu\text{mol/L})}$$

Za žene je potrebno dobiveni rezultat pomnožiti sa 0,85

Danas se za procjenu glomerularne filtracije više koristi pojednostavljena formula MDRD (od engl. Modification of Diet in Renal Disease) koja u obzir uzima dob, spol, rasu i vrijednost kreatinina. Prema dosadašnjim istraživanjima u bolesnika s KBB stadij 3-5 srednje životne dobi MDRD je pouzdanija metoda procjene bubrežne funkcije od Cockcroft - Gaultove jednadžbe (12).

MDRD formula =  $186 \times (\text{serumski kreatinin u } \mu\text{mol/L})^{-1,154} \times (\text{dob u godinama})$

$^{-0,203} \times (0,742 \text{ za ženski spol}) \times (1,210 \text{ za Afroamerikance}).$

Nedostatak ove metode je u podcjenjivanju glomerularne filtracije pri vrijednostima većim od  $60 \text{ mL/min/1,73m}^2$ , stoga se od 2009. godine koristi i novija, preciznija procjena pomoću CKD – EPI formule (od engl. Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) koja više eliminira „bias“ (13,14).

Dosada je u serumu i u urinu identificirano nekoliko pokazatelja ranog tubularnog oštećenja koji bi se mogli koristiti u procjeni glomerularne filtracije, što je od osobite važnosti u akutnoj ozljedi bubrega. To su neutrofilni gelatinaza pridruženi lipocelin – NGAL (od engl. neutrophil gelatinase-associated lipocalin), KIM1 (od engl. kidney injury molecule-1), spermidine/sperminN(1)-acetyltransferaza, cistatin C i interleukin-18 (15). Cistatin C je niskomolekularni protein koji se filtrira u glomerulima, a pokazao se osobito pouzdanim u stanjima početnoga oštećenja bubrega (16). Prema podacima metaanalize iz 2011. godine koja je obuhvatila 19 studija iz 11 država serumski se cistatin C pokazao vrlo dobrim prediktorom akutne ozljede bubrega, s osobitim naglaskom na važnost bolje procjene glomerularne filtracije u Jedinicama intenzivnoga liječenja zbog predviđanja daljnjega ishoda bolesti te zbog prilagodbe doze potencijalno nefrotoksičnih lijekova. Bolji je od drugih proučavanih markera i zbog toga što mu se ne mijenja razina pri istodobnoj prisutnosti bolesti jetre, upalnih zbivanja ili infekcija (16,17).

#### **1.1.4. Zatajivanje bubrežne funkcije**

Zatajivanje bubrežne funkcije se očituje akutnom ozljedom bubrega ili razvojem kronične bubrežne bolesti.

##### **1.1.4.1 Akutna ozljeda bubrega**

Akutna ozljeda bubrega je klinički sindrom karakteriziran naglim otkazivanjem bubrežne funkcije praćen porastom dušičnih tvari u krvi, smanjenim protokom krvi kroz bubrege, pogoršanjem glomerularne filtracije i smanjenim izlučivanjem mokraće (18). U oko 80 % bolesnika količina mokraće izlučene u 24 sata iznosi manje od 500 ml, odnosno manje od 100 ml, dok je u preostalih oko 20 % bolesnika količina izlučene mokraće veća od 500 ml (19). Prema dosadašnjim istraživanjima incidencija akutne ozljede bubrega u hospitaliziranih bolesnika je u porastu, dijelom i zahvaljujući boljemu prepoznavanju bolesti (20). Tako je zabilježena incidencija 1983. godine bila 4,9 % (21), 2002. 7,2 % (22), a 2012. 22,7 % (23). Stanje je povezano s visokom smrtnošću koja može iznositi i do 50 % (20), neovisno o uzroku koji je doveo do oštećenja. U svrhu pravovremenoga postavljanja dijagnoze i procjene težine oštećenja 2004. godine ADQI (od engl. Acute Dialysis Quality Initiative) i AKIN (od engl. Acute Kidney Injury Network) grupe objavile su klasifikaciju pod nazivom RIFLE (od engl. Risk, Injury, Failure, Loss, End stage renal disease) kriteriji, odnosno 2007. godine minimalno izmijenjenu inačicu u obliku AKIN podjele akutne ozljede bubrega (24,25). RIFLE kriteriji se temelje na promjeni u vrijednostima serumskog kreatinina i glomerularne filtracije prema bazičnim vrijednostima, te proizvodnji urina prema tjelesnoj težini u jedinici vremena, prema kojima se akutne ozljede bubrega potom dijele ovisno o stupnju oštećenja, odnosno krajnjim ishodima koji predstavljaju gubitak bubrežne funkcije, ukoliko se bubrežna funkcija mora nadomještati duže od četiri tjedna, odnosno završni stadij KBB ukoliko ta potreba postoji duže od tri mjeseca. Viši stupanj prema obje klasifikacije povezan je s lošijim ishodima (25,26). Napredovanje prema završnom stadiju KBB ovisi o kategoriji u kojoj je započeto nadomjesno liječenje bubrežne funkcije. Prema jednoj studiji provedenoj u Jedinici intenzivnog liječenja u Švedskoj pokazano je da su bolesnici u kojih je započeto s nadomještanjem bubrežne funkcije u kategoriji F imali više od 50 % smrtnih ishoda promatranih tijekom 30 dana, od onih u kojih je s liječenjem započeto u kategorijama R i I u kojih je bilo manje od 25 % smrtnih ishoda (27).

Uzroci akutne ozljede bubrega su brojni, a najčešće se koristi podjela na prerenalno, renalno i postrenalno oštećenje (28).

Prerenalno oštećenje obuhvaća oko 70 % akutnih ozljeda bubrega, a nastaje u sklopu bubrežne hipoperfuzije uslijed hipovolemije bilo da se radi o stvarnom gubitku volumena krvarenjem, povraćanjem, proljevima i sl. ili o funkcionalnom smanjenju volumena uslijed pogoršanja srčane funkcije u stanjima kardiogenog šoka, masivne plućne embolije, kongestivnog zatajivanja srca ili tamponade perikarda. Također se može razviti nakon primjene jodnih kontrastnih sredstava, i određenih lijekova poput nekih imunosupresiva te nesteroidnih antireumatika koji smanjuju perfuziju bubrega smanjujući sintezu vazodilatacijskih prostaglandina (28,29).

Renalno, intrinzično oštećenje rezultat je ozljede tubula, glomerula, intersticija ili bubrežnih krvnih žila, a njegov najčešći oblik je akutna tubularna nekroza u sklopu teške ishemije zbog protrahirane sustavne hipotenzije i djelovanja endo- i egzotoksina (29).

Postrenalno oštećenje nastaje zbog strukturnih i funkcijskih poremećaja protoka mokraće. Javlja se u obliku opstrukcije oba mokraćovoda (primjerice ginekološkim tumorima ili tumorima prostate, kamencima, edemom i sl.), smetnji u pražnjenju mjehura (ukoliko se opstrukcija nalazi na mjestu izlaza iz mokraćnog mjehura, uz hipertrofiju prostate ili karcinom mokraćnog mjehura) te vrlo rijetko u sklopu opstrukcije same mokraćne cijevi (28-30).

#### **1.1.4.2. Liječenje akutne ozljede bubrega**

Liječenje akutne ozljede bubrega započinje liječenjem osnovne bolesti koja je i uzrokovala oštećenje. Tako se u većine bolesnika bubrežna funkcija može potpuno oporaviti, no u manjega dijela, može se očekivati i ubrzano napredovanjem prema KBB (31). Oporavak je brži u bolesnika s prerenalnim oštećenjem, nego u renalnom ili postrenalnom oštećenju. Tome u prilog govori istraživanje provedeno na 159 bolesnika od kojih je u 54 % akutna ozljeda bubrega bila prerenalne, 34 % renalne, a postrenalne etiologije 12 %. U 17,6 % bolesnika radilo se o akutizaciji KBB. Sedmog dana liječenja samo je u skupini bolesnika s prerenalnim oštećenjem postignuta normalizacija dušičnih tvari, dok su ostali zahtijevali produženo liječenje (31).

Ukoliko se optimalnim medikamentoznim liječenjem ne postigne zadovoljavajući terapijski i klinički odgovor započinje se s nadomještanjem bubrežne funkcije dijalizom.



## KONTINUIRANO NADOMJEŠTANJE BUBREŽNE FUNKCIJE

Krajem 80-tih godina prošlog stoljeća počeo se mijenjati pristup liječenju akutne ozljede bubrega dijalizom. Do tada se uglavnom primjenjivala intermitentna hemodijaliza (IHD) s jasnim ograničenjima u hemodinamski nestabilnih bolesnika opterećenih teškim bolestima poput sepe ili višestrukog organskog zatajivanja. Razvojem novih dijaliznih tehnika, primjenom kontinuiranih metoda izbjegnute su komplikacije tipične za IHD poput pada tlaka, a uz uklanjanje željenog volumena. Pojedine se metode kontinuiranog nadomještanja bubrežne funkcije (od engl. Continuous Renal Replacement Therapy, CRRT) razlikuju ovisno o primjeni fizikalno-kemijskih procesa difuzije ili konvekcije (ili obje), krvožilnom pristupu i mjestu u izvantjelesnom optoku gdje se dodaje nadoknada tekućine (32).

Najčešće indikacije za liječenje ovom metodom su: akutna ozljeda bubrega komplicirana akutnim ili kroničnim zatajivanjem srca, hiperkatabolizmom, hipervolemijom, akutnim ili kroničnim zatajivanjem jetre i/ili edemom mozga. Manje česte nebubrežne indikacije su sistemski upalni odgovor, sepsa, višestruko zatajivanje organa, sindrom nagnječenja tkiva, sindrom raspadanja tumora, laktatna acidoza i kronično popuštanje srca (33,34).

Najčešće korištene metode liječenja su: kontinuirana venovenska hemofiltracija, kontinuirana venovenska hemodijaliza, kontinuirana venovenska hemodijafiltracija i polagana kontinuirana ultrafiltracija. Aparat za provođenje kontinuiranih metoda dijalize prikazan je na **Slici 1.**

Kontinuirana venovenska hemofiltracija-CVVH (od engl. Continuous Venovenous Hemofiltration) je metoda u kojoj peristaltička crpka omogućuje cirkuliranje venske krvi bolesnika izvantjelesnim sustavom, uz dodatak heparina u arterijsku krvnu liniju. Nadomjesna se tekućina dodaje prije ili poslije filtera, a ultrafiltracijom u suvišku postiže se željeni gubitak tekućine (34).

Kontinuirana venovenska hemodijaliza-CVVHD (od engl. Continuous Venovenous Haemodialysis) je metoda pri kojoj venska krv bolesnika cirkulira izvan tijela uz pomoć peristaltičke crpke. Fizikalno-kemijski procesi koji se koriste kako bi se uklonili toksini su difuzija+slaba konvekcija (34).

Kontinuirana venovenska hemodijafiltracija-CVVHDF (od engl. Continuous Venovenous Hemodiafiltration) je metoda s karakteristikama CVVH i CVVHD.

Nadomjesna otopina se primjenjuje ovisno o kliničkom statusu bolesnika, a fizikalno-kemijski procesi koji se koriste u uklanjanju toksina su difuzija i konvekcija (34).

Polagana kontinuirana ultrafiltracija - SCUF (od engl. Slow Continuous Ultrafiltration) je metoda koja se koristi za liječenje volumno opterećenog bolesnika i tvrdokornih edema s ili bez bubrežnog oštećenja (34).



**Slika 1.** Aparat za provođenje kontinuiranih metoda dijalize.  
Prisma iz 2003. godine, Opća bolnica Bjelovar.

### **1.1.4.3. Kronična bubrežna bolest**

#### **Definicija**

Kronična bubrežna bolest je klinički sindrom obilježen trajnim propadanjem bubrežne funkcije i smanjenjem glomerularne filtracije ispod 60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> površine tijela, tijekom najmanje tri mjeseca (35). Klinička obilježja sindroma posljedica su nepovratnih oštećenja svih funkcija bubrega: ekskretorne, endokrine i metaboličke funkcije.

#### **Epidemiologija**

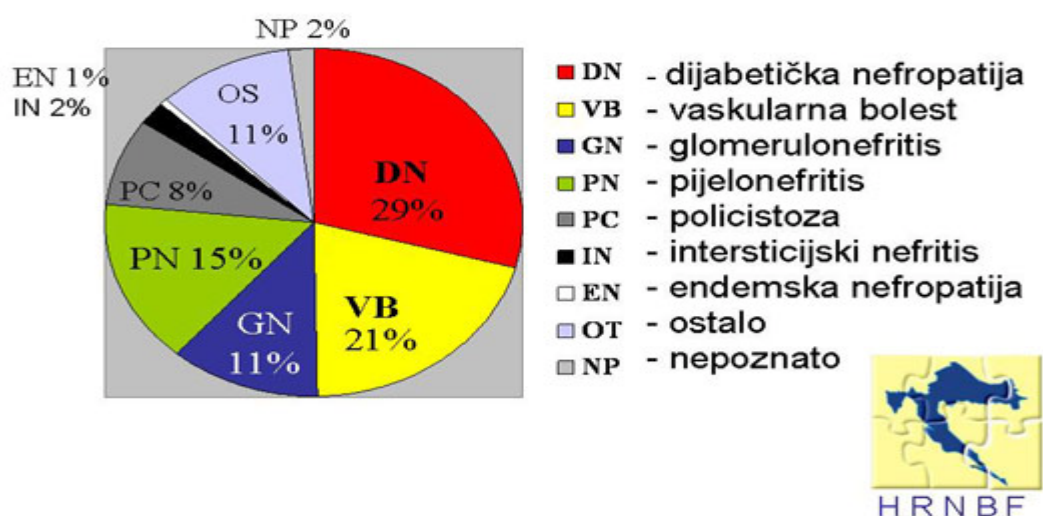
Kronična bubrežna bolest je jedan od vodećih zdravstvenih problema u svijetu i u Hrvatskoj. U razvijenim zemljama, prema podacima registra Europskog udruženja za dijalizu i transplantaciju, incidencija bolesnika sa završnim stadijem KBB koji iziskuju nadomještanje bubrežne funkcije jednom od dostupnih metoda liječenja (hemodijaliza, peritonejska dijaliza, transplanatacija bubrega) iznosi više od 100 novih bolesnika na milijun stanovnika (36). Za Hrvatsku, prema podacima Hrvatskog registra za nadomještanje bubrežne funkcije incidencija je za 2012. godinu iznosila 138 na milijun stanovnika (37).

Kronična bubrežna bolest je neovisan čimbenik rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti.

#### **Etiologija**

Tijekom vremena brojne se sustavne bolesti kao i primarne bolesti bubrega kompliciraju razvojem KBB koja se mora liječiti jednom od metoda nadomještanja bubrežne funkcije. U Hrvatskoj se u najčešće uzroke ubrajaju šećerna bolest i arterijska hipertenzija, a slijede ih kronični pijelonefritis, policistična bolest bubrega, intersticijski nefritis, te ostali i nepoznati uzroci. U našoj je zemlji uz prevalenciju od 1 % jedan od uzroka KBB i endemska nefropatija koja se opisuje u bolesnika nastanjenih zapadno od Slavenskog Broda uz rijeku Savu (38). Raspodjela bolesnika liječenih nadomještanjem bubrežne funkcije u Hrvatskoj za 2012. prikazana je na **Slici 2**. Udio pojedinih stanja ovisi o dobi i porijeklu bolesnika.

## Osnovna bubrežna bolest novih na NBF 2012 godine



**Slika 2.** Raspodjela bolesnika liječenih nadomještanjem bubrežne funkcije u Hrvatskoj za 2012. NBF-nadomještanje bubrežne funkcije. Izvor: <http://www.hdndt.org/registar/hrvatski-registar-nadomjestanja-bubrezne-funkcije.html>

### Patofiziologija i klinički stadiji

Napredovanju bolesti pogoduju različiti čimbenici poput glomerularne hiperperfuzije, proteinurije, dislipidemije, metaboličke acidoze, anemije i hiperfosfatemije. Osobit utjecaj na pogoršanje bolesti ima sustavno povišen krvni tlak koji se prenosi na glomerule (39). Visoki tlak u glomerulima potiče pak mezangijske stanice na lučenje citokina koji dovode do povećane sinteze mezangijskog matriksa uzrokujući na taj način glomeruloskleroza i atrofiju nefrona (40). Obzirom na veliki broj nefrona od 1-4 milijuna, a koji imaju sposobnost prilagodbe i preuzimanja funkcije oštećenih nefrona dio bolesnika duže vrijeme nema simptome KBB. Simptomi se razvijaju kada propadne više od 80 % funkcije bubrega. Biljezi bubrežnog oštećenja su gubitak bjelančevina urinom, nenormalnosti urina ili sedimenta te nenormalnosti uočene dijagnostičkim pretragama bubrega (39).

Na temelju kliničke slike i procijenjene glomerularne filtracije razlikujemo 4 patofiziološka stadija KBB (**Tablica 1.**).

**Tablica 1.** Stadiji kronične bubrežne bolesti.

<b>Stadij</b>	<b>Opis GF mL/min/1,73 m<sup>2</sup></b>
<b>Nema KBB-rizični bolesnici s visokim krvnim tlakom, bez bubrežnog oštećenja, normalna GF</b>	<b>≥90</b>
<b>1. Oštećenje bubrega uz normalnu ili visoku GF</b>	<b>&gt; ≥90</b>
<b>2. Blago smanjena GF</b>	<b>60-90</b>
<b>3a. Blago do umjereno smanjena GF</b>	<b>45-59</b>
<b>3b. Umjereno do značajno smanjena GF</b>	<b>30-44</b>
<b>4. Značajno smanjena GF</b>	<b>15-29</b>
<b>5. Završni stadij bubrežne bolesti</b>	<b>&lt;15</b>

GF-glomerularna filtracija

Prilagođeno prema: Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney int Suppl.* 2013; 3:1-150 (35).

Bolesnici u 1. i 2. stadiju, te dio bolesnika koji su u 3. stadiju, uglavnom nemaju simptoma, a ukoliko su prisutni simptomi posljedica su osnovne bolesti. Glomerularna filtracija je normalna ili blago smanjena. Drugi biljezi oštećenja bubrežne funkcije poput patološkog nalaza sedimenta urina, proteinurije ili prikaz određenih strukturalnih anomalija poput primjerice vezikoureteralnog refluksa mogu ukazivati na dijagnozu. Budući da je visoki krvni tlak vrlo čest u KBB i kao uzrok i kao posljedica bolesti ne treba ga izdvajati kao zasebni biljeg oštećenja (35).

U 3. se stadiju bolesti mogu nalaziti znakovi manifestne KBB uz zadržavanje dušičnih tvari u krvi, a u kliničkoj slici postupno dolazi do izražaja slabost, malaksalost, nikturija. Simptomatska anemija najčešće se razvija u 4. stadiju, zajedno s poremećajima elektrolita, metabolizma kalcija i fosfora te acidobazne ravnoteže (41). Pravodobnim postavljanjem dijagnoze i liječenjem komplikacija, osobito anemije, danas dostupnim lijekovima za stimuliranje eritropoeze može se usporiti i odgoditi napredovanje bolesti prema završnom stadiju. Zbog pridruženoga visokog pobola i smrtnosti od srčanožilnih bolesti dio bolesnika

nikada niti ne razvije završni stadij KBB. Daljnjim napredovanjem KBB, u 4. i 5. stadiju osim napredovanja endokrinih i metaboličkih poremećaja, dolazi i do težega narušavanja ravnoteže vode, pogoršanja hipertenzije, produbljivanja poremećaja elektrolita i acidobazne ravnoteže. S padom glomerularne filtracije na 15 mL/min/1,73m<sup>2</sup> javljaju se srčanožilne, endokrine, hematološke, ili probavne komplikacije (ponekad i vrlo teške uslijed krvarenja pri erozivnom gastritisu ili ulkusu želuca i dvanaesnika), a predstavljaju uvod u završni, 5. stadij KBB (41).

Metabolička acidoza nastupa pri snižavanju glomerularne filtracije na 10 mL/min jer je količina proizvedenih kiselina u organizmu premašila adaptacijske mehanizme funkcionalnih nefrona koji sudjeluju u izlučivanju amonijaka i regeneraciji bikarbonata. To su procesi koji se prvenstveno odvijaju u proksimalnom i distalnom tubulu tako da je za tubularne i intersticijske bolesti karakterističan raniji nastup acidoze (41).

Primjerena i dostatna regulacija vode, natrija i kalija u većine je bolesnika održana do razine glomerularne filtracije 5-10 mL/min. Mehanizmi kojima se to osigurava su povećana natriureza te povećana sekrecija kalija. Hiperkalemija je potencijalno smrtonosna komplikacija zbog mogućnosti izazivanja malignih poremećaja srčanog ritma koji se javljaju kada koncentracija kalija u krvi premaši 7 mmol/L. Hiperfosfatemija nastaje zbog smanjena izlučivanja fosfata koji potom potiču sintezu paratireoidnog hormona (PTH). Vežući se sa kalcijem smanjuju razinu ioniziranog kalcija što je poticaj pojačanom stvaranju PTH, a također dodatno smanjuju ionako sniženo stvaranje kalcitriola (zbog manje bubrežne mase) koje je onda također poticaj većoj proizvodnji PTH (sekundarni hiperparatireoidizam). Opisani patogenetski mehanizmi odgovorni su za nastanak koštane bubrežne bolesti koja se može komplicirati nastankom patoloških fraktura i metastatskih kalcifikacija (41).

### **Posljedični poremećaji drugih sustava u sklopu kronične bubrežne bolesti**

Poremećaji srčanožilnog sustava su najveći zdravstveni problem bolesnika s KBB (42,43). Najteža komplikacija u višim stupnjevima bolesti je plućni edem. U gotovo svih bolesnika prisutan je visoki krvni tlak uslijed retencije natrija i vode te povećane koncentracije renina u krvi. Izolirano povišeni sistolički tlak povezan je sa 2-4 puta većim rizikom nastanka hipertrofije lijeve klijetke koja se povezuje s nastankom aritmija, te smrtnosti zbog srčanožilnih uzroka i moždanoga udara (44). Stoga je primjerena kontrola krvnog tlaka iznimno važna. Hipertrofija lijeve klijetke se povezuje i s nastankom aritmija. Generalizirana i ubrzana ateroskleroza uz KBB značajan je čimbenik povišenog srčanožilnog

rizika u podlozi opstruktivnih bolesti koronarnih arterija povećavajući tako prevalenciju koronarne bolesti u naših bolesnika. Ateroskleroza također uzrokuje okluzivne bolesti cerebralnih i perifernih krvnih žila (45).

Najčešći probavni poremećaji su mučnina i mršavljenje, te krvarenje iz probavnog sustava radi visoke koncentracije gastrina. Povećan je rizik od razvoja akutnog pankreatisa, a i neovisno o kliničkoj slici pankreatitisa, u bolesnika se može naći povećana amilaza jer se radi o enzimu koji se u zdravih ljudi izlučuje mokraćom. U bolesnika s KBB, osobito u završnom stadiju te u starijih bolesnika često je prisutna pothranjenosti (od engl. PEM, protein-energy malnutrition) koja je čimbenik rizika povećanog pobola i smrtnosti (46,47). Njezinu razvoju pogoduju anoreksija (radi mučnine, povraćanja, uremije te u dijaliziranih bolesnika i nakupljanje toksina koji se u potpunosti ne uklone postupkom dijalize), zatim upalna stanja (potičući katabolizam), pridruženi komorbiditeti (ciroza jetre, zloćudne bolesti, šećerna bolest, kronična opstruktivna plućna bolest), endokrinološki poremećaji, metabolička acidoza te psihološke komponentne. Nedavne istraživanja pokazala su kako je pothranjenost osim u bolesnika na dijalizi (pri čemu se opisuje utjecaj bioinkompatibilnosti dijalizne membrane i gubitak nutritivnih tvari) česta i prije samoga započinjanja liječenja dijalizom (48,49). Pri smanjenju suhe tjelesne težine u bolesnika liječenih jednom od metoda nadomještanja bubrežne funkcije (hemodijaliza, peritonejska dijaliza) trebalo bi razmotriti mogućnost razvoja pothranjenosti. Serumski albumin je dobar i u kliničkoj praksi najčešće korišten pokazatelj nutritivnog statusa bolesnika (50).

Anemija u KBB je normocitna, normokromna i nastaje prvenstveno kao posljedica smanjene sinteze eritropoetina. Osim smanjene sinteze eritropoetina na nastanak anemije utječe smanjen životni vijek eritrocita u krvi, gubitak željeza probavnim sustavom, deficit folata i vitamina B12, sekundarni hiperparatireoidizam, te uremički toksini koji su odgovorni i za trombocitopeniju koja se povlači nakon dijalize. Povezana je s nastankom hipertrofije lijeve klijetke, a može se liječiti lijekovima koji stimuliraju eritropoezu uz primjenu preparata željeza te održavanjem ciljnih vrijednosti hemoglobina (Hb) između 100-120 g/L (51,52).

Neurološki simptomi u bolesnika sa KBB su posljedica metaboličkih promjena, nastalih zbog nakupljanja toksičnih uremičkih tvari, hiperkalemije, hiperkoagulabilnosti, imunoloških promjena te narušene acidobazne ravnoteže. Klinički se prezentiraju nesanicom, umorom, perifernom neuropatijom s parestezijama udova, miopatijom, uremičkom encefalopatijom te razvojem moždanog udara (53).

Endokrinološki poremećaji se odnose na već spomenuti hiperparatireoidizam, hipotireozu, te promjene seksualnosti bolesnika i amenoreju u žena.

#### **1.1.4.4. Liječenje kronične bubrežne bolesti**

Prema podacima Hrvatskog registra nadomještanja bubrežne funkcije, na kraju 2012. godine u Hrvatskoj je 1,3 % više bolesnika u odnosu na 2011. živjelo uz pomoć nadomjesnog bubrežnog liječenja, odnosno 4406 osoba (37).

Usvajanjem pozitivnih promjena životnih navika, poput prestanka pušenja, provođenja redovite fizičke aktivnosti i smanjenja prekomjerne tjelesne težine, te liječenjem visokog krvnog tlaka, smanjivanjem proteinurije, hiperlipoproteinemije, šećerne bolesti, hiperfosfatemije, ispravljanjem anemije, acidoze i hiperkalemije potrebno je pokušati usporiti napredovanje KBB.

Opservacijskim studijama dokazana je povezanost između visokog krvnog tlaka, te napredovanja i incidencije završnog stadija KBB (54). Tako Europske smjernice za liječenje ove bolesti ukazuju na potrebu snižavanja vrijednosti sistoličkog tlaka na manje od 140 mmHg, a u uvjetima pridružene proteinurije ispod 130 mmHg, uz redovito praćenje glomerularne filtracije (55,56), no kao i u bolesnika koji se već liječe jednom od metoda nadomještanja bubrežne funkcije, manje je razvidno koje bi to apsolutne vrijednosti tlaka bile. U potonjih međutim, podaci metaanaliza potvrđuju povezanost snižavanja tlaka i manje incidencije kardiovaskularnih događaja sa fatalnim ishodom (55,57).

Jedan od glavnih ciljeva liječenja KBB je smanjenje proteinurije, ponajprije lijekovima koji djeluju na blokadu renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava (RAAS), a to su blokatori receptora za angiotenzin II (od engl. angiotensin receptor blocker, ARB) i inhibitori angiotenzin konvertaze (od engl. angiotensin converting enzyme inhibitor, ACE) (55,58,59). Još zasada nema objavljene studije koja bi pokazala koja od navedenih skupina je učinkovitija.

U liječenju anemije bubrežne bolesti koriste se uz preparate željeza i lijekovi koji stimuliraju eritropoezu. Od velike je važnosti otkrivanje anemije već u stadijima 1-4 KBB radi odgađanja napredovanja KBB, kao i liječenje usmjereno izbjegavanju transfuzija osobito u bolesnika koji su budući kandidati za transplantaciju bubrega. U bolesnika na hemodijalizi ciljne vrijednosti Hb su od 110-120 g/L, uz ukoliko je moguće izbjegavanje većih oscilacija Hb, te također izbjegavanje transfuzija (51).



Zbog povezanost KBB sa srčanožilnim i moždanožilnim bolestima, prema KDIGO (od engl. *Kidney Disease: Improving Global Outcomes*) preporukama, potrebno je praćenje lipidograma. Tako se u osoba starijih od 50 godina preporuča liječenje statinima, dok u bolesnika ispod navedene dobne granice, u terapiju ih treba uvesti samo ako su prisutni čimbenici rizika poput poznate koronarne bolesti, šećerne bolesti ili preboljelog moždanog udara. U grupi bolesnika koji se već liječe dijalizom takova terapija nije obavezna, no ukoliko je započeta u predijaliznoj fazi bolesti, može se nastaviti (60).

Budući da je dijabetička nefropatija najčešći uzrok završnog stadija KBB koji zahtijeva liječenje dijalizom, te da je u KBB povećana inzulinska rezistencija u većine će takovih bolesnika, za održavanje primjerene regulacije glikemije, biti potrebno manje jedinica inzulina. Zbog mogućnosti laktacidoze zabranjena je uporaba metformina.

Liječenje hiperfosfatemije bitno je radi utjecaja na nastanak kalcifikacija krvnih žila. Ispravljenje se provodi vezačima fosfata poput kalcijevih soli (kalcijev karbonat) ili sevelemer karbonata te novijih formula kao što je kalcij acetat/magnezij karbonat.

U hiperkalemiji osim izbjegavanja namirnica bogatih kalijem i diureticima primjenjuje se ionski izmjenjivač kalcij-polistirensulfonat, a u liječenju metaboličke acidoze natrij-hidrogenkarbonat.

Indikacije za hemodijalizu su uz stanja akutne ozljede bubrega i KBB u kojima se poremećaji elektrolita, acidobazne ravnoteže, zadržavanje dušičnih tvari te volumno opterećenje nisu uspjeli ispraviti konzervativnim metodama liječenja, i pojedina otrovanja (etilen-glikolom, metanolom, etanolom, lijekovima koji se mogu odstraniti hemodijalizom, metalima i elektrolitima).

Napredovanjem KBB prema predzavršnom stadiju, bolesniku je potrebno predočiti mogućnosti liječenja hemodijalizom, peritonejskom dijalizom i transplantacijom bubrega. Dogovor o izboru metode je važan radi planiranja krvožilnog pristupa, ovisno o napredovanju bolesti. Ukoliko se bolesnik odluči na liječenje hemodijalizom operativnim će se zahvatom formirati arteriovenska fistula, dok će se u uvjetima odabira peritonejske dijalize planirati postavljanje peritonejskog katetera u trbušnu šupljinu. Odluka o započinjanju liječenja dijalizom ovisi o brojnim čimbenicima kao što su glomerularna filtracija, klinički status, kardiovaskularni rizici te osnovna bubrežna bolest i za svakoga se bolesnika donosi individualno. Pri vrijednostima klirensa kreatinina manjim od 10 mL/min, a u bolesnika sa šećernom bolesti 15 mL/min, potrebno je započeti s kroničnim nadomještanjem bubrežne funkcije (61).

**Hemodijaliza** je metoda izvantjelesnog pročišćavanja krvi koja se temelji na fizikalnokemijskom principu difuzije. Difuzija podrazumijeva kretanje molekula iz otopine u kojoj se nalaze u većoj koncentraciji u otopinu s manjom koncentracijom kroz polupropusnu membranu na temelju koncentracijskog gradijenta. Uz koncentracijski gradijent i veličinu molekula u odnosu na veličinu pora, za učinkovitost difuzije bitni su i građa membrane dijalazatora, odlaganje bjelančevina na početku dijalize, električni naboj i temperatura otopine (34). Predstavlja najvažniji mehanizam odstranjivanja uremičkih toksina tijekom dijalize. Molekule vode mogu proći kroz sve vrste polupropusnih membrana, procesom koji se naziva ultrafiltracija. Osnovna uloga ultrafiltracije je uklanjanje viška tekućine/vode iz krvi bolesnika u dijalizat, a odvija se djelovanjem hidrostatskog i osmotskog tlaka. Razlika tlaka s obje strane membrane i koeficijent ultrafiltracije membrane dijalizatora određuju veličinu ultrafiltracije. Uklanjanje malih do srednje velikih molekula ostvaruje se konvekcijom (34).

**Peritonejska dijaliza** je metoda liječenja pri kojoj se za uklanjanje uremičkih toksina i tekućine koristi potrbušnica (lat.peritoneum), pri čemu uremički toksini prelaze iz krvi u utočeni dijalizat u trbušnoj šupljini niz koncentracijski gradijent.

Povijest pokušaja primjene potrbušnice u terapijske svrhe seže u 1744. godinu kada je u Engleskoj kirurg Christopher Warick prvi puta isprao trbušnu šupljinu mješavinom vode i vina u bolesnice sa tvrdokornim ascitesom. Uslijedilo je poboljšanje stanja bolesnice, ali i drugi pokušaj ispiranja jačom mješavinom vode i vina koji je zbog pogoršanja stanja bolesnice tijekom primjene morao biti prekinut. Ubrzo nakon toga, svećenik Stephen Hales koji je ranije promatrao izvođenje Warickove metode predlaže modifikaciju uvođenjem dva troakara sa svake strane trbuha kako bi tekućina ulazila i izlazila iz trbuha. Ovaj prvi opis korištenja potrbušnice nastavio se kasnije primjenjivati u liječenju uremije, sa postupnim unapređivanjem metode. Danas bi ova metoda trebala bi biti prvi izbor u liječenju bolesnika sa otežanom uspostavom krvožilnog pristupa, srčanožilnim bolestima, šećernom bolešću, djece i starijih bolesnika, dok ju treba izbjegavati u stanjima nakon ponovljenih operacija ili upalnih zbivanja u truhu zbog priraslica (64). Prednosti peritonejske dijalize su liječenje kod kuće, manja ograničenja u prehrani i unosu tekućine u odnosu na hemodijalizu što pridonosi boljoj kvaliteti života, uspješnije ispravljanje anemije i očuvanje preostale bubrežne funkcije. Očuvanje preostale bubrežne funkcije povezano je s većim preživljavanjem bolesnika na dijalizi (65). Nedostatci ove metode su infekcije tunela i izlazišta peritonejskog katetera i peritonitis, te moguće mehaničke komplikacije poput propuštanja dijalizne tekućine.

**Transplantacija bubrega** je najbolja metoda liječenja uznapredovale KBB, ukoliko u bolesnika nema zapreka za operativni zahvat i primjenu imunosupresijske terapije. To je ujedno i najjeftinija metoda nadomještanja bubrežne funkcije, koja bolesnicima povećava kvalitetu života, ali i ukupno preživljenje u odnosu na liječenje dijalizom (66-68). Transplantacija bubrega je moguća od živog (srodnog i nesrodnog), ili mrtvog darivatelja (kadavera). Apsolutne kontraindikacije za transplantaciju su nedavna maligna i/ili metastatska bolest, aktivna infekcija, aktivni vaskulitis ili glomerulonefritis, uznapredovale teške bolesti drugih sustava, neispravljena anomalija mokraćnog sustava, ekstremna debljina, psihijatrijske bolesti poput ovisnosti o drogama ili alkoholu, primarna oksaloza (69). Prije transplantacije potrebno je učiniti i tipizaciju tkiva uz identifikaciju antigena klase I (HLA-A i HLA-B) i klase II (HLA-DR), a neposredno prije učiniti križnu reakciju mikrolimfocitotoksičnosti (engl. cross match). Cross match je laboratorijski test kojim se utvrđuje posjeduje li primatelj presatka protutitijela protiv antigena HLA donora. Ukoliko su prisutna, odnosno križna reakcija je pozitivna transplantacija je kontraindicirana. Nakon transplantacije, u liječenju se koristi protokol čiju osnovu čine kalcijneurinski inhibitori (ciklosporin, takrolimus) uz dodatak kortikosteroida i mikofenolat mofetila ili mikofenolne kiseline. Imunosupresijski lijekovi nose povećani rizik pojave nekih malignoma (68), infekcije, kao i moguće nuspojave lijekova poput debljanja, kožne nuspojave, nefrotoksičnost, neurotoksičnost, mogućnost supresije koštane srži, pojava hipertenzije, intolerancija glukoze (69).

Osobitu pažnju nakon transplantacije potrebno je usmjeriti na rano otkrivanje infekcija. U prvih mjesec dana najčešće se radi o infekcijama usko povezanim uz operativni zahvat, te o bakterijskim infekcijama mokraćnog sustava i pluća. U kasnijem tijeku, od 1-6 mjeseca češće se radi o virusnim infekcijama uzrokovanim citomegalovirusom, Epstein-Barrovim virusom, virusom BK te gljivičnim infekcijama ili *Pneumocystis carinii* (69). Nakon transplantacije neke se bolesti mogu vratiti u transplantirani bubreg; poput IgA nefropatije, membranoproliferativnog glomerulonefritisa, membranske nefropatije, fokalne i segmentalne glomeruloskleroza, oksaloze, stoga je bolesnike potrebno kontinuirano pratiti kako bi se promjene na koje se može utjecati pravovremeno prepoznale i liječile, sa ciljem očuvanja funkcije presadka.

## 1.2. ŠEĆERNA BOLEST (lat.diabetes mellitus)

Šećerna bolest (ŠB) je najčešća metabolička bolest kroničnoga tijeka. Uzrokovana je apsolutnim ili relativnim manjkom inzulina uz različit stupanj inzulinske rezistencije. Obilježava ju poremećen metabolizam masti, bjelančevina i ugljikohidrata, a očituje se povišenom razinom glukoze u krvi. Napredovanjem uzrokuje oštećenja ciljnih organa: bubrega, očiju, živaca, srca i krvnih žila (70).

### 1.2.1. Epidemiologija šećerne bolesti

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) u svijetu je oko 347 milijuna odraslih osoba koje boluju od ŠB (71), a predviđa se daljnji rast do čak 500 milijuna do 2030. godine (72,73). Procjenjuje se da od ukupnog broja oboljelih od ŠB 5-10 % ima tip 1 bolesti, u približno 90 % bolesnika se nalazi tip 2 (74), dok se manji postotak odnosi na druge i neodređene uzroke.

### 1.2.2. Etiološka klasifikacija

Od 2000. godine koristi se klasifikacija prema zaključcima Američke dijabetološke udruge (od engl. American Diabetes Association, ADA) (70) koju je podržala i SZO. Razlikuju se četiri skupine:

- a) šećerna bolest tip 1 koji može biti autoimuni i idiopatski,
- b) šećerna bolest tip 2,
- c) posebni tipovi ŠB u koje se ubrajaju bolesti egzokrinog dijela gušterače, endokrinopatije, genetički poremećaji beta stanica i djelovanja inzulina, te ŠB nastala kao posljedica virusnih infekcija ili uzimanja lijekova.
- d) gestacijska ŠB

Najčešći su ŠB tip 1 i 2.

**Šećerna bolest tipa 1** se razvija u bolesnika u kojih je uslijed međudjelovanja nasljednih i okolišnih čimbenika ili autoimunskih bolesti nastupilo postupno ili naglo uništenja beta stanica Langerhansovih otočića gušterače. Posljedica je potpuni izostanak stvaranja inzulina, koji se potom mora primjenjivati u liječenju, za razliku od ŠB tip 2 gdje je

moguće i liječenje tabletama (peroralnim hipoglikemicima) ili njihovom kombinacijom. Najčešće se javlja u djetinjstvu, ali može se javiti i u 30-tim i ranim 40-tim godinama. Tipični simptomi bolesti su pojačano žedanje, pojačano mokrenje, pojačan apetit i gubitak na tjelesnoj težini (75). U bolesnika se mogu naći specifična protutijela kojih nema u ŠB tip 2. To su: protutijela na antigen citoplazme Langerhansovih stanica (od engl. islet cell antibodies, ICA), protutijela na endogeni inzulin (od engl. insulin autoantibodies, IAA) te protutijela na membranski protein (od engl. glutamic acid decarboxylase autoantibodies, GADA) (76). Liječenje se provodi inzulinom.

**Šećerna bolest tip 2** nastaje djelovanjem različitih nasljednih i vanjskih čimbenika, a glavno mu je obilježje smanjeno i nedostatan lučenje inzulina iz gušterače uz rezistenciju perifernih tkiva na učinke inzulina (77). Zbog inzulinske rezistencije mijenja se koncentracija dostupnih slobodnih masnih kiselina u stanicama endotela sa njihovom posljedično povećanom oksidacijom i stvaranjem reaktivnih molekula kisika koje potom aktivacijom specifičnih metaboličkih puteva oštećuju stanice i tkiva (78) radi čega se ŠB i smatra čimbenikom srčanožilnoga rizika. Razvoj inzulinske rezistencije povezuje se s pretilošću čija se prevalencija posljednja tri desetljeća povećava. Osim pretilosti, inzulinsku rezistenciju mogu uzrokovati trudnoća tada s posljedičnim razvojem gestacijskog dijabetesa (79), zatim policistični jajnici (80), suvišak hormona rasta, glukokortikoida (81), stečena ili genetička lipodistrofija (82), te neke rjeđe bolesti poput hemokromatoze (83).

Liječenje ŠB provodi se osim peroralnim hipoglikemicima i inzulinom (najčešće predmiješanim inzulinom u dvije dnevne doze ili intenziviranim načinom liječenja) i podučavanjem bolesnika o važnostima pravilne prehrane, održavanju primjerene tjelesne težine, provođenju redovite fizičke aktivnosti i prestanku pušenja. Prema podacima metaanalize kojom je bilo obuhvaćeno 1,2 milijuna ispitanika, pušenje je bitan čimbenik rizika razvoja ŠB (84,85), usko povezan s pretilošću centralnog tipa i inzulinskom rezistencijom (86).

Dosada su brojne studije ukazale na važnost dobre regulacije glikemije u smanjivanju razvoja i napredovanja kroničnih komplikacija bolesti. Rezultati DCCT studije (od engl. Diabetes control and Complications Trials) sa uključenih 1400 bolesnika s ŠB tip 1, pokazali su koliko edukacija bolesnika i modalitet liječenja inzulinom utječe na ishode komplikacija. U grupi ispitanika liječenih konvencionalnim pristupom koji je uključivao primjenu inzulina u 2 dnevne doze i tromjesečnu jednokratnu poduku bolesnika, hemoglobin A1c (HbA1c) bio je

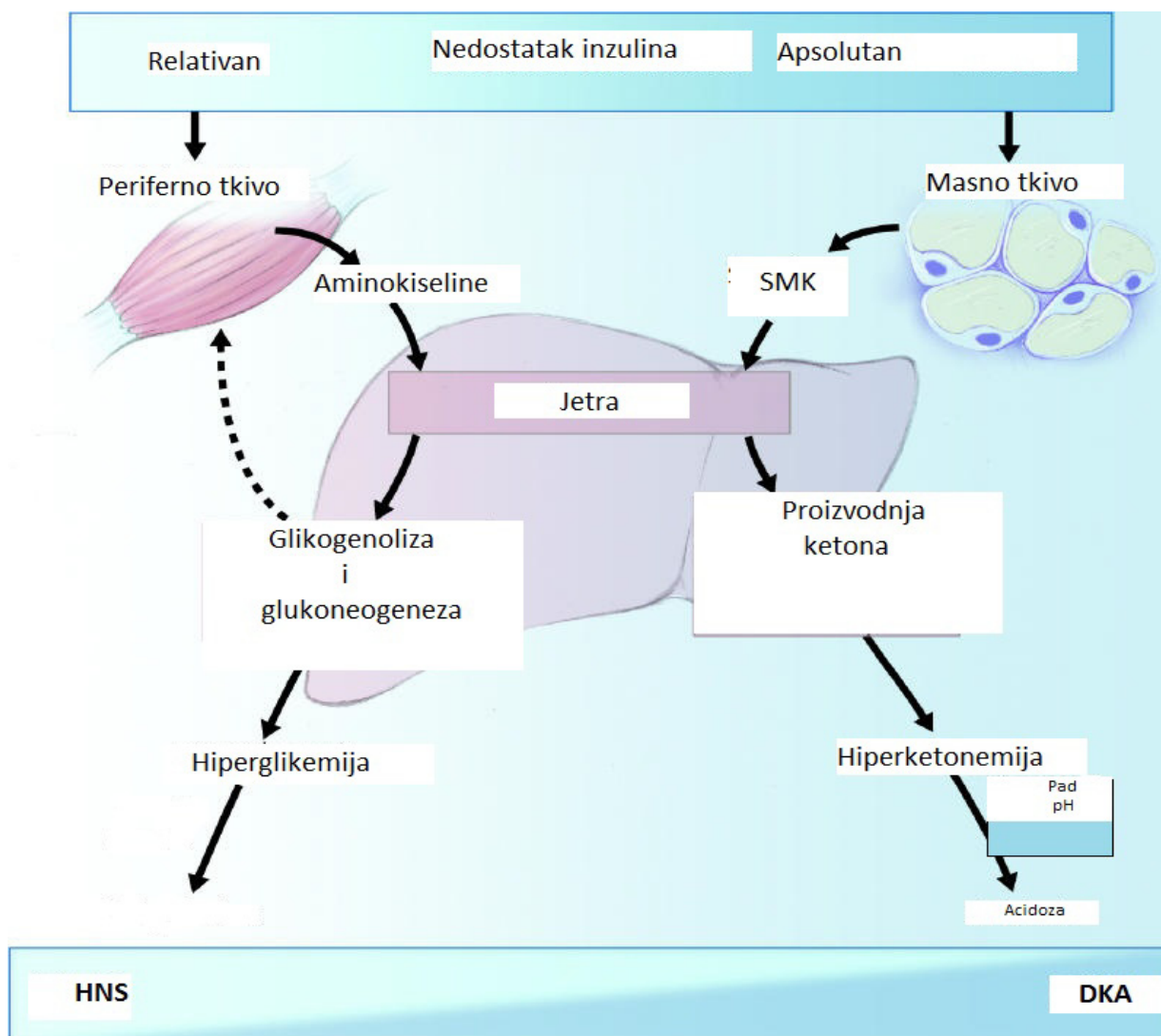
visokih 9,0 %, dok je u grupi ispitanika liječenih intenziviranom terapijom inzulinom u 4 dnevne doze uz dobru edukaciju i psihološku potporu oboljelih HbA1c na kraju studije iznosio 7,2 % sa istovremenim smanjenjem retinopatije za 47 %, mikroalbuminurije za 39 %, nefropatije za 54 % i neuropatije za 60 % u toj skupini bolesnika (87).

### **1.2.3. Akutne komplikacije**

Akutne komplikacije ŠB su teški metabolički poremećaji koji zahtijevaju brzo prepoznavanje kliničkog stanja, hitnu primjenu intenzivnih mjera liječenja i nadzor hemodinamskih parametara. To su dijabetička ketoacidoza i koma, hiperosmolarno neketotičko stanje i koma, acidoza mliječnom kiselinom i hipoglikemijska koma. Uprkos liječenju, pobol i smrtnost uzrokovani dijabetičkom ketoacidozom i hiperosmolarnim neketotičkim stanjem još su uvijek visoki (88).

Dijabetička ketoacidoza se češće javlja u bolesnika sa ŠB tip 1. Obilježava ju pH krvi niži od 7,25 ili snižavanje razine serumskih bikarbonata, uz visoke razine glukoze u krvi. Razvija se naglo u bolesnika s novootkrivenom ŠB, ili pogoršanjem već poznate ŠB u stanjima akutnih bolesti (najčešće infekcija mokraćnog ili dišnog sustava, sepsi ili nakon operativnih zahvata) (89). Kliničkom slikom dominiraju simptomi hiperglikemije, a ukoliko se ne započne s liječenjem, napredovanjem poremećaja razvija se produbljeno Kussmaulovo disanje, tahikardija, pad tlaka te potom koma. Liječenje se provodi primjenom inzulina, nadoknadom tekućine i elektrolita, ispravljanjem acidoze, primjenom antibiotika te ciljanim liječenjem uzroka koji je do poremećaja doveo (90).

Hiperosmolarno neketotičko stanje i koma su poremećaji praćeni hiperosmolarnošću seruma i izrazito visokim vrijednostima glukoze u krvi s posljedičnom teškom dehidracijom. Napredovanjem poremećaja i pogoršanjem bolesti koja je u podlozi zbivanja razvijaju se poremećaji svijesti sve do kome. Terapija je usmjerena nadoknadi volumena, stabilizaciji srčanožilnog statusa, liječenju infekcije i korekciji hiperglikemije brzdjelujućim inzulinom (91). Patogeneza dijabetičke ketoacidoze i hiperosmolarnog neketotičnog stanja prikazane su na **Slici 3**.



**Slika 3.** Prikaz patogeneze hiperosmolarnog neketotičnog stanja (HNS) i dijabetičke ketoacidoze (DKA). Prilagođeno prema Chiasson JL, Aris-Jilwan N, Bélanger R, i sur. Diagnosis and treatment of diabetic ketoacidosis and the hyperglycemic hyperosmolar state CMAJ 2003;168:859–66 (90).

Acidoza mliječnom kiselinom je obilježena pojačanim stvaranjem ili smanjenim iskorištavanjem laktata. Ranije se češće povezivala s primjenom fenformina u liječenju ŠB tip 2, no od kada je on povučen iz uporabe ova se komplikacija rijetko viđa; iznimno je opisana uz uporabu metformina uz istodobno prisutno bubrežno oštećenje, a i tada veći utjecaj na nastanak komplikacije imaju precipitirajući čimbenici (92). Liječenje se provodi infuzijskim otopinama, inzulinom te ispravljanjem acidobaznih poremećaja natrijhidrogen-karbonatima,

eventualno hemodijalizom.

Hipoglikemijska kriza i koma se razvijaju u slučajevima pada razine glukoze u krvi ispod 2,5 mmol/L. Nastaje u slučajevima pogrešaka u pridržavanju higijensko-dijetetskih mjera uz istovremeno neprilagođenu dozu lijeka, povećanu fizičku aktivnost ili pogoršanja KBB. Klinički se bolesnici prezentiraju neuroglikopeničnim ili adrenergičkim simptomima. Neuroglikopenični simptomi su glavobolja, smetnje govora, poremećaj svijesti, slabost, a adrenergički simptomi su glad, drhtavica, bljedilo, palpitacije i znojenje. Ukoliko se radi o blažoj hipoglikemiji preporuča se pojesti 15-20 g šećera te nakon toga pojesti redovan obrok, a ukoliko se radi o teškoj hipoglikemiji s poremećajima svijesti neophodna je intravenozna terapija glukozom (93).

#### 1.2.4. Kronične komplikacije

Shematski prikaz podjele kroničnih komplikacija ŠB prikazana je u **Tablici 2**.

**Tablica 2.** Klasifikacija kroničnih komplikacija bolesti.

<b>Mikrovaskularne</b>	<b>Makrovaskularne</b>
Retinopatija	koronarna arterijska bolest
Nefropatija	periferna vaskularna bolest
Neuropatija	cerebrovaskularna bolest

Kronične komplikacije bolesti se postupno razvijaju, a precipitira ih kronična hiperglikemija. Makrovaskularne komplikacije ŠB nastaju zbog aterosklerotske opstrukcije koronarnih arterija koronarne bolesti, perifernih krvnih žila i mozga. Najčešće srčanožilne komplikacije se prezentiraju razvojem koronarne bolesti, popuštanjem srca i periferne okluzivne bolesti. Periferne okluzivne bolesti u osoba sa ŠB zahvaćaju osim velikih, i srednje i male krvne žile, a uz mikrovaskularne komplikacije i dijabetičku neuropatiju pridonose razvoju dijabetičkog stopala, koje je najčešća kronična komplikacija. Napredovanje dijabetičke retinopatije, može se usporiti dobrom regulacijom glikemije. U liječenju se najčešće koristi fotokoagulacija. Budući da prisutna retinopatija korelira s postojanjem



dijabetičke nefropatije, prema K/DOQI Smjernicama iz 2007. godine dijabetička nefropatija se može pripisati ŠB ukoliko je uz nju još prisutna i proteinurija. U suprotnom, potrebno je razmotriti druge moguće uzroke bubrežne bolesti (94). Dijabetička neuropatija se najčešće klinički manifestira parestezijama i grčevima, još dosada nije pronađena dovoljno učinkovita terapija kojom bi se postiglo povlačenje navedenih simptoma.

## **1.2.5. DIJABETIČKA NEFROPATIJA**

### **1.2.5.1. Definicija i epidemiologija**

Dijabetička nefropatija je kronična, mikrovaskularna komplikacija ŠB tipa 1, tipa 2, a ponekada se može razviti i u sklopu dugih oblika ŠB u kojima postoji dugotrajna izloženost visokim vrijednostima glukoze u krvi. Naziva se i Kimmelstiel-Wilsonov sindrom, interkapilarni glomerulonefritis ili nodularna dijabetička glomeruloskleroza, a prezentira se pojavom albuminurije potvrđene u najmanje dva mjerenja u razmaku od 3 do 6 mjeseci, uz u velikoga broja bolesnika trajno i nepovratno smanjenje glomerularne filtracije (95). Razvija se postupno, nekoliko godina od početka ŠB i jedan je od najčešćih razloga za trajno nadomještanje bubrežne funkcije dijalizom i transplantaciju bubrega (37). Ova je komplikacija nezavisni rizični čimbenik smrti bolesnika oboljelih od ŠB.

Sindrom se prvi puta spominje u literaturi 1936. godine, a otkrili su ga liječnici Paul Kimmelstiel i Clifford Wilson (96). Radi se o glomerulopatiji koju karakteriziraju tipične strukturne i funkcionalne promjene. Strukturne promjene odnose se na mezangijalnu ekspanziju, zadebljanje glomerularne bazalne membrane i glomerularnu sklerozu, dok se funkcionalne promjene odnose na hiperfiltraciju u početku bolesti, albuminuriju, pogoršanje bubrežne funkcije i razvoj visokog krvnog tlaka (97). Albuminurija može biti normalna do blago povećana; (od engl. normal to mildly increased) ukoliko su vrijednosti izlučenog albumina u urinu do 30 mg/dan, umjereno visoka; (od engl. moderately increased albuminuria) ranije nazivana mikroalbuminurija s izlučivanjem albumina između 30-300 mg/dan, odnosno vrlo visoka albuminurija; (od engl. severely increased albuminuria) ranije nazivana makroalbuminurija, s vrijednostima albumina većim od 300 mg/dan (35, 98).

U 20-30 % bolesnika sa tipom 1 ŠB, albuminurija se javlja 10-15 godina od postavljanja dijagnoze, a dobrom regulacijom glikemije i krvnog tlaka može se održati stabilnom, no u nekih se bolesnika može očekivati i napredovanje prema klinički manifestnoj

dijabetičkoj nefropatiji i završnom stadiju KBB. U bolesnika s tipom 2 ŠB sam početak bolesti često ostaje nepoznat, te albuminurija može biti prisutna već u vrijeme postavljanja dijagnoze.

Prema podacima Hrvatskog registra nadomještanja bubrežne funkcije, u Hrvatskoj je 2011. godine bilo 32 %, a 2012. godine 29 % novih bolesnika kojima je dijabetička nefropatija bila osnovna bubrežna bolest koja je zahtijevala nadomještanje bubrežne funkcije jednom od metoda nadomjesnog liječenja (37).

### **1.2.5.2. Patogeneza i patologija**

Čimbenici rizika razvoja dijabetičke nefropatije se mogu podijeliti na nepromjenjive i promjenjive. Nepromjenjivi su genetička predodređenost, dob, spol i rasa, a promjenjivi na koje je važno utjecati aktivnim liječenjem su krvni tlak, regulacija glikemije, anemija, dislipidemija, pušenje i adipozitet.

Predmnijevani patogenetski mehanizmi razvoja ove, ali i ostalih kroničnih komplikacija šećerne bolesti su: aktivacija poliolskog i heksozaminskog puta, aktivacija protein kinaze C i komplikacije nastale djelovanjem krajnjih produkata glikozilacije (78). Zajednička im je osobina povećano stvaranje reaktivnih molekula kisika u mitohondrijima stanica ciljnih organa. Komplikacije proizišle aktivacijom poliolskog metaboličkog puta nastaju zbog povećanog stvaranja sorbitola pomoću aldoza-reduktaze. Sorbitol uzrokuje osmotska oštećenja stanice koja potom dovode do promjena stanične funkcije (78,99). Druga teorija razvoja kroničnih komplikacija ŠB ima uporište i aktiviranju heksozaminskog puta hiperglikemijom sve do krajnjeg produkta uridin difosfat N-acetilglukozamina. On se može vezati za transkripcijske čimbenike, mijenjati izražaj gena i tako regulirati povećanje transformirajućeg čimbenika rasta (od engl. transforming growth factor beta, TGF-beta) koji je odgovoran za ubrzanu proizvodnju kolagena i fibronektina. Potonji također regulira i potiče stvaranje inhibitora aktivatora plazminogena (engl. plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) koji smanjuje fibrinolizu (100). Kliničke manifestacije takovih procesa očituju se razvojem okluzije krvnih žila. Aktivaciju protein kinaze C (PKC) uzrokuje povećana sinteza diacilglicerola (DAG). Protein kinaza C svoje učinke ostvaruje promjenama enzimatske funkcije Na/K ATP-aze, te mijenjajući izražaj pojedinih gena i čimbenika rasta. U stanjima hiperglikemije povećava se i stvaranje krajnjih produkata glikozilacije (od engl. advanced glycosilation endproducts, AGEs) koji sudjeluju u nastanku ateroskleroze, oštećuju

glomerule, sastav i strukturu matriksa i tako pridonose u razvoju dijabetičke nefropatije (99). Na razini glomerula, hiperglikemija povećava izražaj TGF-beta i o njemu ovisnih proteina. Smatra se da je dijabetička nefropatija udružena sa smanjenim izražajem koštanog morfogenetskog proteina-7 (od engl. bone morphogenetic protein-7, BMP-7) koji inače smanjuje profibrogene učinke TGF-beta (101). Napredovanju oštećenja pogoduje i nedostatna ekspresija nefrina s posljedičnom povećanom propusnošću glomerularne bazalne membrane (102, 103).

Razvoju dijabetičke nefropatije pridonose i hemodinamske promjene u bubrežnoj mikrocirkulaciji. Glomerularna hiperfiltracija se razvija zbog povišenog hidrauličkog tlaka u kapilarama glomerula koji se razvija radi vazodilatacije dovodne i vazokonstrukcije odvodne arteriole. Vazodilatacija dovodne arteriole istovremeno omogućuje i prijenos tlaka iz aorte u glomerule uzrokujući tako u i njima visoki tlak s posljedičnim oštećenjima (104).

U većine bolesnika dijagnoza se postavlja na temelju tipičnih kliničkih manifestacija bolesti, no ukoliko je tijek bolesti neuobičajen, sa vrlo visokom albuminurijom već u vrijeme postavljanja dijagnoze, ili se pogoršanje glomerularne filtracije ne može objasniti dijabetičkom nefropatijom unatoč optimalnoj regulaciji tlaka, a prate se povišene vrijednosti kreatinina, hematurija, aktivni sediment urina ili je dijagnosticirana i neka druga sistemska bolest; potrebno je učiniti biopsiju bubrega kojom se, ovisno o nalazu, može bitno promijeniti terapijski pristup (94).

Od 2010. godine koristi se ujednačena patohistološka klasifikacija dijabetičke nefropatije koju je izradilo Društvo za patološku anatomiju bubrega (od engl. Renal Pathology Society, RPS), prema kojoj se ovisno o izražaju promjena u glomerulima klasificira u 4 stadija (**Tablica 3.**) (105). Istovremeno su klasificirane i patološke promjene intersticija i krvnih žila (**Tablica 4.**) (105).

**Tablica 3.** Patološka klasifikacija oštećenja glomerula u dijabetičkoj nefropatiji.

Prilagođeno prema Tervaert TWC, Mooyaart AL, Amann K, i sur. On behalf of the Renal pathology Society. Pathologic Classification of Diabetic Nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2010;21:556-63 (105).

Stadij	I	Ia	Ib	III	IV
Opis	blage ili nespecifične promjene u SM, EM, dokazano zadebljanje GBM-a	blago povećanje mezangija	jako povećanje mezangija	nodularna skleroza (Kimmelstiel-Wilsonova lezija)	uznapredovala dijabetička glomeruloskleroza
Uključni kriteriji	*bioptički uzorak ne ispunjava kriterije za stadije II,III ili IV, GBM >395 nm u žena i >430 nm u muškaraca ≥9 godina	* bioptički uzorak ne ispunjava kriterije za stadije III ili IV * blago povećanje mezangija u >25% promatranog mezangija	* bioptički uzorak ne ispunjava kriterije za stadije III-IV * jako povećanje mezangija u >25% promatranog mezangija	* bioptički uzorak ne ispunjava kriterije za stadij IV * najmanje jedna Kimmelstiel-Wilsonova lezija	* globalna glomerularna skleroza u >50% glomerula * lezije stadija I-III

SM-svjetlosni mikroskop, EM-elektronski mikroskop, GBM-glomerularna bazalna membrana

**Tablica 4.** Intersticijske i vaskularne lezije u dijabetičkoj nefropatiji.

Prilagođeno prema Tervaert TWC, Mooyaart AL, Amann K i sur. On behalf of the Renal pathology Society. Pathologic Classification of Diabetic Nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2010;21:556-63 (105).

Lezije	Uvjeti	Bodovanje
<b>Intersticijske lezije</b>		
IFTA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• bez IFTA-e</li> <li>• &lt;25%</li> <li>• 25% do 50%</li> <li>• &gt;50%</li> </ul>	0 1 2 3
upalne promjene intersticija	<ul style="list-style-type: none"> <li>• odsutne</li> <li>• infiltracija u području IFTA-e</li> <li>• infiltracija u području bez IFTA-e</li> </ul>	0 1 2
<b>Vaskularne lezije</b>		
hijalinoza arteriola	<ul style="list-style-type: none"> <li>• odsutna</li> <li>• najmanje jedno područje arteriolarne hijalinoze</li> <li>• više od jednoga područja arteriolarne hijalinoze</li> </ul>	0 1 2
postojanje velikih žila arterioskleroza	<ul style="list-style-type: none"> <li>• —</li> <li>• bez zadebljanja intime</li> <li>• zadebljanje intime manje od debljine medije</li> <li>• zadebljanje intime veće od zadebljanja medije</li> </ul>	da/ne 0 1 2

IFTA-intersticijska fibroza i tubularna atrofija

### 1.2.5.3. Stadiji i kliničke osobitosti

Dijabetička nefropatija prolazi kroz pet stadija razvoja:

1. *stadij* je stadij hiperfunkcije bubrega, a obilježen je povećanom (125-140 mL/min/ 1,73 m<sup>2</sup>) ili normalnom glomerularnom filtracijom i povećanjem veličine bubrega za oko 20 % uslijed hipertrofije tubula i ekspanzije intersticija (104). Albuminurija i krvni tlak su granicama normale.

Brojna su istraživanja provedena kako bi se istražio utjecaj hiperfiltracije na bubrežnu funkciju. Rezultati meta-analize višegodišnjeg praćenja 780 bolesnika s tipom 1 ŠB, koje su pokazali Magee i suradnici, sa ciljem utvrđivanja povezanosti hiperfiltracije i budućeg razvoja dijabetičke nefropatije potvrdili su, da je u osoba u kojih je bila prisutna polazna hiperfiltracija, bolest 2,7 puta češće napredovala u više stadije, u odnosu na bolesnike s urednom glomerularnom filtracijom (106).

2. *stadij* - tihi stadij ili stadij kliničke latencije obilježava uredna glomerularna filtracija, bez kliničkih znakova bolesti, ali sa patohistološki potvrđenim zadebljanjem bazalne membrane i proliferacijom mezangija. Značajan dio bolesnika ostaje u ovom stadiju i do 20 godina (104).

3. *stadij* - naziva se još i stadij početne nefropatije jer se u njemu nalazi prvi klinički znak oštećenja glomerula, a to je umjereno visoka albuminurija s vrijednostima albumina između 30 – 300 mg/dan. U taj stadij ulazi približno 40 % bolesnika. Prema podacima nedavno objavljene japanske studije učinjene u bolesnika s tipom 2 ŠB, albuminurija i dijabetička retinopatija u ovoj su skupini bolesnika udružene s ranijim pogoršanjem bubrežne funkcije, i napredovanjem dijabetičke nefropatije (107), što je u skladu s rezultatima zamijećenim u bolesnika s tipom 1 ŠB (108). Pravovremenim dijagnosticiranjem i liječenjem, umjereno visoku albuminuriju se može značajno smanjiti (109), i time usporiti napredovanje bolesti prema 4. i 5. stadiju.

4. *stadij* - stadij jasne dijabetičke nefropatije obilježen je sniženom glomerularnom filtracijom, vrijednostima albumina višim od 300 mg/dan i povišenim krvnim tlakom. Ireverzibilan je, za razliku od prethodna tri stadija u kojima se primjerenom terapijom pojedine promjene mogu povući ili se može zaustaviti njihovo napredovanje. Patohistološki promjene odgovaraju nodularnoj sklerozi s minimalno jednom Kimmelstiel-Wilsonovom lezijom (105).

5. *stadij* predstavlja završni stadij KBB sa padom glomerularne filtracije  $< 15 \text{ mL/min/1,73 m}^2$  i značajnom proteinurijom. U bioptičkom materijalu vidi se slika uznapredovale dijabetičke glomerularne skleroze, koja prema patohistološkoj klasifikaciji odgovara IV patohistološkom stadiju glomerularnih lezija (105).

Naposljetku, zbog visoke smrtnosti i pobola od srčano-žilnih bolesti tijekom 1-5. stadija, manji broj bolesnika razvije završni stadij KBB i potrebu za nadomjesnim bubrežnim liječenjem.

#### **1.2.5.4. Liječenje**

U liječenju dijabetičke nefropatije potrebno je uz kontrolu glikemije, krvnog tlaka, ispravljanje anemije i dislipidemije lijekovima, naglasiti i važnost redovitoga provođenja fizičke aktivnosti, redukcije prekomjerne tjelesne težine, prestanka pušenja te ograničenoga unosa soli.

##### *Kontrola glikemije*

Rezultati istraživanja velikih studija; UKPDS, DCCT i ADVANCE ukazali su na važnu ulogu regulacije glikemije u razvoju albuminurije i napredovanju ove kronične komplikacije (87,110,111). Međutim, pristup svakom pojedinom bolesniku u suradnji s dijabetologom i odabiru terapije, treba biti racionalan ovisno o njegovoj dobi, dužini trajanja ŠB, već razvijenim komplikacijama i pridruženim bolestima, budući da je ekscesivno snižavanje HbA1c, ispod 6 %, usko povezano s povećanom smrtnošću bolesnika (112). Osim učinkovitosti kontrole glikemije u sprečavanju i odgodi kroničnih komplikacija bolesti, ista se može vidjeti i u bolesnika nakon transplantacije gušterače i bubrega. Prema istraživanju talijanskih autora u 32 bolesnika sa ŠB tip 1 u kojih je transplantirana gušterača u odnosu na 30 bolesnika u kojih je primjenjena konzervativna terapija nakon godinu dana postignuta je bolje regulacija glikemije, krvnog tlaka, snižavanje vrijednosti kolesterola i LDL, te manja proteinurija (113). 2006. Fioretto i suradnici objavili su po prvi puta dobivene rezultate istraživanja na ljudima kojim su pokazali dugoročne učinke uspješne transplantacije gušterače. Prema njihovim rezultatima, nakon 10 godina praćenja došlo je ne samo do povlačenja ranijim biopsijama bubrega opisanih promjena, već i do oporavka tubula (114).

### *Kontrola krvnog tlaka*

Kontrola krvnog tlaka ima bitnu ulogu u sprečavanju napredovanja dijabetičke nefropatije. Jedan od najvažnijih rezultata UKPDS studije odnosio se na regulaciju tlaka i sprečavanje makrovaskularnih i mikrovaskularnih komplikacija ŠB, budući da su bolesnici uz terapiju ŠB liječeni i različitim antihipertenzivima. Prema studiji, sniženje sistoličkog krvnog tlaka za 10 mmHg može smanjiti mogućnost razvoja komplikacija ŠB za 12 %, a najniži rizik je zabilježen pri vrijednostima sistoličkog tlaka ispod 120 mmHg (115). Navedeno potvrđuju i druga istraživanja, poput Irbesartan Diabetic Nephropathy Trial (IDNT) (116) koje je provedeno na uzorku od 1715 bolesnika sa tipom 2 ŠB. Bolesnici su bili tretirani ARB-om, kalcijским antagonistom ili placebo. Nakon 2,6 godina praćenja, bila je vidljiva korelacija između snižavanja tlaka i smanjenja smrtnosti od srčanožilnih bolesti, ali i usporavanja napredovanja dijabetičke nefropatije prema završnom stadiju KBB u korist ARB. Usporavanje napredovanja bolesti može se pripisati djelovanju ARB kao i ACE inhibitorima jer oni osim na sistemski visoki krvni tlak povoljno djeluju i na tlak u glomerulima djelujući na dilataciju eferentne arteriole, kao i na RAAS.

U razvoju proteinurije i dijabetičke nefropatije ključnu ulogu ima angiotenzin II. Smanjujući njegov učinak smanjuje se i aktivnost TGF-beta i oštećenje podocita koje bi dovelo do promjena u strukturi glomerularne membrane i omogućilo razvoj proteinurije (117). Primijenjeni u 1. ili 2. stadiju dijabetičke nefropatije mogu spriječiti nastup i/ili pogoršanje albuminurije, za razliku od viših stadija gdje je takovo liječenje manje učinkovito (118). Kombinacija ARB i ACE inhibitora može biti učinkovita u smanjenju proteinurije više od primjene jednog lijeka u maksimalnoj dozi, no uz rizik mogućih nuspojava u obliku hiperkalemije, hipotenzije ili porasta kreatinina, te se stoga prema Smjernicama ESH-ESC iz 2013. godine ne preporuča (razina dokaza IIIB) (119).

### *Liječenje anemije*

Anemija u ovih bolesnika smanjuje kvalitetu života i pridonosi lošijem ishodu bolesti, a njezinom ispravljanju treba pristupiti nakon isključivanja drugih uzroka (ponajprije paraneoplastičkih procesa). Uz liječenje preparatima željeza, pri vrijednostima Hb nižim od 110 g/L, preporuča se i uporaba lijekova koji stimuliraju eritropoezu s postizanjem ciljnih vrijednosti Hb unutar 110-120 g/L (120). Vrijednosti Hb iznad 130 g/L treba potrebno je izbjegavati jer se povezuju s mogućim povećanjem svih uzroka smrtnosti i nepovoljnih kardiovaskularnih događaja (121).



### *Liječenje dislipidemije*

Udruženi, dislipidemija, ŠB i KBB značajni su rizični čimbenici razvoja opstruktivne aterosklerotske koronarne bolesti. Povišene vrijednosti LDL kolesterola, u studijskim analizama, su se pokazale rizičnim čimbenikom za pojavu nefropatije u bolesnika s tipom 1 ŠB. Dislipidemija, je također, zasebno jedan od vodećih čimbenika koji pogoršava aterosklerozu, i ubrzava napredovanje nefropatije u tipu 1 ŠB i povećava rizik od srčanožilnih bolesti (122), koje se uvođenjem hipolipemika u terapiju i snižavanjem vrijednosti serumskih lipida može usporiti (123).

### *Novi terapijski pokušaji*

U posljednje vrijeme, ispituju se nove supstancije u cilju poboljšanja liječenja dijabetičke nefropatije i odgađanja završnog stadija KBB. Nedavno provedena studija s vitaminom D u kombinaciji s ARB, ukazuje na njegov mogući povoljni učinak na snižavanje albuminurije u toj skupini bolesnika (124), no što će još biti potrebno utvrditi većim, randomiziranim studijama. Bardoksolon je sintetski triterpenoid čiji se učinak temelji na snižavanju sinteze proupalnih medijatora. Jedina je tvar za koju je dokazan povoljan učinak na glomerularnu filtraciju, ali uz veću učestalost neželjenih srčanožilnih incidenata uslijed porasta krvnog tlaka i zadržavanja tekućine (125) zbog čega je potrebno pričekati rezultate istraživanja koja su u tijeku. Istraživanje sulodeksida i njegovog antifibroznog učinka, putem sniženoga stvaranja TGF-beta i posljedičnog smanjenja propusnosti bazalne membrane, i snižavanja mikroalbuminurije, na većem uzorku ispitanika je ranije završeno jer nisu uočene bitne razlike između učinka placeba i sulodeksida (126). U novije vrijeme istražuju se i povoljni učinci sode bikarbone na poboljšanje nutritivnog statusa bolesnika i usporavanja pogoršanja bubrežne funkcije (127).

### **1.3. Koštani morfogenetski proteini**

#### **1.3.1. Definicija i podjela**

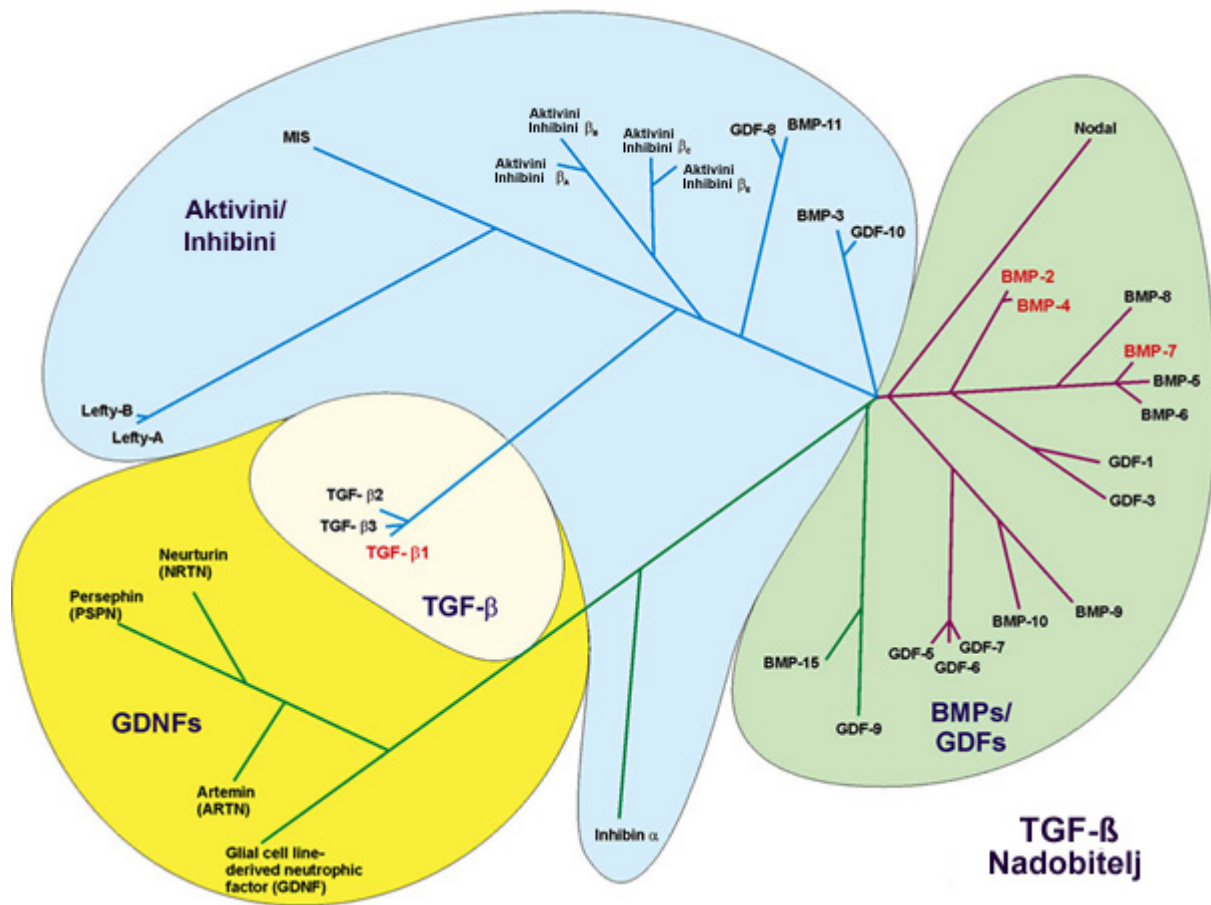
Koštani morfogenetski proteini (od engl. Bone Morphogenetic Protein, BMP) dio su velike obitelji unutar nadobitelji TGF-beta. Imaju vrlo važnu ulogu tijekom embrionalnog razvoja i organogeneze, te u odrasloj dobi, u održavanju funkcije i strukture organa.

Do danas je poznato više od 20 članova BMP obitelji (128).

Otkriveni su tijekom 60-tih godina prošloga stoljeća kada je američki istraživač, dr. Marshall R. Urist (1914-2001.), pokazao da demineralizirani koštani matriks primjenjen injekcijom u mišić ili potkožno u sisavaca uzrokuje ektopično stvaranje kosti. Molekule koje su bile odgovorne za taj proces nazvao je koštanim morfogenetskim proteinima (129). Bilo je to revolucionarno otkriće koje je otvaralo nove mogućnosti u liječenju koštanih defekata.

Nadobitelj TGF-beta je dobila ime prema prvom članu obitelji koji je izoliran; TGF-beta 1.

Uz TGF-beta i BMP koja je najveći član, dio obitelji su i glijalni neurotrofični čimbenik (od engl. Glial derived neurotrophic factor, GDNF), aktivini i inhibini (130) (**Slika 4.**).



**Slika 4. Članovi TGF-beta nadobitelji.** Prilagođeno prema Weiskirchen R. Meurer SK. BMP-7 counteracting TGF-beta<sub>1</sub> activities in organ fibrosis. *Front Biosci* 2013;18:1407-34. (130).

Koštani morfogenetski proteini su građeni u obliku dimernih molekula povezanih disulfidnom vezom, a nastaju u stanicama u obliku velikih preteča molekula sastavljenih od hidrofobno-sekretorne i propeptidne jedinice pridružene zreloj domeni. Ovisno o slijedu aminokiselina i poznatim učincima, mogu se podijeliti u četiri podskupine BMP-2/4, BMP 5/6/7/8a/8b, BMP 9/10 i BMP 12/13/14 (131). Utječu na razvoj sva tri zametna listića: ektoderma, mezoderma i endoderma i imaju višestruke, važne uloge u rastu, diferencijaciji i apoptozi brojnih tkiva i organa (**Tablica 5.**) (132).

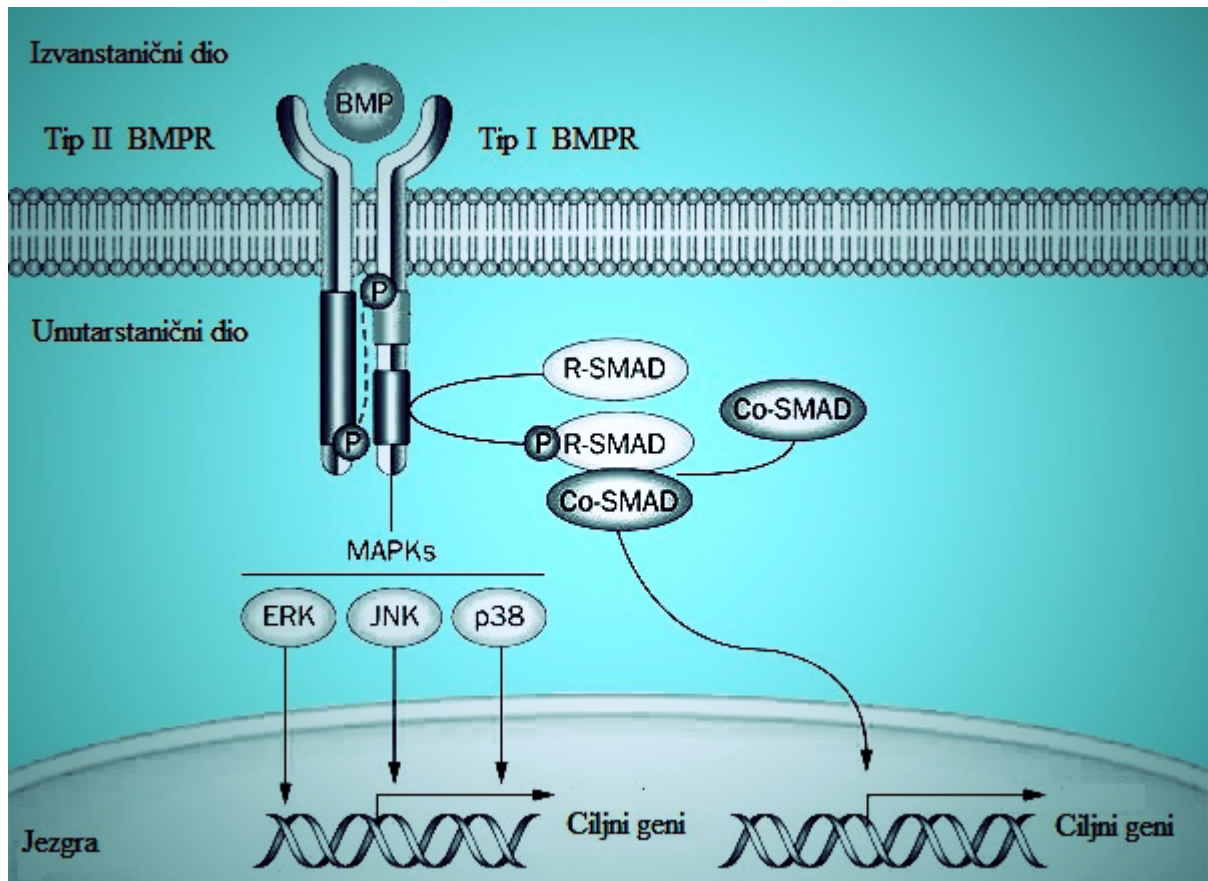
**Tablica 5.** Klasifikacija i posredovanje učinka BMP na različita tkiva i organe. Prilagođeno prema: Rao SM, Ugale GM, Warad SB. Bone morphogenetic proteins: periodontal regeneration. N Am J Med Sci. 2013;5:161-8 (132).

<b>Koštani morfogenetski protein (BMP)</b>	<b>Posredovanje</b>
BMP-1	Nije član TGF beta obitelji
BMP-2	Osteoinduktivna aktivnost, posredovanje u diferencijaciji osteoblasta, apoptoza
BMP-3	Sprječavanje osteogeneze
BMP-4	Osteoinduktivna aktivnost, posredovanje u razvoju pluća i oka
BMP-5	Hondrogeneza
BMP-6	Diferencijacija osteoblasta, hondrogeneza
BMP-7	Osteoinduktivna aktivnost, posredovanje u razvoju bubrega i oka
BMP-8	Osteoinduktivna aktivnost
BMP-9	Utjecaj na razvoj živčanog sustava, učinak na retikuloendotelni sustav jetre
BMP-10	Razvoj srca
BMP-11	Utjecaj na živčano tkivo
BMP-12	Posredovanje u razvoju tetiva
BMP-13	Posredovanje u razvoju tetiva i ligamenata
BMP-14	Poboljšava cijeljenje tetiva i stvaranje kosti
BMP-15	Stimulacija folikula

### 1.3.2. Stanični mehanizmi djelovanja

Svoje učinke na staničnoj razini BMP ostvaruju vezanjem na serin/treonin kinazne receptore koji se sastoje od tri dijela: kratkog izvanstaničnog, transmembranskog i unutarstaničnog odsječka (133). Dva su osnovna tipa receptora; tip I i tip II. Dosada je poznato sedam receptora tipa I, pod nazivom ALK 1 – ALK7 (od engl. Activin receptor Like Kinase), ali se BMP mogu vezati samo za ALK2, ALK3 i ALK6, i četiri receptora tipa II; od kojih se BMP mogu vezati za ActRIIA, ActRIIB, BMPRII (131).

Za prijenos signala potrebna su oba tipa receptora. Tip II receptori, koji su prema sastavu aktivne kinaze, fosforiliraju i aktiviraju receptore tipa I. Aktivacijom receptora tipa I BMP signal se prenosi u stanicu i putem Smad molekula pokreće jedan od dva signalna puta: Smad ovisni ili Smad neovisni, kojim se u konačnici direktno utječe na modulaciju i izražaj gena. Tip I receptori determiniraju Smad aktivacijski put daljnijega prijenosa signalnog puta u stanicu (134). Prema funkcionalnom statusu razlikuju se tri razreda Smad molekula: receptor specifični, regulatorni Smad 1, 2, 3, 5, i 8; zajednički Smad 4; i inhibitorni Smad 6 i 7. Nakon aktivacije receptora tipa I i fosforilacije regulatorne-Smad molekule u većem dijelu 1, 5 i 8, dolazi do spajanja sa Smad 4 molekulama, i stvaranja heterodimerskog kompleksa kojim se potom signal prenosi u jezgru i regulira transkripcija gena (134). Aktivnost BMP negativno reguliraju BMP antagonisti Noggin, Chordin, Folistatin i CTGF (od engl. connective tissue growth factor) koji se nalaze u izvanstaničnom prostoru. Osim Smad signalnog puta koji se unutar TGF-beta nadobitelji i BMP obitelji uglavnom opisuje, odvijaju se paralelno i drugi, Smad neovisni, signalni putevi; MAPK (od engl. mitogen-activated protein kinase), JNK (od engl. C-Jun amino-terminal kinases), ERK (od engl. extracellular signal-regulated kinases) (**Slika 5.**) (134,135).



**Slika 5.** Prijenos BMP signala. Prikaz Smad ovisnog puta i Smad neovisnog puta te djelovanje na transkripciju ciljnih gena u staničnoj jezgri.

MAPK, mitogen-activated protein kinase, JNK, C-Jun amino-terminal kinases, ERK, extracellular signal-regulated kinase. Prilagođeno prema Eileen M. Shore EM, Kaplan FS. Inherited human diseases of heterotopic bone formation. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6:518-27 (135).

Dosadašnja istraživanja pokazala su da su BMP osobito važni u razvoju bubrega, pri čemu je najviše podataka dobiveno iz eksperimentalnih, animalnih modela miševa i štakora, a odnose se na povoljne učinke BMP 2, 4 i 7. U ljudi i miševa, u molekuli BMP-7 proteina postoji naime, velika podudarnost u slijedu aminokiselina, kao i u ostatku TGF-beta nadobitelji i drugih vrsta poput vinske mušice, miša, *Xenopusa* (vrsta afričke žabe) i, čovjeka (136,137).

### 1.3.3. Koštani morfogenetski protein-7

Koštani morfogenetski protein – 7, protein je molekularne mase 35 kDa, stvara se u bubregu u kojemu je i izražen u najvećoj količini, i u čijem je razvoju prepoznat kao najvažnija molekula. Ovisno o izvješćima pojedinih autora, izražaj BMP-7 je raznoliko raspoređen unutar pojedinih struktura humanih bubrega. U zdravom bubrežnom tkivu, kao i u tkivu prožetom tumorskim stanicama, na uzorku od 64 biopsija, BMP-7, i njegovi receptori bili su izraženi u svim strukturama, najviše u epitelnim stanicama proksimalnih kanalića (138), dok je prema izvješću Wetzela i suradnika, u 6 ljudskih bubrega mRNA za BMP-7, bila najbolje izražena u distalnom kanaliću i sabirnim cijevima. U životinjskim modelima, vrlo dobar izražaj je pak prikazan, osim u području nefrona, i u adventiciji bubrežnih arterija, pijelonu te ureteru (139).

Koštani morfogenetski protein-7 ima ključnu ulogu u ranom razvoju bubrega iz metanefritičkog mezenhima tijekom embrionalnog razdoblja, sa vršnim vrijednostima od 12-14 tjedna (140), a u odrasloj dobi u determinaciji patofizioloških mehanizama razvoja oštećenja funkcije bubrega. Dokazi o nepobitnoj ulozi ove molekule potječu s kraja 90-tih godina prošloga stoljeća kada je pokazano da miševi koji ga nemaju u genomu, i u kojih je zbog toga izostao razvitak bubrega, umiru prvi dan po okotu u slici uremije, uz patološkoanatomski nalaz hidrouretera i displastičko promijenjenih bubrega. Osim toga, njegov nedostatak u miševa dovodi do ozbiljnih oštećenja očiju te skeleta (141,142).

Osnovna mu je zadaća zaštita bubrega od akutnog i kroničnog oštećenja, sprečavanjem razvoja upalnih procesa i fibroznih promjena (143). U uvjetima eksperimentalno izazvane akutne ozljede bubrega, primjena BMP-7 pridonijela je bržem oporavku bubrežne funkcije, uz manju tubularnu nekrozu, potisnut upalni odgovor i apoptozu (144). U modelu KBB, administracija BMP-7 poboljšala je bubrežnu funkciju, i preživljenje životinja, smanjenim izražajem profibrotičkih molekula poput kolagena tipa 1 i fibronektina, uz istodobno povećano stvaranje aktivne matriks metaloproteinaze-2 iz mezangijskih stanica, koja ima važnu ulogu u cijeljenju tkiva utjecajem na razgradnju strukturnih proteina izvanstaničnog matriksa (145).

Renoprotektivnu ulogu BMP-7 u očuvanju strukture i funkcije bubrega potvrđuju i literaturni podaci dobiveni istraživanjem karcinogeneze. Analiziranje njegova učinka provedeno na uzorcima tumora svijetlih stanica ljudskih bubrega, u kojemu je nađen smanjen izražaj BMP-7 RNK, potvrdilo je takovu hipotezu, ali i ukazalo na moguću novu ulogu BMP-

7 kao prognostičkog čimbenika daljnjeg tijeka bolesti (146).

U eksperimentalnom modelu dijabetičke nefropatije uzrokovane streptozotocinom, pokazao se važnim u smanjenju razvoja fibroze, nakupljanju izvanstaničnog matriksa, time i daljnjem oštećenju strukture i funkcije bubrega, poništavajući učinke TGF-beta (147). Učinkovit je u snižavanju proteinurije, djelomičnom smanjenju hipertrofije i poboljšanju glomerularne filtracije (148). Održavanjem primjerenosti vrijednosti BMP-7 smanjuje se i propadanje podocita, a time i daljnje napredovanje bolesti (149).

Dosadašnjim istraživanjima pokazano je da su izražaj BMP-7 i broj podocita sniženi u humanoj dijabetičkoj nefropatiji, uz pridružen pojačan izražaj izvanstaničnog BMP-7 antagonista CTGF koji se smatra važnim čimbenikom aktivacije signalnih puteva (150), i čija inhibicija, u eksperimentalnim uvjetima poboljšava ishode bubrežnih bolesti (151).



## **2. HIPOTEZA**

Naša hipoteza jest pokazati da se izraženost BMP-7 mijenja progresijom bubrežne bolesti.

Koštani morfogogenetski protein-7 je u proteklom desetljeću prepoznat kao važan antifibrogeni čimbenik. Dosadašnja istraživanja pokazala su da poboljšava glomerularnu filtraciju, smanjuje proteinuriju, upalni odgovor i razvoj fibroznih promjena koje obilježavaju napredovanje kronične bubrežne bolesti u završni stadij.

### **3. CILJEVI RADA**

**Osnovni ciljevi ove Disertacije su:**

1. pokazati izraženost BMP-7 u različitim stadijima dijabetičke nefropatije
2. istražiti izraženost BMP-7 u bioptatima bubrega bolesnika s dijabetičkom nefropatijom
3. usporediti izraženost BMP-7 u različitim stadijima dijabetičke nefropatije sa izraženošću BMP-7 u bioptatima bubrega
4. istražiti izraženost BMP-7 u različitim stadijima dijabetičke nefropatije ovisno o demografskim čimbenicima (dob, spol, komorbiditet – visoki krvni tlak, hiperlipoproteinemija, preboljeli infarkt miokarda, cerebrovaskularni inzult, razvijene kronične komplikacije na mrežnici).

## **4. ISPITANICI I METODE**

## Prikaz redoslijeda istraživanja

Provedeno istraživanje prospektivnoga je karaktera, podijeljeno u 2 dijela od kojih je prvi dio proveden tijekom godine dana u Općoj bolnici Bjelovar na skupini od 120 ispitanika podijeljenih u 4 skupine, dok su u drugom dijelu istraživanja upotrijebljeni preostali bioptički materijali bolesnika s dijabetičkom nefropatijom pohranjeni u arhivi Kliničkoga zavoda za patologiju i citologiju KBC Zagreb.

Istraživanje je provedeno uz dozvolu nadležnog Etičkog povjerenstva i informirani pismeni pristanak svakog ispitanika.

### *4.1.1. Prvi dio istraživanja-ELISA test*

U istraživanje su uključeni bolesnici sa ŠB tip 2 i razvijenom dijabetičkom nefropatijom, visokim krvnim tlakom, preboljelim srčanožilnim i moždanožilnim bolestima, a iz ovoga dijela istraživanja isključeni su bolesnici s tipom 1 ŠB, akutnom bolešću i anamnezom zloćudne bolesti. Navedeni su podatci dobiveni kliničkim pregledom bolesnika i uvidom u medicinsku dokumentaciju. Pri pregledu bolesnika zabilježeni su osobni podaci; ime i prezime, spol, godina rođenja, kontakt podaci, izmjeren je krvni tlak, tjelesna težina i visina radi izračuna indeksa tjelesne mase, te laboratorijski nalazi ureje, kreatinina, lipidograma, HbA1c i albuminurije učinjeni u Jedinici za laboratorijsku dijagnostiku Opće bolnice Bjelovar. Glomerularna filtracija je procijenjena na temelju Cockcroft-Gaultove i modificirane MDRD formule, temeljem koje su bolesnici podijeljeni u skupine po 30 ispitanika, ovisno o stadiju bubrežne bolesti:

1. bolesnici sa ŠB tip 2 u I-II stadiju KBB (uključuje glomerularnu filtraciju  $>90$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup> uz oštećenje bubrega, i glomerularnu filtraciju od 60-90 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>),
2. bolesnici sa ŠB tip 2 u predzavršnom stadiju KBB i glomerularnom filtracijom od 15-30 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>,
3. bolesnici sa ŠB tip 2 na hemodijalizi u kojih je glomerularna filtracija manja od 15 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>,
4. zdrave osobe – kontrola.

Od svakoga ispitanika, na tašte, standardnom je venepunkcijom uzeto 20 mL periferne krvi za ELISA test, a u bolesnika na hemodijalizi pri samom započinjanju postupka hemodijalize.

Uzorci su potom centrifugirani i pohranjeni u ledu na -20 C.

Kada su svi uzorci sakupljeni, ELISA testom je u njima određena koncentracija BMP-7.

*ELISA test (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)* je danas najrašireniji imunotest za otkrivanje specifičnosti protutijela, otkrivanje autoprotutijela, te za mjerenje koncentracije brojnih antigena. Izvodi se u automatskom analizatoru rabeći protutijela vezana na enzime koji se vežu na nepoznate antigene predočene na površini stanice. Dodavanjem specifičnih supstrata za enzime kompleks protutijelo/antigen postaje prepoznatljiv i dostupan mjerenju (152).

Koncentracije BMP-7 u serumu su određene imunoenzimatskim kompletima: Human BMP-7 ELISA (R&D Systems, USA) kataloški broj DBP 700, koji sadržava jednu polistirensku pločicu sastavljenu od 96 jažica obloženih monoklonalnim mišjim protutijelom za BMP-7, puferirani rekombinantni ljudski BMP-7, BMP-7 konjugat i otopinu supstrata kromogena (tetrametilbenzidina) i hidrogen peroksida za inkubaciju, pufer, koncentriranu otopinu za ispiranje, te otopinu za zaustavljanje reakcije (sulfatna kiselina). Za potrebe ovoga istraživanja na uzorcima 120 ispitanika iskorištena su dva kompleta (96+24 jažica). Uz svako testiranje korištene su kontrole u tri razine i to na početku i kraju testa (RD-SET 613-RD613). Postupak pripreme uzoraka učinjen je prema uputama proizvođača. Uzorci su prije pripreme odmrznuti na sobnu temperaturu kao i ELISA kompleti. U svaku od 120 jažica stavljaju se uzorak i rekombinantni BMP-7 nakon čega slijedi inkubacija na sobnoj temperaturi u trajanju 2 sata, potom ispiranje 4 puta otopinom iz komercijalnog seta; dodavanje konjugata BMP-7 (893141), ponovno ispiranje 4 puta, aplikacija reagensa sastavljenog od tetrametilbenzidina i hidrogen-peroksida i završna inkubacija u trajanju 30 minuta. Reakcija se zaustavlja sulfatnom kiselinom, a rezultati se moraju očitati unutar 30 minuta. Svaki uzorak analiziran je i očitao na uređaju Dynatech Laboratories MRX (450 nm).

Budući da su dobivene vrijednosti u bolesnika i u kontrolnoj skupini niže od preporučenih, učinjena je kontrola valjanosti testa provjerom postavljanja testa i testnih kontrola; u potpunosti je ponovljeno testiranje uzoraka kontrolne skupine zdravih ispitanika, te je proširen broj testiranih bolesnika iz 3.skupine (bolesnici na hemodijalizi). Dobiveni kontrolni rezultati u potpunosti odgovaraju prvim rezultatima, koji su potom ušli u statističku analizu, a valjanost rezultata je potvrđena testnim kontrolama koje su sastavni dio imunoenzimatskog kompleta.

Podatci za svakog ispitanika upisani su u bazu podataka oblikovanu u Microsoft Accessu.

#### *4.1.2. Drugi dio istraživanja-Imunohistokemijsko bojanje*

U drugome dijelu istraživanja, u 30 uzoraka bioptata bubrega bolesnika s prethodno potvrđenom dijagnozom dijabetičke nefropatije, preostalih iz Arhive Zavoda za patologiju i citologiju KBC Zagreb, a učinjenih u razdoblju od 1998. – 2012. godine, imunohistokemijskim bojanjem je određena izraženost BMP-7.

Za određivanje stadija dijabetičke nefropatije koristili smo Patološku klasifikaciju oštećenja glomerula u dijabetičkoj nefropatiji kako je prethodno opisano (105).

U vrijeme biopsije najmlađi bolesnik imao je 24 godine, a najstariji 70 godina (prosječna dob muškaraca bila 53, a žena 51 godinu). Bilo je 15 muškaraca i 13 žena, a u tri bolesnika osnovna je bolest bila ŠB tip 1, dok je u 25 bolesnika to bila ŠB tip 2.

Tijekom postupka dva su uzorka uklonjena zbog nedostatnosti materijala (globalno sklerozirani glomeruli). U kontrolnoj skupini korišteni su uzorci zdravog tkiva 12 bubrega dobiveni tijekom nefrektomije bolesnika s lokaliziranim tumorom bubrega. Uzorci su izuzeti s najudaljenijega mjesta od tumora.

*Imunohistokemija* je dijagnostička metoda izbora u analizi bioptata, jer omogućuje prikaz antigena izraženih na površini stanice i same stanične morfologije svjetlosnim mikroskopom.

Postupak se sastoji od pripreme uzoraka, obilježavanja i vizualizacije mikroskopiranjem. Za svakoga bolesnika izdvojena je po jedna parafinska kocka iz koje su izrezani rezovi debljine 4-5  $\mu\text{m}$  i postavljeni na staklo, i potom deparafirani.

U istraživanju je korišteno anti-humano monoklonalno protutijelo: BMP-7 (R&D Systems, USA, mišje monoklonalno protutijelo, klon 164311, kataloški br. GLM0209111). Nakon deparafiniziranja rezova, antigen BMP-7 je demaskiran u PT-modulu (DakoCytomation, Denmark) na 97 °C, 20 minuta u puferu iz EnVision flex komercijalnog seta (K8010, DakoCytomation, Denmark) i obrađen standardnim automatiziranim postupkom u Autostainer + aparatu (DakoCytomation, Denmark), te kontrastiran hematoxylinom.

EnVision je polimer s dekstranskom osnovom na kojoj se nalaze molekule različitih enzima. EnVision sustav sadrži sekundarna protutijela kojima može detektirati bilo koje primarno mišje ili zečje protutijelo (153).

Nakon imunohistokemijske obrade, uslijedilo je mikroskopiranje uzoraka. Pozitivnim rezultatom izražaja BMP-7 smatrana je prisutnost bojanja u > 5 % stanica.

Analiza je izvršena na najmanje 5 vidnih polja velikog povećanja 400x (VVP), ukupno na



najmanje 1000 stanica. Analizirana je prisutnost citoplazmatskog izražaja u epitelu kanalića i glomerularnim stanicama.

Intenzitet BMP-7 bojanja određen je na sljedeći način: 0 - negativno; 1+ - bojanje vidljivo na povećanju 400x (slabi intenzitet), 2+ - bojanje vidljivo na povećanju 100x (umjereni intenzitet) i 3+ -bojanje vidljivo na povećanju 50x (jaki intenzitet).

#### *4.1.3. Statistička analiza*

Statistička obrada i analiza podataka izvršena je licenciranim programom STATISTICA 6.1 StatSoft inc. 1983-2003 (Serial number AGA304B211928E61). Korišteni su sljedeći moduli tog programa Basic Statistics/Tables (Descriptive Statistics), Nonparametrics, te grafovi Histogram, Box plot i Scatter plot.

Rezultati dobiveni statističkom obradom prikazani su grafički i numerički (tabelarno). Statističko testiranje provedeno je na razini značajnosti od 95 % ( $\alpha=0,05$ ).

Kvalitativni parametri opisani su frekvencijskim tablicama, mjereni parametri deskriptivnom statistikom, a grafički prikazani histogramima.

Za sve mjerene parametre provjerena je razdioba podataka unutar svake skupine, na osnovu mjere asimetričnosti razdiobe (Skewness) i mjere spljoštenosti razdoobe (Kurtosis). Ako se vrijednosti obje te mjere unutar intervala (-1,1) tada podaci slijede normalnu razdiobu, u protivnom, ako je vrijednost barem jedne od tih mjera izvan tog intervala podaci nisu normalno distribuirani. U slučaju podataka koji slijede normalnu razdiobu, prosjek i standardna devijacija su dobri pokazatelji, dok su za podatke koji ne slijede normalnu razdiobu, dobri pokazatelji medijan i raspon (maximum – minimum).

Statistička razlika između skupina u odnosu na kvalitativne parametre testirana je Pearson hi-kvadrat testom.

Statistička razlika između skupina bolesnika u odnosu na mjerne parametre čije vrijednosti nisu normalno distribuirane, testirana je Kruskal-Wallis ANOVA testom. To je neparametrijski test kojim se testira razlika između središnjih vrijednosti (medijana) tri ili više skupina.

Statistička razlika između dva nezavisna uzorka (muškarci – žene, prebolio – nije prebolio) testirana je Mann-Whitney U testom. To je neparametrijski test kojim se testira razlika između središnjih vrijednosti (medijana) dva nezavisna uzorka.

Testiranje razlike između bolesnih i zdravih u odnosu na dob testirana je t-testom.

Testiranje povezanosti BMP-7 s ostalim izmjerenim parametrima testirano je linearnom regresijskom analizom i izračunavanjem Pearson-ovog koeficijenta korelacije, kao statističke mjere linearne povezanosti dva izmjerena parametra.

Testiranje izražaja BMP-7 u bioptatima bubrega učinjeno je Fisherovim egzaktnim testom.

## **5. REZULTATI**

## 5.1. Rezultati ELISA testa

### *Prvi dio istraživanja*

#### **5.1.1. Raspodjela uzorka**

Na uzorku od ukupno 90 ispitanika koji su prikupljeni tijekom godine dana istražena je izraženost BMP-7 u različitim stadijima dijabetičke nefropatije ovisno o demografskim čimbenicima: dob, spol, komorbiditet - visoki krvni tlak, hiperlipoproteinemija, preboljeli infarkt mikarda, cerebrovaskularni inzult, razvijene kronične komplikacije na mrežnici, i uspoređena s rezultatima kontrolne skupine koju je činilo 30 zdravih dobrovoljaca. Bolesnici su prema prethodno opisanim kriterijima podijeljeni u skupine od po 30 ispitanika, uz također 30 ispitanika u kontrolnoj skupini. Distribucija ispitanika po skupinama prikazana je u **Tablici 6.**

**Tablica 6.** Raspodjela ispitanika po skupinama.

Skupina	Broj bolesnika	Postotak (%)
1- iznad 60	30	25,0
2- do 30	30	25,0
3- hemodijaliza	30	25,0
4- zdravi	30	25,0
Ukupno	120	100,0

### **5.1.2. Demografski podaci ispitanika**

Demografski podaci i kliničke karakteristike ispitanika navedeni su u Tablici 7. i 8. Distribucija prema spolu pokazala je da je bilo ukupno 42,5 % žena i 57,5 % muškaraca. Analiza ispitanika unutar pojedinih skupina, pokazala je da je nešto veći udio ženskog spola bio u drugoj skupini koja je obuhvatila bolesnike u predzavršnom stadiju KBB, a muškog spola u prvoj skupini ispitanika s početnom KBB I i II stadija.

Riječ je o bolesnicima koji su probirani tijekom godinu dana u Općoj bolnici Bjelovar u Nefrološkoj ambulanti i Ambulanti Centra za dijabetes, te u Centru za hemodijalizu iste ustanove. Svi su bolesnici bili oboljeli od šećerne bolesti tip 2 s razvijenom dijabetičkom nefropatijom, a od pridruženih bolesti u većine je bio prisutan visoki krvni tlak, u 14,17% preboljeli cerebrovaskularni inzult, u 12,50% preboljeli infarkt miokarda, te u 66,67% hiperlipoproteinemija.

Hi-kvadrat test pokazao je da ne postoji statistički značajna razlika između skupina, u odnosu na raspodjelu bolesnika prema spolu ( $p > 0,05$ ) (**Tablica 7.**).

Nije bilo razlike u starosti između bolesnika i zdravih ispitanika. Raspodjelom bolesnika prema pojedinim skupinama medijan dobi prve skupine bio je 60,0 (min-max 48-74), druge skupine bio je 71,0 (min-max 51-91), a treće skupine 65,5 (min-max 41-79). U četvrtoj, kontrolnoj skupini ispitanika medijan je iznosio 65,50 (odnosno min-max 47-87). (**Slika 6, Tablica 8.**)

Testiranje razlika između dobi bolesnika i zdravih ispitanika prikazano je u **Tablici 9.**

Kompatibilnost uzoraka provjerena je testom razlike bolesnika i zdravih ispitanika u odnosu na dob. Učinjen je T-test koji je pokazao da ne postoji statistički značajna razlika između bolesnih i zdravih u odnosu na dob ( $p > 0,05$ ) (**Slika 7.**), te se može zaključiti da su dobivene statističke razlike uzrokovane razlikama u vrijednostima promatranih parametara.

Kako ne postoji statistički značajna razlika između bolesnih i zdravih u odnosu na spol i dob, zaključujemo da se radi o kompatibilnim uzorcima, te su dobivene statističke razlike uzrokovane razlikama u vrijednostima promatranih parametara.

**Tablica 7.** Raspodjela ispitanika prema spolu.

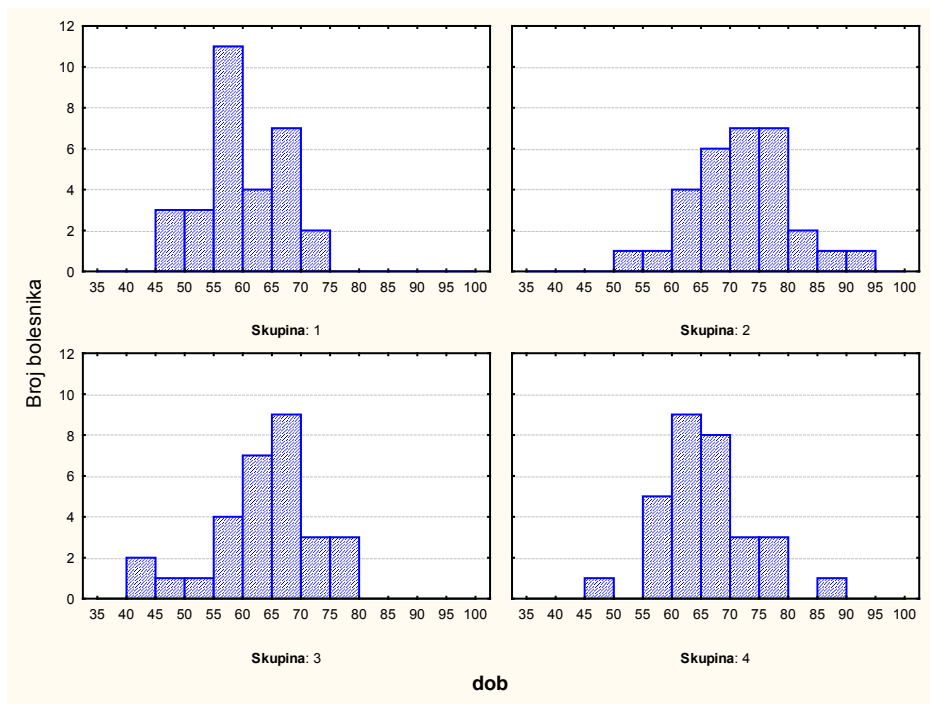
Spol	Skupina 1	Skupina 2	Skupina 3	Skupina 4	Ukupno
ženski	10	16	12	13	51
%	8,33%	13,33%	10,00%	10,83%	42,50%
muški	20	14	18	17	69
%	16,67%	11,67%	15,00%	14,17%	57,50%
Ukupno u skupini	30	30	30	30	120
%	25,00%	25,00%	25,00%	25,00%	100,00%

Parametar	Pearson Chi-square (hi-kvadrat)	Df (stupnjevi slobode)	p vrijednost
Spol	2,558	3	0,465

$p > 0,05$

**Tablica 8.** Raspodjela bolesnika prema dobi.

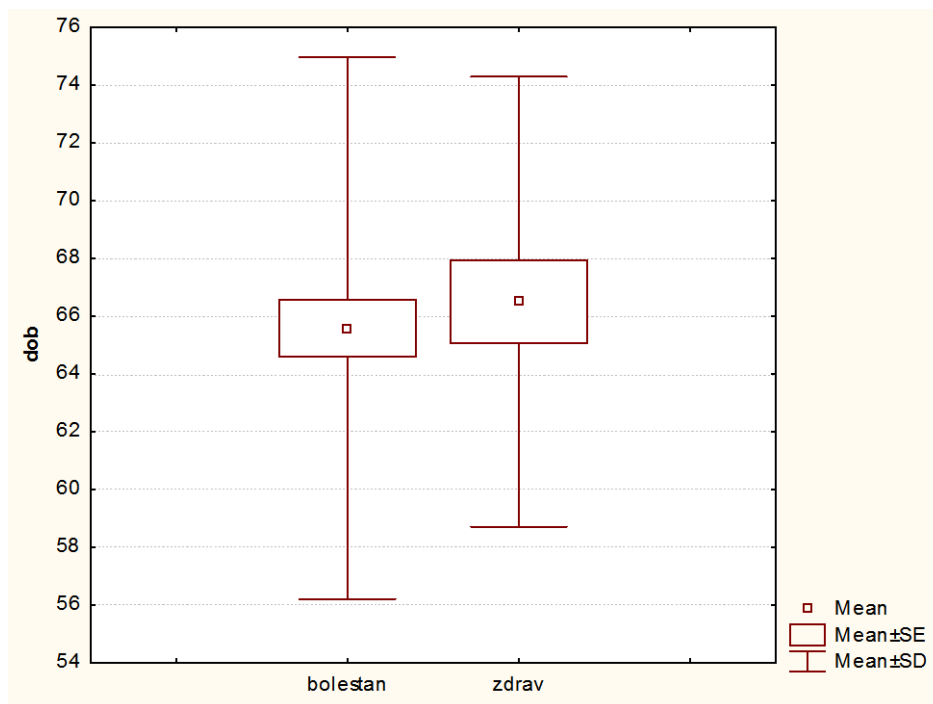
Skupina	Dob							
	Broj bolesnika	Prosjek	Median	Minimum	Maximum	S.D.	Skewness	Kurtosis
1	30	60,97	60,00	48,00	74,00	7,015	0,043	-0,761
2	30	71,90	71,00	51,00	91,00	8,470	-0,098	0,535
3	30	63,90	65,50	41,00	79,00	9,114	-0,721	0,635
4	30	66,50	65,50	47,00	87,00	7,789	0,322	1,340



**Slika 6.** Grafički prikaz raspodjele bolesnika prema dobi.

**Tablica 9.** Testiranje razlike između bolesnih i zdravih u odnosu na dob.

T-test; skupina 1: bolestan, skupina 2: zdrav									
	Prosjek bolestan	Prosjek zdrav	t-vrijednost	s.s.	p	N bolestan	N Zdrav	Std.Dev. bolestan	Std.Dev. zdrav
<b>dob</b>	65,6	66,5	-0,479	118	0,633	90	30	9,384	7,789



**Slika 7.** Raspodjela bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike.



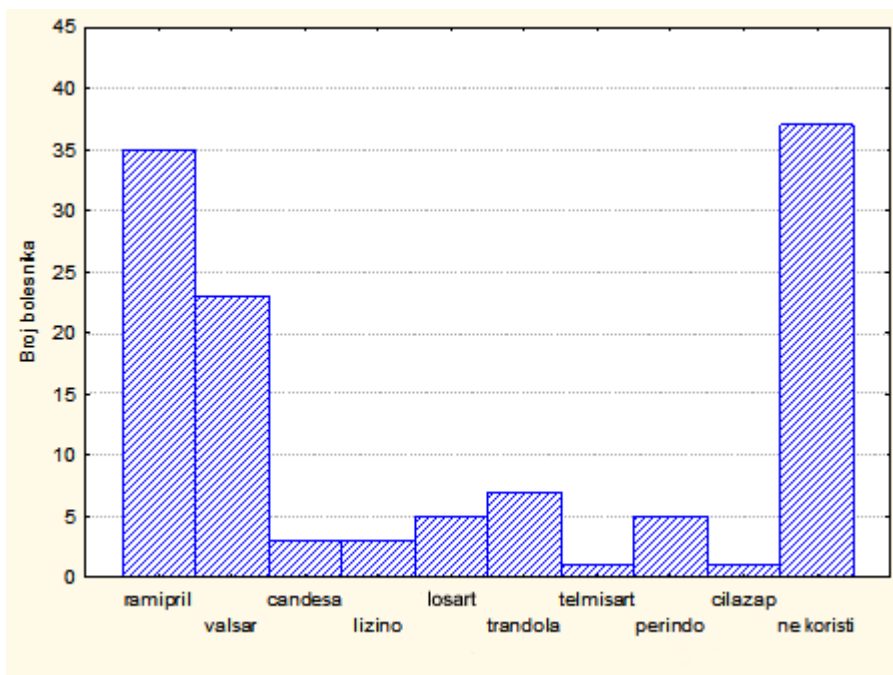
### **5.1.3. Udio pojedinih skupina lijekova u liječenju visokog krvnog tlaka, hiperlipoproteinemije i pridruženih bolesti**

U svakog je bolesnika analizirana cjelokupna dotadašnja farmakološka terapija, te su posebno evidentirani ACE-inhibitori i ARB, blokatori kalcijjskih kanala, beta-blokatori te statini prema skupinama. Bolesnici su također podučeni o važnosti provođenja nefarmakoloških mjera u liječenju, poput održavanja idealne tjelesne težine pri čemu im je na temelju tjelesne visine i težine izračunat indeks tjelesne mase.

ACE-inhibitori i blokatori receptora angiotenzina predstavljaju zlatni standard u liječenju visokog krvnog tlaka u bolesnika sa ŠB i KBB. Prepoznavanje bolesti i pravovremeno započinjanje terapije smanjuje proteinuriju i usporava napredovanje bolesti u završni stadij. U naših je bolesnika u terapiji najzastupljeni ramipril (29,17 %), slijedi ga valsartan ( 19,17 %), dok su losartan, trandolapril, kandesartan, lizinopril i telmisartan manje zastupljeni. Pojedinačni je udio oba najzastupljenija lijeka u skupini dijaliziranih bolesnika, što se povezuje s velikim udjelom teških hipertenzija u ovoj skupini kao posljedica, ali i značajan pridruženi uzrok KBB. Također je za izdvojiti i ukupno čak 25 od 30 bolesnika s početnim bubrežnim oštećenjem na terapiji ACE-inhibitorima ili blokatorima receptora angiotenzina koji su propisani s ciljem očuvanja bubrežne funkcije, odgode KBB i smanjenja proteinurije u bolesnika s dijabetičkom nefropatijom. Sama povezanost uporabe ovih lijekova i izražaja BMP-7 manje je jasna. Raspodjela bolesnika prema uporabi ACE-inhibitora i ARB prikazana je na **Tablici 10**, a udio pojedinih lijekova po skupinama na **Slikama 8. i 9.** U istraživanju je proučavan utjecaj i zastupljenost i drugih lijekova koji se koriste u liječenju visokog krvnog tlaka (**Tablica 11. i 12., Slika 10., 11., 12. i 13.**), hiperlipoproteinemije (**Tablica 13., Slika 14. i 15.**) kao i kliničke karakteristike bolesnika poput preboljelog cerebrovaskularnog infarkta i infarkta miokarda te njihova povezanost s vrijednostima BMP-7 (**Tablica 14. i 15., Slika 16. i 17.**). Bisoprolol je najzastupljeniji beta-blokator za koji se ujedno predmnijeva bolji antiaritmijski učinak od druga dva uključena lijeka, i to u 1. i 3. skupini ispitanika, pri čemu je od ukupno 15 bolesnika s preboljelim infarktomiokarda, upravo njih 9 bilo u 3. skupini, dijaliziranih, bolesnika što je bio jedan od razloga uvođenja navedenih lijekova u terapiju. Osim preboljelog infarkta miokarda, 14,17 % bolesnika u anamnezi je imalo preboljeli cerebrovaskularni infarkt (**Tablica 14.**). Blokatori kalcijjskih kanala predvođeni su amlodipinom u 25,83 %, a lercanidipinom u 14,17 % bolesnika (**Tablica 12.**). Atorvastatin je bio najzastupljeniji, u 55,83 % bolesnika lijek u liječenju hiperlipoproteinemije (**Tablica 13.**).

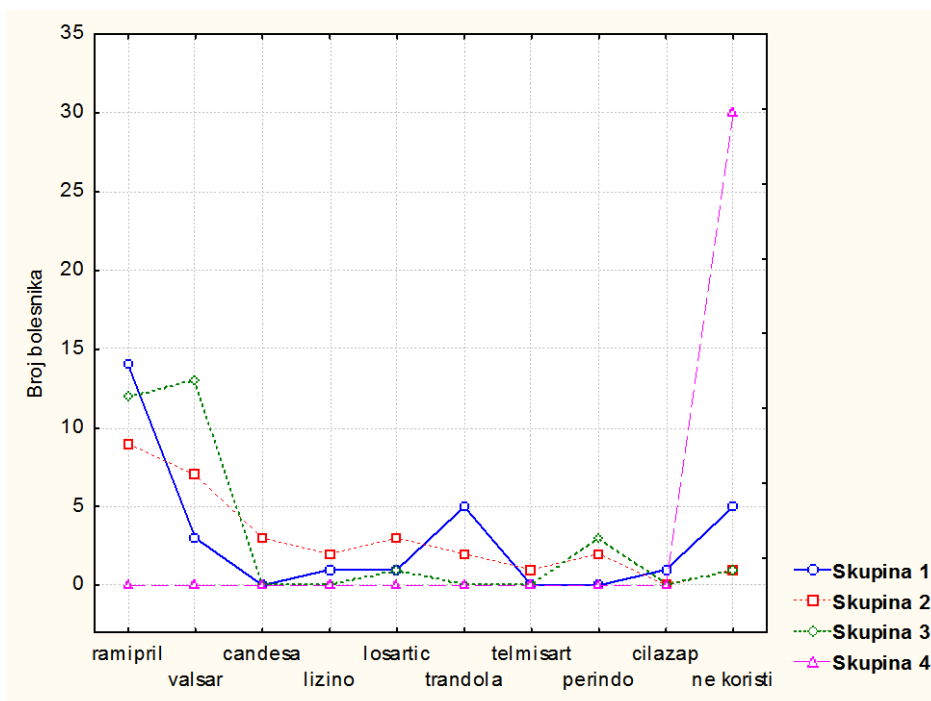
**Tablica 10.** Raspodjela bolesnika prema uporabi ACE-inhibitora i ARB. ACE-inhibitori-  
inhibitori angiotenzin konvertirajućeg enzima, ARB-blokatori receptora angiotenzina

ACE	Skupina 1	Skupina 2	Skupina 3	Skupina 4	Ukupno
ramipril	14	9	12	0	35
%	11,67%	7,50%	10,00%	0,00%	29,17%
valsartan	3	7	13	0	23
%	2,50%	5,83%	10,83%	0,00%	19,17%
kandesartan	0	3	0	0	3
%	0,00%	2,50%	0,00%	0,00%	2,50%
lizinopril	1	2	0	0	3
%	0,83%	1,67%	0,00%	0,00%	2,50%
losartan	1	3	1	0	5
%	0,83%	2,50%	0,83%	0,00%	4,17%
trandolapril	5	2	0	0	7
%	4,17%	1,67%	0,00%	0,00%	5,83%
telmisartan	0	1	0	0	1
%	0,00%	0,83%	0,00%	0,00%	0,83%
perindopril	0	2	3	0	5
%	0,00%	1,67%	2,50%	0,00%	4,17%
cilazapril	1	0	0	0	1
%	0,83%	0,00%	0,00%	0,00%	0,83%
ne koristi	5	1	1	30	37
%	4,17%	0,83%	0,83%	25,00%	30,83%
Ukupno u skupini	30	30	30	30	120
%	25,00%	25,00%	25,00%	25,00%	100,00%



**Slika 8.** Udio pojedinih ACE-inhibitora i ARB u liječenju visokog krvnog tlaka.

valsar-valsartan, candesa-candesartan, lizino-lizinopril, losart-losartan, trandola-trandolapril, telmisart-telmisartan, perindo-perindopril, cilazap-cilazapril

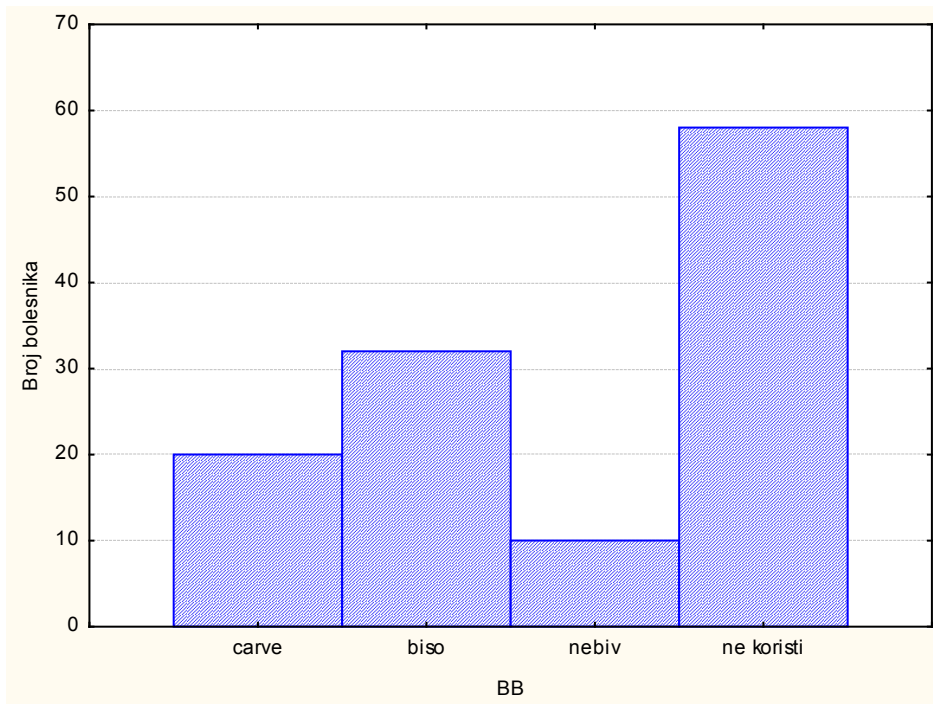


**Slika 9.** Prikaz ACE-inhibitora i ARB po određenim skupinama bolesnika.

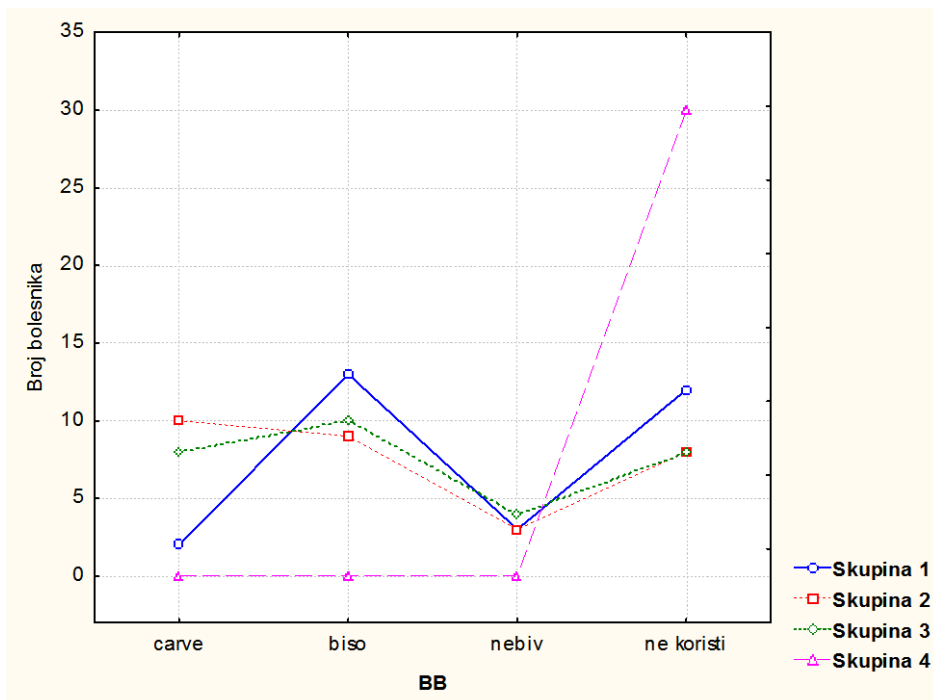
**Tablica 11.** Raspodjela bolesnika prema uporabi beta blokatora u terapiji.

<b>BB</b>	<b>Skupina 1</b>	<b>Skupina 2</b>	<b>Skupina 3</b>	<b>Skupina 4</b>	<b>Ukupno</b>
carvelol	2	10	8	0	20
%	1,67%	8,33%	6,67%	0,00%	16,67%
bisoprolol	13	9	10	0	32
%	10,83%	7,50%	8,33%	0,00%	26,67%
nebivolol	3	3	4	0	10
%	2,50%	2,50%	3,33%	0,00%	8,33%
ne koristi	12	8	8	30	58
%	10,00%	6,67%	6,67%	25,00%	48,33%
Ukupno u skupini	30	30	30	30	120
%	25,00%	25,00%	25,00%	25,00%	100,00%

BB-beta blokatori



**Slika 10.** Udio pojedinih beta blokatora.  
carve-carvelol, biso-bisoprolol, nebiv-nebivolol

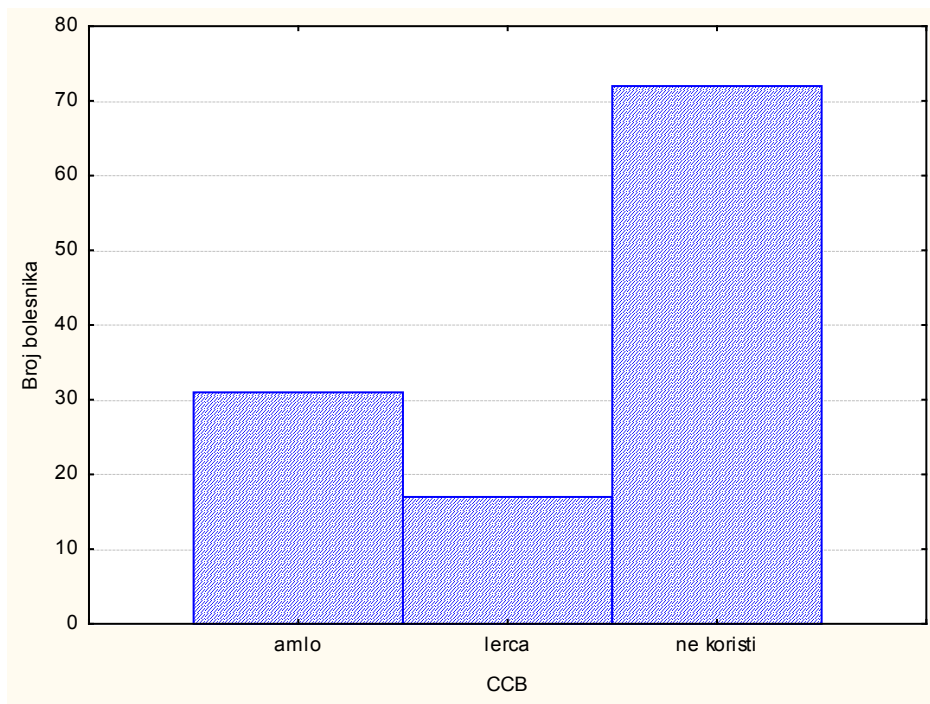


**Slika 11.** Prikaz beta blokatora u određenim skupinama bolesnika.

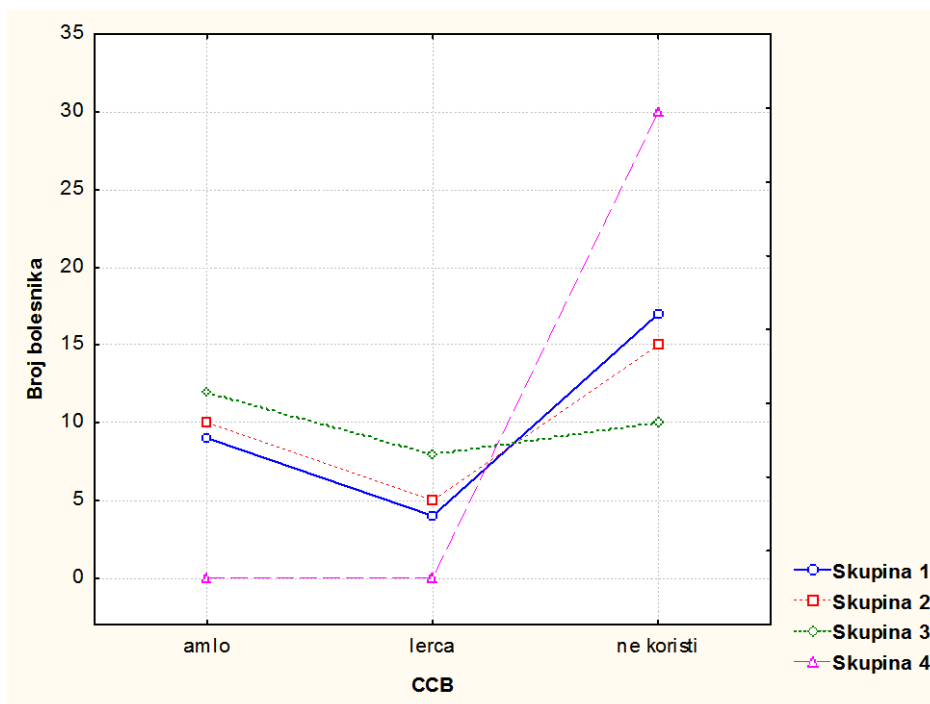
**Tablica 12.** Raspodjela bolesnika prema uporabi blokatora kalcijских kanala u terapiji.

<b>CCB</b>	<b>Skupina 1</b>	<b>Skupina 2</b>	<b>Skupina 3</b>	<b>Skupina 4</b>	<b>Ukupno</b>
amlodipin	9	10	12	0	31
%	7,50%	8,33%	10,00%	0,00%	25,83%
lercanil	4	5	8	0	17
%	3,33%	4,17%	6,67%	0,00%	14,17%
ne koristi	17	15	10	30	72
%	14,17%	12,50%	8,33%	25,00%	60,00%
Ukupno u skupini	30	30	30	30	120
%	25,00%	25,00%	25,00%	25,00%	100,00%

CCB-blokatori kalcijских kanala



**Slika 12.** Udio pojedinih blokatora kalcijevih kanala u liječenju visokog krvnog tlaka.  
amlo-amlodipin, lerca-lercanidipin

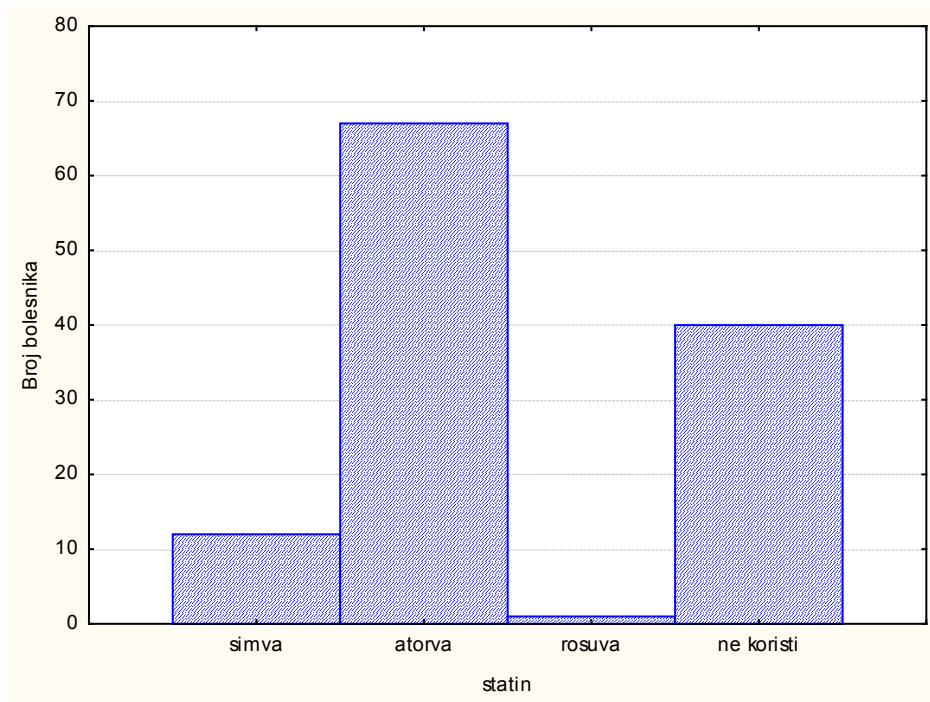


**Slika 13.** Prikaz blokatora kalcijevih kanala u određenim skupinama bolesnika.

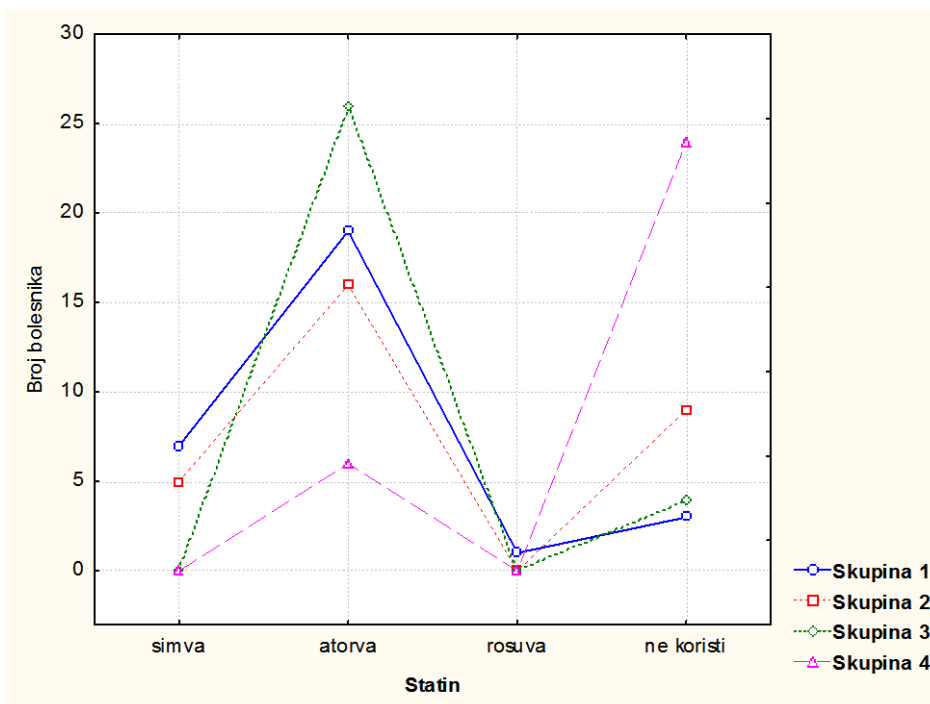
**Tablica 13.** Raspodjela bolesnika prema uporabi statina u terapiji.

<b>Statin</b>	<b>Skupina 1</b>	<b>Skupina 2</b>	<b>Skupina 3</b>	<b>Skupina 4</b>	<b>Ukupno</b>
simvastatin	7	5	0	0	12
%	5,83%	4,17%	0,00%	0,00%	10,00%
atorvastatin	19	16	26	6	67
%	15,83%	13,33%	21,67%	5,00%	55,83%
rosuvastatin	1	0	0	0	1
%	0,83	0,00%	0,00%	0,00%	0,83%
ne koristi	3	9	4	24	40
%	2,50%	7,50%	3,33%	20,00%	33,33%
Ukupno u skupini	30	30	30	30	120
%	25,00%	25,00%	25,00%	25,00%	100,00%





**Slika 14.** Udio pojedinih statina u liječenju hiperlipoproteinemije.  
simva-simvastatin, atorva-atorvastatin, rosuva-rosuvastatin

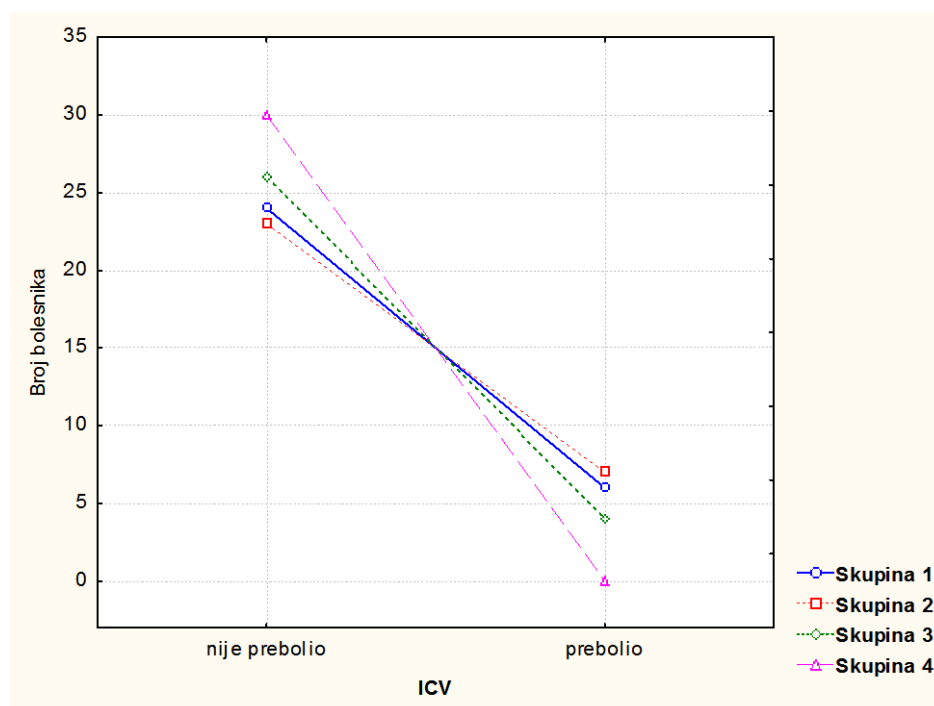


**Slika 15.** Prikaz statina u određenim skupinama bolesnika.

**Tablica 14.** Raspodjela bolesnika ovisno o preboljelom cerebrovaskularnom inzultu.

ICV	Skupina 1	Skupina 2	Skupina 3	Skupina 4	Ukupno
nije prebolio	24	23	26	30	103
%	20,00%	19,17%	21,67%	25,00%	85,83%
prebolio	6	7	4	0	17
%	5,00%	5,83%	3,33%	0,00%	14,17%
Ukupno u skupini	30	30	30	30	120
%	25,00%	25,00%	25,00%	25,00%	100,00%

ICV-cerebrovaskularni inzult

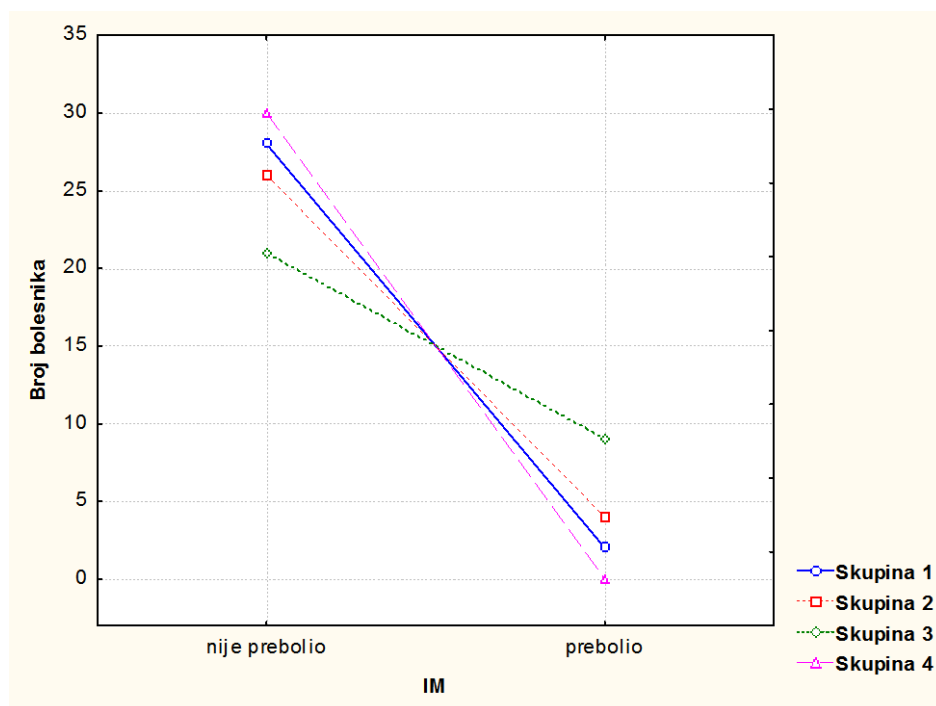


**Slika 16.** Prikaz bolesnika ovisno o preboljelom ICV prema skupinama bolesnika.

**Tablica 15.** Raspodjela bolesnika ovisno o preboljelom infarktu miokarda.

IM	Skupina 1	Skupina 2	Skupina 3	Skupina 4	Ukupno
nije prebolio	28	26	21	30	105
%	23,33%	21,67%	17,50%	25,00%	87,50%
prebolio	2	4	9	0	15
%	1,67%	3,33%	7,50%	0,00%	12,50%
Ukupno u skupini	30	30	30	30	120
%	25,00%	25,00%	25,00%	25,00%	100,00%

IM-infarkt miokarda



**Slika 17.** Prikaz bolesnika ovisno o preboljelom IM prema skupinama bolesnika.

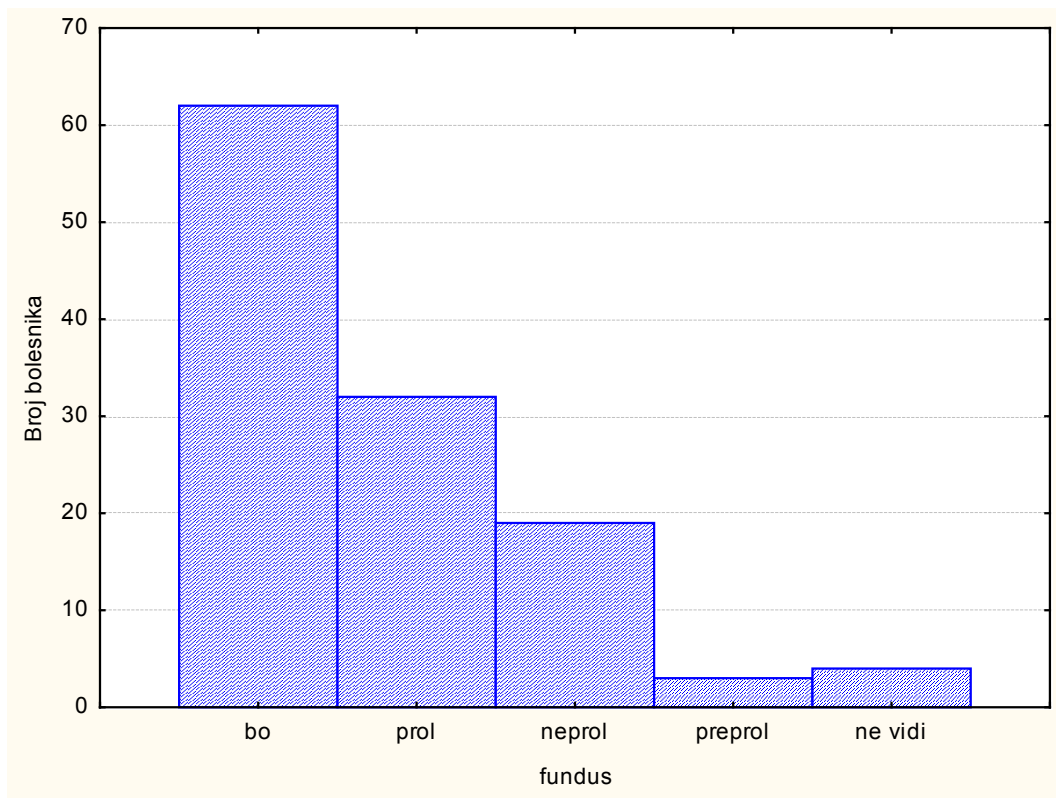
#### 5.1.4. Raspodjela bolesnika prema nalazu fundusa

Analizom rezultata obuhvaćena je raspodjela bolesnika ovisno o nalazima pregleda očne pozadine – fundusa. Svi zdravi dobrovoljci iz kontrolne skupine imali su uredan nalaz, kao i 17,5 % ispitanika iz 1. skupine, 8,33 % iz 2. skupine, te 0,83 %, odnosno jedan ispitanik iz skupine dijaliziranih bolesnika. Promjene fundusa razgraničene su prema nalazu oftalmologa u proliferativnu, neproliferativnu i preproliferativnu dijabetičku retinopatiju. Četiri bolesnika; jedan iz druge skupine i tri iz skupine dijaliziranih bolesnika su izgubila vid uslijed dijabetičke retinopatije (Tablica 16., Slika 18. i 19.).

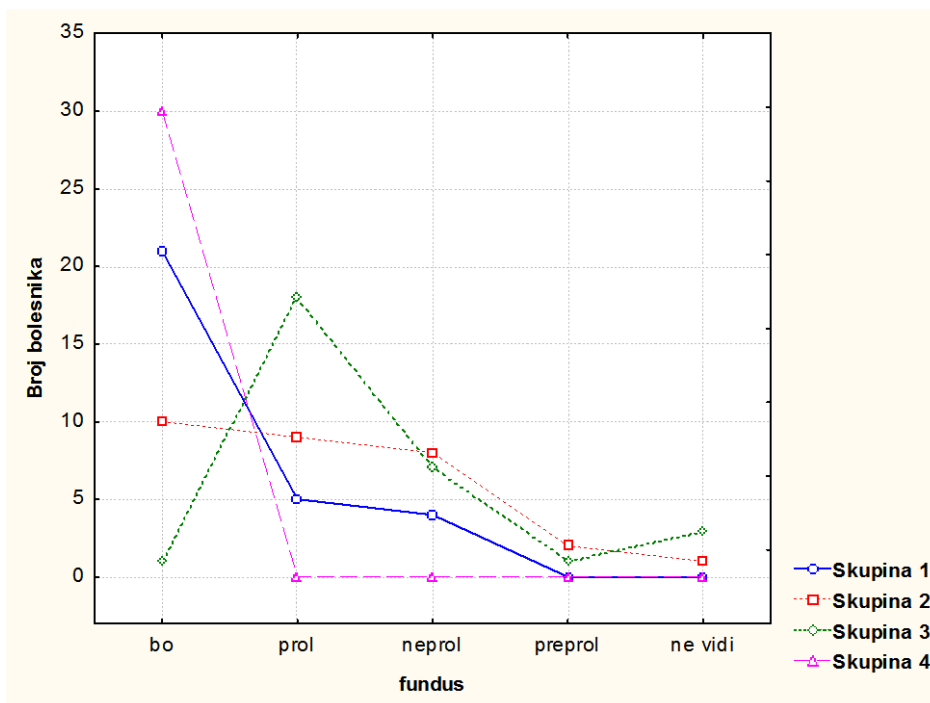
**Tablica 16.** Raspodjela bolesnika ovisno o nalazu fundusa.

Fundus	Skupina 1	Skupina 2	Skupina 3	Skupina 4	Ukupno
Bo	21	10	1	30	62
%	17,50%	8,33%	0,83%	25,00%	51,67%
Prol	5	9	18	0	32
%	4,17%	7,50%	15,00%	0,00%	26,67%
neprol	4	8	7	0	19
%	3,33%	6,67%	5,83%	0,00%	15,83%
preprol	0	2	1	0	3
%	0,00%	1,67%	0,83%	0,00%	2,50%
ne vidi	0	1	3	0	4
%	0,00%	0,83%	2,50%	0,00%	3,33%
Ukupno u skupini	30	30	30	30	120
%	25,00%	25,00%	25,00%	25,00%	100,00%

bo-bez osobitosti, prol-proliferativna retinopatija, neprol-neproliferativna retinopatija, preprol-preproliferativna retinopatija



Slika 18. Prikaz svih bolesnika ovisno o nalazu fundusa.



Slika 19. Raspodjela nalaza fundusa prema određenim skupinama bolesnika.

### ***5.1.5. Testiranje razlike između skupina po kvalitativnim parametrima***

U **Tablici 17.** prikazani su rezultati hi – kvadrat testa kojim se testiralo postojanje razlike između pojedinih skupina, a u odnosu na raspodjelu bolesnika, po kvalitativnim parametrima ( $p > 0,05$ ), a na **Slici 20.** testiranje razlike između bolesnika koji koriste terapiju za liječenje visokog krvnog tlaka ( prikaz ACE/ARB) u odnosu na BMP-7.

Hi – kvadrat test je pokazao da postoji statistički značajna razlika između skupina prema analiziranim parametrima primjenjenih lijekova; ACE/ARB, beta-blokatora, blokatora kalcijjskih kanala, statina, preboljelog infarkta miokarda i nalaza fundusa, dok je u odnosu na ICV razlika statistički granično značajna (približno je 0,05).

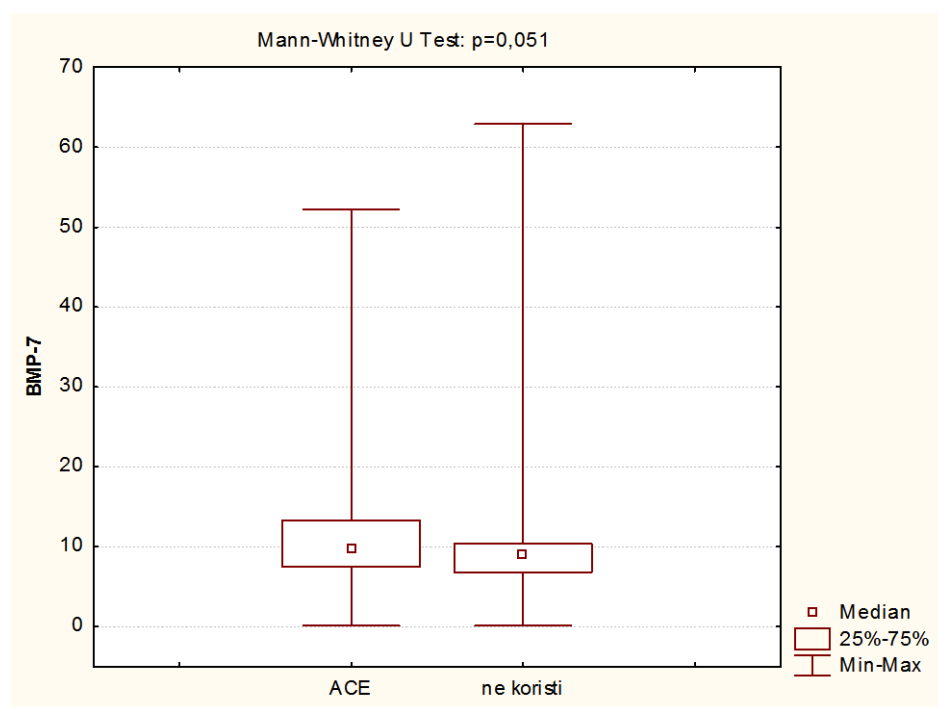
U odnosu na BMP-7, testiranje razlike između bolesnika koji su bili na terapiji ACE-inhibitorima ili ARB i koji su bili bez takove specifične terapije (no, liječeni su drugim skupinama lijekova) učinjeno je Mann – Whitney U Testom (**Slika 20.**).

Razlika se pokazala granično statistički značajna. Zajednički, doprinosni učinak zaštitnog djelovanja ove skupine lijekova i BMP-7, vjerojatno učinkom na angiotenzin 2 i TGF-beta, mogao bi objasniti dobivenu razliku, budući da se testiranjem BMP-7 vrijednosti kod bolesnika na terapiji drugim lijekovima koje su koristili bolesnici u našem istraživanju (BB, CCB te pridruženo liječenje hiperlipoproteinemije statinima) statistički ne razlikuju od vrijednosti kod osoba koje ne koriste navedenu terapiju.

**Tablica 17.** Testiranje razlike između skupina u odnosu na raspodjelu bolesnika po kvalitativnim parametrima pomoću hi-kvadrat testa.

Parametar	Pearson Chi-square (hi-kvadrat)	Df (stupnjevi slobode)	p vrijednost
ACE/ARB	130,247	27	<0,001
BB	130,247	27	<0,001
CCB	30,752	6	<0,001
Statin	56,210	9	<0,001
ICV	7,881	3	0,049
IM	13,638	3	0,003
Fundus	70,607	12	<0,001

p<0,05



**Slika 20.** Testiranje razlike primjene ACE-inhibitora (ujedno i ARB) u liječenju u odnosu na BMP-7.

### ***5.1.6. Analiza laboratorijskih parametara, trajanja ŠB i vrijednosti krvnog tlaka***

Obilježja bubrežne funkcije, određeni laboratorijski parametri, trajanje šećerne bolesti i vrijednosti krvnog tlaka prikazani su u **Tablici 18.** odvojeno za svaku skupinu ispitanika, a u **Tablici 24.** je prikazana testirana povezanost BMP-7 sa izmjerenim parametrima koristeći Pearsonov koeficijent korelacije.

Od svih ispitanika u istraživanju prikupljeni su parametri dobiveni analizom laboratorijskih pretraga i anamnestičkih podataka bolesnika, a koji su poznati čimbenici napredovanja KBB, učinjeno je mjerenje krvnog tlaka i izračunat indeks tjelesne mase.

Uz BMP-7 vrijednosti, zabilježeno je trajanje šećerne bolesti, vrijednosti ureje, kreatinina, kolesterol, HbA1c, albumina, LDL, HDL, triglicerida i klirensa kreatinina, odnosno procijenjene glomerularne filtracije prema MDRD formuli. Vrijednosti krvnog tlaka su razgraničene na sistolički odnosno dijastolički tlak. Trajanja ŠB najkraće je bilo u 1. skupini bolesnika (medijan 8, min-max 1-22), a očekivano najveće u 3. skupini (medijan 15,5 min-max 6-33). Prosječne vrijednosti sistoličkog tlaka nisu se značajnije razlikovale niti u jednoj ispitivanih skupina (139-143-139-138 mmHg), kao niti dijastoličkog (86,5-85-80,5-83 mmHg). Regulacija ŠB prema vrijednostima HbA1c nije bila zadovoljavajuća u 1. i 2. skupini u odnosu na skupinu hemodijaliziranih bolesnika (medijan 6,0 min-max 4,9-8,7). Skupina hemodijaliziranih bolesnika imala je i niži indeks tjelesne mase (medijan 24,0 min-max 20,0-29,0) u odnosu na 1. i 2. skupinu bolesnika. Hiperlipoproteinemija, uzimajući u obzir terapiju statinima je bila dobro regulirana.

U kontrolnoj skupini zdravih ispitanika za izdvojiti je indeks tjelesne mase koji je pri gornjoj granici preporučenih vrijednosti i iznosi prosječno 24,3 kg/m<sup>2</sup> (medijan 24, min-max 20-30) (Tablica 18.).



**Tablica 18.** Deskriptivna statistika mjerenih parametara po skupinama.

Skupina 1								
Parametar	Broj bolesnika	Prosjek	Median	Minimum	Maximum	S.D.	Skewness	Kurtosis
<b>BMP-7</b>	30	10,34	8,00	0,10	39,70	8,642	2,713	7,787
<b>trajanje ŠB</b>	30	9,33	8,00	1,00	22,00	5,797	0,505183	-0,42244
<b>ureja</b>	30	5,58	5,30	3,30	9,30	1,474	0,628795	0,06880
<b>klirens</b>	30	74,80	73,00	61,00	94,00	8,660	0,621412	-0,31513
<b>kreatinin</b>	30	89,47	92,00	66,00	112,00	13,945	-0,109541	-1,37344
<b>tlaksis</b>	30	139,17	130,00	110,00	230,00	23,529	2,099078	6,70911
<b>tlakdia</b>	30	86,53	80,00	60,00	160,00	16,994	2,836504	12,02157
<b>kolesterol</b>	30	5,09	4,99	3,12	7,42	1,117	0,432534	-0,57863
<b>HbA1c</b>	30	8,47	8,20	5,50	11,50	1,763	0,159642	-1,22107
<b>albumini</b>	30	963,36	83,05	39,40	23190,00	4218,506	5,396204	29,35581
<b>LDL</b>	30	2,96	2,96	1,40	5,00	1,006	0,395997	-0,41605
<b>HDL</b>	30	1,19	1,08	0,76	2,31	0,359	1,386101	2,04129
<b>trigliceridi</b>	30	2,54	1,98	0,50	7,80	1,943	1,773692	2,44260
<b>Indeks tjelesne mase</b>	30	32,88	31,52	23,00	54,43	7,194	0,974967	1,27359

<b>Skupina 2</b>								
<b>Parametar</b>	<b>Broj bolesnika</b>	<b>Prosjek</b>	<b>Median</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>	<b>S.D.</b>	<b>Skewness</b>	<b>Kurtosis</b>
<b>BMP-7</b>	30	9,59	8,60	0,10	32,30	6,736	1,510	3,961
<b>trajanje ŠB</b>	30	16,43	12,50	2,00	32,00	7,973	0,393	-0,824
<b>ureja</b>	30	15,64	14,50	9,40	29,00	4,936	0,842	0,311
<b>klirens</b>	30	25,23	26,50	14,00	30,00	4,561	-1,096	0,455
<b>kreatinin</b>	30	214,13	212,50	152,00	343,00	48,747	0,722	0,119
<b>tlaksis</b>	30	142,97	142,00	110,00	190,00	20,280	0,463	0,327
<b>tlakdia</b>	30	85,10	81,00	70,00	100,00	8,620	0,290	-0,662
<b>kolesterol</b>	30	4,88	4,73	1,90	10,00	1,617	1,002	2,227
<b>HbA1c</b>	30	7,30	7,25	4,90	10,00	1,258	0,476	-0,087
<b>albumini</b>	30	1003,75	182,85	32,00	10000,00	2031,108	3,418	13,420
<b>LDL</b>	30	2,87	2,91	0,45	8,17	1,447	1,609	5,150
<b>HDL</b>	30	1,08	0,97	0,55	2,04	0,340	1,054	1,203
<b>trigliceridi</b>	30	2,41	1,76	0,82	10,83	1,912	3,234	12,983
<b>Indeks tjelesne mase</b>	30	28,25	27,00	19,00	45,70	6,781	1,002	0,257

**Skupina 3**

<b>Parametar</b>	<b>Broj bolesnika</b>	<b>Prosjek</b>	<b>Median</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>	<b>S.D.</b>	<b>Skewness</b>	<b>Kurtosis</b>
<b>BMP-7</b>	30	41,81	12,70	5,70	698,00	125,607	5,263	28,266
<b>trajanje ŠB</b>	30	17,73	15,50	6,00	33,00	7,282	0,475	-0,590
<b>ureja</b>	0							
<b>klirens</b>	0							
<b>kreatinin</b>	0							
<b>tlaksis</b>	30	139,00	132,50	105,00	195,00	20,017	0,872	0,819
<b>tlakdia</b>	30	80,50	80,00	65,00	105,00	9,035	0,630	1,106
<b>kolesterol</b>	30	3,52	3,29	2,47	5,60	0,807	1,160	0,515
<b>HbA1c</b>	30	6,22	6,00	4,90	8,70	0,977	1,344	1,115
<b>albumini</b>	0							
<b>LDL</b>	30	1,55	1,48	0,43	2,64	0,535	0,380	-0,092
<b>HDL</b>	30	1,05	0,97	0,59	1,88	0,291	0,799	0,726
<b>trigliceridi</b>	30	1,95	1,50	0,37	7,66	1,523	2,172	5,837
<b>Indeks tjelesne mase</b>	30	23,93	24,00	20,00	29,00	2,852	0,254	-1,201

**Skupina 4**

<b>Parametar</b>	<b>Broj bolesnika</b>	<b>Prosjek</b>	<b>Median</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>	<b>S.D.</b>	<b>Skewness</b>	<b>Kurtosis</b>
<b>BMP-7</b>	30	10,17	9,45	0,10	62,90	10,492	4,601	23,816
<b>trajanje ŠB</b>	30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000		
<b>ureja</b>	30	5,83	5,80	3,00	8,40	1,095	-0,104	1,173
<b>klirens</b>	30	75,83	75,00	51,00	97,00	12,169	-0,012	-0,873
<b>kreatinin</b>	30	84,40	81,00	57,00	127,00	15,131	0,998	1,302
<b>tlaksis</b>	30	138,33	139,50	110,00	160,00	12,209	-0,133	-0,299
<b>tlakdia</b>	30	82,80	83,50	60,00	93,00	7,208	-1,152	2,052
<b>kolesterol</b>	30	5,78	5,72	4,00	7,70	0,949	0,299	0,025
<b>HbA1c</b>	30	5,47	5,50	4,80	6,00	0,289	-0,395	0,058
<b>albumini</b>	30	9,54	5,85	1,00	44,20	9,214	2,511	6,817
<b>LDL</b>	30	3,57	3,46	2,20	5,76	0,831	0,476	0,279
<b>HDL</b>	30	1,67	1,60	0,98	2,74	0,426	0,601	-0,111
<b>trigliceridi</b>	30	1,19	1,19	0,57	2,86	0,428	2,019	7,099
<b>Indeks tjelesne mase</b>	30	24,30	24,00	20,00	30,00	2,641	0,277	-0,428

### **5.1.7. Testiranje razlike prema kliničkim obilježjima ispitanika u odnosu na BMP-7**

Na **Slikama 21.-26. i u Tablicama 19.-23.** pokazani su rezultati testiranja razlika između sve 4 ispitivane skupine, spolova, preboljelog cerebrovaskularnog incidenta, infarkta miokarda i nalaza fundusa, u odnosu na BMP-7. U Tablici 24. potom slijedi prikaz povezanosti s ostalim izmjerenim laboratorijskim pokazateljima, trajanjem ŠB, vrijednostima krvnog tlaka i indeksom tjelesne mase.

Testiranje razlike između skupina u odnosu na BMP-7: U dobivenim rezultatima, koji su provjereni ponovnim mjerenjem i povećanjem cjelokupnog uzorka, izdvaja se jedna dobivena ekstremna vrijednost BMP-7 (698 pg/mL).

Kruskal-Wallis ANOVA analizom pokazano je kako su u 3. skupini kojom su obuhvaćeni bolesnici na hemodijalizi, a uzorci su uzeti prije započinjanja hemodijalize, statistički značajno veće vrijednosti BMP-7, nego u ostalim ispitivanim skupinama. BMP-7 vrijednosti nisu statistički različite u skupinama 1, 2 i 4. Prema grafički prikazanim BMP-7 vrijednostima, sa i bez ekstremno visoke vrijednosti od 698 pg/mL, rezultat testiranja je u oba slučaja isti (**Slika 21. i 22.**).

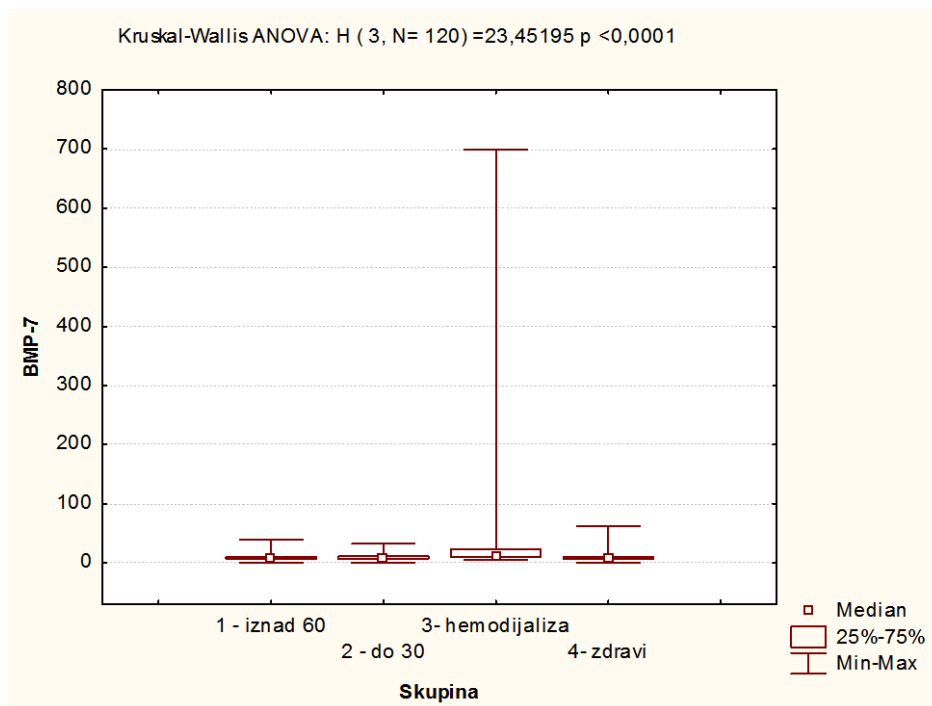
Testiranje razlike između spolova u odnosu na BMP-7: Za prikaz ove razlike korišten je Mann-Whitney U Test prema varijabli spol. Rezultati su pokazali da se vrijednosti BMP-7 između muškaraca i žena statistički ne razlikuju. U skupini 4 kojom su obuhvaćeni zdravi dobrovoljci dobivene vrijednosti BMP-7 se statistički granično razlikuju između muškaraca i žena ( $p$  je približno jednak 0,05) (**Slika 23., Tablica 19.**).

Testiranje razlike između bolesnika sa preboljelim i bez cerebrovaskularnog incidenta u anamnezi u odnosu na BMP-7: Mann Whitney U Test u 1, 2, i 3. skupini bolesnika pokazao je da se vrijednosti BMP-7 ne razlikuju između bolesnika koji su preboljeli i koji nisu preboljeli događaj ( $p > 0,05$ ). U skupini 4. testiranje nije bilo moguće učiniti jer se radi o kontrolnoj skupini ispitanika u kojoj nitko nije prebolio cerebrovaskularni inzult (**Slika 24., Tablica 20.**).

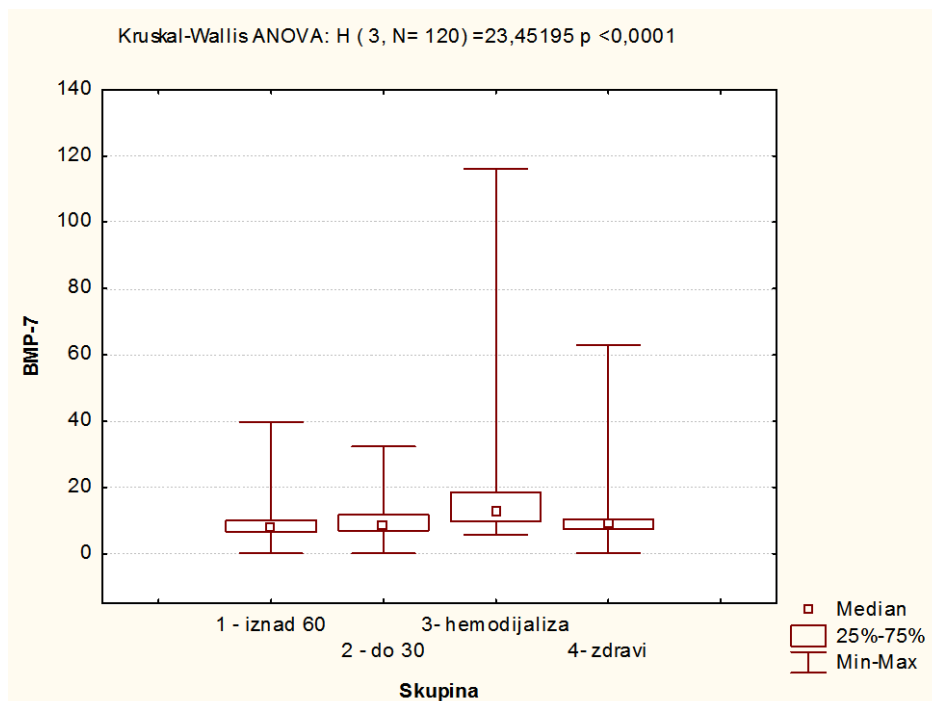
Testiranje razlike između bolesnika sa preboljelim i bez infarkta miokarda u anamnezi u odnosu na BMP-7: Mann Whitney U Test po skupinama bolesnika pokazao je da se vrijednosti BMP-7 ne razlikuju između bolesnika koji su preboljeli i koji nisu preboljeli infarkt miokarda ( $p > 0,05$ ). U skupini 4. testiranje nije bilo moguće učiniti jer se radi o kontrolnoj skupini ispitanika u kojoj nitko nije prebolio infarkt miokarda (**Slika 25., Tablica 21.**).

Testiranje razlike između vrijednosti fundusa i BMP-7: Testiranje u 4. skupini se nije moglo provesti, jer svi ispitanici, koji su ujedno i zdravi dobrovoljci imaju uredan nalaz fundusa – bez dijabetičke retinopatije.

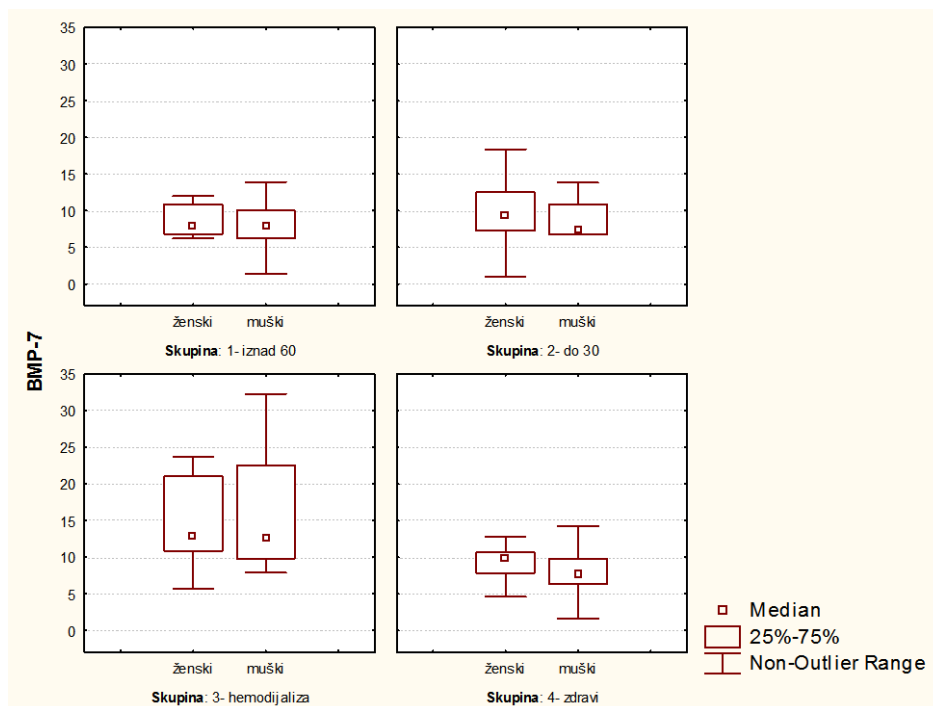
Kruskal-Wallis ANOVA pokazuje da se vrijednosti BMP-7 statistički značajno razlikuje kod pojedinih nalaza fundusa u prve tri skupine ( $p < 0,001$ ), što bi moglo ukazivati na njegovu zaštitnu ulogu u pokušaju usporavanja razvoja mikrovaskularnih komplikacija. Naime, izuzevši uredne nalaze, u 1. i 2. skupini bolesnika najizraženije su proliferativne promjene fundusa (N=5, vs N=9), s prosječnom vrijednošću BMP-7 značajno većom u 2. skupini od 10,32 pg/mL, u odnosu na 1. skupinu gdje ona iznosi 4,34 pg/mL. Pozornost privlače i nalazi fundusa u 3. skupini sa također značajno većom prosječnom vrijednošću BMP-7 od 60,06 pg/mL u s 18 bolesnika sa proliferativnom dijabetičkom retinopatijom. U toj skupini bilo je još 7 bolesnika sa neproliferativnom i vrijednošću BMP-7 od 13,94 pg/mL i 1 bolesnik sa preproliferativnom retinopatijom uz BMP-7 7,9 pg/mL; te 1 bolesnik s urednim nalazom uz još 3 bolesnika koja su izgubila vid (**Tablica 22. i 23., Slika 26.**).



**Slika 21.** Prikaz razlika između skupina u odnosu na BMP-7 sa jednom dobivenom ekstremno visokom vrijednošću (698 pg/ml).



**Slika 22.** Prikaz razlika između skupina u odnosu na BMP-7 bez ekstremno visoke vrijednosti BMP-7.



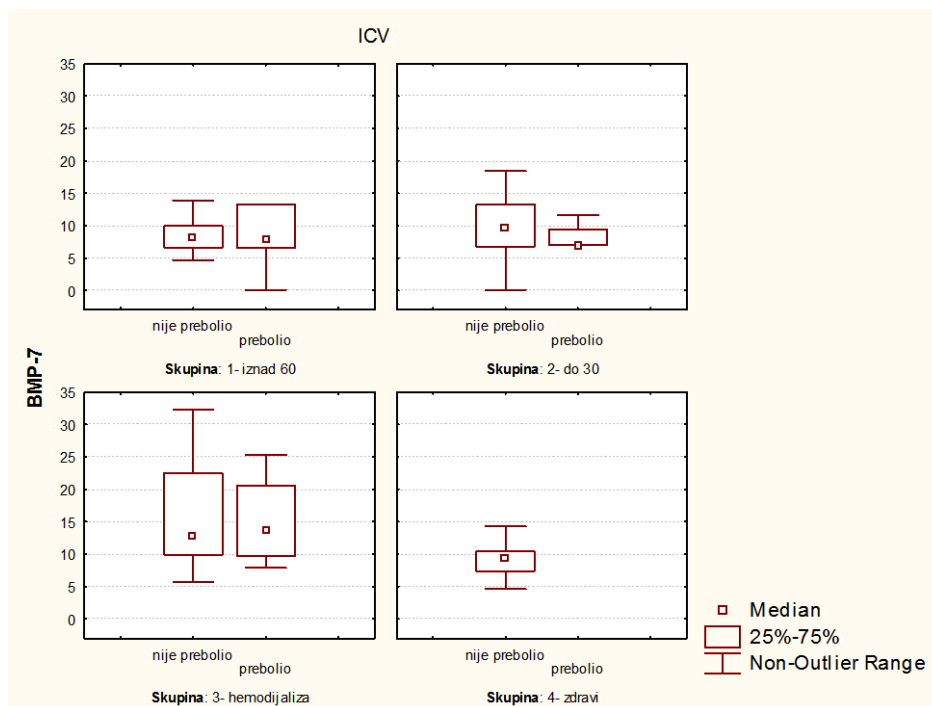
Slika 23. Prikaz testiranja razlike između spolova u donosu na BMP-7.

Tablica 19. Mann-Whitney U Test prema varijabli spol.

	Skupina 1		Skupina 2		Skupina 3		Skupina 4	
	Z	p-level	Z	p-level	Z	p-level	Z	p-level
<b>BMP-7</b>	0,330	0,741	0,935	0,350	0,339	0,735	1,991	0,046

p je približno jednak 0,05



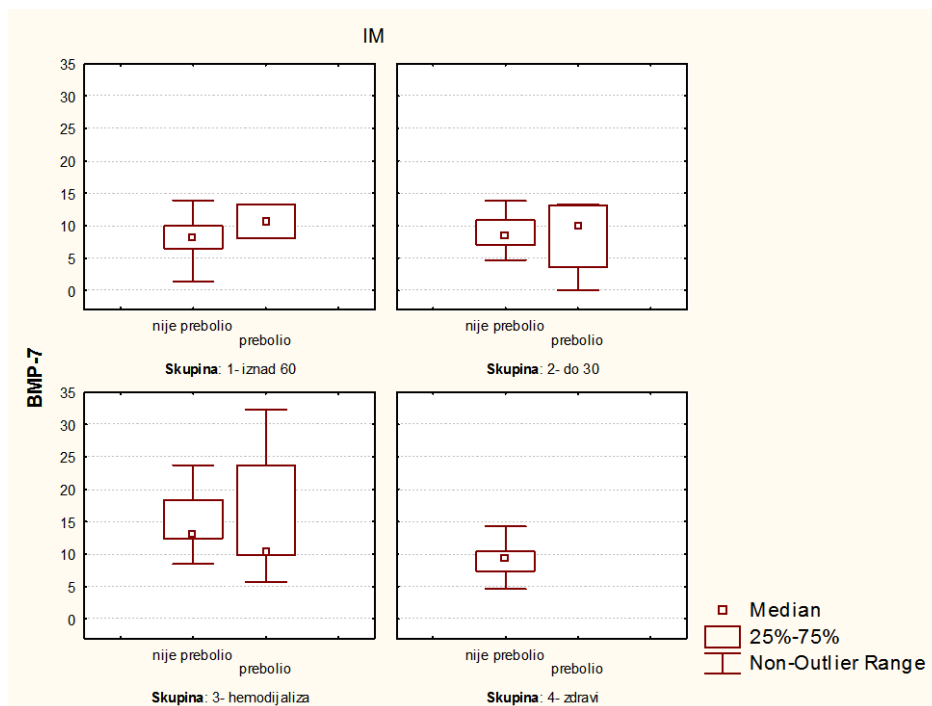


**Slika 24.** Prikaz testiranja razlike između skupina bolesnika sa i bez preboljelog ICV-a u donosu na BMP-7. ICV – cerebrovaskularni inzult.

**Tablica 20.** Mann-Whitney U Test prema varijabli ICV.

	Skupina 1		Skupina 2		Skupina 3		Skupina 4	
	Z	p-level	Z	p-level	Z	p-level	Z	p-level
<b>BMP-7</b>	0,078	0,938	1,154	0,248	0,244	0,807	/	/

ICV – cerebrovaskularni inzult



**Slika 25.** Prikaz testiranja razlike između skupina bolesnika sa i bez preboljelog IM u donosu na BMP-7. IM – infarkt miokarda

**Tablica 21.** Mann-Whitney U Test prema varijabli IM.

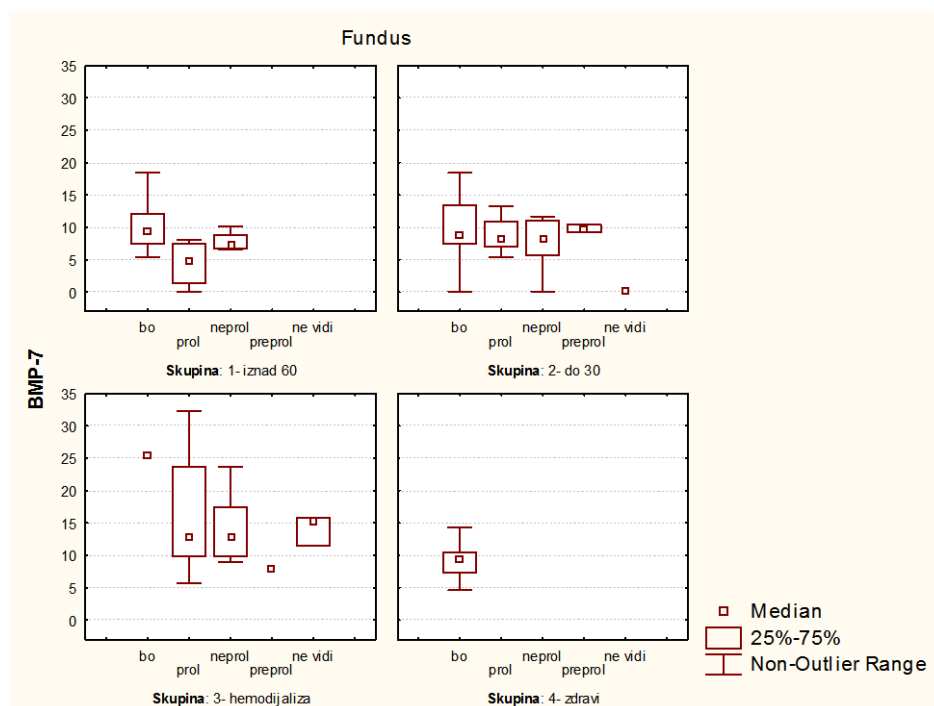
	Skupina 1		Skupina 2		Skupina 3		Skupina 4	
	Z	p-level	Z	p-level	Z	p-level	Z	p-level
<b>BMP-7</b>	-0,874	0,382	0,092	0,927	1,268	0,205	/	/

IM-infarkt miokarda

**Tablica 22.** Testiranje razlike između vrijednosti fundusa u odnosu na BMP-7.

fundus	p vrijednost
bo vs prol	<0,001
bo vs neprol	<0,001
bo vs preprol	<0,001
bo vs ne vidi	<0,001
prol vs neprol	<0,001
prol vs preprol	<0,001
prol vs ne vidi	<0,001
neprol vs preprol	<0,001
neprol vs ne vidi	<0,001
preprol vs ne vidi	1,000

p<0,001



**Slika 26.** Prikaz nalaza fundusa prema skupinama bolesnika u odnosu na BMP-7.

**Tablica 23.** Raspodjela vrijednosti BMP-7 po skupinama i nalazima fundusa.

Skupina	Fundus	N	Prosjek	Median	Minimum	Maximum	Std.Dev.
Skupina 1	bo	21	12,25	9,4	5,4	39,7	9,550
	prol	5	4,34	4,7	0,1	8,0	3,540
	neprol	4	7,78	7,2	6,6	10,2	1,662
	preprol	0	/	/	/	/	/
	ne vidi	0	/	/	/	/	/
Skupina 2	bo	10	9,30	8,9	0,1	18,4	5,716
	prol	9	10,32	8,0	5,4	24,6	5,876
	neprol	8	10,29	8,2	0,1	32,3	9,601
	preprol	2	9,8	9,8	9,2	10,4	0,849
	ne vidi	1	0,1	0,1	0,1	0,1	/
Skupina 3	bo	1	25,3	25,3	25,3	25,3	/
	prol	18	60,06	12,7	5,7	698,0	161,286
	neprol	7	13,94	12,7	9,0	23,7	5,084
	preprol	1	7,9	7,9	7,9	7,9	/
	ne vidi	3	14,17	15,2	11,5	15,8	2,329
Skupina 4	bo	30	10,17	9,4	0,1	62,9	10,492
	prol	0	/	/	/	/	/
	neprol	0	/	/	/	/	/
	preprol	0	/	/	/	/	/
	ne vidi	0	/	/	/	/	/

U **Tablici 24.** prikazani su rezultati testiranja povezanost BMP-7 s ostalim izmjerenim parametrima. Testiranje je provedeno zajedno za sve skupine i po svakoj skupini posebno koristeći Pearsonov koeficijent korelacije.

Za izdvojiti je prikaz povezanosti nalaza ureje i BMP-7 prema skupinama. Regresijska analiza pokazala je da ne postoji statistički značajna povezanost između BMP-7 i ureje u prvoj, drugoj i trećoj skupini ( $p > 0,05$ ), no postoji statistički granično značajna negativna povezanost – porastom vrijednosti BMP-7 bilježe se niže vrijednosti ureje u četvrtoj skupini. Razlog te granično značajne povezanosti je jedna visoka vrijednost BMP-7 među zdravim ispitanicima (**Slika 27.**).

Regresijska analiza povezanosti HbA1c i BMP-7 pokazuje da ne postoji statistički značajna povezanost u skupinama 1, 2 i 4 ( $p > 0,05$ ). No, u skupini 3 postoji statistički značajna pozitivna povezanost između BMP-7 i HbA1c ( $p < 0,05$ ) što je odraz manjeg broja bolesnika s iznimno visokom vrijednošću BMP-7 i HbA1c (**Slika 28.**). Bolji odraz regulacije glikemije dobiven je ranije opisanom deskriptivnom statistikom (**Tablica 18.**).

Regresijska analiza povezanosti HDL i BMP-7 prema skupinama pokazuje da ne postoji statistički značajna povezanost između BMP-7 i HDL u prvoj, drugoj i trećoj skupini ( $p > 0,05$ ), te da u skupini 4 postoji statistički značajna povezanost između BMP-7 i HDL ( $p < 0,05$ ). Razlog tomu je jedna visoka HDL vrijednost, pa se taj rezultat ne može smatrati statistički značajnim (**Slika 29.**).

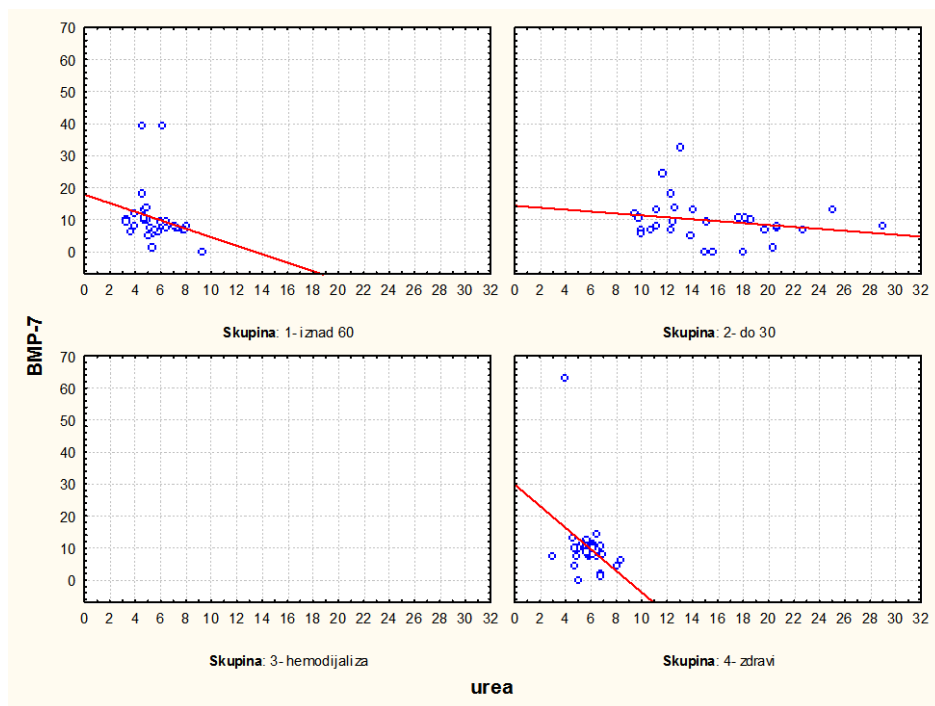
Povezanost s dobi, trajanjem ŠB, krvnim tlakom (razgraničenim na sistolički i dijastolički), vrijednosti kolesterola, LDL-a, triglicerida, albuminurijom, indeksom tjelesne mase u regresijskoj analizi nije dostigla statistički značaj.

**Tablica 24.** Testiranje povezanosti BMP-7 s ostalim izmjerenim parametrima.

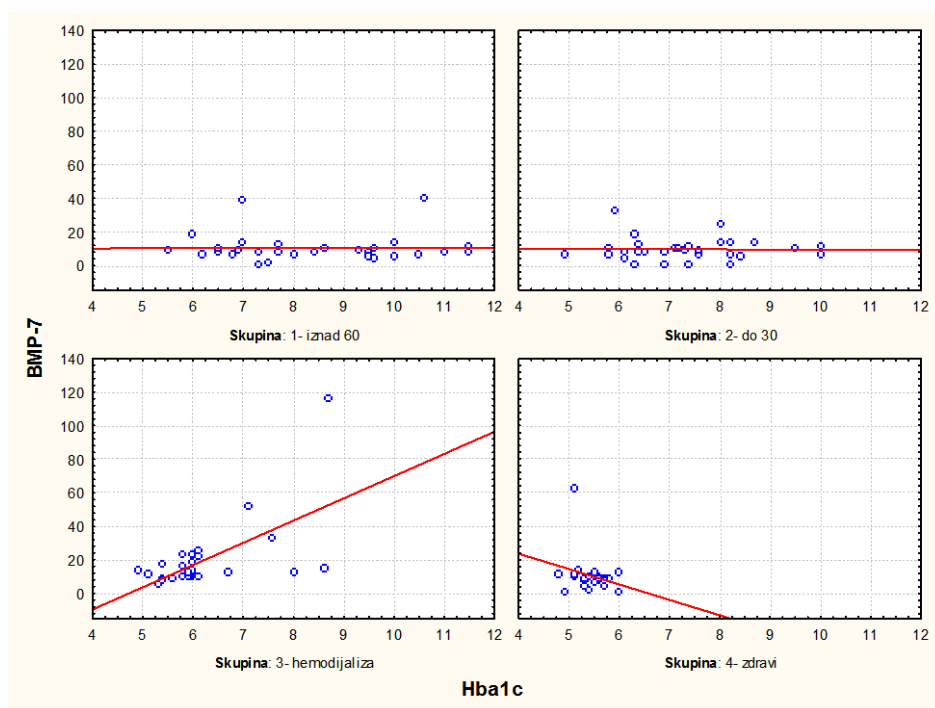
izmjereni parametar	Sve skupine		Skupina 1		Skupina 2		Skupina 3		Skupina 4	
	r	p	R	p	R	p	R	P	r	p
Dob	0,039	0,674	0,126	0,508	0,216	0,252	0,105	0,589	0,029	0,878
trajanje ŠB	0,040	0,669	-0,173	0,361	-0,005	0,977	-0,203	0,292	/	/
Ureja	-0,126	0,235	-0,226	0,230	-0,221	0,242	/	/	-0,352	0,056
Klirens	0,041	0,704	0,226	0,231	-0,018	0,925	/	/	-0,091	0,634
Kreatinin	-0,067	0,528	-0,145	0,444	-0,064	0,735	/	/	-0,158	0,405
Tlaksis	-0,060	0,516	-0,279	0,135	0,086	0,650	0,055	0,779	-0,251	0,180
Tlakdia	-0,119	0,199	-0,182	0,336	-0,098	0,607	0,068	0,726	-0,298	0,110
Kolesterol	-0,154	0,094	0,002	0,993	-0,083	0,663	0,020	0,919	0,055	0,773
HbA1c	0,053	0,567	0,012	0,951	-0,021	0,914	0,607	0,0005	-0,253	0,177
albumini	-0,053	0,622	-0,073	0,702	-0,72	0,707	/	/	-0,178	0,346
LDL	-0,163	0,076	-0,049	0,797	-0,056	0,769	0,177	0,358	-0,119	0,531
HDL	0,030	0,746	-0,123	0,519	-0,061	0,748	0,184	0,341	0,445	0,01
Trigliceridi	-0,128	0,165	-0,033	0,862	-0,223	0,235	-0,212	0,269	-0,200	0,289
BMI	-0,111	0,231	-0,272	0,145	0,137	0,470	0,088	0,649	-0,044	0,816

r = Pearson-ov koeficijent korelacije

p = pripadajuća p-vrijednost. Povezanost je statistički značajna ako je  $p < 0,05$ .

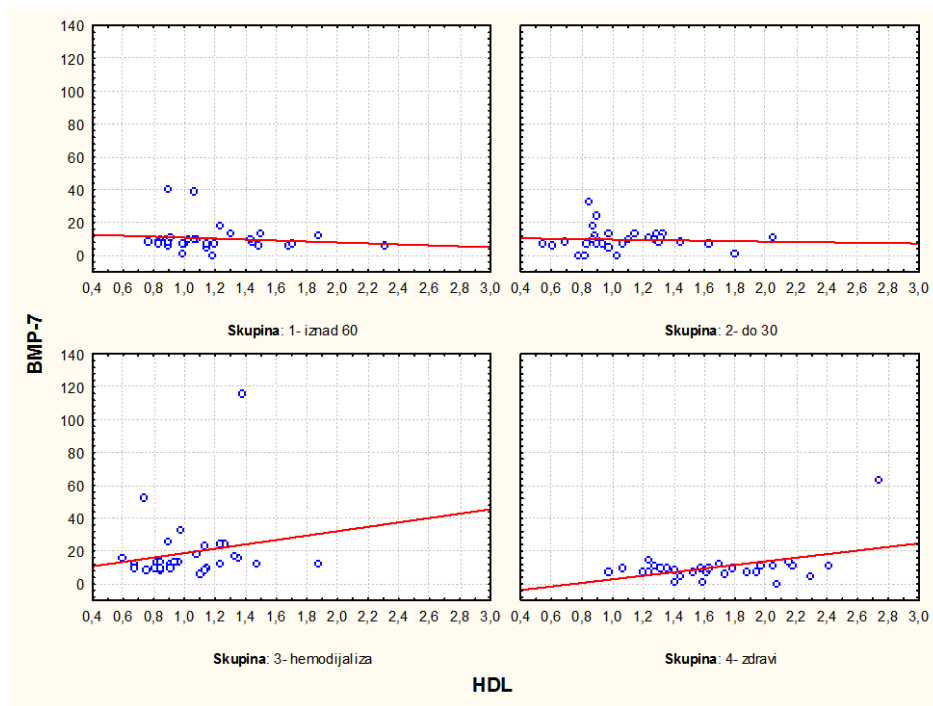


Slika 27. Prikaz povezanosti nalaza ureje i BMP-7 prema skupinama.



$p > 0,05$

Slika 28. Prikaz povezanosti nalaza HbA1c i BMP-7 prema skupinama.



**Slika 29.** Prikaz povezanosti nalaza HDL i BMP-7 prema skupinama.



## 5.2. Rezultati imunohistokemijskog bojanja

### *Drugi dio istraživanja - KBC Zagreb*

U ovom dijelu istraživanja prikazali smo izraženost BMP-7 u biopstatima bubrega bolesnika s dijabetičkom nefropatijom te izraženost BMP-7 prema različitim stadijima dijabetičke nefropatije.

### *Obilježja bolesnika*

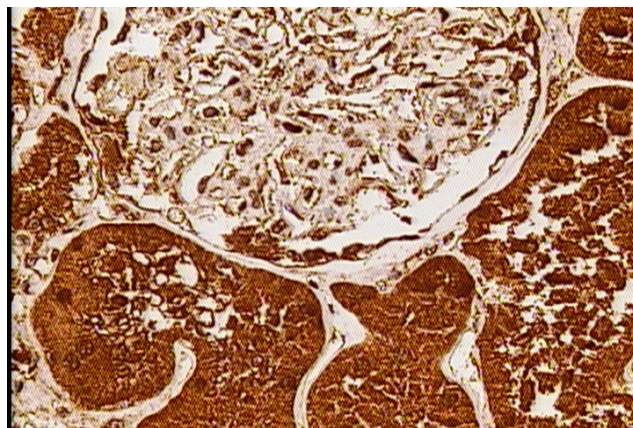
Tri bolesnika su imala ŠB tip 1, dok je 25 bilo sa ŠB tip 2. U vrijeme biopsije najmlađi bolesnik imao je 24, a najstariji 70 godina, prosječne dobi bolesnika od 53 godine, 60 % je bilo muškaraca. Biopsije su provedene u razdoblju od 1998.-2012. godine.

### **5.2.1. Izražaj BMP-7 u proksimalnim kanalićima**

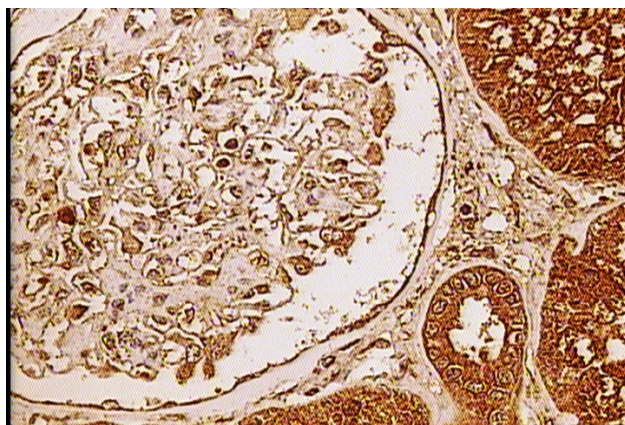
BMP-7 je bio različito izražen u citoplazmi epitelnih stanica proksimalnih kanalića i podocita u svim stadijima dijabetičke nefropatije (**Slika 30, 31, 32.**).

Četiri bolesnika su imala dijabetičku nefropatiju I i II stadija, a BMP-7 je bio jako izražen (3+) u svim uzorcima u proksimalnim kanalićima. Dvadesetčetiri bolesnika imalo je III ili IV stadij dijabetičke nefropatije, a BMP-7 je bio umjereno izražen (2+) u 7 uzoraka, dok je jako izražen (3+) bio u 17 uzoraka. Nije uočena statistička značajna razlika (**Slika 33.**).

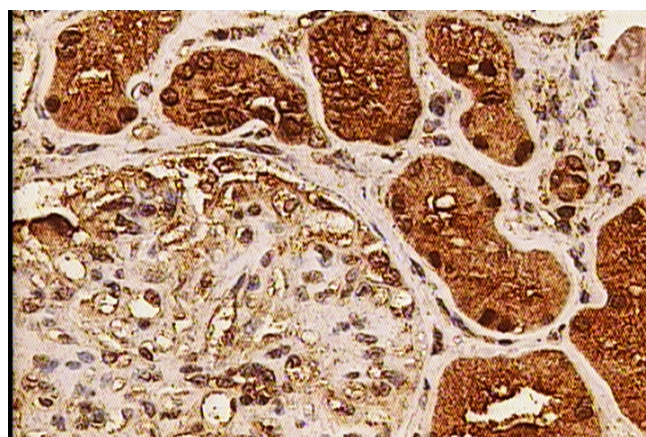
BMP-7 izražaj u kontrolnim uzorcima je bio slabiji nego u početnim stadijima dijabetičke nefropatije, bez statistički značajne razlike.



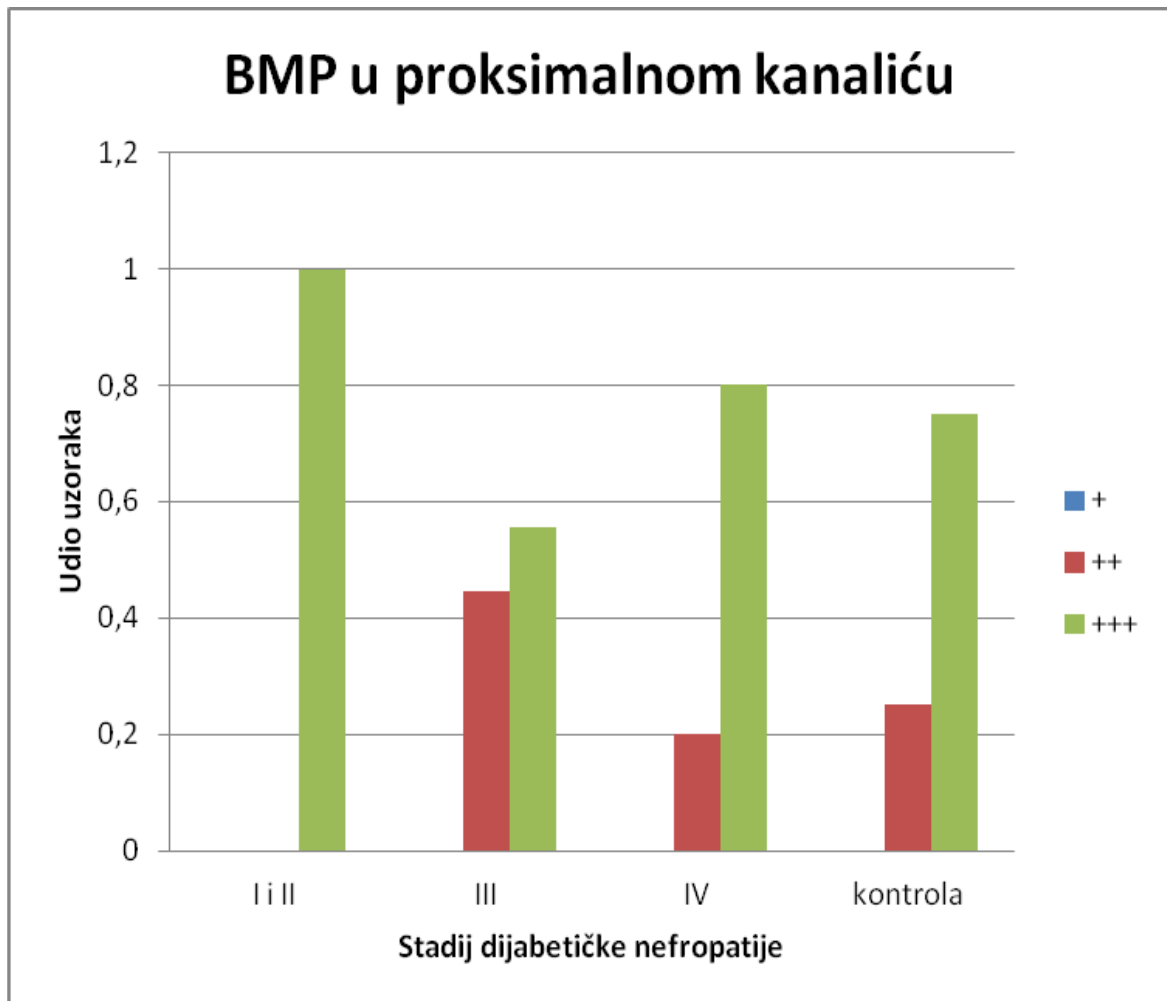
**Slika 30.** Imunohistokemijski BMP-7 je jako pozitivan u citoplazmama epitela kanalića i slabo pozitivan u podocitima (BMP-7, objektiv x 400).



**Slika 31.** Imunohistokemijsko bojanje na BMP-7 pokazuje umjerenu pozitivnost citoplazmi epitela kanalića i podocita izražaja 2+ (BMP-7, objektiv x 400).



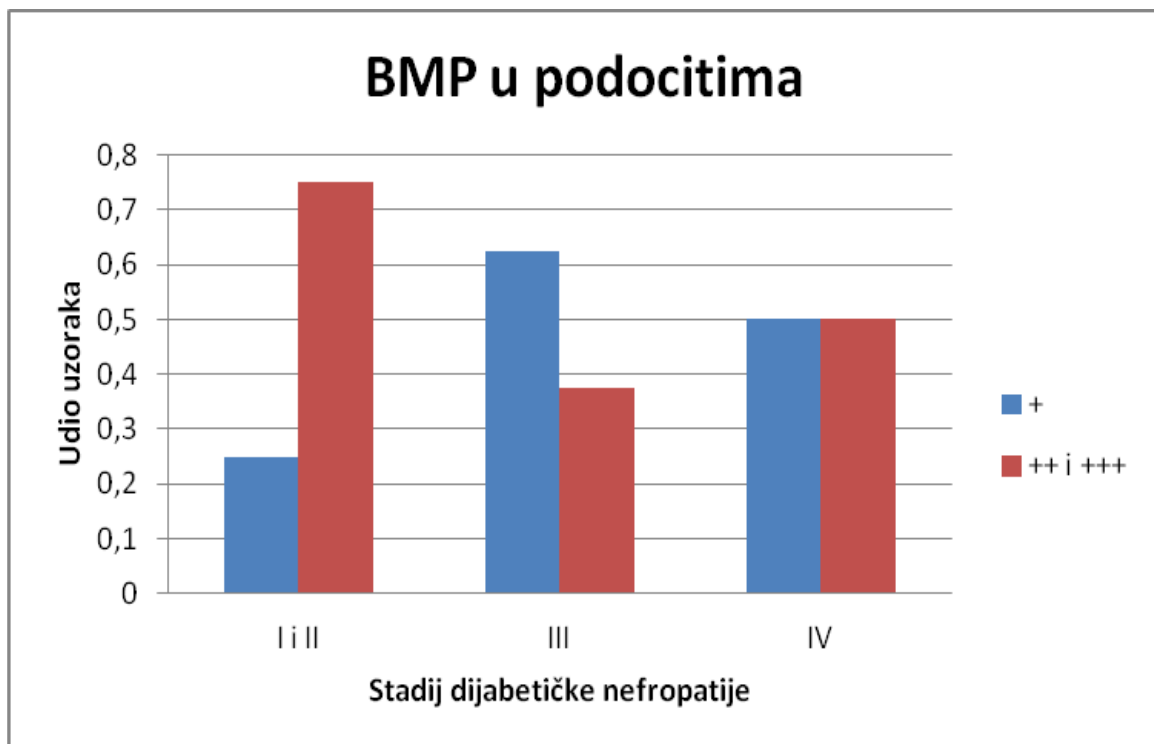
**Slika 32.** BMP 7 je jako pozitivan u citoplazmama epitela kanalića kore te u podocitima (BMP- 7, objektiv x 400).



**Slika 33.** Izražaj BMP-7 u proksimalnim kanalićima u različitim stadijima dijabetičke nefropatije.

### 5.2.2. Izražaj BMP-7 u podocitima

Izražaj BMP-7 u podocitima je različit. U početnim stadijima dijabetičke nefropatije izražaj je umjeren ili jak 2 ili 3 +, dok je u uznapredovalim stadijima bolesti u većini uzoraka nizak (1 +). Tako je u trećem stadiju izražaj 1+ zabilježen u 62,5 % uzoraka, 2+ u 12,5 %, dok je 3+ zabilježeno u 25 % uzoraka. U stadiju IV, 50 % uzoraka imalo je izražaj 1+, 14 % 2+, dok je preostalih 36 % pokazivalo jak izražaj 3+ (**Slika 34.**). Razlike nisu dostigle statistički značaj.



**Slika 34.** Izražaj BMP-7 u podocitima u različitim stadijima dijabetičke nefropatije.

## **6. RASPRAVA**

Prema dosadašnjim literaturnim podacima ovo je prvo istraživanje vrijednosti BMP-7 u serumu bolesnika oboljelih od dijabetičke nefropatije prema stupnjevima KBB, s istodobnim određivanjem izražaja BMP-7 u biopstatima ljudskih bubrega s potvrđenom patohistološkom dijagnozom dijabetičke nefropatije. Za potrebe našeg istraživanja upotrebljeno je 120 uzoraka seruma ispitanika u kojih je ELISA testom određena vrijednost BMP-7, te 30 uzoraka biopstata bubrega u kojima je potom imunohistokemijskim bojanjem određen izražaj BMP-7. Rezultatima je potvrđena hipoteza prema kojoj se izražaj BMP-7 mijenja progresijom bolesti.

Ispitanici za analizu vrijednosti BMP-7 ELISA testom podijeljeni su u skupine od 30 ispitanika, prema procijenjenoj glomerularnoj filtraciji, tako da su prvu skupinu činili ispitanici sa ŠB tip 2 s početnim bubrežnim oštećenjem, drugu bolesnici u predzavršnom stadiju KBB, treću skupinu bolesnici na hemodijalizi, dok je četvrta skupina bila kontrolna skupina zdravih dobrovoljaca. Za potrebe imunohistokemijskog bojanja korišteni su, iz Arhive Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KBC Zagreb, ranije pohranjeni uzorci biopsija bubrega učinjeni u razdoblju od 1998.-2012. godine, sa jasno potvrđenom patohistološkom dijagnozom dijabetičke nefropatije.

Ciljevi ovoga istraživanja bili su pokazati izraženost BMP-7 u različitim stadijima dijabetičke nefropatije, potom istražiti izraženost BMP-7 u biopstatima bubrega bolesnika s dijabetičkom nefropatijom, usporediti izraženost BMP-7 u različitim stadijima dijabetičke nefropatije sa izraženošću BMP-7 u biopstatima bubrega te istražiti izraženost BMP-7 u različitim stadijima dijabetičke nefropatije ovisno o demografskim čimbenicima (dob, spol, komorbiditet – visoki krvni tlak, hiperlipoproteinemija, preboljeli infarkt miokarda, cerebrovaskularni inzult, razvijene kronične komplikacije na mrežnici). Obzirom na definirane ciljeve, bolesnici su probirani uz inicijalno određivanje stadija dijabetičke nefropatije kako na razini ispitanika tako i na razini već biopsijom potvrđene dijabetičke nefropatije u drugom dijelu istraživanja, za analizu uzoraka seruma ELISA testom i preparata biopstata bubrega imunohistokemijski.

Dosadašnja istraživanja su pokazala da je BMP-7 jedini koštani morfogenetski protein, koji ima ključnu ulogu u razvoju bubrega, te da miševi koji ga nemaju u svom genomu umiru odmah nakon okota u slici uremije (141,142).

Tijekom posljednjeg desetljeća, BMP-7 je postao važan antifibrogeni i antiinflamatorni čimbenik. Ranija istraživanja provedena na eksperimentalnim modelima jednostrane obstruktivne uropatije ili dijabetičke glomerularne skleroze, pokazala su da pravovremena

terapijska primjena rekombinantnog humanog BMP-7 može smanjiti razvoj fibroze bubrega u štakora, pospješiti oporavak bubrežne funkcije i očuvati bubrežnu strukturu statistički značajno u usporedbi s konvencionalnom terapijom ACE-inhibitorom (154,155).

Povezanost BMP-7 i kontrole krvnog tlaka dosada nije opisana (148).

Prema rezultatima našeg istraživanja terapija ACE-inhibitorima ili ARB blokatorima je imala statistički granični značaj u odnosu na dobivene vrijednosti BMP-7, no razlika između pojedinih lijekova u tom odnosu nije dostigla statistički značaj. Od ukupnog broja bolesnika njih 7, odnosno 5,83 %, većinom iz prve skupine bolesnika s početnom KBB nije bilo na terapiji ACE inhibitorom ili ARB. U tih je bolesnika visoki krvni tlak reguliran drugim skupinama lijekova.

Pozornost privlače rezultati probira kroničnih komplikacija ŠB razvijenih na očnoj pozadini; nalaza fundusa, koji su za potrebe našeg istraživanja razvrstani u podskupine ovisno o izraženosti promjena u proliferativnu, preproliferativnu, neproliferativnu dijabetičku retinopatiju, te podskupinu bolesnika koja je izgubila vid uslijed napredovanja bolesti. Sve su varijable podskupina međusobno statistički testirane, a rezultati Kruskal-Vallis ANNOVA pokazuju da su vrijednosti BMP-7 statistički značajno različite kod pojedinih nalaza fundusa u svim skupinama oboljelih, što ukazuje na moguću zaštitnu ulogu BMP-7 u razvoju ove kronične komplikacije.

90-tih godina prošlog stoljeća gen za BMP-7 je lokaliziran na kromosomu 20q13.1-q13.3 (156). Molekula BMP-7 je izražena u najranijem embrionalnom razvoju i ima fundamentalnu ulogu u mezenhimalno-epitelijalnoj tranziciji i nefrogenezi, a postoje dokazi da je ključan i u razvoju oka te da direktno sudjeluje u formiranju retine, leće, šarenice i cilijarnog tijela. Čimbenik je preživljenja metanefritičkog mezenhima, u čijoj odsutnosti te stanice odumiru, čime prestaje daljnji razvoj glomerula, a u koštanom sustavu i očima se kasnije mogu vidjeti različiti oblici anomalija (142).

In vitro pokusima, u kulturi stanica štakorskih embrija anti-BMP-7 protutijela zaustavila su razvoj leće. Posljedice ovakvih interakcija dovode do razvoja brojnih okulorenalnih sindroma, od kojih je poznatiji Alportov sindrom (156).

Prognostički značaj nalaza BMP-7 i promjena na očnoj pozadini iz ovoga rada biti će potrebno potvrditi daljnjim istraživanjima.

U 3. skupini bolesnika uočena je statistički značajna pozitivna povezanost između HbA1c i BMP-7 ( $p < 0,05$ ), na što je utjecalo nekoliko bolesnika s vrlo visokim vrijednostima BMP-7 i HbA1c.

Točniji prikaz dobili smo deskriptivnom statistikom mjerenih parametara po skupinama pri čemu se može reći kako promatrajući HbA1c, regulacija ŠB nije bila zadovoljavajuća u 1. i 2. skupini, u odnosu na skupinu dijaliziranih bolesnika gdje je HbA1c prosječno iznosio 6,22 %. Korelacija između vrijednosti BMP-7 i HbA1c može biti odraz trenutačne regulacije glikemije u dijaliziranih bolesnika, ali i ukazivati na povezanost regulacije glikemije i renoprotektivnih učinaka BMP-7.

Vrlo zanimljivi podaci koji ujedno potvrđuju postavljenu nam hipotezu, dobiveni ELISA testom, pokazali su da je najveći izražaj BMP-7 prisutan u skupini od 30 bolesnika na hemodijalizi, dok je u ostalim skupinama zabilježena niža vrijednost neovisno o analiziranoj skupini. Ovaj paradoksalni porast BMP-7 razvija se vjerojatno kao kompenzatorni, mehanizam organizma na ozljedu bubrega i fibrozne promjene u klinički uznapredovaloj KBB, nasuprot dokazanom učinku profibrinogenog čimbenika TGF-beta. Slični rezultati, iznenađujućeg porasta BMP-7, s pogoršanjem bubrežne funkcije, nedavno su opisani u jednom istraživanju turskih autora (157,158). Oni su na uzorku od 80 bolesnika sa dijagnosticiranom KBB, od kojih je 39 bilo sa dijabetičkom nefropatijom, pokušali odrediti ulogu BMP-7 u procjeni napredovanja bubrežne bolesti, pri čemu su napredovanje bolesti definirali  $\geq 50\%$  smanjenjem glomerularne filtracije,  $\geq 2$  porastom kreatinina ili potrebom za nadomjesnim liječenjem KBB. Prema njihovim rezultatima, BMP-7 nije bio učinkovit parametar u procjeni napredovanja bolesti u oboljelih s dijabetičkom nefropatijom, no jeste bio povezan s napredovanjem KBB (157,158).

Veće vrijednosti BMP-7 u djece bolesnika na hemodijalizi, u odnosu na peritonejsku dijalizu i kontrolnu skupinu zdrave djece, opisala je i grupa poljskih autora koja je istraživala povezanost veće učestalosti kardiovaskularnih komplikacija u ovoj skupini bolesnika s izražajem molekula kojima se pripisuju pokretačka, odnosno inhibitorna svojstva na konačni razvoj kalcifikacija – trombocitni faktor rasta u odnosu na osteopontin i BMP-7. Promjene vrijednosti ispitivanih molekula, s naglaskom na povećane vrijednosti BMP-7 i osteopontina, u svom su istraživanju povezali s mogućim preventivnim učinkom na razvoj kalcifikacija, odnosno koštanim metabolizmom, i poznatom ulogom kalcija i fosfora u procesu ateroskleroze (159) koji je osobito izražen upravo u skupini bolesnika na dijalizi i usko je povezan s povećanim pobolom i smrtnošću od srčanožilnih bolesti. U napredovanju ateroskleroze bitnu ulogu ima molekula koštanog morfogenetskog proteina-2 koja svoj proaterogeni i proupalni učinak ostvaruje poticanjem procesa oksidativnog stresa i endotelne disfunkcije, induciranjem osteogenog fenotipa u glatkim mišićnim stanicama krvnih žila i



razvojem kalcifikacija (160). BMP-7 nasuprot tome, kompleksnim mehanizmom polarizacije monocita u M2 makrofage potiče lučenje protuupalnih citokina važnih i prema radu Rochera i sur. mogao bi biti novi terapijski izbor u liječenju ateroskleroze (161).

Neprikosnovenu razliku našega, i istraživanja na životinjskim modelima čine uvjeti u kojima su studije, odnosno pokusi provedeni. Naime, u životinjskim se modelima u strogo kontroliranim uvjetima proizvede dijabetička nefropatija, što pridonosi ujednačenosti tako dobivenih rezultata. Za razliku od životinja, čovjek je sve samo ne „pod kontrolom“. Prisutnost rizičnih čimbenika i pridruženi komorbiditeti opskurni su termini za eksperimentalne uvjete, a uvelike utječu na ishode bolesti. Tako su kontrolirani uvjeti proizvedenih bolesti u odnosu na *stvarne* bolesti, jedan od mogućih uzroka različitih rezultata u životinjskih modela i ljudi.

U konačnici se može zaključiti kako, u svjetlu novijih istraživanja pokušaj renoprotektivnog učinka ovog koštanog morfogenetskog proteina u razvoju KBB dobiva novi značaj.

Dijabetička nefropatija je najčešći uzrok KBB i jedan je od najčešćih razloga nadomještavanje bubrežne funkcije. U ranoj fazi njezina razvoja uočava se povećan izražaj profibrogenog TGF-beta uslijed hiperglikemije i pridruženih patogenetskih mehanizama, te BMP-7, koji se svojim antifibrogenim učinkom suprotstavlja djelovanju TGF-beta. Završnu fazu brojnih bubrežnih bolesti obilježava tubulointersticijska fibroza, stoga se na animalnim modelima dijabetičke nefropatije istraživao mehanizam renoprotektivnog učinka BMP-7 koji su odraz njegovih obilježja koja pokazuje tijekom embrionalnog razvoja. Dobrim modelom pokazala se dijabetička nefropatija uzrokovana streptozotocinom u štakora. U radu Wanga S. i suradnika iz 2003. godine, BMP-7 je inhibitorno djelovao na TGF-beta aktivnost, potom potakao obnavljanje fenotipa tubularnog epitela, djelomično smanjio hipertrofiju bubregu uzrokovanu ŠB, poboljšao glomerularnu filtraciju i histološku strukturu glomerula te smanjio izlučivanje albumina urinom (148).

Mehanizmi antifibrogenih učinaka BMP-7 predmet su brojnih istraživanja. *In vitro*, antifibrogeni učinak BMP-7 ostvaruje blokiranjem TGF-beta potaknutog povećanog stvaranja i nakupljanja PAI-1 koji izravno utječe na glomerularnu fibrogenezu (162). Pri tome se aktivacija Smad 5 signalnog puta čini bitnom sastavnicom koja je potrebna da bi BMP-7 mogao zaustaviti daljnje transkripciju PAI-1 u jezgri koja se odvija uglavnom putem Smad 3 (162).

Za izražaj antifibrogenih učinaka BMP-7 od velike je važnosti dakle, aktiviranje Smad signala koji blokiraju aktivaciju i nuklearnu translokaciju TGF-beta induciranog Smad2/3

kompleksa koji su vodeći medijatori njegovoga fibrogenog učinka (162). Istraživanje učinjeno na kulturi mezangijskih stanica, također je potvrdilo kontraregulatorni učinak BMP-7 u odnosu na profibrogene učinke TGF- $\beta$ , koji se očituju u reduciranju nakupljanja bjelančevina izvastaničnog matriksa u mezangijskim stanicama (163). Deplecija BMP-7 u modelu dijabetičke nefropatije u bubregu eksperimentalnih događa se vrlo rano, čak i prije razvoja strukturnih oštećenja bubrega, djelom i zbog prevladavanja učinaka TGF- $\beta$  (147).

Gubitak izražaja BMP-7 *per se*, kako ukupne vrijednosti tako i receptora tipa 1 i 2 neophodnih u nastavku aktivacije signalnih puteva, ima snažni profibrogeni učinak. Dio tih učinaka pripisuje se istodobnom pridruženom učinku BMP-7 antagonista povećanju vrijednosti TGF- $\beta$  (147).

Drugi dio ovoga istraživanja odnosio se na promjene izražaja BMP-7 u bioptatima bubrega bolesnika u različitim stadijima dijabetičke nefropatije. Radilo se o bolesnicima u kojih još nije bila razvijena završna faza KBB koja bi zahtijevala liječenje dijalizom. U zdravom tkivu bubrega i u uzorcima bubrega s karcinomom svijetlih stanica BMP-7 je osobito izražen u epitelu proksimalnih kanalića bubrežnog parenhima (138).

U našim uzorcima, BMP-7 izražaj u proksimalnim kanalićima bio je jako pozitivan u početnim stadijima, dok se slabiji izražaj prati kako bolest napreduje prema višim stadijima. Izražaj u podocitima manje je konzistentan. U početnim stadijima bio je visok; 2 ili 3+, dok je u uznapredovaloj bolesti u većini uzoraka bio nizak; 1+. Moguće ograničenje ove studije je razmjerno mali broj uzoraka bioptata.

U početnim je stadijima dijabetičke nefropatije zabilježen viši izražaj i u odnosu na kontrolnu skupinu, međutim iako pokazuju pozitivan trend, rezultati nisu dosegli statistički značaj. Nejednolika promjena izražaja promatrane molekule tijekom razvoja bolesti gdje je u početnim stadijima viši, sa posljedičnim opadanjem u višim stadijima mogući je zaštitni mehanizam funkcije i strukture bubrega, u suprotnosti je s ranije opisanim rezultatima u životinjskim modelima (147).

U eksperimentalnom modelu dijabetičke nefropatije, BMP-7 se pokazao bitnim čimbenikom preživljenja podocita (101), a pronađen je i u stanicama centralnog živčanog sustava (164). Održavanje razine BMP-7 u podocitima poboljšava opstanak podocita, što pridonosi smanjenju albuminurije u miševa s ŠB. Nije pronađeno da utječe na dijabetesom inducirano snižavanje TGF- $\beta$ , no smanjuje rano nakupljanje kolagena i fibronektina te održava aktivnost bubrežne kolagenaze koja je u skladu s TGF- $\beta$  aktivnošću - suprotnim

djelovanjem. Povoljan utjecaj BMP-7 na podocyte može se objasniti i antagoniziranjem učinaka TGF- $\beta$  (165).

Iako je u uzorcima promatranih ljudskih biopsija bubrega s višim stadijima dijabetičke nefropatije i uznapredovalom bolešću izražaj BMP-7 bio snižen u usporedbi s uzorcima u početnim stadijima, zapažene razlike nisu bile statistički značajne.

Prikupljeni podaci istraživanja na ljudima djelomično podupiru podatke istraživanja na životinjskim modelima, a ukazuju, i ponovno naglašavaju ulogu BMP-7 u očuvanju funkcije i strukture bubrega. Povišen više nego normalan izražaj u početnim stadijima dijabetičke nefropatije može govoriti u prilog ovih rezultata. U humanoj dijabetičkoj nefropatiji Turk i autori su pokazali da je gubitak podocita te njihove diferencijacije udružen sa sniženom signalnom aktivnošću BMP-7 (150). Naši rezultati povišenog izražaja u uzorcima rane dijabetičke nefropatije ukazuju na mogući poremećaj na razini BMP receptora ili signalnih puteva što rezultira posljedičnom prekomjernom stimulacijom BMP-7.

Zaključno, rezultati ovog istraživanja ukazuju na značajnu ulogu BMP-7 u procesu razvoja dijabetičke nefropatije. U završnom stadiju KBB, u bolesnika na hemodijalizi, gdje bi se na temelju istraživanja provedenih na eksperimentalnim modelima očekivao najmanji izražaj BMP-7, u našem se radu pokazalo statistički značajno povećanje koncentracije ove molekule. Daljnjim istraživanjima trebalo bi objasniti razliku između životinjskih modela i rezultata dobivenih na humanim uzorcima.

Unatoč potencijalnim ograničenjima veličinom uzorka, ovo istraživanje, a navlastito kada se rezultati razmatraju u odnosu na slične rezultate iz turske studije, ukazuje da je potrebno razmotriti ulogu razine BMP-7 u uznapredovalim stadijima humane dijabetičke nefropatije. Za čvršće zaključke o utjecaju razine BMP-7 na dugoročne ishode u tih bolesnika potrebne su prospektivne studije sa većim brojem bolesnika sa dobro definiranim kliničkim i patohistološkim stadijima bolesti.

## **7. ZAKLJUČAK**

1. Bolesnici u završnom stadiju KBB imaju statistički značajno veću izraženost BMP-7 u odnosu na ostale skupine bolesnika.
2. Ista skupina bolesnika ima statistički značajnu pozitivnu povezanost između HbA1c i BMP-7 ( $p < 0,05$ ).
3. Uporaba ACE-inhibitora ili ARB je bila granično statistički značajna u odnosu na vrijednosti BMP-7.
4. Vrijednosti BMP-7 se statistički značajno razlikuju kod pojedinih nalaza fundusa u svim stadijima KBB.
5. U biopstatima bubrega bolesnika sa dijabetičkom nefropatijom u višim stadijima i uznapređovalom bolešću prati se smanjenje izražaja BMP-7 u odnosu na početne stadije bolesti u kojima je bolje izražen.
6. Dobiveni rezultati upućuju na moguće renoprotektivno djelovanje BMP-7 u pokušaju održavanja strukture i funkcije bubrega.
7. Daljnja istraživanja trebaju objasniti razliku između životinjskih modela i rezultata dobivenih na humanim uzorcima.

## **8. SAŽETAK**

UVOD: Koštani morfogenetski protein-7 (od engl. Bone Morphogenetic Protein-7) ima ključnu ulogu tijekom embrionalnog razdoblja razvoja bubrega. Osnovna mu je zadaća zaštita bubrega od akutne ozljede i razvoja kronične bubrežne bolesti, sprečavanjem razvoja upalnih procesa i fibroznih promjena. Miševi koji ga nemaju u genomu umiru prvi dan po okotu u slici uremije. Dijabetička nefropatija je vodeći uzrok kronične bubrežne bolesti i jedan je od najčešćih razloga za nadomještanje bubrežne funkcije u Hrvatskoj, Europi i Sjedinjenim Američkim Državama. Prema dosadašnjim istraživanjima, poglavito na animalnim modelima, obilježena je smanjenim izražajem BMP-7.

CILJ ISTRAŽIVANJA: Cilj doktorskog rada bio je istražiti izraženost BMP-7 u različitim stadijima dijabetičke nefropatije, pokazati da li postoji povezanost s određenim demografskim čimbenicima, te u drugom dijelu rada, istražiti izraženost BMP-7 u biopsijama bubrega bolesnika s dijabetičkom nefropatijom. Istraživanjem na humanom modelu željeli smo potvrditi hipotezu da se izražaj BMP-7 mijenja napredovanjem bolesti.

ISPITANICI I METODE: Istraživanje se sastojalo od dva dijela. U prvom dijelu, ELISA testom na uzorku od 120 ispitanika koji su bili podijeljeni u 4 skupine ovisno o procijenjenoj glomerularnoj filtraciji, izmjerena je koncentracija BMP-7 u serumu. Prvu skupinu činili su ispitanici sa šećernom bolešću tip 2 s početnim bubrežnim oštećenjem, drugu bolesnici u predzavršnom stadiju, treću skupinu bolesnici na hemodijalizi, dok je četvrta skupina bila kontrolna skupina zdravih dobrovoljaca. U drugom dijelu, istražen je izražaj BMP-7 u 30 uzoraka biopsata bubrega bolesnika s potvrđenom dijabetičkom nefropatijom, a kontrolnu skupinu činili su uzorci zdravog tkiva 12 bubrega koji su dobiveni tijekom nefrektomije bolesnika s lokaliziranim tumorom bubrega. Uzorci su izuzeti s najudaljenijega mjesta od tumora.

REZULTATI: Ovim istraživanjem pokazano je da se izražaj BMP-7 mijenja napredovanjem bubrežne bolesti. Statistički značajno veće vrijednosti BMP-7 izmjerene su u skupini bolesnika sa završnim stadijem kronične bubrežne bolesti koji se liječe hemodijalizom u odnosu na druge dvije ispitivane skupine, kao i kontrolnu skupinu. U istoj skupini bolesnika opisane su i statistički značajno različite vrijednosti BMP-7 kod pojedinih nalaza fundusa, a uočena je i statistički značajna pozitivna povezanost između HbA1c i BMP-7 ( $p < 0,05$ ). Nasuprot ovih nalaza, u biopsijama bubrega bolesnika sa dijabetičkom nefropatijom u višim stadijima i uznapredovalom bolešću prati se smanjenje izražaja BMP-7 u odnosu na početne stadije bolesti u kojima je bolje izražen.

ZAKLJUČAK: Ovim je istraživanjem po prvi puta određena izraženost BMP-7 u bolesnika sa

šećernom bolesti tip 2 i različitim stadijima kronične bubrežne bolesti. Rezultati su pokazali da se izražaj BMP-7 mijenja napredovanjem bubrežne bolesti, a statistički značajno najviše vrijednosti izmjerene su u skupini bolesnika na hemodijalizi, dok se nasuprot tome u biopstatima bubrega u početnim stadijima prati povećan izražaj BMP-7 vjerojatno kao zaštitni mehanizam očuvanja strukture i funkcije bubrega, sa postupnim manjim izražajem napredovanjem bolesti. Uprkos potencijalnim ograničenjima, podaci ovoga istraživanja ukazuju na potrebu za reevaluacijom uloge BMP-7 u uznapredovalim stadijima humane dijabetičke nefropatije prospektivnim studijama na većem broju bolesnika sa dobro definiranim kliničkim i patohistološkim stadijima bolesti. Daljnjim istraživanjima također je potrebno objasniti razliku između životinjskih modela i rezultata dobivenih na humanim uzorcima.

Ključne riječi: koštani morfogenetski protein-7, dijabetička nefropatija, kronična bubrežna bolest, ELISA –test, imunohistokemija



## **9. SUMMARY**

## Bone morphogenetic protein-7 in diabetic nephropathy

Renata Ivanac Janković, 2015.

**INTRODUCTION:** Bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) plays a crucial role during the embryonic period of kidney development. Its basic role is to protect the kidney from acute and chronic failure, preventing the development of inflammatory and fibrotic changes. Mice at which it was expelled from the genome, die first day after litter of uremia. Diabetic nephropathy is the leading cause of chronic kidney disease and one of the most common reasons for renal replacement therapy in Croatia, Europe and the United States. According to previous research, especially in animal models, it is characterized by reduced expression of BMP-7.

**AIM:** The aim of this Thesis was to investigate the expression of BMP-7 in different stages of diabetic nephropathy, demonstrate whether there is a correlation with certain demographic factors, and, in the second part of the work, to investigate the expression of BMP-7 in kidney biopsy in patients with diabetic nephropathy. In study on human model, we wanted to confirm the hypothesis that the expression of BMP-7 is changed with disease progression.

**METHODS:** The research consisted of two sections. In the first section, by ELISA test on a sample of 120 patients, who were divided into four groups depending on the estimated glomerular filtration rate, we measured the concentration of BMP-7 in serum. In the first group there were subjects with diabetes mellitus type 2 with the initial renal impairment, at the second group the preterminal patients were, a third group was made of patients on hemodialysis, while the fourth group was the control group of healthy volunteers. In the second section, we studied the expression of BMP-7 in the kidney biopsy samples from 30 patients with confirmed diabetic nephropathy, and the control group was consisted of healthy tissue samples 12 the kidney obtained during nephrectomy patients with localized the kidney tumors. Samples were exempted from the most remote place of the tumor.

**RESULTS:** This research showed that the expression of BMP-7 is changed with the progression of kidney disease. Statistically higher levels of BMP-7 were measured in a group of patients with end stage chronic kidney disease who are treated with hemodialysis, as compared to the other two test groups and control group. In the same group of patients we find statistically significantly different values of BMP-7 in correlation with fundus examination. There was also a statistically significant positive association between HbA1c and BMP-7 ( $p < 0.05$ ). In contrast to these findings, the biopsy of kidney patients with diabetic

nephropathy in the higher stages and advanced disease follows a reduction in expression of BMP-7 in relation to the initial stages of the disease which is better expressed.

CONCLUSION: This research for the first time determined the expression of BMP-7 in patients with diabetes mellitus type 2 and various stages of kidney failure. The results showed that the expression of BMP-7 is changed with the progression of kidney disease, and significantly highest values were measured in patients on hemodialysis, while in contrast the kidney biopsy at the initial stages accompanies increased expression of BMP-7 probably as a protective mechanism for the preservation of the structure and function of the kidneys, with gradual lower expression as the disease progresses. Despite potential limitations, the data of this study suggest the need for a reevaluation of the role of BMP-7 in the advanced stages of human diabetic nephropathy in prospective studies on a larger number of patients with well-defined clinical and histopathological stages of the disease. Further researches are also needed to explain the difference between animal models and the results obtained in human samples.

Key words: bone morphogenetic protein-7, diabetic nephropathy, chronic kidney disease, ELISA test, immunohistochemistry

## **10. LITERATURA**

1. Krmpotić-Nemanić J. Anatomija čovjeka. Zagreb: Medicinska naklada; 1993, str. 831-3.
2. Junqueira LC, Carneiro J. Osnove histologije. 10.izd. Zagreb: Školska knjiga; 2005, str. 383-98.
3. Salomon R, Gubler MC, Niaudet P. Genetics of the nephritic syndrome. *Curr Opin Pediatr* 2000; 12:129-34.
4. Tryggvason K. Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: Nephrin, a key component of the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:2440-5.
5. Benigni A, Gagliardini E, Tomasoni S, i sur. Selective impairment of gene expression and assembly of nephrin in human diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2004; 65:2193-200.
6. Kanwar YS, Farquhar MG. Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. *Proc Natl Acad Sci* 1979; 76:1303-7.
7. Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. 11.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2006, str.307-43.
8. Levey AS, Coresh J, Balk E, i sur. National Kidney Foundation Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification. *Ann Intern Med* 2003; 139:137-47.
9. Desai SP, Isa-Pratt S. Laboratorijske pretrage u kliničkoj medicini. 1.hrv.izd. Split: Placebo; 2003, str. 489-90.
10. Kuzmanić D. Dijagnostički postupci u bolestima bubrega. U: Vrhovac B, Francetić I, Jakišć B, Reiner Ž, Vucelić B, ur. *Interna medicina*. Zagreb: Naklada Ljevak; 2003, str. 1125-8.
11. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976; 16:31-41.
12. Levey AS, Greene T, Kusek JW, Beck GL. MDRD Study Group. A simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine (abstract). *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:155A
13. Stevens LA, Schmid CH, Greene T, i sur. Comparative performance of the CKD Epidemiology Co- llaboration (CKD-EPI) and the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) study equations for estimating GFR levels above 60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>. *Am J Kidney Dis* 2010; 5:486-95.
14. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, i sur. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009; 150:604-12.
15. Edelstein CL. Biomarkers of acute kidney injury. *Adv Chronic Kidney Dis* 2008; 15:222-

34.

16. Delanaye P, Cavalier E, Morel J, i sur. Detection of decreased glomerular filtration rate in intensive care units: serum Cystatin C versus serum creatinine. *BMC Nephrol* 2014; 15:9.
17. Zhang Z, Lu B, Sheng X, Jin N. Cystatin C in prediction of acute kidney injury: a systemic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 2011; 58:356-65.
18. Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest* 2004; 114:5-14.
19. Gašparović V, Čala S. Akutna insuficijencija bubrega. U: Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B, ur. *Interna medicina*. Zagreb: Naklada Ljevak; 2008, str. 1082-6.
20. Case J, Khan S, Khalid R, Khan A. Epidemiology of Acute Kidney Injury in the Intensive Care Unit. *Crit Care Res Pract* 2013; 2013:479730.
21. Hou SH, Bushinsky DA, Wish JB, Cohen JJ, Harrington JT. Hospital-acquired renal insufficiency: a prospective study. *Am J Med* 1983; 74:243-8.
22. Nash K, Hafeez A, Hou S. Hospital-acquired renal insufficiency. *Am J Kidney Dis* 2002; 39:930-6.
23. Wang HE, Muntner P, Chertow GM, Warnock DG. Acute kidney injury and mortality in hospitalized patients. *Am J Nephrol* 2012; 35:349-55.
24. Venkataraman R, Kellum JA. Defining Acute Renal Failure: the RIFLE Criteria. *J. Intensive Care Med* 2007; 22:187-93.
25. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P. Acute Dialysis Quality Initiative workgroup. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care* 2004; 8:R204-12.
26. Kellum JA, Ronco C, Mehta R, Bellomo R. Consensus development in acute renal failure: The Acute Dialysis Quality Initiative. *Curr Opin Crit Care* 2005; 11:527-32.
27. Bell M, Liljestam E, Granath F, Fryckstedt J, Ekblom A, Martling CR. Optimal follow-up time after continuous renal replacement therapy in actual renal failure patients stratified with the RIFLE criteria. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20:354-60.
28. Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. *N Engl J Med* 1996; 334:1448-60.
29. Basile DP, Anderson MD, Sutton TA. Pathophysiology of acute kidney injury. *Compr Physiol* 2012; 2:1303-53.
30. Saulo Klahr S, Miller SB. Acute Oliguria. *N Engl J Med* 1998; 338:671-5.

31. Magden K, Yildirim I, Kutu ME, i sur. Recovery process in patients followed-up due to acute kidney injury. *Hippokratia* 2013; 17:239-42.
32. Kes P. Hemodijaliza: prošlost i sadašnjost. *Medicus* 2001; 10:269-82.
33. Kes P, Ljutić D, Bašić-Jukić N, Brunetta B. Indikacije za kontinuirano nadomještanje bubrežne funkcije. *Acta Med Croatica* 2003; 57:71-5.
34. Kes P, Ljutić D. Kontinuirano nadomještanje bubrežne funkcije. Poslijediplomski tečaj stalnog medicinskog usavršavanja I.kategorije. Zagreb, 2007:7-25.
35. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney int Suppl.* 2013; 3:1-150.
36. [www.era-edta-reg.org/](http://www.era-edta-reg.org/)
37. <http://www.hdndt.org/registar/hrvatski-registar-nadomjestanja-bubrezne-funkcije.html>
38. Cvitković A, Vuković Lela I, Edwards K, i sur. Could disappearance of endemic (Balkan) nephropathy be expected in forthcoming decades. *Kidney Blood Press Res* 2012; 35:147-52.
39. Levey AS, Atkins R, Coresh J. Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. *Kidney Int* 2007; 72:247-59.
40. Steddon S. Ashman N. Chesser A. Cunningham J. Oxford handbook of nephrology and hypertension. Oxford: Oxford University Press; 2012, str. 144-5.
41. Galešić K, Sabljarić Matovinović M. Kronična insuficijencija bubrega. U: Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B, ur. *Interna medicina*. Zagreb: Naklada Ljevak; 2008, str: 1087-91.
42. Kes P, Ljutić D. Cardiovascular risk factors in end-stage renal disease. *Acta Med Croat* 1998; 52(Suppl 1):1-10.
43. Kes P, Druško Đ, Šefer S. The natural history of myocardial disease in end-stage renal failure. *Acta Clin Croat* 1998; 37:41-50.
44. Kes P, Druško Đ. Haemodialysis-associated cardiac arrhythmias. 5th European Meeting on cardioneurology, Asisi, Cardio-Renal 1995; 3:283-6.
45. Raggi P, Boulay A, Chasan-Taber S, i sur. Cardiac calcification in adult hemodialysis patients. A link between end-stage renal disease and cardiovascular disease? *J Am Coll Cardiol* 2002; 39:695-701.
46. Clinical practice guidelines for nutrition in chronic renal failure. KDOQI, National Kidney Foundation. *Am J Kidney Dis* 2000; 35:S1-140.

47. Adequacy of dialysis and nutrition in continuous peritoneal dialysis: association with clinical outcomes. Canada-USA (CANUSA) Peritoneal Dialysis Study Group. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7:198-207.
48. Jansen MAM, Korevaar JC, Dekker FW, Jager KJ, Boeschoten EW, Krediet RT. Renal function and nutritional status at the start of chronic dialysis treatment. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:157-63.
49. Stenvinkel P, Heimbürger O, Paulter F, *i sur.* Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int* 1999; 55:1899-1911.
50. Kerr PG, Strauss BJ, Atkins RC. Assessment of the nutritional state of dialysis patients. *Blood Purif* 1996; 14:382-7.
51. Kes P. Significance of correction of renal anaemia with erythropoietin in haemodialyzed patients. *Acta Med Croat* 2005; 59:148-54.
52. NKF-DOQI clinical practice guidelines for the treatment of anemia of chronic renal failure. National Kidney Foundation-Dialysis Outcomes Quality Initiative. *Am J Kidney Dis* 1997; 30:S192-240.
53. Mahoney CA, Arieff AI. Uremic encephalopathies: clinical, biochemical, and experimental features. *Am J Kidney Dis* 1982; 2:324-36.
54. Klag MJ, Whelton PK, Randall BL, Neaton JD, Brancati FL, Stamler J. End-stage renal disease in African-American and white men. 16-year MRFIT findings. *JAMA* 1997; 277:1293-8.
55. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, *i sur.* Task Force Members. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens* 2013; 31:1281-357.
56. Appel LJ, Wright JT Jr, Greene T, *i sur.* Intensive blood-pressure control in hypertensive chronic kidney disease. *N Engl J Med* 2010; 363:918-29.
57. Heerspink HJ, Ninomiya T, Zoungas S, *i sur.* Effect of lowering blood pressure on cardiovascular events and mortality in patients on dialysis: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Lancet* 2009; 373:1009-15.
58. Lea J, Greene T, Hebert L, *i sur.* The relationship between magnitude of proteinuria reduction and risk of end-stage renal disease: results of the African American study of kidney disease and hypertension. *Arch Intern Med* 2005; 165:947-53.
59. Kunz R, Friedrich C, Wolbers M, Mann JF. Meta-analysis: effect of monotherapy and



- combination therapy with inhibitors of the renin angiotensin system on proteinuria in renal disease. *Ann Intern Med* 2008; 148:30–48.
60. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Lipid Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Lipid Management in Chronic Kidney Disease. *Kidney Int* 2013; 3:259–305.
61. Tattersall J, Dekker F, Heimbürger O, i sur. ERBP Advisory Board. When to start dialysis: updated guidance following publication of the Initiating Dialysis Early and Late (IDEAL) study. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26:2082-6.
62. Gokal R, Khanna R, Krediet Rth, Nolph KD. *Textbook of Peritoneal Dialysis*. 2nd ed. Dordrecht: Cluwer Academic Publisher; 2000, str.1-17.
64. Ryckelynck JP, Abbadie O, Castrale C, Lavainne F, Fakhouri F, Lobbedez T. Why and how to promote peritoneal dialysis? *Presse Med* 2011; 40:1053-8.
65. Cruz DN. Peritoneal dialysis-from basic concepts to clinical excellence. *Contrib Nephrol* 2009; 163:155-60.
66. Laupacis A, Keown P, Pus N, i sur. A study of the quality of life and cost-utility of renal transplantation. *Kidney Int* 1996; 50:235-42.
67. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, i sur. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 1999; 341:1725-30.
68. N. Bašić-Jukić, Bubić-Filipi Lj, Lovčić V, Ratković I, Kes P. Povezanost virusnih bolesti i tumora nakon transplantacije bubrega. *Acta Med Croatica* 2011; 65:355-9.
69. Danovitch GM. *Handbook of Kidney transplantation*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2009.
70. American Diabetes Association. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. *Diabetes Care* 2004; 27:S5-S10.
71. <http://www.who.int/diabetes/en/>
72. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995- 2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998; 21:1414-31.
73. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27:1047-53.
74. Creager MA, Lüscher TF, Cosentino F, Beckman JA. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation* 2003; 108:1527-32.

75. Pavlić RI. Dijagnostika i liječenje šećerne bolesti tip 1. *Medix* 2009; 15:100-6.
76. Krochik AG, Mazza CS, Valdez SN, i sur. Immunologic and genetic markers in insulin-dependent diabetes mellitus (type 1) in an Argentine population. *Medicina (B Aires)* 2001; 61:279-83.
77. Scheen AJ. Pathophysiology of type 2 diabetes. *Acta Clin Belg* 2003; 58:335-41.
78. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005; 54: 1615-25.
79. Huopio H, Hakkarainen H, Pääkkönen M, i sur. Long-term changes in glucose metabolism after gestational diabetes: a double cohort study. *BMC Pregnancy Childbirth* 2014; 14:296.
80. Johnson NP. Metformin use in women with polycystic ovary syndrome. *Ann Transl Med* 2014; 2:56.
81. Rafacho A, Ortsäter H, Nadal A, Quesada I. Glucocorticoid treatment and endocrine pancreas function: implications for glucose homeostasis, insulin resistance and diabetes. *J Endocrinol* 2014; 223:R49-R62.
82. Donadille B, D'Anella P, Auclair M, i sur. Partial lipodystrophy with severe insulin resistance and adult progeria Werner syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2013; 8:106.
83. Creighton Mitchell T, McClain DA. Diabetes and hemochromatosis. *Curr Diab Rep* 2014; 14:488.
84. Willi C, Bodenmann P, Ghali WA, Faris PD, Cornuz J. Active smoking and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2007; 298: 2654-64.
85. Manson JE, Ajani UA, Liu S, Nathan DM, Hennekens CH. A prospective study of cigarette smoking and the incidence of diabetes mellitus among US male physicians. *Am J Med* 2000; 109:538-42.
86. Chiolero A, Faeh D, Paccaud F, Cornuz J. Consequences of smoking for body weight, body fat distribution, and insulin resistance. *Am J Clin Nutr* 2008; 87:801-9.
87. de Boer IH, Rue TC, Cleary PA, i sur. Long-term renal outcomes of patients with type 1 diabetes mellitus and microalbuminuria: an analysis of the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications cohort. *Arch Intern Med* 2011; 171:412-20.
88. Maletkovic J, Drexler A. Diabetic ketoacidosis and hyperglycemic hyperosmolar state. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2013; 42:677-95.
89. Umpierrez GE, Kitabchi AE. Diabetic ketoacidosis: risk factors and management

- strategies. *Treat Endocrinol* 2003; 2:95-108.
90. Chiasson JL, Aris-Jilwan N, Bélanger R, i sur. Diagnosis and treatment of diabetic ketoacidosis and the hyperglycemic hyperosmolar state. *CMAJ* 2003; 168:859–66.
91. Gouni-Berthold I, Krone W. Diabetic ketoacidosis and hyperosmolar hyperglycemic state. *Med Klin (Munich)* 2006; 101:100-5.
92. Lalau JD. Lactic acidosis induced by metformin: incidence, management and prevention. *Drug Saf* 2010; 33:727-40.
93. Kalra S, Mukherjee JJ, Venkataraman S, i sur. Hypoglycemia: The neglected complication. *Indian J Endocrinol Metab* 2013; 17:819-34.
94. KDOQI. Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Diabetes and Chronic Kidney Disease. *Am J Kidney Dis* 2007; 49:S12-154.
95. Bakris GL. Overview of diabetic nephropathy. <http://www.uptodate.com/>
96. Kimmelstiel P, Wilson C. Benign and malignant hypertension and nephrosclerosis. A clinical and pathological study. *Am J Pathol* 1936; 12:45-8.
97. Van Buren, Toto R. Current Update in the management of diabetic nephropathy. *Curr Diabetes Rev* 2013; 9:62-77.
98. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Kidney Disease Outcome Quality Initiative. Am J Kidney Dis* 2002; 39 (Suppl1):1-266.
99. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414:813-20.
100. Nagy T, Miseta A, Kovacs GL. Protein-associated O-GlcNAc, a multifunctional mechanism in cell signaling and its role in the pathogenesis of diabetes, stress and malignant diseases. *Biochem Med* 2007; 17:162-77.
101. Yanagita M. Inhibitors/antagonists of TGF- $\beta$  system in kidney fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27:3686-91.
102. Langham RG, Kelly DJ, Cox AJ, i sur. Proteinuria and the expression of the podocyte slit diaphragm protein, nephrin, in diabetic nephropathy: effects of angiotensin converting enzyme inhibition. *Diabetologia* 2002; 45:1572-6.
103. Doublier S, Salvidio G, Lupia E, i sur. Nephrin expression is reduced in human diabetic nephropathy: evidence for a distinct role for glycated albumin and angiotensin II. *Diabetes* 2003; 52:1023-30.
104. Kes P, Bašić-Jukić N. Dijabetička nefropatija. *Medix* 2009; 149-57.

105. Tervaert TWC, Mooyaart AL, Amann K, i sur. On behalf of the Renal pathology Society. Pathologic Classification of Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21:556-63.
106. Magee GM, Bilous RW, Cardwell CR, Hunter SJ, Kee F, Fogarty DG. Is hyperfiltration associated with the future risk of developing diabetic nephropathy? A meta-analysis. *Diabetologia* 2009; 52:691-7.
107. Moriya T, Tanaka S, Kawasaki R, i sur. Japan Diabetes Complications Study Group. Diabetic retinopathy and microalbuminuria can predict macroalbuminuria and renal function decline in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2013; 36:2803-9.
108. Perkins BA, Ficociello LH, Ostrander BE, i sur. Microalbuminuria and the risk for early progressive renal function decline in type 1 diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:1353-61.
109. Perkins BA, Ficociello LH, Silva KH, Finkelstein DM, Warram JH, Krolewski AS. Regression of microalbuminuria in type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2003; 348:2285–93.
110. UK Prospective Diabetes Study Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998; 352:837-53.
111. The ADVANCE Collaborative Group. Intensive Blood Glucose Control and Vascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2008; 358:2560-72.
112. The Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008; 358:2545-59.
113. Coppelli A, Giannarelli R, Vistoli F, i sur. The beneficial effects of pancreas transplant alone on diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 2005; 28:1366-70.
114. Fioretto P, Sutherland DER, Najafian B, Mauer M. Remodeling of renal interstitial and tubular lesions in pancreas transplant recipients. *Kidney Int* 2006; 69:907-12.
115. Adler AI, Stratton IM, Neil HAW, i sur. Association of systolic blood pressure with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 36): prospective observational study. *BMJ* 2000; 321:412-9.
116. Berl T, Hunsicker LG, Lewis JB, i sur. Impact of achieved blood pressure on cardiovascular outcomes in the Irbesartan Diabetic Nephropathy Trial. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:2170-9.
117. Perico N, Benigni A, Remuzzi G. Present and future drug treatments for chronic kidney diseases: evolving targets in renoprotection. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7:936-53.
118. Jacobsen P, Andersen S, Rossing K, Jensen BR, Parving HH. Dual blockade of the

- renin-angiotensin system versus maximal recommended dose of ACE inhibition in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2003; 63:1874-80.
119. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, i sur. Task Force Members. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens* 2013; 31:1281-357.
120. Kes P, i Ljutić D. Hrvatsko društvo za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju. Smjernice za liječenje anemije u bolesnika s kroničnim zatajenjem bubrega. Zagreb: TIPKO, 2008, str. 1-24.
121. KDOQI Clinical Practice Guideline and Clinical Practice Recommendations for Anemia in Chronic Kidney Disease: 2007 Update of Hemoglobin Target. *Am J Kidney Dis* 2007 ;50: 471-530.
122. Sibley SD, Hokanson JE, Steffes MW, i sur. Increased small dense LDL and intermediate-density lipoprotein with albuminuria in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 1999;22:1165-70.
123. Kes P, Reiner Ž, Brunetta B. Poremećaji lipoproteina u kroničnom zatajenju bubrega, nefrotskom sindromu i dijalizi. *Lijec Vjesn* 2002; 124:372-7.
124. de Zeeuw D, Agarwal R, Amdahl M, i sur. Selective vitamin D receptor activation with paricalcitol for reduction of albuminuria in patients with type 2 diabetes (VITAL study): a randomised controlled trial. *Lancet* 2010; 376:1543-51.
125. Pergola PE, Raskin P, Toto R, i sur. Bardoxolone Methyl and Kidney Function in CKD with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2011; 365:327-36.
126. Packham DK, Wolfe R, Reutens AT, i sur. Sulodexide fails to demonstrate renoprotection in overt type 2 diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23:123-30.
127. de Brito-Ashurst I, Varagunam M, Raftery MJ, Yaqoob MM. Bicarbonate supplementation slows progression of CKD and improves nutritional status. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20:2075-84.
128. Chen D, Zhao M, Myndy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004; 22:233-41.
129. Urist MR. Bone: Formation by autoinduction. *Science* 1965; 150:893-9.
130. Weiskirchen R, Meurer SK. BMP-7 counteracting TGF-beta<sub>1</sub> activities in organ fibrosis. *Front Biosc* 2013; 18:1407-34.
131. Bailly S. Vascular signaling pathway with therapeutic applications. *Bone morphogenetic*

- proteins. U: Feige J.J, Pages G, Fabrice S. Molecular mechanisms of angiogenesis: From ontogenesis to oncogenesis. Paris: Springer-Verlag France; 2014, str.100.
132. Rao SM, Ugale GM, Warad SB. Bone morphogenetic proteins: periodontal regeneration. *N Am J Med Sci* 2013; 5:161-8.
133. Lin HY, Wang XF, Ng-Eaton E, Weinberg RA, Lodish HF. Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* 1992; 68:775–85.
134. Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem* 2010; 147:35-51.
135. Eileen M. Shore EM, Kaplan FS. Inherited human diseases of heterotopic bone formation. *Nat Rev Rheumatol* 2010; 6:518-27.
136. Kingsley DM. The TGF- $\beta$  superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 1994; 8:133-46.
137. Griffith DL, Keck PC, Smpath TK, Rueger DC, Carlson WD. Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: Structural paradigm for the transforming growth factor  $\beta$  superfamily. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93:878-83.
138. Markić D, Celić T, Spanjol J, Grsković A, Bobinac D, Fuckar Z. Expression of bone morphogenetic protein-7, its receptors and Smad1/5/8 in normal human kidney and renal cell cancer. *Coll Antropol* 2010; 34 Suppl 2:149-53.
139. Simon M, Maresh JG, Harris SE, i sur. Expression of bone morphogenetic protein-7 mRNA in normal and ischemic adult rat kidney. *Am J Physiol* 1999; 276:382-9.
140. Helder MN, Ozkaynak E, Sampath KT, i sur. Expression pattern of osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in human and mouse development. *J Histochem Cytochem* 1995; 43:1035-44.
141. Dudley AT, Lyons KM, Robertson EJ. A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev* 1995; 9:2795–807.
142. Luo G, Hofmann C, Bronckers A, Sohocki M, Bradley A, Helder MN, Ozkaynak E, Sampath KT, i sur. Expression pattern of osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in human and mouse development. *J Histochem Cytochem* 1995; 43:1035-44.
143. Hruska KA, Guo G, Wozniak M, i sur. Osteogenic protein-1 prevents renal fibrogenesis associated with ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279:F130–F143.
144. Vukicevic S, Basic V, Rogic D, i sur. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) reduces severity of injury after ischaemic acute renal failure in rat. *J Clin Invest*

1998; 102:202-14.

145. Zeisberg M, Bottiglio C, Kumar N, i sur. Bone morphogenic protein-7 inhibits progression of chronic renal fibrosis associated with two genetic mouse models. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285:F1060-7.

146. Basic-Jukic N, Hudolin T, Radic-Antolic M, i sur. Bone morphogenic protein-7 expression is downregulated in human clear cell renal carcinoma. *J Nephrol* 2011; 24:91-7.

147. Wang SN, Lapage J, Hirschberg R. Loss of tubular bone morphogenic protein-7 in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:2392-99.

148. Wang S, Chen Q, Simon TC i sur. Bone morphogenic protein-7 (BMP-7), a novel therapy for diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2003; 63:2037-49.

149. Wang S, de Caestecker M, Kopp J, Mitu G, Lapage J, Hirschberg R. Renal bone morphogenic protein-7 protects against diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17:2504-12.

150. Turk T, Leeuwis JW, Gray J, i sur. BMP signaling and podocyte markers are decreased in human diabetic nephropathy in association with CTGF overexpression. *J Histochem Cytochem* 2009; 57:623-31.

151. Nguyen TQ, Roestenberg P, van Nieuwenhoven FA, i sur. CTGF inhibits BMP-7 signaling in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19:2098-107.

152. Bidwell DE, Buck AA, Diesfeld HJ. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Bull World Health Organ* 1976; 54:129-39.

153. Key M. Immunohistochemistry Staining Methods. U: Kumar GL, Rudbeck L, ur. Education Guide: Immunohistochemical (IHC) Staining Methods. 5th ed. California: Dako North America; 2009. str. 57-60.

154. Morrissey J, Hruska K, Guo G, Wang S, Chen Q, Klahr S. Bone morphogenic protein-7 improves renal fibrosis and accelerates the return of renal function. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:S14-S21.

155. Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, i sur. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* 2003; 9:964-8.

156. Izzedine H, Bodagh B, Launay-Vacher V, Deray G. Eye and Kidney: From Clinical Findings to Genetic Explanations. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:516-29.

157. Akdoğan MF, Azak A, Huddam B, i sur. Influence of Bone Morphogenic Protein 7 (BMP7) on the Progression of Chronic Kidney Diseases. *J Nephrol Urol Res* 2014; 2:1-8.

158. Denizli N, Azak A, Şakacı M, i sur. Bone morphogenetic protein-7 and disease progression in renal amyloidosis patients. *Ren Fail* 2013; 35:1112-5.
159. Fornalczyk K, Musiał K, Szczepańska M, Zwolinska D. Osteopontin, platelet-derived growth factor and bone morphogenetic protein-7 in children with chronic kidney disease on renal replacement therapy--preliminary results. *Pol Merkur Lekarski* 2009; 26:286-9.
160. Zhang M, Sara JD, Wang FL i sur. Increased plasma BMP-2 levels are associated with atherosclerosis burden and coronary calcification in type 2 diabetic patients. *Cardiovasc Diabetol* 2015; 24:4:64.
161. Rocher C, Singla DK. SMAD-PI3K-Akt-mTOR pathway mediates BMP-7 polarization of monocytes into M2 macrophages. *PLoS One* 2013; 20;8:e84009.
162. Wang S, Hirschberg R. Bone morphogenetic protein-7 signals opposing transforming growth factor beta in mesangial cells. *J Biol Chem* 2004; 279:23200-6.
163. Wang S, Hirschberg R. BMP7 antagonizes TGF-beta-dependent fibrogenesis in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284:F1006-F1013.
164. Yabe T, Samuels I, Schwartz JP. Bone morphogenetic proteins BMP-6 and BMP-7 have differential effects on survival and neurite outgrowth of cerebellar granule cell neurons. *J Neurosci Res* 2002; 68:161-8.
165. Schiffer M, Bitzer M, Roberts IS, i sur. Apoptosis in podocytes induced by TGF-beta and Smad7. *J Clin Invest* 2001;108:807-16.



## **11. ŽIVOTOPIS**

Renata Ivanac Janković, dr.med., specijalist interne medicine, rođena je 14.2.1977. godine u Pakracu. Nakon završene osnovne škole u Daruvaru i srednje Medicinske škole u Bjelovaru, diplomirala je s vrlo dobrim uspjehom na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, u roku, 16. svibnja 2002. godine.

Nakon položenog stručnog ispita u srpnju 2003. godine, u prosincu iste godine započinje specijalizaciju iz interne medicine, a specijalistički ispit s odličnim uspjehom polaže u ožujku 2008. godine. Od 2013.-2015. godine na subspecijalizaciji je iz nefrologije. Doktorski poslijediplomski studij „Biomedicina i zdravstvo“ završila je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Autor je i koautor više znanstvenih radova. Član je Hrvatskog liječničkog zbora i Hrvatskog društva za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju. Udata je i majka jednog sina.