

UNIVERZA V MARIBORU
MEDICINSKA FAKULTETA



Univerza v Mariboru

Medicinska fakulteta

DOKTORSKA DISERTACIJA

**Pomen izbranih genskih polimorfizmov pri nastanku diabetične
ledvične bolezni pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2**

MAJA ŠERUGA

JULIJ 2018

UNIVERZA V MARIBORU
MEDICINSKA FAKULTETA



Univerza v Mariboru

Medicinska fakulteta

DOKTORSKA DISERTACIJA

**Pomen izbranih genskih polimorfizmov pri nastanku diabetične
ledvične bolezni pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2**

MAJA ŠERUGA

Mentor: redni prof. dr. Danijel Petrovič

Somentor:izr. prof. dr. Robert Ekart

JULIJ 2018

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	4
ABSTRACT	6
SEZNAM KRAJŠAV	8
1. UVOD	9
1.1 SLADKORNA BOLEZEN	12
1.2 DIABETIČNA NEFROPATIJA ALI DIABETIČNA LEDVIČNA BOLEZEN	14
1.3 GENSKI POLIMORFIZMI IN DLB	22
2. NAMEN IN HIPOTEZA RAZISKAVE	26
3. PREISKOVANCI IN METODE RAZISKAVE	27
3.1 PREISKOVANCI	27
3.2 BIOKEMIČNE IN URINSKE LABORATORIJSKE PREISKAVE	27
3.3 MOLEKULARNOGENETSKA ANALIZA	28
3.4 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV	30
4. REZULTATI	31
4.1 KLINIČNE IN BIOKEMIJSKE ZNAČILNOSTI PREISKOVANCEV	31
4.2 GENSKA ANALIZA PREISKOVANCEV	33
4.2.1 POLIMORFIZMA RS4340 IN RS 4341, V GENU ZA AK	33
4.2.2 POLIMORFIZMI RS699 IN RS4762 V GENU ZA ANGIOTENZINOGEN (AGT)	34
4.2.3 POLIMORFIZMI RS275651, RS931490, RS5186 IN RS5182 V GENU ZA RECEPTOR 1 ZA ANGIOTENZIN I1 (AGTR1)	35
4.2.4 POLIMORFIZMI RS3087459, RS5370, RS1476046 V GENU ZA ENDOTELIN 1 (EDN1)	37
4.2.5 POLIMORFIZEM RS3802278 V GENU ZA ALOX5AP IN POLIMORFIZEM RS12762303 V GENU ZA ALOX5	38
5. RAZPRAVA	40
5.1 KLINIČNE IN BIOKEMIJSKE ZNAČILNOSTI BOLNIKOV S SB2 IN DIABETIČNO LEDVIČNO BOLEZNIJO	40
5.2 GENSKI POLIMORFIZMI IN DIABETIČNA LEDVIČNA BOLEZEN	42
5.2.1 POVEZAVA MED POLIMORFIZMOMA RS4340 (INSERCIJA/DELECIJA) IN RS4341 V GENU ZA ANGIOTENZINSKO KONVERTAZO IN DIABETIČNO LEVIČNO BOLEZNIJO	42
5.2.2 POVEZAVA MED POLIMORFIZMOMA RS699 IN RS4762 V GENU ZA ANGIOTENZINOGEN (AGT) IN DIABETIČNO LEVIČNO BOLEZNIJO	44
5.2.3 POVEZAVA MED POLIMORFIZMI RS275651, RS931490, RS5182 IN RS5186 V GENU ZA RECEPTOR TIPA 1 ZA ANGIOTENZIN II IN DIABETIČNE LEDVIČNE BOLEZNI	45
5.2.4 POVEZAVA MED POLIMORFIZMI RS3087459, RS5370, RS1476046 V GENU ZA ENDOTELIN 1 IN DIABETIČNO LEDVIČNO BOLEZNIJO	47
5.2.5 POVEZAVA MED POLIMORFIZMOM RS3802278 V GENU ZA ALOX5AP IN POLIMORFIZMOM RS12762303 V GENU ZA ALOX5 IN DIABETIČNO LEDVIČNO BOLEZNIJO	48
5.3 POMANJKLJIVOSTI RAZISKAVE	50
6. ZAKLJUČKI	53
7. LITERATURA	55
8. ČLANKI KOT DEL DOKTORSKE NALOGE	65
9. PRILOGE	66
9.1 ŽIVLJENJEPIS	66
9.2 ZAHVALA	67
9.3 IZJAVA DOKTORSKEGA KANDIDATA	69

KAZALO TABEL

Tabela 1: Klasifikacija KLB (Slovenske smernice za klinično obravnavo sladkorne bolezni tipa 2, leto 2016).....	17
Tabela 2: Klinične in biokemijske značilnosti preiskovancev vključenih v raziskavo	32
Tabela 3: Razporeditev genotipov in alelov polimorfizma rs4340 in rs4341 v genu za AK pri preiskovancih s SB2 in z DLB (primeri) ter preiskovancih s SB2 in brez znakov DLB (kontrola)..	33
Tabela 4: Povezava genotipov polimorfizmov rs4340 in rs4341 v genu za AK z DLB pri preiskovancih s SB2	34
Tabela 5: Razporeditev genotipov in alelov polimorfizmov rs699 in rs4762 v genu za angioten-zinogen (AGT) pri preiskovancih s SB2 in z DLB (primeri) ter preiskovancih s SB2 in brez znakov DLB (kontrola).....	34
Tabela 6: Povezava genotipov polimorfizmov rs699 in rs4762 v genu za AGT z DLB pri preiskovancih s SB2	35
Tabela 7: Razporeditev genotipov in alelov polimorfizmov rs275651, rs931490, rs5182, in rs5186 v genu za AGTR1 pri preiskovancih s SB2 in z DLB (primeri) ter preiskovancih s SB2 in brez znakov DLB (kontrola)	36
Tabela 8: Povezava genotipov polimorfizmov rs275651, rs931490, rs5182 in rs5186 v genu za AGTR1 z DLB pri preiskovancih s SB2	37
Tabela 9: Razporeditev genotipov in alelov polimorfizmov rs3087459, rs5370 in rs1476046 v genu za EDN1 pri preiskovancih s SB2 in z DLB (primeri) ter preiskovancih s SB2 in brez znakov DLB ..	37
Tabela 10: Povezava genotipov polimorfizmov rs3087459, rs5370 in rs1476046 v genu za EDN1 z DLB pri preiskovancih s SB2	38
Tabela 11: Razporeditev genotipov in alelov polimorfizma rs3803278 v genu za ALOX5AP in polimorfizma rs12762303 v genu za ALOX5 pri preiskovancih s SB2 in z DLB (primeri) ter preiskovancih s SB2 in brez znakov DLB (kontrola).....	38
Tabela 12: Povezava polimorfizma rs12762303 v genu za ALOX5 in polimorfizma rs3803278 v genu za ALOX5AP z DLB pri preiskovancih s SB2	39

KAZALO SLIK

Slika 1: RAAS sistem in njegov fiziološki vpliv (Prerejeno: Gard R. <i>Int J Mol Epidemiol Genet</i> 2010; 12: 145-157).....	10
Slika 2: Različno delovanje antiglikemičnih zdravil in njihova zaščitna vloga pri obolenju ledvic (Kinaan M, Ding H, Triggle CR. <i>Metformin: An old drug for the treatment of diabetes but a new drug for the protection of the endothelium, Med Princ Pract</i> 2015).	19
Slika 3: Vloga genetike in epigenetike v patogenezi zapletov sladkorne bolezni (<i>Genetics of cardiovascular and renal complication in diabetes. J Diabetes Investigation</i> 2016).	25
Slika 4: Genski dejavniki in dejavniki okolja, ki vplivajo na razvoj DLB (Slika je prirajena po: Shiro Maeda. <i>Do inflammatory cytokine genes confer susceptibility to diabetic nephropathy? Kidney International</i> 2008; 74: 413-415).	51

POVZETEK

Sladkorna bolezen (SB) je kronična presnovna motnja, ki jo opredeljuje stalno povečana vrednost glukoze v krvi, imenovana hiperglikemija. Bolezen je povezana s kroničnimi zapleti na tarčnih organih, kot so oči, ledvice, živci, srce in ožilje. SB je velika javnozdravstvena težava, saj za to boleznijo zbolijo vse več ljudi.

Diabetična nefropatija (DN – izraz, ki ga bolj uporabljamo za biopsijsko dokazano prizadetost ledvic zaradi SB) ali diabetična ledvična bolezen je kronični zaplet pri SB. Proteinurija, povišan krvni tlak in postopen upad ledvične funkcije ob visoki srčno-žilni obolevnosti in umrljivosti so glavne značilnosti razvite diabetične nefropatije pri SB. Okoli 30 do 50% bolnikov razvije klinično očitno DN, vendar ne vemo, kateri bolniki jo bodo razvili in kateri ne.

Pravimo, da je DLB večvzročna bolezen in do zdaj so ugotovili, da je v patogenezo okvare ledvice vključenih več genov. Študije o genskem polimorfizmu pri DLB izvajamo z namenom, da bi odkrili gene, ki bi služili kot biomarkerji, in bi na podlagi teh odkritij lahko razvijali terapevtske smernice, s katerimi bi lahko zavrli ali preprečili komplikacije sladkorne bolezni, kot je DLB. Poleg genov v razvoju bolezni igrajo pomembno vlogo tudi dejavniki okolja. Znano je, da so ti genski polimorfizmi pri DLB tudi različno razporejeni glede na etnično pripadnost.

Namen naše retrospektivne asociacijske raziskave je bil poiskati povezavo med izbranimi kandidatnimi geni in DLB pri Slovencih s SB2, ki so del kavkaške populacije.

V raziskavo smo vključili 651 bolnikov s SB2, ki so imeli bolezen že najmanj 10 let. Preiskovanci so bili slovenskega rodu in so ob vstopu v študijo izpolnili vprašalnik z anamnestičnimi podatki. Odvzeti so bili vzorci krvi za molekularno-genetske in biokemijske preiskave ter vzorci prvega jutranjega urina. Za ocenitev ledvične funkcije smo uporabili MDRD enačbo in s-cistatin. Na ta način smo dobili dve skupini bolnikov, in sicer 276 bolnikov z DLB in 375 bolnikov brez DLB, ki so služili kot kontrola.

Testirali smo naslednje polimorfizme: polimorfizma rs4340 in rs4341 v genu za angiotenzinsko konvertazo (AK), polimorfizma rs699 in rs4762 v genu za angiotenzinogen (AGT), polimorfizme rs275651, rs931490, rs5182 in rs5186 v genu za receptor tipa 1 za angiotenzin II (AGTR1), polimorfizme rs3087459, rs5370, rs1476046 v genu za endotelin 1 (EDN1), polimorfizem rs3802278 v genu za 5-lipoksigenazo-aktivirajoči proteini (ALOX5AP) in polimorfizem rs12762303 v genu za arahidonat 5-lipoksigenazo (ALOX5).

Raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko decembra 2011, preiskovanci pa so ob vstopu v raziskavo dali pismeno privolitev.

Med demografskimi in biokemičnimi kazalniki je bila statistično pomembna razlika ugotovljena v trajanju povišanega krvnega pritiska ($p = 0,02$), posebej sistolične vrednosti ($p < 0,001$), v anamnezi

prebolelih srčno-žilnih dogodkov, v prisotnosti diabetične retinopatije (DR) in diabetične noge (DN) v skupini preiskovancev z DLB. Biokemijske preiskave krvi so pokazale statistično pomembno višje ravni glikoliziranega hemoglobina (HbA_{1c}), glikemije na tešče, trigliceridov in cistatina C v serumu v skupini bolnikov s SB2 in z DLB v primerjavi s kontrolno skupino. Cistatin C je bil boljši označevalec okvare ledvične funkcije kot oGF (MDRD enačba ml/l) in je bil statistično višji pri bolnikih s SB2 in z DLB ($p < 0,001$).

Rezultati niso pokazali statistično pomembne povezave med polimorfizmi rs4340 in rs4341 v genu za angiotenzinsko konvertazo (AK), polimorfizmi rs699 in rs4762 v genu za angiotenzinogen (AGT), polimorfizmi rs275651, rs931490, rs5182 in rs5186 v genu za receptor tipa 1 za angiotenzin II (AGTR1), polimorfizmi rs3087459, rs5370, rs1476046 v genu za endotelin 1 (EDN1) in polimorfizmu rs12762303 v genu za arahidonat 5-lipoksigenazo (ALOX5) in DLB.

Nasprotno pa smo ugotovili statistično pomembno povezavo med polimorfizmom rs3802278 v genu za 5-lipoksigenazo-aktivirajoči proteini (ALOX5AP) in DLB. Rezultati logistične regresije so pokazali, da imajo posamezniki z genotipom CC 3,14-krat večjo verjetnost za pojav DLB, v primerjavi s posamezniki z genotipom TT. Torej je genotip CC polimorfizma rs3803278 v genu za *ALOX5AP* možni dejavnik tveganja za pojav DLB.

Na podlagi molekularnogenetskih raziskav izbranih polimorfizmov lahko trdimo, da smo med Slovenci s SB2 našli povezavo med polimorfizmom rs3803278 gena *ALOX5AP* in DLB. Ta polimorfizem bi lahko v prihodnosti služil kot genetski marker pri DLB, vendar je za dokaz naše hipoteze potrebnih še več študij, mogoče na več preiskovancih.

Ključne besede: sladkorna bolezen, diabetična ledvična bolezen, genski polimorfizmi

ABSTRACT

Role of selected gene polymorphisms in the development of diabetic kidney disease in patients with type 2 diabetes mellitus

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a chronic metabolic disease characterised by prolonged hyperglycaemia. It is associated with several complications and damage to target organs, such as eyes, kidneys, nerves, heart and vessels. The number of patients with T2DM is increasing, and it is becoming a major public health problem.

Diabetic nephropathy (DN) is one of the microvascular complications of T2DM. The main characteristics of established diabetic nephropathy are proteinuria, high blood pressure and a gradual decline in renal function, together with increased morbidity and mortality due to cardiovascular complications. 30-50% of patients with T2DM will develop clinically evident DN, however, it is not possible to predict at present which patients are at higher risk.

DN is a multifactorial disease with environmental and genetic factors involved in its pathogenesis. Multiple genes are involved in developing DN and its distribution depends, amongst other things, on ethnicity. The main purpose of recognising different genes is to find the ones which can identify groups of patients with T2DM who are more likely to develop DN. This can be used as a marker for screening patients with T2DM and focusing on those groups which would benefit from intensive intervention to prevent or slow down complications, such as DN.

The main purpose of our retrospective study was to establish a connection between the selected groups of genes in Slovenian patients with T2DM and DN.

We selected 651 Slovenian patients with T2DM of at least 10 years duration. All patients had blood tests for genetic and biochemical markers and had their first morning urine sample tested as well. The glomerular filtration rate was estimated using the MDRD equation and cystatin C. We divided patients into two groups: 276 patients had confirmed DN and 375 patients were without clinical signs of DN, the latter acting as the control group.

We tested for the following gene polymorphisms: polymorphisms rs4340 and rs4341 in the gene for angiotensin-converting enzyme (ACE), polymorphisms rs699 and 4762 in the gene for angiotensinogen, polymorphisms rs275651, rs931490, rs5182 and rs5186 in the gene for angiotensin II receptor type 1 (AGTR1), polymorphisms rs3087459, rs5370, rs1476046 in the gene for endothelin 1, polymorphism rs3802278 in the gene for 5-lipoxygenase-activating protein (ALOX5AP), and polymorphism rs12762303 in the gene for arachidonate 5-lipoxygenase (ALOX5).

The study was approved by the National Medical Ethics Committee in December 2011. All patients were informed and a written consent was obtained for their participation in the study.

There were important statistical differences in demographic and biochemical factors between the two groups of patients. Patients with DN had a higher blood pressure ($p = 0.02$), particularly systolic blood pressure ($p < 0.001$). They were more likely to have a history of cardiovascular diseases, diabetic retinopathy and diabetic foot. Patients with DN had higher levels of glycosylated haemoglobin (HbA1c), fasting blood glucose, triglycerides and cystatin C in the serum compared to the control group. Cystatin C in the serum was better for the estimation of renal function than the MDRD equation.

No connection was found between DN and polymorphisms rs4340 and rs4341 in the gene for angiotensin-converting enzyme (ACE), polymorphisms rs699 and rs4762 in the gene for angiotensinogen, polymorphisms rs275651, rs931490, rs5182 and rs5186 in the gene for angiotensin II receptor type 1 (AGTR1), polymorphisms rs3087459, rs5370, rs1476046 in the gene for endothelin 1 and polymorphism rs12762303 in the gene for arachidonate 5-lipoxygenase (ALOX5).

There was, however, a statistically important difference between polymorphism rs3802278 in the gene for 5-lipoxygenase-activating protein (ALOX5AP) in patients with DN ($p = 0.004$). The C allele rs3802278 polymorphism was statistically more frequently distributed in patients with T2DM and DN ($p = 0.006$) than in the control group.

We concluded that the CC genotype of the ALOXAP5 gene (rs3803278) was associated with a 3.14-fold increased risk of DN in patients with T2DM (95% CI = 1.18-8.35 $p = 0.02$).

We can confidently say that we found a connection between the selected genetic polymorphism (rs3802278 on the gene ALOX5AP) in Slovenian patients with T2DM and DN. This could serve as a genetic marker for DN in the future, however, we need more studies on a larger population to confirm our hypothesis.

Key words: diabetes mellitus, diabetic nephropathy, gene polymorphisms

616.379-008.64:616.61:577.2.088.6(043.3)

Razlaga:

616.379-008.64 Sladkorna bolezen
616.61 Diabetična nefropatija
577.2.088.6 Molekularna genetika, polimorfizem genov
(043.3) Doktorske disertacije

SEZNAM KRAJŠAV

- SB sladkorna bolezen
- SB1 sladkorna bolezen tipa 1
- SB2 sladkorna bolezen tipa 2
- DN diabetična nefropatija
- DLB diabetična ledvična bolezen
- DNev diabetična nevropatija
- DR diabetična retinopatija
- TNF tumor nekrotizirajoči faktor
- KLB kronična ledvična bolezen
- KLO kronična ledvična odpoved
- GF glomerulna filtracija
- AGE Advanced glycation end products (glikolizirajoči končni produkti)
- ROS reactive oxygen species
- RNS reactive nitrogen species
- GLP-1 glucagon-like peptide-1
- cAMP ciklični adenzin monofosfat
- AK encim angiotenzinska konvertaza
- SNP polimorfizem enega samega nukleotida
- SŽO srčno žilna obolenja
- GWAS genome- wide associaton study (genomska presečna študija)
- IL interlevkin
- TGF transformirajoči rastni dejavnik
- RAAS renin angioten-aldosteronski sistem
- AGT angiotenzinogen
- AGTR1 angiotenzinski receptor 1
- AGTR2 angiotenzinski receptor 2
- ITM indeks telesne mase
- oGF očistek glomerulne filtracije
- oDP ocena dnevne proteinurije
- EDN1 endotelin 1 gen
- ET 1 endotelin 1
- ETA endotelin receptor A
- ETB endotelin receptor B
- ALOX5 arahidonat 5-lipoksigenaza
- ALOX5AP arahidonat 5-lipoksigenaza aktivirajoči protein
- 5-LO 5-lipoksigenaza
- LT leukotrien

1. UVOD

Sladkorna bolezen (SB) je kronična presnovna motnja, ki jo opredeljuje stalno povečana vrednost glukoze v krvi, imenovana hiperglikemija. Bolezen je povezana s kroničnimi zapleti na tarčnih organih, kot so oči, ledvice, živci, srce in ožilje. V grobem delimo sladkorno bolezen na tip 1 (SB1) in tip 2. Sladkorna bolezen tipa 2 (SB2) je pogostejša in je povezana z zmanjšano občutljivostjo na inzulin. Pojavi se ob nezadostnem uravnavanju hiperinzulinemije.

Diabetična nefropatija (DN) je izraz, ki ga bolj uporabljamo za biopsijsko dokazano prizadetost ledvic zaradi SB, diabetična ledvična bolezen (DLB) pa je kronični zaplet pri obeh oblikah SB. Proteinurija, povišan krvni tlak ter postopen upad ledvične funkcije ob visoki srčno-žilni obolevnosti (SŽO) in umrljivosti so glavne značilnosti razvite DN pri SB1 in SB2. Okoli 30 do 50% bolnikov razvije klinično očitno DN, vendar ne vemo, kateri bolniki jo bodo razvili in kateri ne. V preteklosti je veljalo prepričanje, da je tveganje za ledvične zaplete pri SB2 veliko manjše v primerjavi s SB1. Velik porast bolnikov s SB2 in končno ledvično odpovedjo (KLO) od osemdesetih let prejšnjega stoletja naprej je to mnenje ovrгло. Obstaja veliko dokazov, ki potrjujejo, da je tveganje za DN in napredovanje v KLO enako v obeh skupinah (1). Število bolnikov s SB2 narašča, zato so v razvitem svetu tudi prevzeli vodilni delež med novimi bolniki s KLO, ki preidejo na dializno zdravljenje.

V razvoju DN so pomembni spremenjeni presnovni procesi v bazalni membrani in mezangiju glomerulov ob spremenjeni hemodinamiki v glomerulnih kapilarah (2). Kronična ledvična okvara je večfaktorska bolezen in je posledica SB, zvišanega krvnega pritiska, ateroskleroze, ishemične bolezni ledvic, debelosti, kajenja in tudi drugih pridruženih bolezni ledvic. Prvi znak DN je stalno prisotno povečano izločanje albuminov v urinu ali albuminurija. Razvije se pri 2–5% bolnikov s SB letno (3). Pri bolnikih s SB2 je albuminurija le redko reverzibilna. Pri bolnikih s SB1 pa albuminurija v 20 do 40% napreduje v proteinurijo (4, 5). Bolniki s proteinurijo pa v 10 do 50% razvijejo KLO, pri čemer je potrebno nadomestno dializno zdravljenje ali transplantacija ledvic (6, 7, 8). Pri teh bolnikih je izrazito velika srčno-žilna obolevnost (SŽO) in kar 40–50% jih zaradi teh dogodkov tudi umre (9).

Z nezadržno rastjo števila bolnikov s SB2 izrazito narašča tudi število bolnikov z DN. V Veliki Britaniji je četrtnina bolnikov, ki začnejo z dializnim zdravljenjem, bolnikov s SB, v ZDA pa kar 44,2% bolnikov (10).

V Sloveniji ima vsak enajsti odrasli prebivalec SB2, 30–40% bolnikov s SB pa ima KLB. Ocenjujemo, da imamo v Sloveniji več kot 50.000 bolnikov s SB2, ki imajo KLB (10).

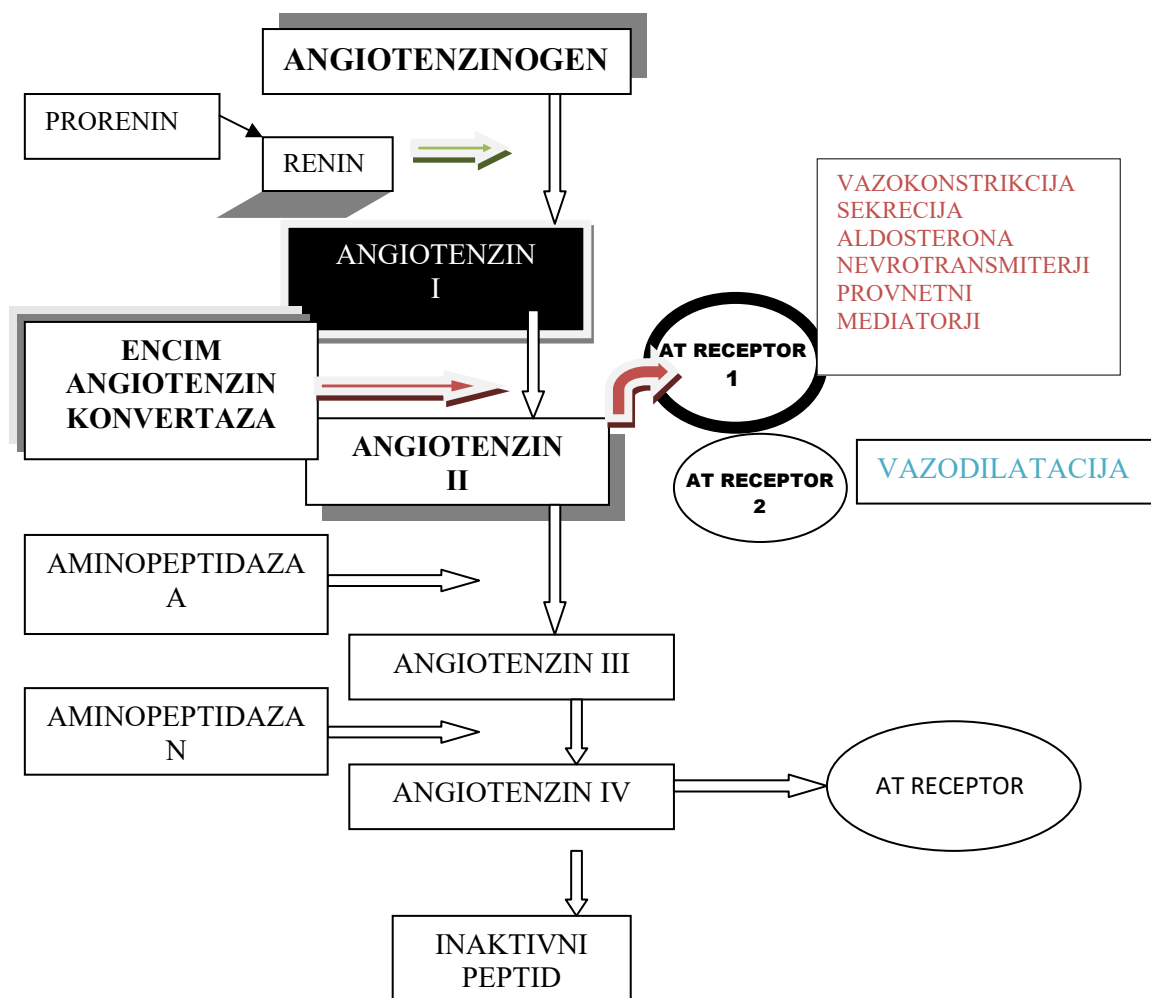
Danes še ne znamo napovedati, kateri bolniki s SB2 bodo dejansko razvili DN in kateri ne.

Povišan krvni sladkor, trajanje SB, povišan krvni pritisk, povišane maščobe v krvi in diabetična retinopatija (DR) so dejavniki tveganja za nastanek DN (8, 11).

Tveganje za razvoj DN ni linearno povezano s trajanjem SB1, kjer je DN boljše raziskana. Raziskave so pokazale tudi izrazito kopičenje bolnikov z DN v družinah. Ob očitni raznovrstnosti nastopa in napredovanja DN tako pri SB1 kot SB2 si postavljamo vprašanje o morebitnem genetskem vplivu na razvoj bolezni (12, 13, 14).

Komponente renin-angiotenzin-aldosteronskega sistema (RAAS) in kalikrein-kininskega sistema imajo številne učinke na arterije (8, 12).

V RAAS ima ključno vlogo angiotenzinogen, ki ga renin pretvori v angiotenzin I, slednjega pa encim angiotenzinska konvertaza (AK) pretvori v aktivno učinkovino angiotenzin II, ki deluje na srčno-žilni sistem prek receptorja tipa 1 angiotenzina II (slika 1: RAAS SISTEM IN NJEGOV FIZIOLOŠKI VPLIV)



Slika 1: RAAS sistem in njegov fiziološki vpliv (Prirejeno: Gard R. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2010; 12: 145-157.)

Angiotenzin II ima centralno vlogo tudi v hemodinamski regulaciji glomerulov. Hiperglikemija in mehanski pritisk, povzročeni z glomerulno hipertenzijo, pripeljeta do ledvične okvare (DN). Ireverzibilno so okvarjeni podociti, ki imajo pri zdravem človeku specifično vlogo v regulaciji intraglomerulnega renin-angiotenzinskega sistema (15).

Zaviranje renin-angiotenzinskega sistema je uspešna metoda zmanjšanja nastanka glomeruloskleroze in s tem končne odpovedi ledvic. V ta namen danes uporabljamo inhibitorje AK in antagoniste receptorja za angiotenzin 1 kot zdravilo, s katerimi poskušamo vplivati na nivo angiotenzina II v serumu (15).

Genetski dejavniki vplivajo na koncentracijo angiotenzinogena (genski polimorfizem angiotenzinogena), na aktivnost AK (polimorfizem insercija/delecija gena za AK) in na izločanje aldosterona (7, 14).

Polimorfizem insercija/delecija gena za AK je v človeški populaciji sorazmerno pogost in velika izraznost tega alela poveča tveganje zapletov SB. Polimorfizem AK gena ne vpliva toliko na krvni pritisk ali nivo angiotenzina II. Raziskave nakazujejo, da ima na izraznost tega polimorfizma vpliv kalikrein-kininski sistem (15). Proučevali so vpliv odsotnosti receptorja 1 bradikina in receptorja 2 bradikina na mišji populaciji s SB in ugotovili, da odsotnost obeh receptorjev za bradikinin poveča albuminurijo pri miših, pospeši glomerulosklerozo, povzroči debelitev glomerulne bazalne membrane, zmanjša prevodnost po živcu in poveča izgubo kostnih mineralov. Tako so znanstveniki prišli do zaključka, da pomanjkanje bradikinin 1 receptorja in bradikinin 2 receptorja pri miših vodi do pojavnosti komplikacij SB. Ta povečana pojavnost ledvične bolezni pri diabetičnih miših je posledica povečanega oksidativnega stresa, okvare mitohondrijev in prevlade fibrogenih genov, med katerimi je tudi endotelin 1. Oba receptorja bradikina imata zaščitno vlogo pri razvoju DN in to prek mehanizma zmanjševanja oksidativnega stresa (13, 14, 15).

Klinične raziskave kažejo, da na potek ateroskleroze vpliva lipooksigenazna pot (16, 17, 18, 19). V tej poti so udeleženi številni proteini, kot npr. FLAP (aktivirajoči protein 5-lipooksigenaze (16, 17)). Protein FLAP kodira gen ALOX5AP, ključno vlogo pri sintezi levkotrienov pa imata ALOX5AP in ALOX5 (16, 17, 18, 19).

Endotelin 1 je vazoaktivni peptid, ki ga izloča žilna endotelna celica in povzroča krčenje gladke mišice v žili. Na ta način prispeva k tonusu žile. Deluje prek dveh podtipov receptorjev, endotelin receptorja A (ET (A)) in endotelin receptorja B (ET(B)). Pri zdravem človeku endotelin stimulira diurezo in natriurezo prek ET(B) v sredici ledvice. Pri bolni ledvici pa endotelin 1 povzroča vazokonstrikcijo, proliferacijo mezangijskih celic, pomnožitev ekstracelularnega matriksa in vnetje prek ET(A). Regulacija sproščanja endotelina je prizadeta v procesu ateroskleroze in tudi v okviru prizadetosti majhnih žil pri DN. Endotelin lahko s svojim vazokonstriktorskim, proliferativnim, profibrotičnim in vnetnim učinkom prispeva k razvoju ledvične okvare pri bolnikih s SB2 in pri tej

skupini bolnikov najdemo tudi povečano koncentracijo endotelina 1 v plazmi (20, 21, 22). Vpliv genskih polimorfizmov encimov, ki regulirajo funkcijo endotelina in vplivajo na razvoj ledvične bolezni, je dokaj neraziskan.

Dejavnike tveganja za razvoj DN lahko razdelimo na okoljske in genske, v realnosti pa noben okoljski dejavnik tveganja ni neodvisen od vpliva genskih dejavnikov tveganja.

Namen naše raziskave je ugotoviti povezavo med izbranimi kandidatnimi geni in diabetično ledvično boleznijo pri bolnikih s SB2 v slovenski populaciji.

1.1 SLADKORNA BOLEZEN

Sladkorna bolezen (SB) je kronična metabolna bolezen, ki nastane zaradi pomanjkanja izločanja inzulina ali njegovega pomanjkljivega delovanja ali obojega. Proizvajajo ga beta celice trebušne slinavke. Motena je prebava ogljikovih hidratov, maščob in beljakovin (2). Tip SB1 je od inzulina odvisna sladkorna bolezen, ki se lahko pojavi že v otroštvu in puberteti oziroma do 30. leta starosti. Gre za avtoimunsko bolezen, zdravljenje pa je potrebno do konca življenja z inzulinom. Ta tip SB ima približno 10% bolnikov; 90% bolnikov pa ima SB2, pri kateri ne gre za pomanjkanje inzulina, ampak nastane zaradi zmanjšane občutljivosti tkiv na inzulin in istočasno zmanjšanje izločanja inzulina, ki se lahko s starostjo povečuje. To obliko SB lahko zdravimo z dieto ali z antidiabetičnimi zdravili, sočasno pa je treba zdraviti tudi težave, ki se pojavljajo vzporedno (povišane vrednosti maščob v krvi, zvečan krvni tlak), oziroma zmanjšati telesno težo, če je ta prevelika, ter opustiti kajenje.

K nastanku in slabšanju bolezni pripomorejo neustrezne življenjske okoliščine (neprimerna prehrana, prevelika telesna teža, premalo gibanja in stres).

SB je velika javnozdravstvena težava, saj za to boleznijo zbolijo vse več čedalje mlajših ljudi. S St. Vincentsko deklaracijo smo že leta 1989 dobili temelje za obvladovanje te bolezni, postavljeni so bili cilji za obvladovanje te bolezni tako na ravni posameznika kot celotne družbe (23).

V državah evropske unije breme SB v povprečju pomeni deset odstotkov vseh zdravstvenih izdatkov. Leta 2010 je bilo na svetu 285 milijonov posameznikov s to boleznijo, kar je 6,4% prebivalcev od 20. do 79. leta starosti, in kar 7,8% ljudi z moteno toleranco za glukozo (MTG), ki je patološko stanje tolerance za glukozo med normalnim in diabetičnim področjem. Projekcije za leto 2030 kažejo na porast te bolezni, saj naj bi kar 7,7% ljudi na svetu imelo SB in 8,4% MTG (23). V Evropi je bilo leta 2010 8,9% ljudi s SB, do leta 2030 pa bo ta številka narasla na 9,8% (23). Na podlagi ankete, ki jo je naredil Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije leta 2007, je bilo v Sloveniji približno 125 tisoč bolnikov s prepoznano sladkorno boleznijo, kar pomeni 6,25% celotnega prebivalstva (23).

Med bolniki s SB je kar 80% predebelih. Za nastanek SB je poleg vedenjskih dejavnikov tveganja pomembna tudi vloga dednosti. V družinah s SB je tveganje, da potomec zbolijo za to bolezen, kar 40% večje kot pri družinah, kjer SB ne poznajo (24).

Kronična hiperglikemija je posledica SB in povzroča kronično okvaro, motnjo ali celo odpoved delovanja različnih organov, posebno oči, ledvic, živcev, srca in ožilja. Urejena glikemija je cilj vsakega zdravljenja SB. Dolgoročno presnovno urejenost ugotavljamo z vrednostjo glikoliziranega hemoglobina (HbA1c), ki predstavlja retrogradni podatek o urejenosti SB v zadnjih dveh do treh mesecih in ima tudi napovedno vrednost za kronične zaplete SB. Priporočena ciljna vrednost HbA1c je 6,5% po smernicah International Diabetes Federation (IDF). Za urejenost SB sta pomembna še dva podatka, in sicer krvni sladkor na tešče in krvni sladkor dve uri po obroku. V Evropi je po državah sladkorna bolezen različno dobro urejena (23). V Sloveniji ima 65% bolnikov s SB brez inzulinskega zdravljenja slabo urejeno glikemijo in 75% bolnikov v skupini z inzulinskim zdravljenjem. Vzroke za tako stanje v Sloveniji lahko iščemo v prereditvi kontrolah pri diabetologih in/ali premajhnemu številu diabetologov ter neučinkoviti samo-kontroli, kar lahko pripišemo slabi ozaveščenosti bolnikov oziroma premajhnemu številu edukatorjev.

Za Pomursko regijo velja, da so bolniki s SB2 slabo urejeni, da so stari v povprečju 63 let, bolezen v povprečju traja 7,6 let in imajo indeks telesne mase (ITM) 31,9 kg/m². V 7,6% jih zdravimo samo z dieto, 50% jih potrebuje inzulin, v 15,9% pa potrebujemo kombinacijo zdravljenja z peroralnimi antidiabetiki in inzulinom (23).

Sodobno zdravljenje SB je sicer izboljšalo kakovost življenja bolnikov in podaljšalo njihovo življenjsko dobo. Bolniki danes umirajo predvsem zaradi kroničnih zapletov. Sem sodijo spremembe na velikih žilah (makroangiopatija) in na malih žilah (mikroangiopatija). Makroangiopatija (predvsem ateroskleroza) je pri SB pogostejša, ni pa specifična. Ateroskleroza se lahko pojavi tudi pred pojavom SB2. Na podlagi tega lahko sklepamo, da na obe bolezni vplivajo tako okoljski kot dedni dejavniki, med njimi sta najpogostejša skupna dejavnika tveganja zvišana vrednost holesterola in zvišan krvni pritisk.

Aterosklerotična SŽO so pri bolnikih s SB 3 do petkrat pogostejša kot pri osebah brez nje. Njihova pogostnost je v primerjavi z napredovanimi mikroangiopatičnimi zapleti desetkrat večja, 75% bolnikov s SB umre zaradi ishemične bolezni srca (25), prizadeto je večje število koronarnih žil in spremembe se pojavijo približno 15 let prej kot pri populaciji, ki SB nima (26).

Mehanizmi vpliva SB na hitrejši razvoj ateroskleroze do danes niso povsem razjasnjeni. Hiperglikemija pospeši oksidativno reakcijo v žilni steni, zmanjšana je aktivacija endotelijske sinteze dušikovega oksida (eNOS), manjša je tvorba in dostopnost biološko aktivnega dušikovega oksida (NO) in povečana tvorba ROS (angl. reactive oxygen species – reaktivne kisikove vrste). Govorimo o oksidativnem in nitroznem stresu. Povečan oksidativni stres verjetno predstavlja glavno pot v razvoju diabetične angiopatije (27). Pri tem procesu pride do porasta vnetnih citokinov (IL 6, IL 18 in TNF alfa) v serumu in s tem do nestabilnosti aterosklerotičnih lezij ter posledično do srčno-žilnih dogodkov (28).

Diabetična retinopatija (DR) je mikroangiopatija na mrežnici bolnika s SB ter se pri bolnikih pojavlja po petih do desetih letih trajanja SB1 in jo pogostokrat najdemo že pri ugotovljeni SB2. Je najpogostejši kronični zaplet SB in najpogostejši vzrok slepote med delovnim prebivalstvom, kot tudi pomemben vzrok slepote med starostniki. Ima jo 20% vseh bolnikov s SB. Prevalenca proliferativne oblike bolezni je pogostejša pri SB1 (29, 30). Tudi ta kronični zaplet SB nastane zaradi oksidativnega stresa, neencimske glikacije strukturnih beljakovin in sproščanja vnetnih mediatorjev, kot je tumor nekrotizirajoči faktor (TNF). Poznamo dve obliki te bolezni. Za proliferativno obliko retinopatije je značilno, da pride do obsežnih krvavitvev v mrežnico ali steklovino. Posledica tega procesa je brazgotinjenje in vlek mrežnice ter posledični odstop mrežnice. Pri neproliferativni obliki bolezni, ki je pogostejša pri SB tipa 2, pa so spremembe opazne v mrežnici, vidimo vijugaste vene, pikčaste krvavitve in trde ali redke mehke eksudate (2).

Vzdrževanje stalne normoglikemije je preventiva razvoja DR. Fotokuagolacija mrežnice z laserjem je simptomatski ukrep, ki preprečuje krvavitve, občasno pa se oftalmologi poslužujejo tudi vitrektomije (31, 32).

Diabetična nevropatija (DNev) je pogost kronični zaplet SB. Hiperglikemija je ponovno pobudnik patoloških procesov v živčnih celicah, saj obstaja pribitek sorbitola v celicah. Znižana je aktivnost Na/K ATPaze, s čimer pride do znižanja prevajanja akcijskega potenciala nevronov. Morfološko gre za segmentno demielinizacijo in propad nevronov (2). Poznamo razvito klinično sliko bolezni in subklinično sliko, kjer bolnik še nima težav, z objektivnimi preiskovanimi metodami pa že najdemo motnje v prevodnosti motoričnih in senzoričnih živcev.

Diabetična noga je kombinacija makroangiopatije in nevropatije. Približno 25% bolnikov se vsaj enkrat v življenju sooči s tem problemom (2), ki v končni fazi lahko vodi tudi do amputacije prstov ali noge. Ločimo nevropatsko, ishemično obliko in kombinacijo obeh. Pri tipu SB1 prevladuje nevropatična oblika bolezni, pri tipu SB2 pa ishemična oblika bolezni.

1.2 DIABETIČNA NEFROPATIJA ALI DIABETIČNA LEDVIČNA BOLEZEN

Diabetična nefropatija (DN) je izraz, ki smo ga zgodovinsko ohranili za okvaro ledvic pri SB, kjer smo bolezen dokazali z biopsijo ledvic, sicer pa uporabljamo izraz diabetična ledvična bolezen (DLB).

Gre za kronično specifično okvaro ledvic pri SB2. Bolniki s SB2 sodijo med posameznike s povečanim tveganjem za KLB in najpogostejša med njimi je DLB. KLB je pogost zaplet, ki pomembno vpliva na obolevnost in preživetje bolnikov s SB2, ter predstavlja veliko socialno in ekonomsko breme. Označuje tudi bolnike s povečanim srčno-žilnim tveganjem, zato je pomembno tudi presajanje bolnikov za KLB, da lahko nato z ustreznim ukrepanjem upočasnimo napredovanje ledvične okvare (10, 33, 34, 35).

KLB je kronična bolezen, za katero je značilno, da traja več kot tri mesece. Gre za strukturno okvaro ledvice, ki se klinično lahko pojavlja s proteinurijo/albuminurijo, eritrociturijo in tudi s slikovnimi spremembami na ultrazvoku ledvic in računalniški tomografiji, lahko pa jo dokazujemo z biopsijo organa. KLB označuje tudi zmanjšana glomerulna filtracija (GF), in sicer pod 60 ml/min/1,73 m². V Sloveniji smo v letu 2009 ocenili, da ima vsak deseti odrasli bolnik KLB, to je več kot 165.000 ljudi (33).

Za dokaz DLB je pomembno trajanje SB, preiskava seča, s-kreatinin in ocena GF v časovnem obdobju, ultrazvok ledvic, prisotnost in urejenost krvnega pritiska in pregled očesnega ozadja.

Histološka slika pri okvari ledvic pokaže zadebeljeno bazalno membrano, ki je lahko tudi desetkrat debelejša kot pri zdravem človeku. Zadebeljeno bazalno membrano najdemo na glomerulnih in na drugih ledvičnih žilah, pomnoži se tudi mezangijski matriks, v katerega se odlagajo glikirane beljakovine in pride do hialinizacije glomerula. Končni stadij je propad nefrona in razmnožitev veziva v ledvičnem intersticiju (2).

Patofiziološko gre za presnovne motnje v bazalni membrani in mezangiju glomerulov, spremenjena je znotrajledvična hemodinamika, posledica je večja prepustnost bazalne membrane. Hiperglikemija s hipervolemijo poveča pretok skozi ledvice, pride do dilatacije aferentne arteriole in zoženja eferentne arteriole. Posledica tega je povečanje pritiska v glomerulnih kapilarah in povečana GF. Povečana prepustnost bazalne membrane in glomerulne hiperfiltracije povzročata večje izločanje beljakovin (2).

Pri bolnikih s SB sta zvečana glikacija in tvorba kolagena, upočasnjena pa je njegova razgradnja. Bistveni sestavni deli bazalne membrane in mezangija so kolagen, glikozaminoglikani, laminin in fibronektin. Zgoraj naštetih procesi povzročijo zadebelitev bazalne membrane, pomnoži se mezangijski matriks in spremeni se naboj bazalne membrane, s čimer se poveča prepustnost bazalne membrane (2).

Vidimo, da je patofiziologija DLB zapletena in na razvoj bolezni vpliva več faktorjev. Nekoč je prevladovalo mnenje, da ima dobro urejena SB manj zapletov bolezni, kot je DLB, vendar danes s študijami dokazujejo, da se pri 30% bolnikov s SB1 in 25–40% bolnikov s SB2 lahko razvije kronična okvara ledvic kljub dobro urejeni glikemiji (36).

Razlike obstajajo tudi med etničnimi skupinami, kar potrjuje različen vpliv genetike pri razvoju bolezni pri različnih narodih (38,39). Afroameričani z DLB imajo petkrat večjo verjetnost, da jim tekom življenja odpovedo ledvice in se soočijo z nadomestnim dializnim zdravljenjem, prav tako so bolj ogroženi Američani in Španci (13, 37, 38). V Aziji multicentrične študije kažejo na kar 40-odstotno prevalenco albuminurije pri bolnikih s SB2 in družinsko obremenjenost (39).

Danes v patofiziologiji okvare ledvic pri SB znanstveniki govorijo o tako imenovanih glikolizirajočih končnih produktih (AGE), ki nastanejo pri neencimskih reakcijah glukoze z amino skupinami beljakovin, lipoproteinov in nukleinskih kislin. Ti krožeči produkti lahko delujejo prek receptorjev ali pa tudi ne in spremenijo sestavo bazalne membrane, tako da povečajo izraznost kolagena tipa IV

in s tem membranski naboj ter prepustnost membrane. Če gre za mehanizem, ki je odvisen od receptorjev, lahko ti končni produkti delujejo na makrofage, monocite, endotelne celice, podocyte, tubularne epitelne celice in gladke mišične celice. Na ta način pride tudi do sproženja vnetne reakcije (40, 41) in sproščanja številnih citokinov, rastnih faktorjev (TGF- beta 1), interlevkin-1beta, interlevkin-6, TNF itd.

Pri SB1 in SB2 so ob okvari ledvic našli povečano koncentracijo teh glikolizirajočih končnih produktov (42).

Hiperglikemija je povezana tudi z moteno regulacijo nastanka reaktivnih kisikovih in dušikovih spojin (angl. reactive oxygen species ROS; reactive nitrogen species RNS); govorimo o oksidativnem in nitroznem stresu (43). Povečan oksidativni stres verjetno predstavlja glavno pot v razvoju diabetične angiopatije (44, 45). ROS in RNS dokazano vplivajo na strukturo in funkcijo žilnega endotelija. Posledice endotelijske disfunkcije so zmanjšana aktivacija eNOS, manjša tvorba in dostopnost biološko aktivnega dušikovega oksida (NO) in povečana tvorba ROS.

Superoksidne radikale izločijo mitohondrijski in citosolni antioksidantni obrambni mehanizmi, ki pa so pri sladkornem bolniku poškodovani, zaradi česar pride do oksidacije lipidov v membranah, DNA, beljakovinah in ogljikovih hidratih. Posledica teh sprememb je motnja v sestavi in delovanju celičnih sestavin.

Nov predmet proučevanja v farmakoterapiji DLB je Na/glukoza kotransporter 2 (SGLT-2), ki ureja resorpcijo glukoze v ledvicah. Hiperglikemija in hiperinzulinemija vodita do povečane izraženosti SGLT-2, kar vodi do povečane resorpcije glukoze v krvi in poslabšanja hiperglikemije ter slabše urejenosti krvnega pritiska (46). Z uporabo zaviralca tega transportnega mehanizma v ledvici so se začele izvajati študije, ki proučujejo zaščitniško vlogo slednjega pri nastanku DLB (47, 48).

Tudi inkretin je pokazal svojo zaščitniško vlogo pri razvoju DLB. Gre za hormon glucagon-like peptide-1 (GLP-1), ki sproži izločanje inzulina iz beta celic trebušne slinavke. Ima tudi antioksidantni učinek na različna tkiva. Receptorje za ta hormon najdemo v trebušni slinavki, možganih, srcu, pljučih, črevesu in ledvicah. Mehanizem delovanja je prek vezave na receptor in povečanja nastajanja cikličnega adenozin monofosfata (cAMP), ki aktivira protein kinazo A. Po tej poti se poveča sekrecija inzulina in zmanjša delovanje ledvične NADPH oksidaze. Posledica tega je zmanjšanje oksidativnega stresa. Uporaba GLP-1R agonistov zmanjša albuminurijo in razrast mezangija ter zmanjša količino superoksidov v glomerulu in tako varuje ledvice (49, 50).

Pri SB2, za razliko od SB1, ob odkritju bolezni ne vemo, koliko časa dejansko že traja bolezen in ali so že prisotni znaki mikro- ali makroangiopatije, zato ob odkritju bolezni najprej opravimo običajno analizo urina in precipitacijski test za proteinurijo ter ocenimo glomerulno filtracijo (oGF) na podlagi določitve koncentracije serumskega kreatinina po standardizirani laboratorijski metodi.

S presejanjem najprej pregledujemo naključni vzorec urina s testnimi lističi in s sulfosalicilno kislino. Če je testni listič za proteinurijo 0, nadaljujemo s preiskavo jutranjih vzorcev urina, in če je ta pozitiven v dveh vzorcih jutranjega urina od treh v zadnjih treh mesecih, lahko govorimo o diabetični ledvični bolezni, ki pomembno vpliva na obolevnost in preživetje bolnika s SB 2 (33, 34).

Kaj je **normoalbuminurija**? To je razmerje med koncentracijama albumina in kreatinina v urinu do 3g/mol v dveh od treh vzorcev urina, zbranih v obdobju enega tedna do treh mesecev. Na testnem lističu dobimo rezultat negativno ali sled proteinov (51).

Zmerno zvišana albuminurija, prej *mikroalbuminurija*, je razmerje med koncentracijama albumina in kreatinina od 3 do 30 g/mol v dveh od treh vzorcih urina, zbranih v obdobju enega tedna do treh mesecev. Vrednosti proti zgornji meji intervala lahko sežejo že v področje proteinurije. Na testnem lističu dobimo rezultat sled proteinov ali + (51).

Visoko zvišana albuminurija, prej *makroalbuminurija*, je razmerje med koncentracijama albumina in kreatinina 30 g/mol in več v dveh od treh vzorcih urina, zbranih v obdobju enega tedna do treh mesecev. Vse vrednosti zagotovo sežejo v področje bolezenske proteinurije. Na testnem lističu dobimo rezultat + ali več+ (51).

Albuminurija se lahko poveča tudi ob večjem fizičnem naporu, ob okužbi, povečani telesni temperaturi, akutnem poslabšanju srčnega popuščanja, hudi hiperglikemiji in pomembno zvišanem krvnem pritisku (52).

KLB označuje okvara funkcije ali strukture ledvice. To pomeni, da je oGF pod 60 ml/min/1,73 m² in/ali so prisotne bolezenske nenormalnosti ali so prisotni označevalci ledvične okvare (nenormalnost urina ali krvi ali slikovne nenormalnosti ledvic) ali pa pride do presaditve ledvic. Poznamo več stopenj KLB (Tabela 1).

Tabela 1: Klasifikacija KLB (Slovenske smernice za klinično obravnavo sladkorne bolezni tipa 2, leto 2016)

STOPNJA	OPIS	GF (ml/min/1,73m ²)
1	Ledvična okvara z normalno ali povišano GF	>90
2	Ledvična okvara z blago ali znižano GF	60- 89
3a	Zmerno znižana GF	45-59
3b	Zmerno znižana GF	30-44
4	Hudo znižana GF	15-29
5	LEDVIČNA ODPOVED	< 15 ali dializa

GF - glomerulna filtracija

Osnovno načelo za oceno GF je določitev očistka neke snovi, to je prostornine plazme, ki se v določeni časovni enoti očisti te snovi z izločanjem v seč, ali preprosto povedano pomeni zmožnost ledvice, da odstrani določeno snov iz plazme in jo izloči s sečem. V vsakdanji klinični praksi za oceno GF najpogosteje uporabljamo serumsko koncentracijo kreatinina. Danes se je uveljavila enačba MDRD (angl. Modification of Diet in Renal Disease), ki od laboratorijskih meritev vključuje le vrednost serumskega kreatinina. GF je podana na standardizirano telesno površino 1,73 m². Na

izračun vplivajo spol, starost, mišična masa, prehrana in zdravila. V zadnjem času se vse bolj uporablja tudi novi označevalec ledvične funkcije, in sicer serumski cistatin C. Izloča se z GF. Serumsko koncentracija odraža hitrost GF in je neodvisna od spola in starosti, saj so vrednosti od prvega leta starosti naprej praktično enake (52, 53).

Z ustreznim ukrepanjem lahko upočasnimo napredovanje ledvične okvare, zato presejalne teste opravimo enkrat na leto in sledimo Slovenskim smernicam za klinično obravnavo sladkorne bolezni tipa 2, ki so bile posodobljene leta 2016 (51).

DLB je manj verjetna, ko bolnik nima DR, ko je GF majhna ali se hitro zmanjšuje, ko se proteinurija hitro slabša ali pa je prisoten nefrotski sindrom. Hipertenzijo težko zdravimo, prisoten je aktiven sediment v urinu in prisotni so tudi simptomi in znaki za druge sistemske bolezni. Proti DLB govori tudi zmanjšanje GF za več kot 30% po uvedbi zdravljenja z ACE inhibitorji ali antagonisti angiotenzinskih receptorjev (51).

Velik problem pri DLB je, da tretjina bolnikov nima ne proteinurije in ne albuminurije, ledvična bolezen sama po sebi pa je večfaktorska, in je lahko posledica SB, zvišanega krvnega pritiska, ateroskleroze, ishemične bolezni ledvic, debelosti in kajenja.

Biopsija ledvic nam lahko v zapletenih okoliščinah pomaga pri postavitvi diagnoze ledvične okvare, histološke spremembe so značilne in so razdeljene v štiri velike skupine od I-IV (54).

Za preprečevanje zapletov SB je zelo pomembna njena urejenost. Eno od meril urejenosti je glikiran hemoglobin (HbA1c). Študije v devetdesetih letih so že pokazale, da urejenost HbA1c pod 7% pri SB1 pomembno zmanjša zaplete bolezni, in sicer za 34% pri bolnikih, ki so vstopali v študijo brez DR ali albuminurije, in za 43% pri bolnikih z že znano DR, z ali brez albuminurije in normalno GF (55). Tudi po 22-ih letih sledenja bolnikov s SB1 lahko povemo, da je dobra urejenost bolezni zelo pomembna za preprečevanje komplikacij in preprečevanje hipoglikemij (56).

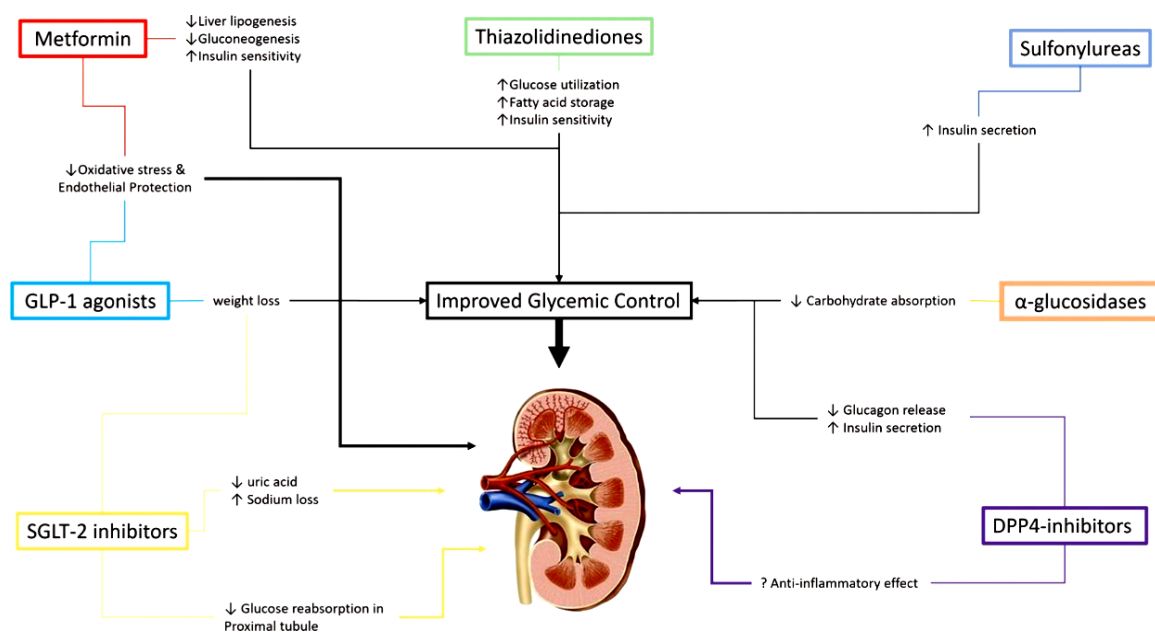
Do podobnih zaključkov lahko pridemo tudi pri bolnikih s SB2.

Japonski znanstveniki so sedem let sledili 110-im bolnikom s SB2 in HbA1c pod 7,1% ali HbA1c 9,4%. V skupini z bolj urejenim sladkorjem so samo v 7,7 odstotkih dokazali albuminurijo in, nasprotno, v skupini s slabo urejeno boleznijo v 28 odstotkih (57). Do podobnih ugotovitev so prišli tudi britanski znanstveniki (58). V študiji ADVANCE so pet let sledili okrog 11.000-im bolnikom. Ena skupina bolnikov je imela HbA1C 6,5%, druga pa 7,3%. Ugotovili so, da med skupinama ni bilo statistično pomembnih razlik glede SŽO ali izboljšanja DR, vendar je bilo v prvi skupini pri napredovanju albuminurije in poslabšanju ledvične funkcije manj zapletov, in sicer za 21%. Rezultati so ostali podobni, tudi če so čas sledenja podaljšali za dve leti (57, 59). Ob stremljenju za urejenem krvnim sladkorjem se je treba izogibati pogostim hipoglikemijam, zlasti pri DLB, kjer je GF že zmanjšana, saj pri teh bolnikih vidimo podaljšano delovanje inzulina, zmanjšana je glukoneogeneza in že lahko kažejo znake podhranjenosti. Postavimo si lahko tudi

vprašanje, ali je HbA1c res zadostno merilo za kontrolo urejenosti SB, če vemo, da je ta lahko lažno nižji pri KLB, saj je 120-dnevni cikel eritrocitov krajši, prav tako na vrednost HbA1c vpliva še anemija, motnje v acido-baznem ravnotežju in zmanjšana proizvodnja eritropoetina (60). Obstajajo še različne druge možnosti kontrole sladkorja v krvi, kot je recimo serumski fruktozamin, v novjšem času pa znanstveniki govorijo o glikiranem albuminu, na katerega anemija ali nižja GF ne vplivata, vendar še ni opravljenih dovolj študij, da bi ga uporabljali v klinični praksi (61).

Dobro urejena glikemija zmanjšuje žilne zaplete in ledvično bolezen pri SB.

Za urejanje SB uporabljamo poleg inzulina številna antiglikemična zdravila, ki tako varujejo tudi ledvice oziroma preprečujejo razvoj DLB.



Slika 2: Različno delovanje antiglikemičnih zdravil in njihova zaščitna vloga pri obolenju ledvic (Kinaan M, Ding H, Triggle CR. *Metformin: An old drug for the treatment of diabetes but a new drug for the protection of the endothelium, Med Princ Pract.* 2015).

METFORMIN je zdravilo, ki je bilo odkrito leta 1958 in se ga je nekoč na široko uporabljalo zaradi njegovega hipoglikemičnega učinka in učinka na endotelij, steatotična jetra in pri debelosti. Zaradi suma, da povzroča laktoacidozo, nekaj časa ni bilo v množični uporabi. Z novjšimi študijami pa so dokazali, da se laktat, ki nastane pri delovanju zdravila v jetrih prek Corijevega cikla, pretvori nazaj v glukozo (62) in sam po sebi ne povzroča zdravju ogrožajoče laktatne acidoze. Zdravilo je varno pri stabilni majhni do srednji veliki ledvični okvari ($GF > 45$ ml/min/1,73m²), ne smemo pa ga uporabljati pri $GF < 30$ ml/min/1,73m², polovični odmerek pa rabimo pri GF med 30 in 45 ml/min/1,73m² (63). Pozorni moramo biti pri predpisovanju zdravila tudi pri stanjih, kjer gre za bolezensko zvišanje laktata, kot so sepsa, akutna ledvična odpoved, šok in srčni infarkt, ter pri uporabi rtg kontrastnih sredstev.

DRUGA GENERACIJA ZDRAVIL SULFONILSEČNINE

To je zdravilo, ki se veže na ATP-občutljive K⁺ kanalčke beta celic trebušne slinavke in odpre Ca kanalčke istih celic, ter povzroči povečano izločanja inzulina (64). Prva generacija zdravil te skupine je rada povzročala hipoglikemijo, pri dolgotrajni uporabi pa hiponatremijo in povečala srčno žilno tveganje. Tudi pri drugi generaciji (glyburide, glipizide) zdravil pogosto opazimo hipoglikemijo (65). Glipizid se v jetrih razgradi v neaktivne presnovke in ga pri ledvični okvari ni treba prilagajati, kar pa ne velja za glyburid.

TAZOLIDINI so zdravila, ki zmanjšajo maščobne kisline in glukozo v krvi ter povečajo občutljivost tkiv na inzulin (66). Izločajo se prek jeter, zato odmerka zdravil pri bolezni ledvic ni treba prilagajati. Do zdaj je bilo narejenih relativno malo študij, ki bi dokazovale renoprotektivni učinek zdravil.

AKARBOZA je saharoza, ki se v tankem črevesu veže na mesto, kjer se absorbirajo ogljikovi hidrati, zato se zmanjša prehod glukoze iz hrane v kri. Zdravilo ima manjši vpliv na HbA_{1c}, povzroča pa flatulenco in ga je treba prilagoditi pri GF < 30 ml/min/1,73m² (67, 68, 69).

ZAVIRALCI DIPEPTIDIL PEPTIDAZE (DPP-4) ALI GLIPTINI

So relativno novo zdravilo za urejanje SB in so na tržišču od leta 2006. Njihova naloga je, da onemogočijo delovanje inkretinov in želodčnih peptidov. Posledica tega je povišan nivo inkretinov, ki vodi do večje sekrecije inzulina in zmanjšuje izločanje glukagona (70). Ta zdravila ne povzročajo pogosto hipoglikemije, treba pa jih je prilagajati ledvični funkciji. DPP-4 peptid najdemo v epitelnih celicah proksimalnih tubulih ledvic, endotelnih celicah in tudi v levkocitih. Njihova stimulacija sproži vnetni odziv, inhibicija pa ga zavre, zato so postali vir raziskovanj, saj bi zaviranje sproščanja tega peptida lahko imelo zaščitno vlogo v razvoju DLB. Do danes opravljene študije pa dajejo nasprotujoče si rezultate. Glede na podatke v študiji MARLINA-T2 se z linagliptinom statistično zmanjša vrednost HbA_{1c} za 0,6% v 24-ih tednih, vendar ni opaziti vpliva na albuminurijo (68). SAVOR študija s saksagliptinom pa govori o ravno obratnem učinku, in sicer o zaščitnem učinku na ledvice in manjšem vplivu na nivo glukoze v krvi (69).

AGONISTI RECEPTORJEV ZA GLP-1

GLP-1 je inkretin in neuropeptid, ki se izloča v črevesju in hipotalamusu kot odgovor na prisotnost hranil. Poveča izločanje inzulina, vzpodbuja rast beta celic v trebušni slinavki in zavira njihov razpad, zmanjša praznjenje želodca in s tem povečuje občutek sitosti, pri čemer je rezultat izguba telesne teže (70). Fujita in sodelavci so dokazali, da so GLP-1 receptorji prisotni v glomerulnih kapilarah pri miših, ne pa v tubulih, zato so imele miši, ki so imele pomanjkanje teh receptorjev, večjo izločanje albuminov v urinu, večjo koncentracijo označevalcev oksidativnega stresa in večje spremembe mezangija kot pa miši, ki so ta receptor imele. Klinično je bilo največ študij opravljenih z liraglutidom in dokazali so, da pomembno vpliva na zmanjšanje albuminurije (71), premalo pa je študij, ki bi govorile v prid varnosti uporabe zdravila pri srednji do hudi okvari ledvic.

INHIBITORJI SGLT-2 (canagliflozin, dapagliflozin, empagliflozin)

So nova zdravila, ki zavirajo reabsorpcijo glukoze v proksimalnih delih tubulov ledvice in posledica tega je osmotska diureza – glikozurija. Na ta način lahko uravnavamo nivo glukoze v krvi, pride do zmanjšanja telesne teže, zmanjšamo nivo maščobe in sečne kisline v krvi in zmanjša se oksidativni stres. Zaradi zmanjšane reabsorpcije Na v proksimalnih tubulih ledvice pride do povečanja koncentracije Na v makuli densi in s tem do vasomodulacije v aferentnem žilju. Pride do zmanjšanja hiperfiltracije. Slaba stran delovanja teh zdravil je večja nevarnost dehidracije in genitouretralnih vnetij, zlasti s kandido zaradi glikozurije. Novejše klinične študije potrjujejo njihovo zaščitno vlogo pri razvoju DLB in njihov pozitiven vpliv na srčno-žilne dogodke (72). Zdravila lahko varno uporabljamo pri srednji ledvični okvari, prepovedana pa so pri končni odpovedi ledvic ali pri težji ledvični okvari.

INZULIN

Danes renoprotektivna vloga tega hormona še ni razčiščena, 60% se ga očisti z GF in 40% prek peritubularnega žilja. Ob ledvični okvari se zmanjša očistek inzulina in tudi pretok krvi skozi ledvice. Občutljivost na inzulin je zmanjšana in tvorba endogenega inzulina je zmanjšana kot posledica metabolne acidoze in povečanega izločanja parathormona. Vse to vpliva tudi na dnevne doze inzulina, pri zgodnejši okvari ledvic pride do večje rezistence na inzulin in s tem do porasta glukoze v krvi in povečanih potreb po inzulinu, v poznejši fazi bolezni ledvic pa pride do manjšega očistka inzulina in posledično do hipoglikemije, tako da je potrebno odmerke inzulina dnevno prilagajati (73).

UREJANJE KRVNEGA PRITISKA

Arterijska hipertenzija je pomemben in pogost dejavnik tveganja za žilne zaplete pri bolnikih s SB 2. Cilj zdravljenja je čim daljše in kakovostno življenje. Naravni potek DLB vodi od albuminurije do proteinurije, od povišane GF pa do končne ledvične odpovedi ($GF < 15 \text{ ml/min/1,73m}^2$), ko potrebujemo dializno zdravljenje. Ob vseh teh prehodih se srečamo z vedno bolj neurejenim krvnim pritiskom, ki je izziv našega zdravljenja. Okrog 65% bolnikov s SB, ki so odvisni od inzulina in imajo makroalbuminurijo, ima visok krvni pritisk, celo 58% bolnikov s SB2 in brez znakov albuminurije pa ima visok krvni pritisk. Ta številka pa pri poslabšanju albuminurije in zmanjšanju delovanju ledvic naraste na okrog 90% (74, 75).

Priporočen ciljni krvni tlak je za večino bolnikov 140/85 mmHg ali manj, tudi po slovenskih smernicah, obnovljenih v letu 2016 (51). Ciljni krvni tlak pri posebnih skupinah, kot so bolniki s stalno proteinurijo, je pod 130 mmHg, ob pogoju da lahko redno spremljamo ledvično delovanje. Pri bolnikih, starejših od 80 let, ki so v dobri psihofizični kondiciji in imajo sistolični tlak 160 mmHg ali več, priporočamo znižanje sistoličnega krvnega tlaka na med 140 in 150 mmHg, če to dobro prenašajo, če pa so v slabši psihofizični kondiciji pa ciljni krvni tlak določamo individualno. Zdravilo izbora za zdravljenje krvnega pritiska sta zaviralec angiotenzinske konvertaze ali antagonist

angiotenzinskih receptorjev. Obe zdravili sta v dosedanjih študijah pokazali, da zmanjšata izločanje albumina v urinu in upočasnita DLB pri SB 1 in SB2, ne zmanjšata pa smrtnost pri bolnikih (76). Uporabljamo lahko zdravila iz vseh skupin antitihipertenzivov, vključno z diuretiki, dolgo delujočimi antagonisti kalcijevih kanalčkov in novejšimi vazodilatativnimi blokatorji beta, ki ne vplivajo pomembno na urejenost glikemije in zaznavanje hipoglikemije (51).

Kombinacije AK zaviralca in antagonista angiotenzinskih receptorjev za rutinsko zdravljenje arterijske hipertenzije ne priporočamo, ker lahko kombinacija zdravil povzroča hiperkaliemijo in zmanjšanje GF (76). Prav tako ne priporočamo zdravljenja z direktnim zaviralcem renina (aliskirenom), čeprav zmanjšuje albuminurijo pri bolniku s SB in znižuje krvni pritisk, ker ima več stranskih učinkov, kot je hiperkaliemija, in ne vpliva na SŽO pri teh bolnikih. To je dokazala študija ALTITUDE, objavljena leta 2012.

Ciljni krvni tlak pogosto dosežemo šele s kombinacijo več kot dveh antihipertenzivnih zdravil, in sicer najpogosteje s kombinacijo zaviralca AK in diuretika ali antagonistom angiotenzinskih receptorjev in diuretikom ter zaviralca angiotenzinske konvertaze in kalcijevega antagonista.

UREJANJE MAŠČOB V KRVI

Hiperlipidemija je pogost spremljevalec SB. Povečan holesterol v krvi ne vpliva samo na razvoj ateroskleroze, ampak pospešuje tudi glomerulosklerozo pri KLB. Statini so najpogostejše zdravilo za znižanje holesterola v krvi in urejanje hiperlipidemije pri SB. Pomembno zmanjšajo LDL holesterol pri bolnikih z DLB in pri bolnikih s KLB, zmanjšajo SŽO pri obeh skupinah bolnikov, ne izboljšajo pa ledvične okvare pri obeh skupinah bolnikov (77, 78). Klinične študije dokazujejo, da se bolnikom na dializi z jemanjem statinov srčno-žilna smrtnost ne zmanjša, vendar se z zdravilom nadaljuje, če pri KLB pride do dokončne odpovedi ledvic in je potrebno nadomestno zdravljenje z dializo. Statini so relativno varna zdravila tudi pri okvari funkcije ledvic.

Fenofibrati kot zdravilo za zniževanje holesterola imajo pri bolnikih s SB2 tudi vpliv na zmanjšano izločanje albumina v urinu. Zmanjšajo vnetje in proizvodnjo kolagena I v mezangijskih celicah (79, 80).

1.3 GENSKI POLIMORFIZMI IN DLB

Aleli so različne oblike določene DNA sekvence na določeni kromosomski lokaciji (lokusu). Če so aleli tako pogosti, da jih najdemo v več kot enemu odstotku populacije, govorimo o genetskemu polimorfizmu. Nekateri aleli predstavljajo spremembo v sekvenci DNA, ki leži v intronih in na funkcijo gena nimajo vpliva, nekatere spremembe v zaporedju pa se nahajajo v kodirajočih zaporedjih in imajo lahko za posledico sintezo različnih proteinov, ki lahko vodijo do različnih fenotipov (81).

SNP (polimorfizem enega samega nukleotida) pomeni, da se dva človeška osebka na določenem mestu v genomu razlikujeta v enem samem nukleotidu (81).

ASOCIACIJSKE ŠTUDIJE iščejo skupno pojavljanje dveh dednih lastnosti ali značilnosti z večjo pogostostjo, kot bi bilo pričakovati na podlagi verjetnosti. Asociacija znotraj populacije pa išče specifični alel, ki je običajno najden v večjem odstotku med bolnimi; pri tem je pomembna izbira kontrolnih skupin; če gre dejansko za asociacijo, se bo običajno pojavila z enim specifičnim alelom za celotno preučevano populacijo (81).

V genetski epidemiologiji so znane tako imenovane študije združevanja genomov (angl. genome-wide association study – GWAS), ki v študiji genoma opazujejo genetske različice pri različnih posameznikih in jih povezujejo z določenimi lastnostmi (boleznimi). V študijo so zajeti ljudje z boleznijo in ljudje brez bolezni, ki služijo za kontrolo. Vsaka oseba da vzorec DNA, iz katere se z uporabo SNP bere na milijone genskih variant. Če je pri bolnikih s to boleznijo pogostejša vrsta enega alela, velja, da je varianta povezana z boleznijo. GWA študije preučujejo celoten genom, v nasprotju z metodami, ki jih poznamo v genetiki in specifično testirajo majhno število vnaprej določenih genskih regij (kandidatne gene). GWA študije identificirajo SNP in druge variante v DNA, povezane z boleznijo, vendar same ne morejo določiti, kateri geni so vzročni (82, 83).

Vemo, da je DLB večfaktorska bolezen. Različne študije po vsem svetu so ugotovile, da je v patogenezo okvare ledvic vključenih več genov. Študije o genskem polimorfizmu pri DLB izvajamo z namenom, da bi odkrili gene, ki bi služili kot bioznačevalci, in bi na podlagi teh odkritjih lahko razvijali terapevtske smernice, s katerimi bi lahko zavrli ali preprečili komplikacije SB, kot je DLB. Poleg genov v razvoju bolezni igrajo pomembno vlogo tudi dejavniki okolja. Znano je, da so ti genski polimorfizmi pri DLB tudi različno razporejeni glede na etnično pripadnost.

Obstajajo štiri velike skupine genskih različic, ki jih povezujejo z DLB, in sicer genske različice vnetnih citokinov, ekstracelularnega matriksa, geni, vključeni v oksidativni stres in delovanje endotela, geni, vključeni v delovanje ledvic, in pa genske različice v metabolizmu glukoze in lipidov.

Vnetni citokini sodelujejo v patogenezi DLB. Poznamo različne genske polimorfizme, ki kodirajo te citokine. Citokini delujejo na več različnih tipov celic, tako da sprožajo različne biološke procese. So velika in različna skupina molekul. Razlikujemo 37 različnih interlevkinov, dejavnike tumorske nekroze (TNF), interferone, transformirajoče rastne dejavnike (TGF) in kemokine. Njihova posebna vloga je pri regulaciji vnetnega in imunološkega odgovora. Med najbolj proučene spadata interlevkin (IL) -1beta alel 2 (C/T polimorfizem) in IL-1RN (IL-1 receptor antagonist gen). *IL-6* gen (polimorfizem C/G) je odgovoren za napredovanje DLB in makroalbuminurijo pri Japoncih s SB 2 (84, 85,86).

Gen za TNF je na kromosomu 6p in je podvržen genskim spremembam. -308G/A v genu za *TNF-alfa* naj bi bil povezan s povečanim tveganjem za nastanek DLB pri bolnikih s SB2, vendar so si rezultati v študijah nasprotujoči in so odvisni od etnične pripadnosti posameznika (87, 88).

Obstajajo tudi genske različice v sestavi zunajceličnega matriksa. Kolagen tipa IV je pomembna beljakovina v strukturi številnih tkiv v telesu in je tudi del bazalne membrane. Dva polimorfizma rs614282 in rs679062 kažeta statistično značilno povezanost z DLB (89, 90), vendar so si tudi tu rezultati nasprotujoči. Laminini so glikoproteini zunajceličnega matriksa in nekolagenski del bazalne membrane in so vključeni v številne biološke procese, kot so celična diferenciacija, migracija in oprijem celic (86). Ewens in sodelavci (2005) so našli povezavo na *LAMA4* genu in *LAMAC1* genu, ki kodira ta glikoprotein in DLB (89). Podobne, a tudi nasprotujoče povezave so našli znanstveniki tudi pri genu, ki kodira metaloproteinazo 9. To je encim, ki razgrajuje kolagen IV in V in tudi druge sestavine zunajceličnega matriksa (91).

Najbolj proučene različice genov oksidativnega stresa sta endotelna sintaza dušikovega oksida (*NOS*) gen in superoksid dismutaza 2 (*MnSOD/SOD2*). Pri *NOS* sta najbolj raziskana polimorfizma G894T (rs1799983) in T786C (rs2070744). Polimorfizem G894T je pogosto povezan z DLB in z večjim tveganjem za napredovanje DLB (86).

Katalaza je encim, ki ščiti celice pred oksidativnimi poškodbami ROS sistema tako, da cepi vodikov peroksid v vodo in kisik. Poznamo dva genska polimorfizma gena (*CAT*), in sicer rs560807 in rs1049982, ki sta povezana z večjim tveganjem za nastanek DLB pri SB 1 (86). Podobno velja tudi za superoksidno dismutazo, ki ščiti celico pred oksidativnimi poškodbami s cepljenjem prostih radikalov. Polimorfizem Valin/alanin (rs4880) v genu za *MnSOD* je povezan z večjo verjetnost za nastanek DLB pri SB1 (94). Ta različica nastopa pogosteje pri Japoncih in Korejcih (85%–90%) kot pri prebivalcih severne Evrope (50%).

Pomembnost RAAS sistema pri uravnavanju hemodinamike v ledvici smo omenili že v uvodu.

Encim AK s svojim delovanjem povzroča konstrikcijo žil in na ta način dviguje krvni pritisk. Polimorfizem v genu, ki kodira ta encim, je povezan z nivojem tega encima v krvi. Najbolj proučevan polimorfizem tega gena je insercija/delecija (*I/D*). Poznamo tri genotipe: II, ID in DD. Genotip DD tega gena je povezan z DLB pri SB1 in SB2. Meta-analize so pokazale, da imajo nosilci genotipa II kar 22% manjšo verjetnost, da zbolijo za DLB kot pa nosilci genotipa DD (95), vendar tudi na tem področju znanstveniki ne dobijo enakih rezultatov. Ta trditev naj ne bi veljala za belce (96).

V renin-angiotenzinskem sistemu ima ključno vlogo angiotenzinogen (*AGT*), ki ga encim AK prek angiotenzina I pretvori v aktivno učinkovino angiotenzin II. Ta deluje na srčno-žilni sistem prek receptorja tipa 1 angiotenzina II (*AGTR1*) Poznamo še angiotenzin receptor tipa 2 (*AGTR2*). Meta-analize, ki jih je opravljal Mooyaart leta 2011, niso našle povezave med polimorfizmom rs699 v genu za *AGT* in rs5186 v genu za *AGTR1* in DLB (97). V nasprotju s to ugotovitvijo pa so nedavne študije pokazale, da obstaja povezava med DLB in polimorfizmom v genu za *AGTR2* predvsem pri ženski populaciji (98).

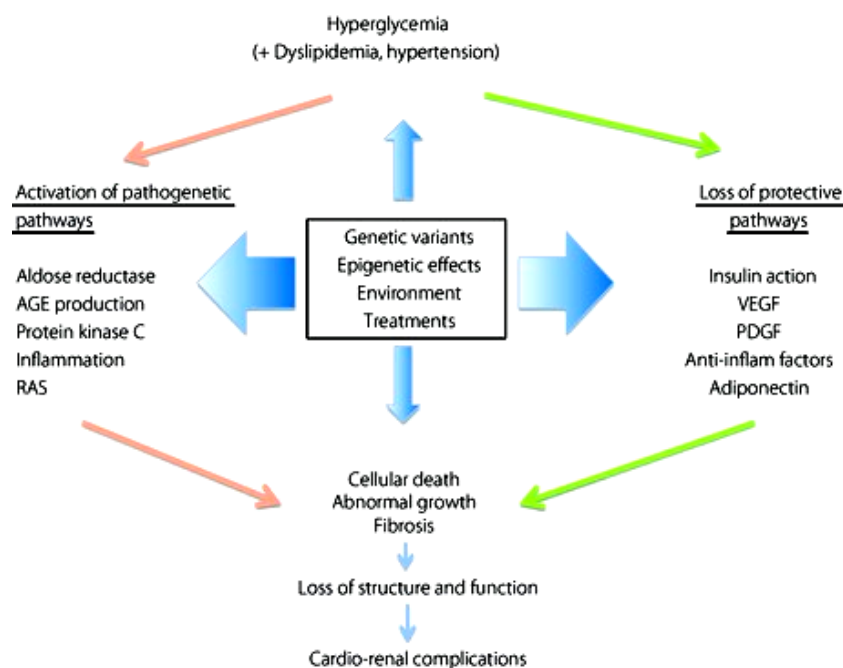
Na DLB vplivajo tudi genski polimorfizmi, ki sodelujejo pri metabolizmu lipidov in glukoze. Adiponektin je citokin s protivnetnimi značilnostmi in uravnava inzulinsko odpornost in dislipidemijo. Alel A na intronu1 (rs182052) gena za adiponektin je povezan z DBL pri Američanih afriškega rodu (99). Nasprotne pa so ugotovitve za polimorfizem rs17300539.

(G > A), in sicer naj bi G alel imel zaščitno vlogo pri razvoju DLB, kar pa ne velja za prebivalce Finske (99).

Apolipoprotein E je ena glavnih sestavin plazemskih lipoproteinov in ima mnogo bioloških funkcij. Polimorfizem apoproteina E vpliva na sestavo serumskih lipidov in tako na patogenezo ateroskleroze ter razvoj DN. E4 alel naj bi imel zaščitno vlogo pri razvoju DLB (20, 21).

Encim aldozna reduktaza pretvarja glukozo v sorbitol in gen, ki ga kodira, ima vsaj dva polimorfizma, ki sta predmet številni študij v povezavi z DLB pri SB 1 in SB 2 (101).

Vidimo, da so številni geni povezani z patogenezo DLB, in številni polimorfizmi v teh genih vplivajo na razvoj in napredovanje DLB (102)



Slika 3: Vloga genetike in epigenetike v patogenezi zapletov sladkorne bolezni (*Genetics of cardiovascular and renal complication in diabetes. J Diabetes Investigation 2016*).

2. NAMEN IN HIPOTEZA RAZISKAVE

Namen naše asociacijske raziskave je bil preveriti naslednje trditve:

1. Polimorfizma rs4340 in rs4341 v genu za angiotenzinsko konvertazo (*AK*) sta povezana z DLB pri bolnikih s SB2.
2. Polimorfizma rs699 in rs4762 v genu za angiotenzinogen (*AGT*) sta povezana z DLB pri bolnikih s SB2.
3. Polimorfizmi rs275651, rs931490, rs5182 in rs5186 v genu za receptor tipa 1 za angiotenzin II (*AGTRI*) so povezani z DLB pri bolnikih s SB2.
4. Polimorfizmi rs3087459, rs5370, rs1476046 v genu za endotelin 1 (*EDNI*) so povezani z DLB pri bolnikih s SB2.
5. Polimorfizem rs3802278 v genu za *ALOX5AP* in polimorfizem rs12762303 v genu za *ALOX5* sta povezana z DLB pri bolnikih s SB2.

Hipoteza je naslednja:

Polimorfizmi testiranih genov so povezani z diabetično ledvično boleznijo pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2.

3. PREISKOVANCI IN METODE RAZISKAVE

Vsi preiskovanci, ki so sodelovali v raziskavi, so bili seznanjeni s potekom in namenom raziskave. Strinjali so se z odvzemom krvi za genetske in biokemijske preiskave ter z ultrazvočno preiskavo, kar so potrdili s svojim podpisom. Raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko na redni seji 13. decembra 2011 (številka odločbe: 105/11).

3.1 PREISKOVANCI

V retrospektivno asociacijsko raziskavo smo vključili 651 preiskovancev s SB2, ki so imeli bolezen že najmanj deset let. Bolniki so bili vodeni v diabetičnih ambulantah v Splošni bolnišnici Murska Sobota, Splošni bolnišnici Slovenj Gradec in v Univerzitetnem kliničnem centru Maribor. Preiskovanci so bili slovenskega rodu in niso bili v sorodu. Ob vključitvi v raziskavo so vsi preiskovanci podali anamnestične podatke o predhodnih boleznih, kajenju in jemanju zdravil. Odvzeti so jim bili vzorci krvi za molekularno-genetske in biokemijske preiskave in oddali so vzorce urina. Odvzeta jim je bila venska kri iz kubitalne vene, in sicer 10 ml v epruvete Na-EDTA. Določeni so bili glikemija na tešče, HbA1c (%), skupni holesterol, HDL, LDL, trigliceridi, serumski kreatinin, S-sečnina, S-cistatin in S-hemoglobin. Preiskovanci so bili ob odvzemu krvi tešči. Od kliničnih podatkov so bili zbrani podatki o spolu in starosti, telesni teži in višini, izračunan je bil indeks telesne mase (ITM) ter izmerjena sistolični in diastolični krvni pritisk. Vsi omenjeni podatki so bili vpisani v enotni vprašalnik. Bolniki so opravili pregled očesnega ozadja za izključitev diabetične retinopatije (DR) in meritve gleženjskega indeksa za izključevanje periferne arterijske bolezni ter so bili pregledani v ambulanti za diabetično nogo za izključevanje diabetične nevropatije (DNeur). Vsi vključeni bolniki so v razmaku enega meseca trikrat oddali prvi jutranji urin in glede na prisotnost stalne albuminurije smo jih razporedili v dve skupini, skupino z diabetično nefropatijo (DN) in skupino brez nje, ki je služila kot kontrola. Za ocenitev ledvične funkcije smo uporabili enačbo MDRD in s-cistatin. Na ta način smo dobili dve skupini bolnikov, in sicer 276 bolnikov z DN in 375 bolnikov brez DN, ki so služili kot kontrola. Opravili smo tudi ultrazvok trebuha zaradi strukturne ocene ledvic.

Iz raziskave so bili izključeni bolniki z že znano ledvično boleznijo, bolniki s srčnim popuščanjem NYHA III-IV, bolniki z akutno okužbo sečil, z znanimi ledvičnimi kamni in bolniki, ki so prekomerno uživali alkohol.

3.2 BIOKEMIČNE IN URINSKE LABORATORIJSKE PREISKAVE

Ob vključitvi v raziskavo smo odvzeli kri za že navedene biokemične preiskave.

Očistek glomerulne filtracije (**eGF**) je bil izračunan po revidirani enačbi **MDRD**: $eGF \text{ (ml/min/1,73m}^2\text{)} = 175 \times (\text{koncentracija s-kreatinina (mikrog/l)/88,4})^{-1,154} \times (\text{starost})^{-0,203} \times (0,742 \text{ za ženske})$ (33,

34). Standardna laboratorijska metoda za merjenje koncentracije s-kreatinina je bila predpogoj za točnejše izračunavanje oGF po formuli. Določili smo ga trikrat v razmaku enega meseca.

Albuminurijo oziroma **proteinurijo** smo najprej določali s testnimi lističi naključnega vzorca urina, in ko je bil pri preiskavi urina s testnim lističem izsledek proteinurije 0, smo določili koncentracijo albumina in kreatinina v srednjem curku drugega jutranjega vzorca urina. Preiskovanci so dobili pisna navodila, na kaj morajo biti pozorni pri zbiranju in oddaji vzorca jutranjega urina. Ko je bilo razmerje med koncentracijama albumina in kreatinina pod 3g/mol, smo to opredelili kot *normoalbuminurijo*, ko pa je bilo to razmerje 3 g/mol pa do 300 g/mol, smo to opredelili kot *zmerno zvišano albuminurijo* (mikroalbuminurijo). Če je bilo razmerje med koncentracijo albumina in kreatinina 30 g/mol in več, pa smo to opredelili kot *visoko zvišano albuminurijo* (makroalbuminurijo). Razmerje albumina in kreatinina v urinu smo določali v treh vzorcih urina v razmaku enega meseca. Razmerja albumin/kreatinin nismo določali, če so preiskovanci imeli znake okužbe, povišano telesno temperaturo, visok krvni pritisk ali znake srčnega popuščanja.

Ko je bil pri preiskavi urina s testnim lističem izsledek 1 ali več, smo določili koncentracijo proteinov in kreatinina v srednjem curku drugega jutranjega vzorca urina. Laboratorijske izsledke smo podali kot količnik U-proteini/kreatinin v g/mol in izračunali oceno dnevne proteinurije (oDP) po enačbi:

$$\text{oDP (g/dan/1,73m}^2\text{)} = \text{U-proteini(g/l)} \times 8,8 \text{ mmol/dan/1,73m}^2 : \text{U-kreatinin(mmol/l)}.$$

Vrednost oDP nad 0,150 g/dan/1,73m² je bila bolezenska, in če je bila takšna vrednost izmerjena v dveh vzorcih jutranjega urina od treh, smo to proglasili kot stalno proteinurijo.

Biokemijske preiskave in ostale urinske laboratorijske preiskave so bile izvedene po standardnem biokemijskem postopku v testiranem bolnišničnem laboratoriju.

3.3 MOLEKULARNOGENETSKA ANALIZA

DNA smo izolirali v raziskovalnem laboratoriju Inštituta za histologijo in embriologijo v Ljubljani. Izolacija genomske DNA je potekala v aparatu QIAcube (Qiagen GmbH, Hilden, Nemčija) po protokolu "V3". Postopek za izolacijo DNA iz 200 µl krvi smo izvedli s pomočjo QIAamp DNA Blood Mini Kita (250) (Qiagen GmbH, Hilden, Nemčija), v katerega je vključenih pet različnih reagentov (pufer AL, 96% etanol, pufer AW1, pufer AW2, pufer AE) in ustrezna količina proteaze (Qiagen GmbH, Hilden, Nemčija) (285 µl/200 µl krvi). Izolirano DNA smo do uporabe shranili na -24 °C.

Polimorfizem rs4340 v genu za *AK* smo določili s pomočjo verižne reakcije s polimerazo (PCR). Reakcijska mešanica za PCR (10 ml) je vsebovala 0,5 mM dNTP (Gibco), 10 mM TRIS HCl pufer (Gibco), 3 mM MgCl₂, 0,2 mM začetne oligonukleotide (5'-CTT ACT TGA ATT CCA AGA GCA CCC-3', 5'-TCC CAG AGG GAA TAT ATG CGT TGG-3'), 500 ng genomske DNA ter 1 enoto encima Taq DNA polimeraze (Gibco). Reakcija PCR je vsebovala 30 ciklov enominutne

denaturacije pri 94 °C, enominutnega pripenjanja oligonukleotidov pri 60 °C in dvominutne sinteze DNA pri 72 °C. Produkta PCR smo ločili na 2-odstotnem agaroznem gelu. S kompetitivno alelna specifično verižno reakcijo s polimerazo smo analizirali polimorfizem rs4341v genu *AK*, polimorfizma rs699 in rs4762 v genu za *AGT*, polimorfizme rs275651, rs931490, rs5182 in rs5186 v genu za *AGTRI* in polimorfizme rs1476046, rs5370, rs3087459 v genu za *EDNI*. Za pripravo 5 µl reakcijske mešanice smo uporabili naslednje reagente: 2x KASPar Reaction Mix v 3 (KTaq polimeraza DNA, pasivno referenčno barvilo ROX, 1,8 mM MgCl₂, dva oligonukleotida, ki sta na 5' koncu označena s fluorescenčnima barviloma FAM in HEX in katerih nukleotidno zaporedje je komplementarno zaporedju »repov« na alelna specifičnih oligonukleotidnih začetnikih; dva oligonukleotida, ki imata na 3' koncu dušilno barvilo in katerih zaporedje je komplementarno zaporedju oligo-nukleotidov s fluoresceini ter zaporedju »repov« alelna specifičnih oligonukleotidnih začetnikov): 2,5 µl; Assay Mix (mešanica treh neoznačenih oligonukleotidnih začetnikov: dva alelna specifična oligonukleotidna začetnika, ki imata na 5' koncu neoznačen »rep« in skupni proti-smiselni oligonukleotidni začetnik): 0,07 µl, MgCl₂ (50 mM): 0,05 µl; H₂O: 1,38 µl; genomska DNA: 1 µl. Pomnoževanje je potekalo v aparaturi StepOne (Applied Biosystems) pod naslednjimi pogoji: aktivacija encima Taq polimeraze 15 minut pri 94 °C, sledilo je deset ciklov pomnoževanja v dveh stopnjah: denaturacija 20 sekund pri 94 °C, prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje verige DNA 60 sekund pri 61 °C (temperatura se je pri naslednjih ciklih postopno zniževala, vsak cikel za 0,6 °C do 55 °C »touchdown« PCR); ter dodatnih 26 ciklov: denaturacija deset sekund pri 94 °C, prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje verige DNA 60 sekund pri 55 °C.

Izbrani genski polimorfizem rs38022789 v genu za *ALOX5AP* in polimorfizem rs12762303 v genu *ALOX5* smo analizirali z metodo PCR v realnem času. Uporabljali smo vnaprej izdelan komplet kemikalij TagMan SNP Genotyping assay (C_25474290_10 in C_27830265_10) (Applied Biosystem by Life Technologies, ZDA), pri čemer smo sledili protokolu, priporočenem s strani proizvajalca. Reakcijska mešanica (5 µl) je vsebovala (1×) univerzalno reakcijsko mešanico TagMan Universal Master Mix, (1×) mešanico oligonukleotidnih začetnikov in s fluorescentnimi barvili (VIC/FAM) označeni sonde, specifični za detekcijo genskega polimorfizma SNP Genotyping Assay, 1,88 µl H₂O in 0,5 µl DNA. Reakcija pomnoževanja je potekala v aparatu StepOne™ (48-well) Real-Time PCR Systems pod naslednjimi pogoji: 1. korak: branja začetne fluorescence (angl. »Pre – PCR Read«): 30 sekund pri 60 °C; 2. korak: qPCR pomnoževanje: predenaturacija: deset minut pri 95 °C; 35 ciklov (15 sekund pri 95 °C – denaturacija in 60 sekund pri 60 °C (faza prileganja specifičnih začetnih oligonukletidov in sonde); 3. korak: branje končne (generirane) fluorescence (angl. »Post – PCR Read« : 30 sekund pri 60 °C (3). V vsaki seriji smo na optično ploščico nanesti tudi po tri kontrolne vzorce z znanim genotipom (homozigotni vzorec za en alel, heterozigotni vzorec in homozigotni vzorec za drug alel) ter negativno kontrolo.

3.4 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

Normalno porazdelitev spremenljivk smo preverili s Kolmogorov-Smirnovim testom. Normalno porazdeljene kontinuirane spremenljivke smo prikazali v obliki povprečja \pm standardni odklon, vrednosti preostalih spremenljivk, ki niso bile normalno porazdeljene, pa kot vrednosti mediane (medkvartilni interval). Numerične vrednosti spremenljivk med preiskovanci z DN in kontrolno skupino (brez DN) smo primerjali s Studentovim testom t, če so bile normalno porazdeljene in z Mann-Whitneyevim testom ali Kruskal-Wallisovim testom, če so bile spremenljivke asimetrično porazdeljene. Za primerjavo vrednosti kategoričnih spremenljivk, statistično vrednotenje razlik v frekvencah alelov in genotipov med obema preiskovanima skupinama pa smo uporabili test hi-kvadrat. S pomočjo testa hi-kvadrat smo preverili, ali se genotipi v obeh skupinah porazdeljujejo v skladu s Hardy-Weinbergovim ravnotežjem. Naredili smo logistično regresijsko analizo. Izračunali smo razmerje obojev (OR) in 95-odstotni interval zaupanja. Neodvisne spremenljivke so tiste, ki so se pokazale za statistično pomembne v univariatni analizi. Pri preizkušanju domnev smo kot statistično pomembno upoštevali vrednost p, manjšo od 0,05. Statistično analizo smo naredili s pomočjo računalniškega programa SPSS verzija 20 (SPSS Inc. Illinois).

4. REZULTATI

Doktorska disertacija je sestavljena iz trinajstih asociacijskih raziskav v šestih genih:

1. polimorfizma rs4340 in rs4341 v genu za angiotenzinsko konvertazo (*AK*)
2. polimorfizma rs699 in rs4762 v genu za angiotenzinogen (*AGT*),
3. polimorfizmi rs275651, rs931490, rs5182 in rs5186 v genu za receptor tipa 1 za angiotenzin II (*AGTRI*),
4. polimorfizmi rs3087459, rs5370, rs1476046 v genu za endotelin 1 (*EDNI*),
5. polimorfizem rs3802278 v genu za 5-lipoksigenazo-aktivirajoči proteini (*ALOX5AP*)
6. polimorfizem rs12762303 v genu za arahidonat 5-lipoksigenazo (*ALOX5*)

pri bolnikih s SB2, pri čemer smo ugotavljali povezavo z razvojem diabetične ledvične bolezni.

4.1 KLINIČNE IN BIOKEMIJSKE ZNAČILNOSTI PREISKOVANCEV

Demografski, klinični in biokemični podatki 651-ih preiskovancev s SB2, ki so bili vključeni v našo raziskavo, so prikazani v tabeli 2. Med preiskovanci je bilo 375 bolnikov brez znakov DLB, ki so nam služili kot kontrolna skupina, preostalih 276 bolnikov pa je imelo znake DLB po Slovenskih smernicah za klinično obravnavo sladkorne bolezni tipa 2 (51, 103).

Tabela 2: Klinične in biokemijske značilnosti preiskovancev vključenih v raziskavo

	Bolniki s SB2 in z DLB	Bolniki s SB2 in brez DLB	p-vrednost
število vključenih preiskovancev	276	375	
moški spol	59,1%	52,4%	0,1
starost (leta)	64,75 ± 9,15	63,75 ± 8,0	0,13
trajanje SB (leta)	14,0 (10,0-19,0)	13,5 (11,0-18,3)	0,84
trajanje visokega krvnega tlaka (leta)	12,23 ± 9,88	10,52 ± 8,22	0,02
sistolični krvni tlak [mm Hg]	155,27 ± 18,92	149,84 ± 19,63	<0,001
diastolični krvni tlak [mm Hg]	84,87 ± 11,63	84,06 ± 11,42	0,36
indeks telesne mase	31,3 ± 4,68	30,77 ± 5,0	0,23
kadilci (%)	6,6%	8,9%	0,31
srčno žilne bolezni	20,0%	12,2%	0,007
anamneza srčno žilnih bolezni	41,3%	58,7%	0,91
diabetična retinopatija	37,8%	24,6%	<0,001
trajanje diabetične retinopatije (leta)	3,94 ± 3,11	6,54 ± 7,03	0,23
diabetična nevropatija	9,1%	6,0%	0,38
diabetična noga	15,5%	8,1%	0,03
S-HbA1c [%] ¹	7,98 ± 1,38	7,65 ± 1,14	0,001
glikemija na tešče [mmol/l]	9,03 ± 2,76	8,51 ± 2,53	0,01
S-Hb [g/l]	139,39 ± 14,91	139,40 ± 12,96	0,99
S-urea [mmol/l]	7,35 ± 3,73	6,25 ± 1,91	<0,001
S-kreatinine [μmol/l]	81,0 (66,0-103,0)	76,0 (64,0-89,8)	0,002
moški spol	92,0 (71,5-107,0)*	82,5 (69,0-95,0)*	0,006
ženski spol	70,5 (55,8-88,3) **	70,0 (59,0-81,0) **	0,7
oGFR [MDRD, ml/min]	72,6 ± 19,74	75,22 ± 15,16	0,22
moški spol	71,97 ± 19,45*	77,66 ± 14,33*	0,002*
ženski spol	74,31 ± 20,72**	72,45 ± 15,69**	0,13**
S-cistatin C [mg/l]	0,8 (0,7-1,1)	0,7 (0,6-0,9)	<0,001
celotni holesterol [mmol/l]	4,62 ± 1,17	4,55 ± 0,99	0,42
holesterol HDL [mmol/l]	1,23 ± 0,35	1,26 ± 0,36	0,29
holesterol LDL [mmol/l]	2,59 ± 0,95	2,57 ± 0,80	0,73
trigliceridi [mmol/l]	1,6 (1,1-2,5)	1,5 (1,0-2,3)	0,04
U-albumin/kreatinin [g/mol] - vzorec, 1	9,4 (4,5-33,6)	1,0 (0,6-1,6)	<0,001
U-albumin/kreatinin [g/mol] - vzorec, 2	10,6 (4,5-33,9)	1,0 (0,7-1,7)	<0,001
U-albumin/kreatinin [g/mol] - vzorec, 3	9,5 (4,3-33,9)	1,1 (0,7-1,8)	<0,001

Vrednosti spremenljivk so prikazane kot povprečje ± standardni odklon ali kot mediana (medkvartilni interval)
oGRF - očistek glomerulne filtracije, HDL - high-density lipoprotein, LDL - low-density lipoprotein,
S - serum, Hb - hemoglobin, HbA1c - glikiran hemoglobin, U - urin, Hb - hemoglobin
*primerjava moških z DLB in moških brez DLB; **primerjava žensk z DLB in žensk brez DLB

Iz tabele 2 je razvidno, da med bolniki s SB2 in z DLB ter kontrolno skupino ni bilo statistično pomembnih razlik v starosti, spolu, trajanju SB, indeksu telesne mase, diastoličnem krvnem pritisku in kadilskem statusu.

Statistično pomembna razlika je bila ugotovljena pri naslednjih spremenljivkah, in sicer trajanju povišanega krvnega tlaka ($p = 0,02$), posebej sistolične vrednosti ($p < 0,001$), anamnezi prebolelih srčno-žilnih dogodkov, prisotnosti DR in diabetične noge. Biokemijske preiskave krvi so pokazale statistično pomembno višje ravni HbA1c, glikemije na tešče, trigliceridov in cistatina C v serumu v skupini bolnikov s SB2 in z DLB v primerjavi s kontrolno skupino.

Razlike v kazalnikih, ki opredeljujejo ledvično okvaro (serumski kreatinin, cistatin C) in razmerje albumin/kreatinin v treh vzorcih jutranjega urina, nam dokazujejo pravilni izbor primerov, saj se statistično razlikujejo ($p < 0,001$) od kontrolne skupine, ki nima DLB. Cistatin C je bil boljši označevalec okvare ledvične funkcije kot oGF (MDRD enačba ml/l) in je bil statistično višji pri bolnikih s SB2 in DLB ($p < 0,001$) (tabela 2).

4.2 GENSKA ANALIZA PREISKOVANCEV

V tem delu so prikazani rezultati raziskovanja izbranih polimorfizmov v kandidatnih genih za DLB. V vsako raziskavo je bilo vključenih 276 bolnikov z DLB in 375 bolnikov, ki niso imeli znakov DLB, vsi pa so imeli SB2 že vsaj 10 let.

4.2.1 POLIMORFIZMA rs4340 in rs 4341, V GENU ZA AK

Razporeditev genotipov in alelov polimorfizma rs4340 in rs4341 v genu za *AK* je prikazana v tabeli 3.

Tabela 3: Razporeditev genotipov in alelov polimorfizma rs4340 in rs4341 v genu za *AK* pri preiskovancih s SB2 in z DLB (primeri) ter preiskovancih s SB2 in brez znakov DLB (kontrolne)

Genotip	Primeri (276)	Kontrolne (375)	p-vrednost
rs4340			
DD	78 (28,3)	115 (30,7)	
ID	129 (46,7)	169 (45,0)	0,8
II	69 (25)	91 (24,3)	
alel D (%)	285 (51,6)	399 (53,2)	0,06
alel I (%)	267 (48,4)	351 (46,8)	
HWE	0,3	0,07	
rs4341			
CC	56 (20,3)	79 (21,0)	
CG	144 (52,2)	178 (47,4)	0,45
GG	76 (27,5)	118 (31,5)	
alel C (%)	256 (46,4)	336 (44,8)	
alel G (%)	296 (53,6)	414 (55,2)	0,6
HWE	0,42	0,44	

HWE - Hardy-Weinbergovo ravnovesje

Primerjava bolnikov z DLB s kontrolno skupino brez DLB ni pokazala statistično pomembnih razlik v razporeditvi genotipov in alelov polimorfizmov rs4340 in rs4341 v genu za *AK*. Razporeditev genotipov pri bolnikih s SB2 in z DLB ter v kontrolni skupini preiskovancev brez DLB in s SB2 je bila v Hardy-Weinbergovem ravnovesju.

Povezavo genotipov polimorfizmov rs4340 in rs4341 v genu za *AK* s tveganjem za pojav DLB prikazuje tabela 4.

Tabela 4: Povezava genotipov polimorfizmov rs4340 in rs4341 v genu za *AK* z DLB pri preiskovancih s SB2

	Genotip	Primeri (276)	Kontrole (375)	*OR, 95% CI/p-vrednost
rs4340	DD	78 (28,3)	115 (30,7)	0,80 (0,29 – 2,25)/0,7
	ID	129 (46,7)	169 (45,0)	1,32 (0,49 – 3,53)/0,6
	II	69 (25)	91 (24,3)	referenca
rs4341	CC	56 (20,3)	79 (21,0)	1,00 (0,27 – 3,76)/0,99
	CG	144 (52,2)	178 (47,4)	0,76 (0,26 – 2,19)/0,61
	GG	76 (27,5)	118 (31,5)	referenca

*OR - razmerje obojev, prilagojeno na trajanje hipertenzije, sistolični krvni tlak, prisotnost srčno-žilnih bolezni, DR, diabetične noge, vrednosti HbA1c, glukoze na tešče, serumske vrednosti uree, kreatinina, cistatina, razmerje albumin/kreatinin, CI - interval zaupanja

Rezultati logistične regresije so pokazali, da ni statistično pomembne povezave med testiranima polimorfizmoma in DLB.

4.2.2 POLIMORFIZMI rs699 in rs4762 V GENU ZA ANGIOTENZINOGEN (*AGT*)

Razporeditev genotipov in alelov polimorfizmov rs699 in rs4762 v genu za angiotenzinogen (*AGT*) je prikazana v tabeli 5.

Tabela 5: Razporeditev genotipov in alelov polimorfizmov rs699 in rs4762 v genu za angiotenzinogen (*AGT*) pri preiskovancih s SB2 in z DLB (primeri) ter preiskovancih s SB2 in brez znakov DLB (kontrola)

	Primeri (276)	Kontrole (375)	p-vrednost
rs699			
GG	57 (20,6)	88 (23,4)	
GA	144 (52,2)	180 (48,1)	0,56
AA	75 (27,2)	107 (28,5)	
alel G (%)	258 (46,7)	356 (47,5)	0,8
alel A (%)	294 (53,3)	394 (52,5)	
HWE	0,43	0,47	
rs4762			
GG	204 (73,9)	264 (70,4)	
GA	64 (23,2)	103 (27,5)	0,41
AA	8 (2,9)	8 (2,1)	
alel G (%)	472 (85,5)	631 (84,1)	0,5
alel A (%)	80 (14,5)	119 (15,9)	
HWE	0,28	0,58	

HWE - Hardy-Weinbergovo ravnovesje

Primerjava bolnikov z DLB s kontrolno skupino brez DLB ni pokazala statistično pomembnih razlik v razporeditvi genotipov in alelov polimorfizmov rs699 in rs4762 v genu za *AGT*. Razporeditev genotipov pri bolnikih s SB2 in z DLB ter v kontrolni skupini preiskovancev brez DLB in s SB2 (kontrola) je bila v Hardy-Weinbergovem ravnovesju.

Povezavo genotipov polimorfizmov rs699 in rs4762 v genu za *AGT* s tveganjem za pojav DLB prikazuje tabela 6.

Tabela 6: Povezava genotipov polimorfizmov rs699 in rs4762 v genu za *AGT* z DLB pri preiskovancih s SB2

	genotip	primeri (276)	kontrole (375)	*OR, 95% CI/p-vrednost
rs699	GG	57 (20,6)	88 (23,4)	1,12 (0,42 – 2,95)/0,82
	GA	144 (52,2)	180 (48,1)	1,65 (0,74 – 3,66)/0,22
	AA	75 (27,2)	107 (28,5)	referenca
rs4762	GG	204 (73,9)	264 (70,4)	0,94 (0,45 – 1,96)/0,86
	GA	64 (23,2)	103 (27,5)	0,14 (0,01 – 2,25)/0,16
	AA	8 (2,9)	8 (2,1)	referenca

OR - razmerje obolevnosti, prilagojeno na trajanje hipertenzije, sistolični krvni tlak, prisotnost srčno-žilnih bolezni, DR, diabetične noge, vrednosti HbA1c, glukoze na tešče, serumske vrednosti uree, kreatinina, cistatina, razmerje albumin/kreatinin, CI - interval zaupanja

Rezultati logistične regresije so pokazali, da ni statistično pomembne povezave med testiranimi polimorfizmi in DLB.

4.2.3 POLIMORFIZMI rs275651, rs931490, rs5186 in rs5182 V GENU ZA RECEPTOR 1 ZA ANGIOTENZIN I1 (*AGTR1*)

Razporeditev genotipov in alelov polimorfizmov rs275651, rs931490, rs5182, in rs5186 v genu za *AGTR1* je prikazana v tabeli 7.

Tabela 7: Razporeditev genotipov in alelov polimorfizmov rs275651, rs931490, rs5182, in rs5186 v genu za *AGTRI* pri preiskovancih s SB2 in z DLB (primeri) ter preiskovancih s SB2 in brez znakov DLB (kontrola)

	Primeri (276)	Kontrole (375)	p-vrednost
rs275651			
AA	13 (4,7)	8 (2,1)	0,16
AT	83 (30,1)	108 (28,8)	
TT	180 (65,2)	259 (69,1)	
alel A (%)	109 (19,7)	124 (16,5)	0,15
alel T (%)	443 (80,3)	626 (83,5)	
HWE	0,40	0,40	
rs931490			
AA	177 (64,1)	251 (66,9)	0,11
GA	86 (31,2)	117 (31,2)	
GG	13 (4,7)	7 (1,9)	
alel A (%)	440 (79,7)	619 (82,5)	0,22
alel G (%)	112 (20,3)	131 (17,5)	
HWE	0,54	0,11	
rs5182			
TT	58 (21,0)	60 (16,0)	0,25
TC	142 (51,4)	202 (53,9)	
CC	76 (27,5)	113 (30,1)	
alel T (%)	258 (46,7)	322 (42,9)	0,19
alel C (%)	294 (53,3)	428 (57,1)	
HWE	0,58	0,05	
rs5186			
CC	22 (7,9)	32 (8,4)	0,40
CA	110 (39,7)	167 (44,6)	
AA	144 (52,3)	176 (47,0)	
alel C (%)	154 (27,9)	231 (30,8)	0,28
alel A (%)	398 (72,1)	519 (69,2)	
HWE	0,88	0,39	

HWE- Hardy-Weinbergovo ravnovesje

Primerjava bolnikov z DLB s kontrolno skupino brez DLB ni pokazala statistično pomembnih razlik v razporeditvi genotipov in alelov polimorfizmov rs275651, rs931490, rs5186 in rs5182 v genu za *AGTRI*. Razporeditev genotipov pri bolnikih s SB2 in z DLB ter v kontrolni skupini preiskovancev brez DLB in s SB2 (kontrola) je bila v Hardy-Weinbergovem ravnotežju.

Povezavo genotipov polimorfizmov rs275651, rs931490, rs5182 in rs5186 v genu za *AGTRI* s tveganjem za pojav DLB prikazuje tabela 8.

Tabela 8: Povezava genotipov polimorfizmov rs275651, rs931490, rs5182 in rs5186 v genu za *AGTRI* z DLB pri preiskovancih s SB2

	Genotip	Primeri (276)	Kontrole (375)	*OR, 95% CI/p-vrednost
rs275651	AA	13 (4,7)	8 (2,1)	1,64 (0,23 – 11,71)/0,82
	AT	83 (30,1)	108 (28,8)	1,38 (0,69 – 2,76)/0,36
	TT	180 (65,2)	259 (69,1)	referenca
rs931490	AA	177 (64,1)	251 (66,9)	referenca
	GA	86 (31,2)	117 (31,2)	1,17 (0,58 – 2,36)/0,65
	GG	13 (4,7)	7 (1,9)	1,57 (0,22 – 11,24)/0,65
rs5182	TT	58 (21,0)	60 (16,0)	referenca
	TC	142 (51,4)	202 (53,9)	0,89 (0,38 – 2,08)/0,79
	CC	76 (27,5)	113 (30,1)	0,88 (0,31 – 2,47)/0,81
rs5186	CC	22 (7,9)	32 (8,4)	2,10 (0,55 – 7,40)/0,29
	CA	110 (39,7)	167 (44,6)	0,76 (0,39 – 1,49)/0,43
	AA	144 (52,3)	176 (47,0)	referenca

OR - razmerje obetov, prilagojeno na trajanje hipertenzije, sistolični krvni tlak, prisotnost srčno-žilnih bolezni, DR, diabetične noge, vrednosti HbA1c, glukoze na tešče, serumske vrednosti uree, kreatinina, cistatina, razmerje albumin/kreatinin, CI - interval zaupanja

Rezultati logistične regresije so pokazali, da ni statistično pomembne povezave med testiranimi polimorfizmi in DLB.

4.2.4 POLIMORFIZMI rs3087459, rs5370, rs1476046 V GENU ZA ENDOTELIN 1 (*EDN1*)

Razporeditev genotipov in alelov polimorfizmov rs3087459, rs5370 in rs1476046 v genu za *EDN1* je prikazana v tabeli 9.

Tabela 9: Razporeditev genotipov in alelov polimorfizmov rs3087459, rs5370 in rs1476046 v genu za *EDN1* pri preiskovancih s SB2 in z DLB (primeri) ter preiskovancih s SB2 in brez znakov DLB

	Primeri (276)	Kontrole (375)	p-vrednost
rs3087459			
CC	6 (2,2)	13 (3,4)	
AC	81 (29,3)	110 (29,3)	0,6
AA	189 (68,5)	252 (67,3)	
alel C (%)	93 (16,8)	136 (18,1)	
alel A (%)	459 (83,2)	614 (81,9)	0,6
HWE	0,4	0,8	
rs5370			
TT	12 (4,3)	22 (5,9)	
TG	116 (42,1)	139 (37,1)	0,4
GG	148 (53,6)	214 (57,0)	
alel T (%)	140 (25,4)	183 (24,4)	
alel G (%)	412 (74,6)	567 (75,6)	0,7
HWE	0,07	0,9	
rs1476046			
AA	12 (4,3)	28 (7,5)	
GA	116 (42,1)	137 (36,5)	0,1
GG	148 (53,6)	210 (56,0)	
alel A (%)	140 (25,4)	193 (25,7)	
alel G (%)	412 (74,6)	557 (74,3)	0,9
HWE	0,07	0,4	

HWE- Hardy-Weinbergovo ravnovesje

Primerjava bolnikov z DLB s kontrolno skupino brez DLB ni pokazala statistično pomembnih razlik v razporeditvi genotipov in alelov polimorfizmov rs3087459, rs5370 in rs1476046 v genu za *EDNI*. Razporeditev genotipov pri bolnikih s SB2 in z DLB ter v kontrolni skupini preiskovancev brez DLB in s SB2 je bila v Hardy-Weinbergovem ravnovesju.

Povezavo genotipov polimorfizmov rs3087459, rs5370 in rs1476046 v genu za *EDNI* s tveganjem za pojav DLB prikazuje tabela 10.

Tabela 10: Povezava genotipov polimorfizmov rs3087459, rs5370 in rs1476046 v genu za *EDNI* z DLB pri preiskovancih s SB2

	Genotipi	Primeri (276)	Kontrole (375)	OR, 95% CI/p-vrednost
rs3087459	CC	6 (2,2)	13 (3,4)	0,66 (0,10 – 1,02)/0,7
	AC	81 (29,3)	110 (29,3)	0,75 (0,39 – 1,45)/0,4
	AA	189 (68,5)	252 (67,3)	referenca
rs5370	TT	12 (4,3)	22 (5,9)	2,26 (1,28 – 2,37)/0,2
	TG	116 (42,1)	139 (37,1)	2,78 (1,26 – 2,96)/0,4
	GG	148 (53,6)	214 (57,0)	referenca
rs1476046	AA	12 (4,3)	28 (7,5)	0,34 (0,27 – 0,65)/0,2
	GA	116 (42,1)	137 (36,5)	0,53 (0,51 – 1,58)/0,6
	GG	148 (53,6)	210 (56,0)	referenca

OR - razmerje obetov, prilagojeno na trajanje hipertenzije, sistolični krvni tlak, prisotnost srčno-žilnih bolezni, DR, diabetične noge, vrednosti HbA1c, glukoze na tešče, serumske vrednosti uree, kreatinina, cistatina, razmerje albumin/kreatinin, CI - interval zaupanja

Rezultati logistične regresije so pokazali, da ni statistično pomembne povezave med testiranimi polimorfizmi in DLB.

4.2.5 POLIMORFIZEM rs3802278 V GENU ZA *ALOX5AP* IN POLIMORFIZEM rs12762303 V GENU ZA *ALOX5*

Razporeditev genotipov in alelov polimorfizma rs3803278 v genu za *ALOX5AP* in polimorfizma rs12762303 v genu za *ALOX5* je prikazana v tabeli 11.

Tabela 11: Razporeditev genotipov in alelov polimorfizma rs3803278 v genu za *ALOX5AP* in polimorfizma rs12762303 v genu za *ALOX5* pri preiskovancih s SB2 in z DLB (primeri) ter preiskovancih s SB2 in brez znakov DLB (kontrola)

	Primeri (276)	Kontrole (375)	p-vrednost
rs12762303			
TT	177 (64,0)	264 (70,5)	
TC	93 (33,7)	106 (28,3)	0,2
CC	6 (2,3)	5 (1,2)	
alel T (%)	447 (81)	634 (84,5)	0,1
alel C (%)	105 (19)	116 (15,5)	
HWE	0,1	0,1	
rs3803278			
TT	145 (53,0)	224 (59,8)	
TC	101 (36,3)	135 (35,9)	0,004
CC	30 (10,7)	16 (4,3)	
alel T (%)	391 (70,8)	583 (77,7)	0,006
alel C (%)	161 (29,2)	167 (22,3)	
HWE	0,06	0,4	

HWE - Hardy-Weinbergovo ravnovesje

V razporeditvi genotipov polimorfizma rs12762303 v genu za *ALOX5* ni bila ugotovljena statistično pomembna razlika med skupino bolnikov s SB2 in z DLB in skupino bolnikov s SB2 brez DLB. Razporeditev genotipov v populaciji bolnikov s SB2 in z DLB ter v kontrolni skupini je bila v Hardy-Weinbergovem ravnovesju.

Nasprotno pa polimorfizem rs3803278 v genu za *ALOX5AP* kaže statistično značilno razliko v razporeditvi genotipov ($p = 0,004$) in alelov ($p = 0,006$). Pri bolnikih s SB2 in z DLB smo našli genotip TT v 53%, genotip TC v 36,3% in genotip CC v 10,7%. Pri bolnikih s SB2 in brez znakov za DLB pa smo našli genotip TT v 59,8%, genotip TC v 35,9% in genotip CC v 4,3%. Razporeditev genotipov v populaciji bolnikov s SB2 in z DLB ter v kontrolni skupini je bila v Hardy-Weinbergovem ravnovesju.

Povezavo genotipov polimorfizma rs12762303 v genu za *ALOX5* in polimorfizma rs3803278 v genu za *ALOX5AP* s tveganjem za pojav DLB prikazuje tabela 12.

Tabela 12: Povezava polimorfizma rs12762303 v genu za *ALOX5* in polimorfizma rs3803278 v genu za *ALOX5AP* z DLB pri preiskovancih s SB2

	Genotip	Primeri (276)	Kontrole (375)	OR, 95% CI/p-vrednost
rs12762303	TT	177 (64,0)	264 (70,5)	reference
	TC	93 (33,7)	106 (28,3)	1,56 (0,95 – 2,54)/0,1
	CC	6 (2,3)	5 (1,2)	5,52 (1,59 – 10,54)/0,1
rs3803278	TT	145 (53,0)	224 (59,8)	reference
	TC	101 (36,3)	135 (35,9)	1,16 (0,70 – 1,91)/0,6
	CC	30 (10,7)	16 (4,3)	3,14 (1,18 – 8,35)/0,02

OR - razmerje obetov, prilagojeno na trajanje hipertenzije, sistolični krvni tlak, prisotnost srčno-žilnih bolezni, DR, diabetične noge, vrednosti HbA1c, glukoze na tešče, serumske vrednosti uree, kreatinina, cistatina, razmerje albumin/kreatinin, CI - interval zaupanja

Rezultati logistične regresije so pokazali, da ni statistično pomembne povezave med polimorfizmom rs12762303 in DLB.

Rezultati logistične regresije za rs3803278 so pokazali, da imajo posamezniki z genotipom CC 3,14-krat večjo verjetnost za pojav DLB, v primerjavi s posamezniki z genotipom TT. Torej je genotip CC polimorfizma rs3803278 v genu za *ALOX5AP* možni dejavnik tveganja za pojav DLB.

5. RAZPRAVA

5.1 KLINIČNE IN BIOKEMIJSKE ZNAČILNOSTI BOLNIKOV S SB2 IN DIABETIČNO LEDVIČNO BOLEZNIJO

V našo retrospektivno asociacijsko študijo smo vključili bolnike s SB2, stare med 18 in 80 let. Vsi preiskovanci so imeli SB2 najmanj deset let. Razdelili smo jih v dve skupini glede na prisotnost znakov za DLB po Slovenskih smernicah (103), in sicer v skupino s prisotno DLB, ki je služila kot primer in v kateri je bilo 276 oseb, in skupino brez znakov DLB, ki je služila kot kontrolna skupina in v kateri je bilo 375 oseb. Povprečna starost bolnikov v skupini z DLB je bila 64,75 +/- 9,15 in se statistično ni razlikovala od kontrolne skupine, kjer je bila povprečna starost 63,75 +/- 8,0 let ($p = 0,13$). Statistično značilne razlike ni bilo opaziti niti pri razporeditvi spola vključenih bolnikov v obeh skupinah, vključenih je bilo več moških. Povprečno trajanje SB je bilo 14,5 let in se statistično med skupinama ni razlikovalo ($p = 0,84$). Vsi vključeni bolniki so imeli prekomerno telesno težo, saj je bil ITM v obeh skupinah več kot 30 in se statistično ni razlikoval. Od 6–9% sodelujočih v raziskavi je bilo kadilcev in so bili statistično neznačilno razporejeni v obe skupini.

Zgoraj navedeni podatki nam dokazujejo, da imajo bolniki s SB2 nezdrav življenjski stil, v kar nas prepriča prekomerna telesna teža. Presenetljivo je med njimi majhen delež kadilcev, čeprav so epidemiološke študije potrdile povezavo med kajenjem in srčnim infarktom pri moškem in ženskem spolu (25, 26, 35, 104). Kajenje je neodvisen dejavnik tveganja za srčno-žilno umrljivost pri bolnikih s SB tipa 2 (105).

Trajanje SB v naši študiji nima vpliva na razvoj DLB, kar pa je vprašljiv zaključek. Čas določanja začetka SB2 je netočen, saj ob postavitvi diagnoze v glavnem ne vemo, kako dolgo bolezen že traja, drugi problem pa je, da tretjina bolnikov z DLB na začetku bolezni sploh nima ne albuminurije ne proteinurije in ne zmanjšane oGF (1, 3, 5, 9, 11).

Kronična ledvična bolezen je pogost zaplet pri SB2 in pomembno vpliva na obolevnost ter preživetje bolnikov, ker označuje tudi bolnike z visokim srčno-žilnim tveganjem. Ti bolniki imajo 3- do 5-krat večjo smrtnost kot bolniki brez kronične ledvične okvare (3, 9). Do podobnih zaključkov smo prišli tudi pri naši raziskavi. Vsi sodelujoči so imeli v anamnezi podatke o že prebolelih SŽO (srčni infarkt, možganska kap, tranzitorna ishemična bolezen možgan, angina pectoris, periferna okluzivna bolezen žil) in ta pogostnost dogodkov je bila statistično višja v skupini bolnikov z DLB.

Hiperglikemija, trajanje SB, arterijska hipertenzija in hiperlipidemija so napovedni dejavniki tveganja za nastanek DLB, njeno verjetnost pa napovedujeta DR in diabetična nevropatija (8, 11).

Pri naši skupini bolnikov s SB2 in z DLB smo ugotovili statistično višje vrednosti sistoličnega krvnega pritiska ($p < 0,001$), bolniki v tej skupini so imeli visok krvni pritisk v povprečju že

dvanajst let, v kontrolni skupini pa deset let. Slabša urejenost krvnega pritiska in daljše trajanje krvnega pritiska v anamnezi so lahko vzrok tudi za večjo SŽO v skupini z DLB v naši študiji. Velja, da je med bolniki s SB2 dvakrat več hipertonikov kot pri zdravi populaciji in da se z zvišanjem krvnega pritiska za 10 mmHg tveganje za SŽO poveča za 15% (25, 26, 60, 106), zato obstaja velik interes za ureditev krvnega pritiska pri bolnikih s SB2.

Večjo verjetnost DLB napovedujeta DR (34, 35) in DNeV, kar smo opazili tudi v naši raziskavi. V skupini bolnikov z DLB je bilo statistično večja prisotnost DR ($p < 0,001$) in prisotnost diabetične noge ($p = 0,03$).

Za preprečevanje zapletov SB je zelo pomembna njena urejenost. Dve od meril urejenosti sta glikiran hemoglobin (HbA1c) in glikemija na tešče (55, 56, 57, 58,59). Pri naših bolnikih z DLB sta bili ti dve merili urejenosti SB statistično višji kot pri kontrolni skupini, HbA1c: $p = 0,001$, glikemija na tešče pa $p = 0,01$, torej so imeli bolniki z okvaro ledvic slabše urejen krvni sladkor. Takšna ugotovitev nas lahko ponovno pripelje do zaključka, da lahko dobro urejena hiperglikemija zmanjša kronične zaplete na tarčnih organih, kot so oči, ledvice, živci, srce in ožilje (60, 73, 74).

Ob vključitvi v raziskavo pri obeh opazovanih skupinah ni bilo statistično pomembnih razlik med vrednostmi celotnega holesterola, HDL in LDL, kar pa ni veljalo za vrednost trigliceridov, ki je bila večja pri bolnikih z DLB (tabela 2). Odgovor na tako biokemično sliko lipidnega statusa obeh skupin je lahko intenzivno zdravljenje obeh skupin s statini in manjši poudarek na spremembi življenjskega stila, s poudarkom na izgubo telesne teže in večdnevne fizične aktivnosti. Urejenost maščob v krvi prav tako vpliva na razvoj kroničnih zapletov SB (77, 78, 79).

Stopnjo ledvične okvare opredelimo s serumsko koncentracijo kreatinina ali cistatina C in ocenjeno GF po enačbi »Modification of Diet in Renal Disease« (MDRD) (33, 34, 52, 53). Pri oceni ledvične okvare upoštevamo tudi razmerje med koncentracijo albumina in kreatinina v urinu in glede na izraženo vrednost v (g/mol) nato govorimo o normoalbuminuriji oziroma zmerno ali zelo zvišani albuminuriji (8, 33, 35, 53).

V naši raziskavi so bili vsi biokemični in laboratorijski parametri, ki označujejo kronično ledvično okvaro (s-kreatinin, s-cistatin, razmerje albumin/kreatinin v urinu) statistično značilno višji pri skupini bolnikov s DLB, $p < 0,001$. Enačba MDRD, s katero izražamo oceno glomerulne filtracije in je v klinični praksi najbolj uporabljena laboratorijska metoda za oceno ledvične funkcije, se v naši študiji ni izkazala kot statistično zanesljiv parameter okvare ledvic (tabela 2), saj ni bilo statistično opazne razlike med obema skupinama bolnikov $p = 0,22$. Kot boljši označevalec okvare ledvične funkcije se je izkazal serumski cistatin, saj je bil statistično višji v skupini bolnikov s SB2 in z DLB kot pa v kontrolni skupini ($p < 0,001$).

Možna razlaga za takšen rezultat bi lahko bila starost bolnikov, saj smo v študijo vključevali tudi bolnike, ki so bili stari nad 75 let, in spol (večji procent moške populacije) ter ITM.

Tudi zadnje študije kažejo na to, da bi bil boljši označevalec za okvaro ledvične funkcije cistatin v serumu (52, 53).

Rezultat naše raziskave je, da ima naša kohorta bolnikov s SB2 nezdrav življenjski slog, kar se kaže v ITM. Naši bolniki s SB2 imajo dolgotrajno hipertenzijo in slabo urejen predvsem sistolični krvni pritisk. Ti bolniki imajo tudi večjo SŽO. KLB označuje tudi prisotnost DR in diabetične noge. Za skupino bolnikov z DLB je značilna slabša urejenost glikemije in neurejenost hipertrigliceridemije. Za oceno okvare ledvične funkcije pa se je v naši raziskavi bolje kot enačba MDRD izkazal cistatin C.

Vse našete ugotovitve, do katerih smo prišli v naši raziskavi, se ujemajo z rezultati že omenjenih študij (5, 11, 25, 26, 35, 102, 106, 107).

Trajanje SB v naši študiji ne predstavlja tveganja za razvoj DLB, kar pa ni v skladu s sprejetimi stališči in raziskavami (1, 3, 103), verjetno zato, ker smo že za vključitev v študijo postavili pogoj, da bolezen traja vsaj deset let, pri tem pa nismo točno vedeli, kdaj se je SB začela, smo pa upoštevali čas, kdaj je bil bolnik registriran kot bolnik s SB2.

5.2 GENSKI POLIMORFIZMI IN DIABETIČNA LEDVIČNA BOLEZEN

5.2.1 Povezava med polimorfizmoma rs4340 (insercija/delecija) in rs4341 v genu za angiotenzinsko konvertazo in diabetično ledvično boleznijo

V raziskavi smo ugotavljali povezavo med polimorfizmoma rs4340 in rs4341 gena za angiotenzinsko konvertazo in DLB. V raziskavi nismo ugotovili povezave med testiranima polimorfizmoma in DLB.

Neurejen krvni pritisk vodi do kronične ledvične okvare in poslabšuje že prisotno DLB. Glede na te ugotovitve in dober učinek zdravljenja z zaviralci AK in antagonisti angiotenzinskih receptorjev (6, 7, 9, 60, 61, 74, 76, 77) so se znanstveniki usmerili na proučevanje RAAS sistema in genskega polimorfizma z namenom, da še izboljšajo terapevtske možnosti zdravljenja visokega krvnega pritiska (15, 107, 108, 109, 110) in s tem upočasnijo napredovanje bolezni.

Encim AK cepi angiotenzin I v aktivni oktapeptidni angiotenzin II, ki poveča izločanje aldosterona ter s tem dvigne krvni pritisk in zmanjša izločanje renina.

Gen za AK, ki kodira encim AK, ima lahko insercijo (I) alela ali delecijo (D) alela in s tem tri mogoče genotipe II, ID in DD. Polimorfizem insercija/delecija (rs4340) gena AK je zaporedje 287-ih baznih parov v 16. intronu AK gena na kromosomu 17q 23 in ga pogosto opišemo tudi z rs4340. Polimorfizem rs4340 AK je povezan z aktivnostjo encima AK v krvi in v tkivih. Pri homozigotih II so našli nižji nivo cirkulirajočega encima AK v plazmi, ta je bil za 30% do 60% višji pri ID heterozigotih in DD homozigotih (111). Glede na to, da je polimorfizem rs4340 gena za AK povezan s koncentracijo encima v plazmi, je možno, da bi bil prek te aktivnosti vpleten v nastanek okvare ledvic pri SB2.

Obstaja velika raznolikost v razporeditvi alelov polimorfizma rs4340 gena AK znotraj etničnih skupin širom sveta in iz tega izhajajo tudi nasprotujoči si rezultati raziskav o njegovi vlogi pri DLB (112, 113). Pozitivno povezavo med polimorfizmom rs4340 AK gena in DLB so našli v Aziji (Japonska, južna Indija) (113, 114), do nasprotnih ugotovitev pa so prišli v Iranu (115) in Maleziji (116). Zhong in sodelavci so leta 2015 z meta-analizo prišli do zaključka, da sta alel D in genotip DD polimorfizma gena AK povezana s tveganjem za razvoj DLB pri bolnikih s SB2, najbolj pri prebivalcih Azije (117). Do podobnih ugotovitev je prišel tudi Al-Rubeaan s sodelavci (2013) v študijah, ki jih je izvajal med Arabci (118). Manjše število meta-analiz polimorfizma rs4340 gena AK je narejeno med Evropejci. Skupina raziskovalcev, zbranih pod Liujevim okriljem, je z meta-analizo odkrila, da ni povezave med genskim polimorfizmom rs4340 in razvojem DLB pri SB2 pri kavkaški populaciji (119). Slovenci smo del te kavkaške populacije in mi smo z našo raziskavo prišli do enakih zaključkov, torej da ni povezave med DLB in polimorfizmom rs4340 insercija/delecija gena za AK.

Polimorfizem rs4341 (insercija/delecija gena za AK) je bil do zdaj predmet raziskovanj v maloštevilnih študijah. Najbolj je bil proučevan v povezavi z visokim krvnim pritiskom ali z aterosklerozo. Povezavo med omenjenim polimorfizmom 4341 in debelino intime na karotidnih arterijah pri preiskovancih s SB2 niso našli (120). Španski raziskovalci so leta 2010 raziskovali, ali obstaja povezava med ishemično možgansko okvaro in polimorfizmom rs4341 insercija/delecija gena za AK. Merili so tudi nivo encima AK v serumu. Povezave med D alelom, nivojem AK v serumu in možgansko kapjo med Španci niso našli (121). Polimorfizem rs4340 je bil predmet raziskav leta 2010 tudi med otroci v ZDA, ki so imeli prekomerno telesno težo in visok krvni pritisk. Ugotovili so, da imajo nosilci D alela višji ITM in višji krvni pritisk kot otroci z normalno telesno težo (122).

Do zdaj ni bilo narejenih raziskav polimorfizma rs4341 insercija/delecija v genu AK in DLB pri SB2. V naši retrospektivni asociacijski študiji smo iskali povezavo z DLB. Pri nobeni skupini nismo našli povečane pogostosti kakšnega alela ali genotipa polimorfizma rs4340 ali rs4341.

Pomanjkljivost naše raziskave je razmeroma majhno število preiskovancev, zato je tudi moč študije manjša. Prav tako smo bili omejeni glede podatkov o življenjskem stilu in dieti, s katerimi bi lahko izključevali vpliv okolja na gene.

V prihodnosti je treba načrtovati večje študije, s katerimi bi lahko potrdili ali zavrgli tezo, da genotip DD slabše odgovarja na terapijo z angiotenzinskimi zaviralci, da pa genotip II zmanjšuje izločanje albuminov ter na ta način ščiti delovanje ledvic pri bolnikih s SB2 (123). Alelu D predpisujejo dodatno vlogo pri pojavu slabše urejenega krvnega pritiska (113) in z analizo njegove vloge bi eventualno lahko pripomogli k tarčnemu zdravljenju visokega krvnega pritiska z angiotenzinskimi zaviralci pri bolnikih s SB v vsakodnevni klinični praksi.

5.2.2 Povezava med polimorfizmoma rs699 in rs4762 v genu za angiotenzinogen (AGT) in diabetično levično boleznijo

V naši asociacijski študiji smo se osredotočili na dva polimorfizma *AGT* gena kot možna označevalca za razvoj DLB.

Pri polimorfizmu rs699 gre za zamenjavo T v C, kar ima za posledico menjavo metionina (M) v treonin (T) na 268 kodonu (M268T ali M235T). Ta različica genskega polimorfizma za *ATG* gen je povezana z višjim nivojem angiotenzina v plazmi in višjim krvnim pritiskom (121, 122).

Pri polimorfizmu rs4762 pa gre za zamenjavo C v T in posledično menjavo treonina v metionin na kodonu 207 (T207M ali T174M). Ta polimorfizem ni povezan s povečano koncentracijo plazemskega angiotenzina in z visokim krvnim pritiskom (125, 126).

Povezave omenjenih dveh polimorfizmov rs699 in rs4762 pri naših preiskovancih s SB2 in z DLB nismo našli.

Angiotenzin (*AGT*) gen je lociran na dolgem kraku kromosoma 1 (1q42-43). Sestoji iz petih eksonov in štirih intronov (124). *AGT* spada v skupino plazemskih globulinov, ki se sintetizirajo v jetrih in se v kaskadni verigi RAAS sistema razcepijo do angiotenzina (1-7), ki ima vazodilatatorno, anti-proliferativno in apoptotično vlogo (110).

Vloga polimorfizma rs699 je bila proučevana v številnih študijah po svetu. Iskali so povezanost med SB in kroničnimi komplikacijami te bolezni. Samo dve študiji, objavljeni leta 2003 in 2011, sta našli povezavo med tem polimorfizmom, inzulinsko rezistenco in krvnim pritiskom (125, 126, 127). Sistematični pregled 73-ih raziskav tega polimorfizma nam pove, da rs699 ni dejavnik tveganja za SB niti ni povezan z DR ali diabetično nevropatijo (128).

Pri določenih populacijah pa je alel T in/ali genotip TT polimorfizma rs699 lahko povezan z DLB, in sicer med prebivalci Indije (128, 129), Pakistana (130), Tunizije (131), Tajvana (132), Japonske (133), Kitajske (134) in Turčije (135). Ta polimorfizem je bil povezan s končno ledvično odpovedjo pri Kitajcih (136).

V primerjavi s temi študijami pa poznamo velike meta-analize, ki povezave med rs699 in DLB niso ugotovile (86, 97, 137, 138). Naši rezultati so skladni s temi ugotovitvami, saj v naši populaciji nismo našli povezave med rs699 in DLB. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi raziskovalci na Poljskem (139) in v Nemčiji (140).

Polimorfizem rs4762 gena *AGT* ni bil vključen v mnoge meta-analize in je bil predmet proučevanja le v manjših študijah, ki pa niso našle povezave ne z DLB ne s končno ledvično odpovedjo (129, 131, 136), izjema je bila na Tajskem izvedena študija, ki pa je to povezavo potrdila (132).

V naši populaciji nismo ugotovili povezave med polimorfizmom rs4762 gena *AGT* in DLB.

Naše ugotovitve (odsotnost povezave med polimorfizmoma AGT gena in DLB) so lahko delno posledica rasne in etnične pripadnosti, lahko pa so tudi posledica nepravilne razporeditve preiskovancev v skupino z DLB, saj smo v to skupino uvrščali bolnike na podlagi biokemičnih in laboratorijskih izvidov (51, 103), ne pa z biopsijo ledvic kot zlati standard.

5.2.3 Povezava med polimorfizmi rs275651, rs931490, rs5182 in rs5186 v genu za receptor tipa 1 za angiotenzin II in diabetične ledvične bolezni

V naši retrospektivni asociacijski študiji, ki je vključevala 651 preiskovancev s SB2, nismo ugotovili povezave rs5182, rs5186, rs275651, rs931490 polimorfizmov v genu za *AGTR1* in DLB.

O RAAS sistemu in njegovi fiziološki ter patofiziološki vlogi pri urejanju krvnega pritiska smo do zdaj že mnogo povedali (15, 109, 110). Dolgo že vemo, da lahko zdravljenje z zaviralci AK in antagonisti angiotenzinskih receptorjev upočasni napredovanje DLB in zmanjša izločanje albuminov v urinu (6, 7, 9, 60, 75, 76).

Genetski polimorfizmi posameznih členov v sistemu RAAS lahko vplivajo na upočasnitev kroničnih zapletov SB, zato se njihovem proučevanju danes posveča veliko pozornosti (13, 22, 24, 27, 86, 89, 95, 96, 97, 98, 100, 102). Med najbolj raziskanimi so polimorfizmi encima AK, angiotenzinogena (AGT) in receptorja tipa 1 za angiotenzin II (AGTR1) (108, 111, 127, 128).

Angiotenzin II ima s svojim vazokonstriktorskim učinkom ter zaradi zadrževanja vode in natrija centralno vlogo v RAAS sistemu. Ta učinek angiotenzina II je povezan z dvema receptorjema angiotenzina II, in sicer z receptorjem tipa 1 (AGTR1) in tipa 2 (AGTR2). Mnogo literature danes AGTR1 opredeljuje kot rizični dejavnik pri razvoju hipertenzije. AGTR1 receptorje najdemo večinoma v gladki mišiči žil, srcu, nadledvični žlezi in ledvici (141, 142), AGTR2 receptorje pa v maternici, možganih in v skorji nadledvične žleze. Oba tipa receptorjev pa najdemo v skorji nadledvične žleze in ledvici.

V naši študiji smo se odločili, da bomo proučili vpliv polimorfizmov gena za *AGTR1*. Najdemo ga na kromosomu 3q21-25 in ima 55 Kb parov. AGTR1 je sestavljen iz petih eksonov in zadnji, peti, predstavlja področje kodiranja. Opisanih je pet različic transkripcije (143).

Najbolj proučen polimorfizem AGTR1 je rs5186, imenovan tudi A1166C. Polimorfizem rs5182 tega gena je bil najbolj raziskan v povezavi z aterosklerozo kardiovaskularnih bolezni pri različnih etničnih skupinah in DLB. Manjše število raziskav pa je bilo narejenih na polimorfizmih rs275651 in rs931490 v genu za AGTR1, in sicer večinoma pri bolnikih s hipertenzijo, pljučnim edemom in debelostjo (144, 145, 147).

Hipertenzija prispeva k večji incidenci SŽO in k razvoju DLB (74). Tudi pri naši skupini preiskovancev z DLB je izstopal slabo urejen sistolični krvni pritisk in vsi so imeli anamnezo o prebolelih SŽO.

Dva polimorfizma rs275651 in rs5182 gena *AGTR1* sta bila predmet raziskave pri mehiški populaciji z in brez hipertenzije. Opazili so večjo frekvenco pojavljanja alela C in genotipa CC pri bolnikih s povečanim krvnim pritiskom (147).

Pogostost alela C in genotipa CC polimorfizma rs5182 in pogostnost alela A in genotipa TT polimorfizma rs275651 ni pokazala statistično pomembnih razlik v pojavnosti pri naši skupini preiskovancev s SB2, niti pri skupini z znaki DLB, niti pri skupini, ki je služila kot kontrola.

Sladkorna bolezen in debelost sta neodvisna dejavnika tveganja za razvoj hipertenzije. Obe stanji pa vodita do endotelne disfunkcije, vnetnega odgovora prek sistema citokinov in interlevkinov ter do oksidativnega in nitroznega stresa (148, 149).

Tudi vsi naši preiskovanci, ne glede na to, ali so bili v skupini z DLB ali so pripadali kontrolni skupini, so bili predebeli, z ITM več kot 30. Pri nobeni skupini nismo našli povečane pogostosti kakšnega alela ali genotipa proučevanih polimorfizmov (rs275651, rs931490, rs5182 in rs5186) in niti rs275651, ki ga najbolj povezujejo z debelostjo (144).

Kot smo že ugotovili, obstajajo etnične razlike pri proučevanju različnih polimorfizmov v razvoju DLB pri bolnikih s SB2; če primerjamo na primer Azijo in Evropo, razlike obstajajo celo med populacijo iste države. Taki kontroverzni podatki so povezani tudi s polimorfizmom rs5186 *AGTR1* gena kot dejavnikom tveganja za razvoj DLB pri SB2. V veliki študiji, izvedeni med kavkaško populacijo, kateri pripadamo tudi Slovenci, so ugotovili, da polimorfizem rs5186 predstavlja dejavnik tveganja, ki vodi do poslabšanja ledvične bolezni vse do KLO in je dober označevalec za njeno napoved (147). Prisotnost polimorfizma rs5186 v genu za *AGTR1* pri SB2 pomeni tudi večje tveganje za albuminurijo pri Evropejcih moškega spola (151). Japonci so v svojih raziskavah za isti genski polimorfizem prišli do podobnih zaključkov, ki pa veljajo samo za ženski spol (152). Dve študiji iz Indije sta proučevali vlogo rs5186 pri SB2 in kronične komplikacije te bolezni ter prišli do ugotovitve, da obstaja povezava med alelom C tega polimorfizma in DLB (153). Tudi v Tuniziji so raziskovalci med bolniki s SB2 odkrili povezanost med genotipom CC in alelom C polimorfizma rs5186 in DLB (154). Dve meta-analizi podpirata domnevo, da genotip CC tega polimorfizma poveča tveganje za DLB pri SB2 (156, 157).

V naši študiji frekvenca genotipov in alelov polimorfizma rs5186 ni bila statistično značilno različna med obema skupinama preiskovancev. Pogostost genotipov pri naši skupini preiskovancev z DLB je bila naslednja: genotip CC 7,9%, 39,7% genotip CA in 52,3% genotip AA. Do podobnih rezultatov so prišli tudi iranski raziskovalci (157).

Številne študije so proučevale genski polimorfizem RAAS sistema v povezavi s končno odpovedjo ledvic (158). *AGTR1* gen je neodvisno povezan z napredovanjem ledvične bolezni in SŽO (136, 159).

Naš negativen rezultat je lahko v posledica etnične in rasne raznolikosti, o kateri smo že govorili (20, 157), lahko pa tudi posledica poligenske okvare ledvic, saj so rezultati študij, ki se ukvarjajo z identifikacijo genov ali genskih regij v povezavi z DLB, nedosledne in si med seboj nasprotujejo (160).

5.2.4 Povezava med polimorfizmi rs3087459, rs5370, rs1476046 v genu za endotelin 1 in diabetično ledvično boleznijo

V naši retrospektivni asociacijski študiji nismo uspeli dokazati povezanosti polimorfizmov rs3087459, rs5370 in rs1476046 gena za endotelin 1 (*EDN1*) z diabetično ledvično boleznijo.

Endotelinski sistem je sestavljen iz treh endotelinskih izomer (ET-1, ET-2, ET-3) in dveh podtipov proteinskih receptorjev, ETA in ETB. Endotelin 1 (ET-1) je peptid, sestavljen iz 29-ih aminokislin, in deluje kot intracelularna signalna molekula v številnih organih in tkivih. ET1 je znan kot eden najmočnejših vazokonstriktorjev, stimulira vnetje in pospešuje oksidativne reakcije. V ledvici endotelinski sistem krmili ledvično hemodinamiko, hemostazo vode in soli ter acidobazno ravnotežje. Pomembno vlogo ima pri proliferaciji ledvičnih celic, zunajceličnega matriksa in vnetju (161). Obstajajo številni dokazi, da je ET sistem povezan s patogenezo in poslabšanjem DLB. Pri SB2 je aktiviran endotelinski sistem v ledvici, ki vodi do celične proliferacije, intersticijskega vnetja, fibroze in končno do glomeruloskleroze (162). Ti bolniki imajo tudi povišan cirkulirajoči ET-1, ki odraža tudi nivo albuminurije in resnost okvare ledvic (163, 164). Pomembno je, da je nekaj študij na eksperimentalnih modelih prikazalo pozitiven protektiven učinek antagonistov ET receptorjev na razvoj DLB (166, 167). Do podobnih zaključkov so prišle tudi klinične študije (167, 168, 169). ET-1 ima prav tako pomembno vlogo v patogenezi DR (170, 171) in antagonisti ET receptorjev prav tako upočasnijo razvoj boleznj.

ET-1gen (*EDN1*) se nahaja na kromosomu 6p23-p24 ter je sestavljen iz pet eksonov in štirih intronov. Sestavljen je iz 6838-ih baznih parov (169).

Polimorfizma rs3087459 (A>C) in rs1476046 (G>A) najdemo na intronu gena *EDN1*, polimorfizem rs5370 (G>T) pa na eksonu 5 gena *EDN1* (173).

EDN1 je bil spoznan kot močan kandidatni gen pri kardiovaskularnih boleznih in boleznih ledvic. Različni polimorfizmi gena *EDN1* so bili povezani z hipertenzijo (174, 175), srčnim popuščanjem (176), ishemično boleznijo srca (177, 178), s hipertrofijo levega ventrikla (179), endotelno disfunkcijo (180) in napredovanjem ateroskleroze (181). Polimorfizmi gena *EDN1* so bili povezani še z upadanjem ledvične funkcije pri kroničnih glomerulonefritisih (182) in pri končni ledvični odpovedi zaradi visokega krvnega pritiska (183).

Ledvice so zelo občutljive na endotelin-1 in komponente endotelinskega sistema so prisotne v celotnem nefronu in ledvičnem žilju. Endotelin-1 proizvajajo glomerulne epitelne in mezangijske celice, pa tudi tubolarne celice in celo lokalni makrofagi (21, 22, 184, 185).

ETA receptorji povzročajo vazokonstrikcijo, celično proliferacijo, fibrozo in propad podocitov, medtem ko ETB povzročajo vazodilatacijo, zavirajo vnetje in proliferacijo celic ter zavirajo fibrozne procese (185).

Glede na zgoraj povedano se domneva, da ET-1 vpliva na napredovanje KLB.

Pri bolnikih s SB in z DLB je nenehno aktiviran endotelni sistem, kar dokazujejo povišan nivo cirkulirajočega endotelina 1 (163), povišana koncentracija endotelina 1 v ledvicah (164) in povečana aktivacija receptorja ETA v ledvici in sistemsko (168).

EDNI gen predstavlja močan kandidatni gen za kronične zaplete SB2. Najbolj raziskan med njimi je rs5730, kjer gre za menjavo aminokislinske liz/asn na kodonu 198, ki verjetno vpliva na pretvorbo pre-endotelina v zrelo aktivno obliko (174). Ta polimorfizem je povezan z visokim krvnim pritiskom in debelostjo pri Evropejcih in Japoncih (174).

Vloga polimorfizmov rs3087459 in rs1476046, ki sta locirana na intronu gena *EDNI*, še ni čisto razjasnjena.

Pri Kitajcih s SB2 je polimorfizem rs1476046 povezan s povišano koncentracijo proendotelina-1 in DLB (186) in tudi z endotelno disfunkcijo pri debelih predpubertetnikih (187).

Polimorfizem rs3087459 so raziskovali pri bolnikih z ishemično boleznijo srca (188), do zdaj pa ni bilo še nobenih študij v povezavi s SB2 in z DLB.

Do razlike v rezultatih naše študije in drugih genetskih asociacijskih študij lahko delno pride zaradi različne definicije fenotipa ali različnega vpliva okolja in genov preučevane populacije, pa tudi zaradi malega ali premajhnega števila preiskovancev (189).

Število preiskovancev v naši študiji je bilo relativno majhno in vsi so prihajali iz relativno homogene genske skupnosti s stabilnim okoljskim vplivom. Moč študije je bil dolgo trajanje SB2 pri bolnikih z DLB in kontrolni skupini, na žalost pa nismo merili plazemskega nivoja ET-1.

5.2.5 Povezava med polimorfizmom rs3802278 v genu za *ALOX5AP* in polimorfizmom rs12762303 v genu za *ALOX5* in diabetično ledvično boleznijo

V asociacijski genski raziskavi, v katero smo vključili 276 preiskovancev s SB2 in z DLB ter 375 preiskovancev s SB2 brez znakov DLB, ki so služili kot kontrolna skupina, smo ugotavljali povezanost med polimorfizmom rs3802278 gena za *ALOX5AP* in polimorfizmom rs12762303 gena za *ALOX5* in DLB.

Ugotovili smo da je polimorfizem rs3803278 gena *ALOX5AP* povezan z DLB pri naših preiskovancih, medtem ko povezave polimorfizma rs12762303 gena *ALOX5* z DLB pri naših preiskovancih nismo našli. Študija, ki smo jo izvedli, je po našem vedenju prva, s katero je bila ugotovljena povezava med polimorfizmom rs3803278 gena *ALOX5AP* in DLB pri kavkaški populaciji preiskovancev s SB2.

Yashida s sodelavci (2009) je v svoji raziskavi pri Japoncih prišel do enakih zaključkov. Ugotovil je, da je polimorfizem rs3803278 (alel C) gena *ALOX5AP* povezan s KLB pri bolnikih, ki imajo SB2 (190).

Na podlagi do zdaj povedanega vemo, da je kronična okvara ledvic pri bolnikih s SB2 multifaktorska bolezen in nastane kot posledica SB, arterijske hipertenzije, ateroskleroze, ishemične bolezni ledvic, debelosti in kajenja, lahko pa so pridružene tudi druge ledvične bolezni.

Ateroskleroza je kronična vnetna bolezen (191). Pri SB2 je proces ateroskleroze pospešen. Vidimo, da ti bolniki za SŽO zbolevajo 15 let prej kot bolniki, ki SB nimajo (192). Vnetni proces je stimuliran prek lipooksigenazne poti, levkotrieni pa so moderatorji tega vnetja. Proizvodnjo levkotrienov katalizira encim 5-lipoksigenaza (5-LO), ki ga kodira gen *ALOX5* v sodelovanju z lipoksigenazo-aktivirajočim proteinom, ki pa ga kodira gen *ALOXAP*, znan tudi pod imenom FLAP gen. Tako pride do nastanka skupine levkotrienov, ki nato stimulirajo vnetne procese (193).

Številne študije poročajo o povezanosti polimorfizma *ALOX5AP* z aterosklerozo karotid, miokardnim infarktom in ishemično boleznijo možgan (16, 17, 18), malo pa je znanega o možni povezavi polimorfizma rs3802278 gena *ALOX5AP* in polimorfizma rs12762303 gena *ALOX5* pri SB2 in nastanku DLB.

V modelih na miših, kjer je bila okvara ledvic povzročena z streptozotocinom je Valdivielso s sodelavci (2003) ugotovil, da zaviranje 5-lipoksigenaze-aktivirajočega encima (FLAP/*ALOX5AP*) zmanjša proteinurijo pri diabetičnih miškah (193). Ta ugotovitev je privedla do zaključka, da ima FLAP gen vpliv na aktivacijo lipoksigenazne poti in s tem na tvorbo levkotrienov, ki stimulirajo vnetje pri aterosklerozi.

Disfunkcija endotela je najbolj zgodnji dogodek pri nastanku mikroangiopatije ledvic, ki se klinično manifestira s proteinurijo (197, 198). K endotelni disfunkciji v ledvici prispevajo še oksidativni in nitrozni stres (eNOS/NO), aktivacija sistema RAAS, proizvodnja endotelina -1, žilnega endotelijskega rastnega dejavnika (angl. VEGF) in aktivacija vnetne poti FLAP/5-LO. Končni učinek je vazokonstrikcija žilja v ledvici (199). Podoben vzorec endotelne disfunkcije je opisan tudi na možganskem ožilju (199).

Humane genetske študije nakazujejo povezavo med genotipi in aleli levkotrienske vnetne poti in kliničnimi ali subkliničnimi znaki ateroskleroze. Različni proteini te 5-LO vnetne poti so izraženi v mišjih in človeških aterosklerotičnih lelah (16).

Statistično značilno povezavo so našli raziskovalci med *ALOX5* (rs12762303) in koronarno boleznijo pri kavkaški populaciji v Evropi in podobno povezavo *ALOX5* z nalaganjem kalcija v koronarkah, niso pa dokazali povezave z aterosklerozo karotid pri preiskovancih s SB2 (16, 17).

V sled dokazane povezave polimorfizma rs3803278 gena *ALOX5AP* in DLB pri bolnikih s SB2 v naši populaciji so prišli do podobne ugotovitve tudi Kitajci, ki so ugotovili povezavo izbranega polimorfizma z aterosklerozo karotid (200) tako kot naši raziskovalci na kavkaški populaciji (17).

Med Slovenci s SB2 smo našli povezavo polimorfizma rs3803278 gena *ALOX5AP* in DLB. Ta polimorfizem bi lahko v prihodnosti služil kot genetski označevalec pri DLB, vendar je za dokaz naše hipoteze potrebnih še več študij na večjem številu preiskovancev.

5.3 POMANJKLIVOSTI RAZISKAVE

V asociacijskih raziskavah iščemo povezavo posameznega genskega označevalca (SNP) s fenotipom, ki ga pa navadno opredelimo raziskovalci sami. Povezave posameznih genov, ki vplivajo na fenotip, ne moremo izničiti, prav tako ne moremo izločiti vplivov okolja.

V naši raziskavi smo opredelili fenotip kot DLB na podlagi oGF in albuminurije (10, 33, 34, 51, 103), ki sta splošno sprejeta parametra za opredelitev ledvične okvare pri bolnikih s SB2. Nismo se posluževali biopsije ledvic kot zlatega standarda, ker bi bilo število sodelujočih v preiskavi v tem primeru verjetno manjše, in tako nismo mogli izločiti niti možnih drugih vzrokov ledvičnih okvar pri bolnikih s SB (3, 142) niti vpliva različnih patohistoloških stopenj diabetične glomerulopatije (2, 50).

Tudi različne meritve lahko vplivajo na naše rezultate.

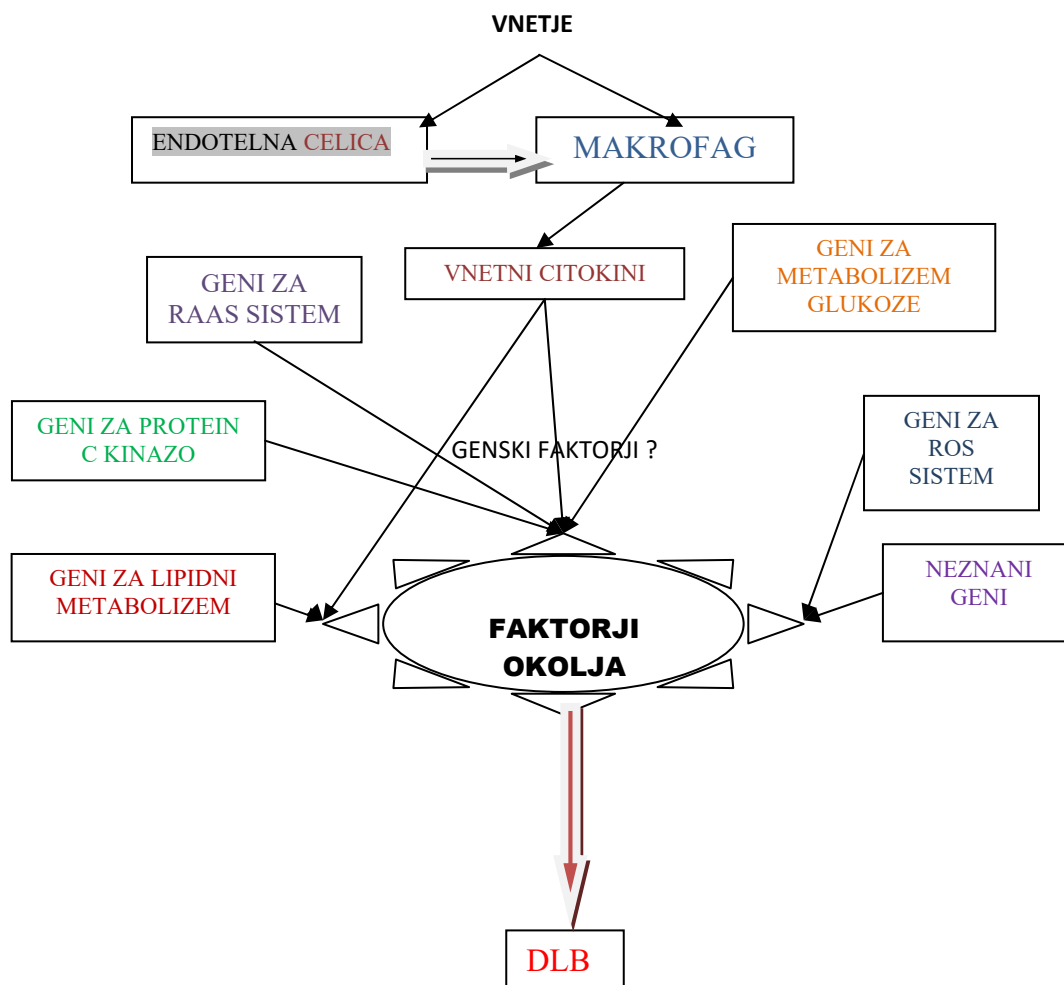
Ocena glomerulne filtracije je bila podana na podlagi enačbe MDRD, na katero imajo poleg laboratorijskih napak vpliv tudi starost, spol, ITM in način prehranjevanja (34, 103). Za bolj objektivno oceno delovanja ledvic smo se zato posluževali še drugega označevalca ledvične funkcije, in sicer s-cistatina C.

Analiza albuminurije je bila narejena iz drugega jutranjega vzorca urina, in da bi se izognili napakam, so preiskovanci dobili natančna navodila za oddajo vzorca, pred tem pa so bili še pregledani, da smo izključili okužbo, srčno popuščanje in vpliv visokega krvnega pritiska na oddane vzorce.

Na rezultate raziskave vpliva tudi izbira in število preiskovancev (198).

Upoštevati je treba, da si preiskovanci niso v sorodu, ker sicer prisotnost posameznih polimorfizmov ne bi odražala stanja v populaciji. Temu vplivu smo se poskušali izogniti tako, da so bolniki pred začetkom raziskave izpolnili vprašalnik. Zaželeno je, da so preiskovanci v obeh skupinah približno iste starosti ter enakomerno razdeljeni po spolu in si medsebojno podobni, razen v fenotipu, ki ga opazujemo, kar pa smo z našo raziskavo dosegli.

Vemo, da na razvoj DLB ne vpliva samo en gen, da je to multifakorska bolezen in da na razvoj bolezni vpliva tudi okolje (slika 4).



Slika 4: Genski dejavniki in dejavniki okolja, ki vplivajo na razvoj DLB (Slika je prirejena po: Shiro Maeda. *Do inflammatory cytokine genes confer susceptibility to diabetic nephropathy?* *Kidney International* 2008; 74: 413-415).

Odločili smo se, da bomo raziskovali polimorfizme izbranih kandidatnih genov glede na poznavanje patogeneze DLB v skladu s hipotezo, da obstaja povezava med polimorfizmi izbranih kandidatnih genov in DLB. Ponovljivost takšnih študij, ki iščejo gene ali genske regije, povezane z DLB, je vprašljiva (97, 160), saj lahko ob ponovitvah raziskave pride do nasprotujočih se rezultatov glede na kriterije vključitve preiskovancev.

V patogenezo DLB je vpleten tudi epigenetski molekularni mehanizem, kot je DNA metilacija, kromatin histonska modifikacija, novejša transkripcija nekodirane RNA (205, 206), kar pa jo z takšno zasnovo raziskave ne proučujemo lahko pa vplivajo na dobljene rezultate.

Poznamo še drugi tip genskih asociacijskih študij. Imenujemo jih presečne raziskave genoma (GWAS). S takimi študijami testiramo veliko polimorfizmov in genov. Rezultati so neodvisni od hipoteze, pomembni sta statistična vrednost (p) in občutljivost signala (202, 203, 204, 206). Prednost teh raziskav je, da zajemajo večje število preiskovancev in večje število polimorfizmov, pri čemer je zmanjšana pristranskost raziskovalcev.

Študije GWAS so bile narejene na populaciji bolnikov s SB2 z namenom identificirati kandidatne gene. Odkritih je preko 80.000 SNP (202). Raziskovalci največ uporabljajo bazo/biobanko podatkov, imenovano GoKin D (angl. Genetics of Kidneys in Diabetes), ki ima zbranih več kot 2,4 milijona SNP-jev (203). Vemo, da v pogostosti določenih kandidatnih genov za DLB obstajajo razlike znotraj etničnih skupin, zato pridejo v poštev take genomske presečne študije, da lahko primerjamo to gensko variabilnost znotraj določenega fenotipa.

Število preiskovancev v študijah GWAS lahko naraste tudi na 200.000 posameznikov, če proučujemo alel z malo pogostostjo (MAF) ali če imamo polimorfizem z majhnim OR. Pomanjkljivost teh študij je, da ima eventualni polimorfizem, ki je povezan z iskanim fenotipom, pri čemer je OR majhen ($> 1,33$, redkeje je nad 3), majhno napovedno vrednost, prav tako težje definiramo zanesljivo fenotip (DLB) (82, 203). Za analizo genskih presečnih študij potrebujemo številne statistične teste, ki so lahko izvor lažno pozitivnih rezultatov in obratno (82, 83, 205, 206).

Presečne genomske študije se večinoma izvajajo pod okriljem velikih konzorcijev, v državah, ki imajo velik proračun za raziskave (ZDA, Kanada, Japonska, Kitajska, Velika Britanija, Nemčija, Francija) zato te ne zajemajo številnih drugih regij v Evropi, kot npr. Slovenije.

Naša asociacijska raziskava ni del raziskave GWAS, je pa majhen mozaik v genski raziskavi Slovencev, ki so del kavkaške populacije, narejene z namenom, da najdemo morebitno povezavo izbranih polimorfizmov z DLB pri bolnikih s SB2 in poiščemo pogostost možnih označevalcev v naši populaciji.

6. ZAKLJUČKI

V naši asociacijski študiji, ki je zajela 651 preiskovancev s SB2, smo prišli do naslednjih zaključkov:

- Preiskovanci obeh skupin (DLB, kontrolna skupina brez DLB) so bili predebeli, saj so imeli ITM več kot 30.
- Preiskovanci obeh skupin so imeli neurejen krvni pritisk, preiskovanci z DLB pa zlasti povišane sistolične vrednosti.
- Preiskovanci obeh skupin so imeli neurejen lipidni status, zlasti vrednosti trigliceridov.
- Preiskovanci obeh skupin so imeli povišan glikoliziran hemoglobin in glukozo na tešče.

Vsa zgoraj naštetá dejstva govorijo o tem, da imamo slabo izobražene bolnike v smislu, kaj pomeni zdrav življenjski slog in kaj njim pomenita urejen krvni pritisk in urejena glikemija. Stanje bi lahko popravili s pogostejšimi obiski diabetičnih dispanzerjev ali referenčnih ambulant. Bolniki z znaki DLB bi mogoče z dvojno kontrolo pri diabetologu in nefrologu dosegli želene cilje počasnejšega napredovanja kronične ledvične okvare. Vprašanje je le, ali imamo na razpolago dovolj specialistov.

- Ugotovili smo, da je s-cistatin C boljši pokazatelj ledvične funkcije kot oGF, izračunan na podlagi enačbe MDRD.

Slovenske smernice za klinično obravnavo sladkorne bolezni tipa 2 iz leta 2016 že priporočajo uporabo cistatina C v primerih, ko je izračun MDRD vprašljiv, zlasti v območju starosti pod 18 in nad 75 let, v nosečnosti, ob malnutriciji ali debelosti, pri boleznih skeletnih mišic, pri para- ali tetraplegiji, ob vegetarijanski prehrani, ob hitrih spremembah ledvičnega delovanja in jemanju nekaterih zdravil.

- Ugotovili smo tudi, da je prisotnost diabetične retinopatije in diabetične noge dober pokazatelj prisotnosti DLB.

Ugotavljali smo tudi povezanosti izbranih polimorfizmov z diabetično ledvično boleznijo pri naših preiskovancih in prišli do naslednjih spoznanj:

- polimorfizma rs4340 in rs4341 gena za AK nista povezana z DLB
- polimorfizma rs699 in rs4762 gena za angiotenzinogen nista povezana z DLB
- polimorfizmi rs275651, rs931490, rs5182 in rs5186 gena receptorja tipa 1 za angiotenzin II niso povezani z DLB
- polimorfizmi rs3087459, rs5370 in rs1476046 gena za endotelin 1 niso povezani z DLB.
- polimorfizem rs12762303 gena ALOX5 ni povezan z DLB

- polimorfizem rs3802278 gena ALOX5AP je povezan z DLB.

To je prva asociacijska študija doslej, ki povezuje rs3803278 gena ALOX5AP z DLB pri kavkaški populaciji s SB2. Alel C ($p = 0,006$) se pojavlja pogosteje pri bolnikih z DLB. S pomočjo logistične regresije smo ugotovili, da imajo nosilci genotipa CC 3,14-krat večjo verjetnost, da zbolijo za DLB kot nosilci genotipa TT.

Glede na dobljene rezultate bi bil lahko polimorfizem rs3803278 genski označevalec za diabetično ledvično okvaro pri kavkaški populaciji, kateri pripadamo tudi Slovenci.

Za uporabo tega odkritja v klinični praksi z namenom zgodnjega odkrivanja DLB bi prišle v poštev dodatne genetske raziskave, ki bi imele večjo moč z vključitvijo večjega števila preiskovancev.

7. LITERATURA

1. Ritz E, Orth SR. Nephropathy in patients with type 2 diabetes melitus. *N Engl J Med* 1999; 341: 1127-33.
2. Mrevlje F. Bolezni presnove. In: Kociančič A, Mrevlje F, Štajer D. *Interna medicina*. Založba Littera Picta d.o.o., Ljubljana 2005: 682-716.
3. Adler AI, Stevens Rj, Manley SE, Bilous RW, Cull CA, Holman RR. Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney Int* 2003; 63: 225-32.
4. 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.
5. Mogensen CE. Microalbuminuria prediccts clinical and early mortality in maturity-onset diabetes. *N Engl J Med* 1984; 310: 356-60.
6. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, et al. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 2001; 345: 861-9.
7. Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, et al. Renoprotective effect of the angiotensin receptor antagonist ibersartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2001; 345: 851-60.
8. Nelson RG, Knowler WC, Pettitt DJ, Saad MF, Charles MA, Bennett PH. Assessing risk of overt nephopathy in diabetic patients from albumin excretion in untimed urine specimens. *Arch Intern Med* 1991; 151: 1761-5.
9. Eurich DT, Majumdar SR, Tsuyuki RT, Johnson JA. Reduced mortality associated with the use of ACE inhibitors in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: 1330-4.
10. The National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK), *Kidney Disease of Diabetes*: <http://kidney.niddk.nih.gov/kudiseases/pubs/kdd/>, dostop 24. 1. 2008.
11. Gall MA, Hougaard P, Borch-Johnsen K, Parving HH. Risk factors for development of incipient and overt diabetic nephropathy in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus: prospective, observational study. *BMJ* 1997; 314: 783-8.
12. *Joslin's Diabetes Mellitus*. Ed.: Kahn CR, Wier GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ. Lippincott Wikkiam & Wilkins, Phialadelphia, 2005.
13. Pettitt DJ, Saad MF, Bennett Ph ar al. Familial predisposition to renal disease in two generations of Pima Indians with type 2 (non-insulin-dependent)diabetes mellitus. *Diabetologija* 1990; 33: 438-43.
14. Quinn M, Angelico MC, Warram JH, Krolewski AS. Familial factors determine the development of diabetic nephropathy in patients with IDDM. *Diabetologia*, 1996; 39: 940-46.
15. Lai KN, Leung JC, Tang SC. The renin- angiotensin system. *Contrib Nephrol* 2011; 170: 135-44.
16. Assimes TL, Knowles JW, Priest JR, et al. Common polymorhpisms of ALOX5 and ALOX5AP and risk of coronary artery disease. *Hum Genet* 2008, 7; 123(4): 399-408.
17. Merlo S, Letonja-Šantel M, Cokan-Vujkovic A, et al. Arachidonate 5-lipoxygenase (ALOX5) gene polymorphism(rs127623039) and arachidonate 5-lipoxygensase activating protein (ALOX5AP) gene polymorphism (rs3802278) and markers of carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes mellitus. *Int J Exp Med* 2016; 9(2): 4509-14.
18. Diakite B, Hamazi K, Hmimech W, Nadifi S. Genetic polymorphisms of T-1131C APOA5 and ALOX5 SG13S114 with the susceptbilty of iscaemic stroke in Marocco. *Jurnal of Genetics* 2016 Jun; 95(2): 303-9.
19. Postula M, Janicki PK, Rosiak M, et al. Targeted deep resequencing of ALOX5 and ALOX5AP in patients with diabetes and association of rare variants with leukotriens pathways. *Exp Ther Med* 2016 Jul; 12(1): 415-21.
20. Mooyaart AL, Valk EJ, Bruijn JA, et el. Genetic associations in diabetic nephropathy: a meta-analysis. *Diabetologia* 2011; 54: 544-53.
21. Nouhofer W, Pittrow D. Endothelin receptor selectivity in chronic kidney disease: rationale and review of recent evidence. *Eur J Clin Invest* 2009; 39 Suppl 2: 50-67.
22. Benz K, Amann K. Endothelin in diabetic renal disease. *Contrib Nephrol* 2011; 172: 139-48.

23. Sladkorna bolezen (on line). 2013. Medicina danes. (citirano sreda 20 februar 2013 št 2. Dostopno na spletnem naslovu: < <http://www.medicina-danes.si/>>.
24. Rich S. Mapping genes in diabetes. Genetic epidemiological perspective. *Diabetes* 1990; 39: 1315-9.
25. Grundy SM, Benjamin IJ, Bureke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV, et al. Diabetes and cardiovascular disease: a statmant for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* 1999; 100: 1134-46.
26. Booth GL, Kapral MK, Fung K, Tu JV. Relation between age and cardiovascular disease in men and women with diabetes compared with non-diabetic people: a population-based retrospective cohort study. *Lancet* 2006; 368: 29-36.
27. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414: 813-20.
28. Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, et al. Inflammatory cytokine cocentrations are actuely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation* 2002; 106: 2067-72.
29. Klein R, Klein BEK, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. III. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diabnosis is 30 or more years. *Arch Ophthalmol* 1984; 102: 527-32.
30. Kocur I, Resnikoff S. Visual impairment and blindness in Europe and their prevention. *British Journal of Ophthalmology* 2002; 86: 716-22.
31. Arm CS, Al-Bermani A, Stannard K, Taylor R. Long-term impact of retinal screening on significant diabetes-related visual impairment in the working age population. *Diabet Med* 2009; 26: 489-92.
32. Taylor CR, Merin LM, Salunga AM, Hepworth JT, Crutcher TD, O,Day DM, et al. Improving diabetic retinopathy screenng ratios using telemedicine-based digital retinal imaging technology: the Vine Hill study. *Diabetes Care* 2007; 574-8.
33. Lindič J, in sod. Presajalne metode za kronično ledvično bolezen: Ocena proteinurije in albuminurije. *ISIS* 2009; 4: 42-6.
34. Hojs R, in sod. Presajalne metode za kronično ledvično bolezen: Ocena glumerulne filtracije. *ISIS* 2009; 3: 44-6.
35. Valmadrid CT, Klein R, Moss SE, et al. The risk of cardiovascular disease mortality associated with microalbuminuria and gross proteinuria in persons with older-onset diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 2000; 160: 1093-110.
36. Effect of intensive therapy on the development and progression of diabetic nephropathy in the Diabetes Control and Complications Trial. The Diabetes Control and Complications (DCCT) Reasearch Group. *Kidney Int* 1995; 47(6): 1703-20.
37. Freedman BI, Spray BJ, Tuttle AB, Buckalew VM Jr. The famillial risk of end-stage renal disease in African Americans. *Am J Kidney Dis* 1993; 21(4): 387-93.
38. Stanton RC. Clinical challenges in diagnosis and management of kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2014; 63 (2 Suppl): S3-21.
39. Wu AY, Kong NC, deLeon FA, Pan CY, Tai TY, Yeung VT, et al. An alarmingly high prevalence of diabetic nephropathy in Asian type 2 diabetic patients: The MicroAlbuminuria Prevalence (MAP) Study. *Diabetologia* 2005; 48 (1): 17-26.
40. Bohlender JM, Franke S, Stein G, Wolf G. Advanced glycation end products and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289(4): F645-59.
41. Wauter JL, Zoukourian C, Chappy O, Wautier MP, Guillausseau PJ, Coa R, et al. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *J Clin Invest* 1996; 97(1): 238-43.
42. Wautier MP, Massin P, Guillausseau PJ, Huijberts M, Levy B, Boulanger E, et al. N(carboxymethyl)-lysine as a biomarker for microvascular complications in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab* 2003; 29(1): 44-52.
43. Szabo C. Role of nitrosative stress in the pathogenesis of diabetic vascular dysfunction. *Br J Pharmacol* 2009; 156(5): 713-27.
44. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 405-12.
45. Škrha J. Pathogenesis of angiopathy in diabetes. *Acta Diabetol* 2003; S324-9.

46. Rahmoune H, Thompson PW, Ward JM, Smith CD, Hong G, Brown J. Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes* 2005; 54(12): 3427-34.
47. Vallon V. The mechanism and therapeutic potential of SGLT2 inhibitors in diabetes mellitus. *Annu Rev Med* 2015; 66: 255-70.
48. Gnudi L, Coward RJ, Long DA. Diabetic Nephropathy : Perspective on novel molecular mechanisms. *Trends Endocrinol Metab* 2016; 27(11): 820- 30.
49. Fujita H, Morii T, Fujishima H, Soto T, Shimizu T, Hosoba M, et al. The protective roles of GLP-1R signaling in diabetic nephropathy: Possible mechanism and therapeutic potential. *Kidney Int* 2014; 85(3): 579-89.
50. Kinaan M, Yau H, Quinn Martinez S, Kar P. Concepts in Diabetic Nephropathy: From Pathophysiology to Treatment. *Journal of Renal and Hepatic Disorders* 2017; 1(2): 10-24.
51. Slovenske smernice za klinično obravnavo sladkorne bolezni tipa 2. Zaletel J, Pongrac Barlovič D, Hojs R. Diabetična ledvična bolezen. *Endodiab.si* 2016: 1-11.
52. Hojs R, Bevc S, Ekart R, Gorenjak M, Puklvec L. Serum cystatin C –based formulas for prediction of glomerular filtration rate in patients with chronic kidney disease. *Nephron Clin Pract* 2010; 114(2): c118-26.
53. Bevc S, Hojs R, Ekart R, Gorenjak M, Puklvec L. Simple cystatin C formula compared to sophisticated CKD-EPI formulas for estimation of glomerular filtration rate in the elderly. *Ther Apher Dial* 2011; 15(3): 261-8.
54. Tervaert TW, Mooyaart AL, Amann K, Cohen AH, Cook HT, Drachenberg CB, et al. Renal Pathology Society. Pathologic classification of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21(4): 556-63.
55. Effect of intensive therapy on the development and progression of diabetic nephropathy in the Diabetes Control and Complications Trial. The Diabetes Control and Complications (DCCT). Research Group. *Kidney Int* 1995; 47(6): 1703-20.
56. DCCT/EDIC Research Group, de Boer IH, Sun W, Cleary PA, Lachin JM, Molitch ME, et al. Intensive diabetes therapy and glomerular filtration rate in type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2011; 365(25): 2366-76.
57. Ohkubo Y, Kishikawa H, Araki E, Miyata T, Isami S, Motoyoshi S, et al. Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complication in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: A randomized prospective 6-year study. *Diabetes Res Clin Pract* 1995; 28(2): 103-17.
58. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 1998; 352(9131): 837-53.
59. ADVANCE Collaborative Group, Patel A, MacMahon S, Chalmers J, Neal B, Billot L, Woodward M, et al. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008; 358(24): 256-72.
60. Zoungas S, Chalmers J, Neal B, Billot L, Li Q, Hirakawa Y, et al. ADVANCE-ON Collaborative Group. Follow-up of blood-pressure lowering and glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2014; 371(15): 1392-406.
61. Tuttle KR, Bakris GL, Bilous RW, Chiang JL, deBoer IH, Goldstein-Fuchs J, et al. Diabetic kidney disease: A report from an ADA Consensus Conference. *Diabetes Care* 2014; 37(10): 2864-83.
62. Kinaan M, Ding H, Triggler CR. Metformin: An old drug for the treatment of diabetes but a new drug for the protection of the endothelium. *Med Princ Pract* 2015; 24(5): 401-15.
63. Heaf J. Metformin in chronic kidney disease: Time for a rethink. *Perit Dial Int* 2014; 34(4): 353-7.
64. Ashcroft FM. Mechanism of the glycaemic effects of sulphonylureas. *Horm Metab Res* 1996; 28(9): 456-63.
65. Roussel R, Lorraine J, Rodriguez A, Salaun-Martin C. Overview of data concerning the safe use of antihyperglycemic medications in type 2 diabetes mellitus and chronic kidney disease. *Adv Ther* 2015; 32(11): 1029-64.
66. Yki-Jarvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med* 2004; 351(11): 1106-18.
67. Haluziak M, Frolík J, Rychlík I. Renal effects of DPP-4 inhibitors: A focus on microalbuminuria. *Int J Endocrinol* 2013; 2013: 895102.

68. Groop PH, Cooper ME, Perkovic V, Sharama K, Schernthaner G, Haneda M, et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition with linagliptin and effects on hyperglycemia and Albuminuria in Patients with type 2 Diabetes and renal dysfunction: Rationale and design of the MARLINA-T2D trial. *Diab Vasc Dis Res* 2015; 12(6): 455-62.
69. Mosenson O, Leibowitz G, Bhatt DL, Chan A, Hirshberg B, Wei C, et al. Effect of saxagliptin on renal outcomes in the SAVOR-TIM 53 Trial. *Diabetes Care* 2017; 40(1): 69-76.
70. Zhao X, Liu G, Shen H, Gao B, Li X, Fu J, et al. Liraglutide inhibits autophagy and apoptosis induced by high glucose through GLP-1R in renal tubular epithelial cells. *Int J Mol Med* 2015; 35(3): 684-92.
71. Davies MJ, Bergenstal R, Bode B, Kushner RF, Lewin A, Skjoth TV, et al. NN8022-1922 Study Group. Efficacy of liraglutide for weight loss among patients with type 2 diabetes: The SCALE Diabetes Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2015; 314(7): 687-99.
72. Wanner C, Inzucchi SE, Lachin JM, Fitchett D, von Eynatten M, Mattheus M, et al. EMPA-REG OUTCOME Investigators. Empagliflozin and progression of kidney disease in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2016; 375(4): 323-34.
73. Parving HH, Hommel E, Mathiesen E, Skott P, Edsberg B, Bahnsen M, et al. Prevalence of microalbuminuria, arterial hypertension, retinopathy and neuropathy in patients with insulin dependent diabetes. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1988; 296(6616): 156-60.
74. Van Buren PN, Toto R. Hypertension in diabetic nephropathy: Epidemiology, mechanism, and management. *Adv Chronic Kidney Dis* 2011; 18(1): 28-41.
75. Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, Berri T, Pohl MA, Lewis JB, et al. Collaborative Study Group. Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2001; 345(12): 851-60.
76. ONTARGET Investigators, Yusuf S, Teo KK, Pogue J, Dyal L, Copland I, Schumacher H, et al. Telmisartan, ramipril, or both in patients at high risk for vascular events. *N Eng J Med* 2008; 358(15): 1547-59.
77. Palmer SC, Craig JC, Navaneethan SD, Tonelli M, Pellegrini F, Strippoli GF. Benefits and harms of statin therapy for persons with chronic kidney disease: A systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med.* 202; 157(4): 263-75.
78. Haynes R, Lewis D, Emberson J, Reith C, Agodoa L, Cass A, et al. SHARP Collaborative Group; Effects of lowering LDL cholesterol on progression of kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2014; 25(8): 1825-33.
79. Ansquer JC, Foucher C, Rattier S, Taskinen MR, Steiner G; DAIS Investigators. Fenofibrate reduces progression to microalbuminuria over 3 years in a placebo-controlled study in type 2 diabetes: Results from the Diabetes Atherosclerosis Intervention Study (DAIS). *Am J Kidney Dis* 2005; 45(3): 485-93.
80. Okopien B, Krysiak R, Herman ZS. Effects of short-term fenofibrate treatment on circulating markers of inflammation and hemostasis in patients with impaired glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(5): 1770-8.
81. Thompson & Thompson. 2007. *Genetics in Medicine*. Philadelphia: Saunders Elsevier Inc. ISBN 978-1-4160-3080-5.
82. Manolio TA. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med* 2010; 363(2): 166-76.
83. Pearson TA, Manolio TA. How to interpret a genome-wide association study. *JAMA* 2008; 299(11): 1335-44.
84. Kitamura A, Hasegawa G, Obayashi H, Kamiuchi K, Ishii M, Yano M, et al. Interleukin-6 polymorphism (-634C/G) in the promoter region and the progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *Diabet Med* 2002; 19: 1000-5.
85. Wang H, Zhang Z, Chu W, Hale T, Cooper JJ, Elbein SC. Molecular screening and association analyses of the interleukin 6 receptor gene variants with type 2 diabetes, diabetic nephropathy, and insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 1123-9.
86. Rizvi S, Tasleem Raza S, Mahdi F. Association of genetic variants with diabetic nephropathy. *World J Diabetes* 2014; 5(6): 809-16.
87. Lindholm E, Bakhtadze E, Cilio C, Agardh E, Groop L, Agardh CD. Association between LTA, TNF and AGER polymorphisms and late diabetic complications. *Plos One* 2008; 3: e2546.
88. Zhao Y, Yang J, Zhang L, Yang Y, Tang Y, Fu P. Association between TNF- α -308G/A polymorphism and diabetic nephropathy risk: a meta-analysis. *Int Urol Nephrol* 2013; 45: 1653-9.

89. Ewens KG, George RA, Sharma K, Ziyadeh FN, Spielman RS. Assessment of 115 candidate genes for diabetic nephropathy by transmission/disequilibrium test. *Diabetes* 2005; 54: 3305-18.
90. Krolewski AS, Tryggvason K, Warram J, Laffel L, Housman D. Diabetic nephropathy and polymorphism in the gene coding for the alfa 1 chain of collagen IV. *Kidney Int* 1990; 37: 510.
91. Hirakawa S, Lange EM, Colicigno CJ, Freedman BI, Rich SS, Bowden DW. Evaluation of genetic variation and association in the matrix metalloproteinase 9(MMP9) gene in ESRD patients. *Am J Kidney Dis* 2003; 42: 133-42.
92. Rahimi Z, Vaisi-Raygani A, Rahimi Z, Parsian A. Concomitant presence of endothelial nitric oxide 894T and angiotensin II.converting enzyme D alleles are associated with diabetic nephropathy in a Kurdish population from Western Iran. *Nephrology(Carlton)* 2012; 17: 175-81.
93. Neugebauer S, Baba T, Watanabe T. Association of the nitric oxide synthase gene polymorphism with an increased risk for progression to diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *Diabetes* 2000; 19: 2302-6.
94. Mollsten A, Marklund SL, Wessmn M, Svensson M,Forsblom C, Parkkonen M, et al. Afunctional polymorphism in the mangnese superoxide dismutase gene and diabetic nephropathy. *Diabetes* 2007; 56: 265-9.
95. Ng DP, Tai BC, Koh D, Tan kw, Chia KS. Angiotensin-I converting enzyme insertion/deletion polymorphism and its association with diabetic nephropthy: a meta-analysis of studies reported between 1994 and 2004 and comprising 14.727 subjects. *Diabetologia* 2005; 48: 1008-16.
96. Sauca OE, Carpini SD, Zagato L, Zerbini G,Manunta P, Cojocar. Role of angiotensin-converting enzymeinsertion/deletion polymorphism in type 1 diabetes nephropathy. *Romanian Journal of Diabetes Nutrition and Metabolic Diseases* 2012; 19: 143-9.
97. Mooyaart AL, Valk EJ, van Es LA, Bruijn JA, de Heer E, Freedman BI, et al. Genetic associations in diabetic nephropathy: a meta-analysis. *Diabetologia* 2011; 54: 544-53.
98. Rahimi Z, Mansouri Zaveleh O, Rahimi Z, Abbasi A. AT2R-1332 G:A polymorphism and diabetic nephropathy in type 2 diabetes mellitus patients. *J Renal Inj Prev* 2013; 2: 97-101.
99. Bostrom MA, Freedom BI, Langefeld CD, Liu L, Hicks PJ,Bowden DW. Association of adiponectin gene polymorphisms with type 2 diabetes in an African American population enriched for nephropathy. *Diabetes* 2009; 58: 499-504.
100. Vionnet N, Tregouet D, Kazeem G, Gut I, Groop PH, Tarnow L, et al. Analysis of 14 candidate genes for diabetic nephropathy on chromosome 3q in European populations: strongest evidence for association with a variant in promotor region of the adiponectin gene. *Diabetes* 2006; 55: 3166-74.
101. Gosek K, Moczulski D, Zukowska-Szzechowska E, Grzeszczak W. C-106T polymorphism in promotor of aldolasa reductase gene is a risk factor for diabetic nephropathy in type 2 diabetes patients with poor glycemic control. *Nephron Exo Nephrol* 2005; 99: e63-e67.
102. Ma R CW. Gentic of cardiovascular and renal complication in diabetes. *J Ddiabetes Investig* 2016; 7(2): 139-54.
103. Zaletel J, Pongrac Barlovič D, Hojs R. Diabetična ledvična bolezen. In: Zaletel J, Ravnik Oblak M, Zavrtnik A. Slovenske smernice za klinično obravnavo sladkorne bolezni tipa 2. Diabetološko združenje Slovenije. Ljubljana 2016; 1. izd.: 118-30.
104. Doll R, Peto R. Mortality in relation to smoking: 20 years, observation on male British doctors. *BMJ* 1976; 2: 1525-36.
105. Fagard RH. Smoking Amplifies Cardiovascular Risk in Patients With Hypertension and Diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32: S429-31.
106. Turner RC, Millns H, Neil HA, Stratton IM, Manley SE, Matthews DR, Holmann RR. Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: United Kingdom Prospective Study (UKPDS: 23), *BMJ* 1998; 316: 823-8.
107. Sowers JR, Epstein M, Edward D, Frohlich ED. Diabetes, Hypertension and Cardiovascular Disease. *Hypertension* 2001; 37: 1053-9.
108. Norton GR, Brooksbank R, Woodiwiss AJ. Gene variants of the renin-angiotensin system and hypertension: from a trough of disillusionment to a welcome phase of enlightenment? *Clin Sci (Lond)* 2010; 118(8): 487-506.
109. Yacoub R, Campbell KN. Inhibition of RAS in diabetic nephropathy. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 2015; 8: 29-40.
110. Moon JY. Recent Update of Renin-angiotensin-aldosterone System in the Pathogenesis of Hypertension. *Electrolyte Blood Press* 2013; 11(2): 41-5.

111. Gard PR. Implications of the angiotensin converting enzyme gene insertion/ deletion polymorphism in health and disease: a snapshot review. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2010; 1(2): 145-57.
112. Zhou TB, Qin YH, Su LN, et al. The association between angiotensin-converting enzyme insertion/ deletion gene variant and risk of focal segmental glomerulosclerosis: A systematic review and meta-analysis. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2011; 12: 624-33.
113. Gohda T, Makita Y, Shike T, et al. Association of the DD genotype and development of Japanese type 2 diabetic nephropathy. *Clin Nephrol* 2001; 56: 475-80.
114. Viswanathan V, Zhu Y, Bala K, et al. Association between ACE gene polymorphism and diabetic nephropathy in South Indian patients. *JOP* 2001; 2: 83-7.
115. Golomohamadi T, Nikzamir A, Nakhjavani M, et al. Association of angiotensin converting enzyme (ACE) gene polymorphism and diabetic nephropathy. *Iranian J Publ Health* 2006; 35: 14-21.
116. Jayapalan JJ, Muniandy S and Chan SP. Null association between ACE gene I/D polymorphism and diabetic nephropathy among multiethnic Malaysian subjects. *Indian J Hum Genet* 2010; 16: 78-86.
117. Zhong W, Jiang Z, Zhou TB. Association between the ACE I/D gene polymorphism and T2DN susceptibility: The risk of T2DM developing into T2DN in the Asian population. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2015: 1-9.
118. Al-Rubeaan K, Siddiqui K, Saeb AT, et al. ACE I/D and MTHFR C677T polymorphisms are significantly associated with type 2 diabetes in Arab ethnicity: A meta-analysis. *Gene* 2013; 520: 166-77.
119. Liu G, Zhou TB, Jiang Z, Zheng D. Association of ACE I/D gene polymorphism with T2DN susceptibility and risk of T2DM developing into T2DN in Caucasian population. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2015; 16(1): 165-71.
120. Merlo S, Novak J, Tkačova N, Nikolajević Starčević J, Šantel Letonja M, Makuc J, et al. Association of the ACE rs4646994 and rs4341 polymorphisms with the progression of carotid atherosclerosis in slovenian patients with type 2 diabetes mellitus. *Balkan J Med Genet* 2015; 18(2): 37-42.
121. Domingues-Montanari S, Fernandez-Cadenas I, Del Rio-Espinola, Mendioroz M, Ribo M, Obach V et al. The I/D polymorphism of the ACE1 gene is not associated with ischaemic stroke in Spanish individuals. *European Journal of Neurology* 2010; 11(17): 1390-2.
122. Eisenmann JC, Sarzynski MA, Glenn K, Rothschild M, Heelan K. ACE I/D genotype, adiposity, and blood pressure in children. *Cardiovasc Diabetol* 2009; 8: 4-10.
123. Ha SK. ACE Insertion/Deletion Polymorphism and Diabetic Nephropathy: Clinical Implications of Genetic Information, *Journal of Diabetic Research* 2014; ID 846068.
124. Gaillard I, Clauser E, Corvol P. Structure of human angiotensinogen gene. *DNA* 1989; 8(2): 87-99.
125. Brand E, Chatelain N, Paillard F, Tired L, Visvikis S, Lathrop M, et al. Detection of putative functional angiotensinogen (AGT) gene variants controlling plasma AGT levels by combined segregation-linkage analysis. *Eur J Hum Genet* 2002; 10(11): 715.
126. Sethi AA, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Angiotensinogen gene polymorphism, plasma angiotensinogen, and risk of hypertension and ischemic heart disease: a meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(7): 1269-75.
127. Underwood PC, Sun B, Williams JS, Pojoga LH, Raby B, Lasky-Su J, et al. The association of the angiotensinogen gene with insulin sensitivity in humans: a tagging single nucleotide polymorphism and haplotype approach. *Metabolism* 2011; 60(8): 1150-7.
128. Prasad P, Tiwari AK, Kumar KM, Ammini AC, Gupta A, Gupta R, et al. Chronic renal insufficiency among Asian Indians with type 2 diabetes: I. Role of RAAS gene polymorphisms. *BMC Med Genet* 2006; 7: 42.
129. Ahluwalia TS1, Ahuja M, Rai TS, Kohli HS, Bhansali A, Sud K, et al. ACE variants interact with the RAS pathway to confer risk and protection against type 2 diabetic nephropathy. *DNA Cell Biol* 2009; 28(3): 141-50.
130. Shaikh R, Shahid SM, Mansoor Q, Ismail M, Azhar A. Genetic variants of ACE (Insertion/Deletion) and AGT (M268T) genes in patients with diabetes and nephropathy. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2014; 15(2): 124-30.
131. Mtiraoui N, Ezzidi I, Turki A, Chaieb M, Mahjoub T, Almawi WY. Renin-angiotensin-aldosterone system genotypes and haplotypes affect the susceptibility to nephropathy in type 2 diabetes patients. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2011; 12(4): 572-80.

132. Chang HR, Cheng CH, Shu KH, Chen CH, Lian JD, Wu MY. Study of the polymorphism of angiotensinogen, angiotensin-converting enzyme and angiotensin receptor in type II diabetes with end-stage renal disease in Taiwan. *J Chin Med Assoc* 2003; 66(1): 51-6.
133. Osawa N, Koya D, Araki S, Uzu T, Tsunoda T, Kashiwagi A, et al. Combinational effect of genes for the renin-angiotensin system in conferring susceptibility to diabetic nephropathy. *J Hum Genet* 2007; 52(2): 143-51.
134. Wang J, Zhu X, Yang L, Liu Y, Zhou W, Li H. Relationship between angiotensinogen gene M235T variant with diabetic nephropathy in Chinese NIDDM. *Chin Med J (Engl)* 1999; 112(9): 797-800.
135. Reis KA, Ebinç FA, Koç E, Demirci H, Erten Y, Güz G, et al. Association of the angiotensinogen M235T and APO E gene polymorphisms in Turkish type 2 diabetic patients with and without nephropathy. *Ren Fail* 2011; 33(5): 469-74.
136. Su SL, Yang HY, Wu CC, Lee HS, Lin YF, Hsu CA, et al. Gene-gene interactions in renin-angiotensin-aldosterone system contributes to end-stage renal disease susceptibility in a Han Chinese population. *Scientific World Journal*. doi: 10.1155/2014/169798. Epub 2014 Apr 13.
137. Tang W, Zhou TB, Jiang Z. Association of the angiotensinogen M235T gene polymorphism with risk of diabetes mellitus developing into diabetic nephropathy. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2015; 16(4): NP27-NP34.
138. Ding W, Wang F, Fang Q, Zhang M, Chen J, Gu Y. Association between two genetic polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system and diabetic nephropathy: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2012; 39(2): 1293-303.
139. Buraczyńska M, Ksiazek P, Łopatyński J, Spasiewicz D, Nowicka T, Ksiazek A. Association of the renin-angiotensin system gene polymorphism with nephropathy in type II diabetes. *Pol Arch Med Wewn* 2002; 108(2): 725-30.
140. Ringel J, Beige J, Kunz R, Distler A, Sharma AM. Genetic variants of the renin-angiotensin system, diabetic nephropathy and hypertension. *Diabetologia* 1997; 40(2): 193-9.
141. Gasparo M, Bullock G. The AT1 and AT2 angiotensin receptors. In: Oparil S, Webber M, editors. *Hypertension: a companion to Brenner & Rector, the kidney*. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 2000, pp. 101-10.
142. Van Buren PN, Toto R. Hypertension in diabetic nephropathy: epidemiology, mechanisms, and management. *Adv Chronic Kidney Dis* 2011; 18(1): 28-41.
143. Guo D, Furuta H, Mizukoshi M, et al. The genomic organization of human angiotensin II type 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 200: 313-9.
144. Seip RL, Volek JS, Wiindemuth A et al. Physiogenomic comparison of human fat loss in response to diets restrictive of carbohydrate or fat. *Nutr Metab* 2008; 5: 4.
145. Guo D, Kelly TN, Hixson JE et al. Genetic Variants in the Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Salt-Sensitivity of Blood Pressure. *J Hypertens* 2010; 28(6): 1210-20.
146. Jin T, Ren Y, Zhu X et al. Angiotensin II Receptor 1 gene variants are associated with high-altitude pulmonary edema risk. *Oncotarget* 2016; 7(47): 77117-123.
147. Martinez-Rodriguez N, Posadas-Romero C, Cardoso G, et al. Association of angiotensin II type I-receptor gene polymorphisms with the risk of developing hypertension in Mexican individuals. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2011; 13(1): 133-40.
148. Motti AK, Shoham DA, North KE. Angiotensin II type 1 receptor polymorphisms and susceptibility to hypertension: A HuGE review. *Genet Med* 2008; 10(8): 560-74.
149. Nelveg-Kristensen KE, Madsen MB, Torp-Pedersen CT, et al. Pharmacogenetic Risk Stratification in Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor-Treated Patients with Congestive Heart Failure: A Retrospective Cohort Study. *PLoS One* 2015; 10(12): Eo144195.
150. Buraczynska M, Ksiazek P, Drop W, et al. Genetic polymorphisms of the renin angiotensin system in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(4): 979-83.
151. Fradin S, Goulet-Salamon B, Chantepie M, et al. Relationship between polymorphisms in the renin-angiotensin system and nephropathy in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab* 2002; 28(1): 27-32.
152. Tomino Y, Makita Y, Shike T, et al. Relationship between polymorphism in the angiotensinogen, angiotensin converting enzyme or angiotensin converting enzyme or angiotensin II receptor and renal progression in Japanese NIDDM patients. *Nephron* 1999; 82(2): 139-44.

153. Shah VN, Cheema BS, Sharma R, et al. ACACbeta gene (rs2268388) and AGTR1 gene (rs5186) polymorphism and risk of nephropathy in Asian Indian patients with type 2 diabetes. *Mol Cell Biochem* 2013; 372(1-2): 191-8.
154. Mehri S, Koubaa N, Hammami S, et al. Genotypic interactions of renin-angiotensin system genes with diabetes type 2 in a Tunisian population. *Life Sci* 2010; 87(1-2): 49-54.
155. Ding W, Wang F, Fang Q, et al. Association between two genetic polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system and diabetic nephropathy: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2012; 39(2): 1293-303.
156. Wang F, Fang Q, Yu N, et al. Association between genetic polymorphism of the angiotensin-converting enzyme and diabetic nephropathy: a meta-analysis comprising 26580 subjects. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2012; 13(1): 161-74.
157. Moradi M, Rahimi Z, Amiri S, et al. AT1R A1166C variants in patients with type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy. *J Nephrothol* 2015; 4(3): 69-76.
158. Brewster UC, Perazella MA. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. *American Journal of Medicine* 2004; 116(4): 263-272.
159. Campbell CY, Fang BF, Guo X, et al. Associations between genetic variants in the ACE, AGT, AGTR1 and AGTR2 genes and renal function in the Multi-ethnic Study of Atherosclerosis. *Am J Nephrol* 2010; 32(2): 156-62.
160. Carpena MP, Rados DV, Sortica DA, de A Souza BM, et al. Genetics of diabetic nephropathy. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2010; 54: 254-61.
161. Kohan DE, Rossi NF, Inscho EW, et al. Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. *Physiol Rev* 2011; 91: 1-77
162. Benz K, Amann K. Endothelin in diabetic renal disease. *Contrib Nephrol* 2011; 172: 139-48.
163. Bruno CM, Meli S, Marcinno M, et al. Plasma endothelin-1 levels and albumin excretion rate in normotensive, microalbuminuric type 2 diabetic patients. *J Biol Regul Homeost Agents* 2002; 16: 114-7.
164. Zanatta CM, Gerchman F, Burtet L, et al. Endothelin-1 levels and albuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2008; 80: 299-304.
165. Hocher B, Schwarz A, Reinbacher D, et al. Effects of endothelin receptor antagonists on the progression of diabetic nephropathy. *Nephron* 2001; 87: 161-9.
166. Cosenzi A, Bernobich E, Trevisan R, et al. Nephroprotective effect of bosentan in diabetic rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; 42: 752-6.
167. Wenzel RR, Littke T, Kuranoff S, et al. Avosentan reduces albumin excretion in diabetics with macroalbuminuria. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 655-64.
168. Kohan DE, Pritchett Y, Molitch M, et al. Addition of atrasentan to renin-angiotensin system blockade reduces albuminuria in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 763-72.
169. de Zeeuw D, Coll B, Andress D, et al. The endothelin antagonist atrasentan lowers residual albuminuria in patients with type 2 diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2014; 25: 1083-93.
170. Kalani M. The importance of endothelin-1 for microvascular dysfunction in diabetes. *Vasc Health Risk Manag* 2008; 4: 1061-1068.
171. Laurenti O, Vingolo EM, Desideri GB, et al. Increased levels of plasma endothelin-1 in non-insulin dependent diabetic patients with retinopathy but without other diabetes-related organ damage. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1997; 105: 40-42.
172. Arinami T, Ishikawa M, Inoue A, et al. Chromosomal assignments of the human endothelin family genes: the endothelin-1 gene (EDN1) to 6p23-p24, the endothelin-2 gene (EDN2) to 1p34, and the endothelin-3 gene (EDN3) to 20q13.2-q13.3. *Am J Hum Genet* 1991; 48 : 990-6.
173. Inoue A, Yanagisawa M, Takawa Y, et al. The human preproendothelin-1 gene. *J Biol Chem* 1989; 264: 14954-9.
174. Tiret L, Poirier O, Hallet V, et al. The Lys198Asn polymorphism in the endothelin-1 gene is associated with blood pressure in overweight people. *Hypertension* 1999; 33: 1169-74.
175. Asai T, Ohkubo T, Katsuya T, et al. Endothelin-1 gene variant associates with blood pressure in obese Japanese subjects: the Ohasama Study. *Hypertension* 2001; 38: 1321-4.
176. Colombo MG, Ciofini E, Paradossi U, et al. ET-1 Lys198Asn and ET(A) receptor H323H polymorphisms in heart failure. A case-control study. *Cardiology* 2006; 105: 246-52.

177. Popov AF, Schulz EG, Hinz J, et al. Impact of endothelin-1 Lys198Asn polymorphism on coronary artery disease and endorgan damage in hypertensives. *Coron Artery Dis* 2008; 19: 429-34.
178. Vargas-Alarcon G, Vallejo M, Posadas-Romero C, et al. The -974C>A (rs3087459) gene polymorphism in the endothelin gene (EDN1) is associated with risk of developing acute coronary syndrome in Mexican patients. *Gene* 2014; 542: 258-62.
179. Castro MG, Rodriguez-Pascual F, Magan-Marchal N, et al. Screening of the endothelin1 gene (EDN1) in a cohort of patients with essential left ventricular hypertrophy. *Ann Hum Genet* 2007; 71 (Pt 5): 601-10.
180. Chatsuriyawong S, Gozal D, Kheirandish-Gozal L, et al. Genetic variance in nitric oxide synthase and endothelin genes among children with and without endothelial dysfunction. *J Transl Med* 2013; 11: 227.
181. Yasuda H, Kamide K, Takiuchi S, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in endothelin family genes with the progression of atherosclerosis in patients with essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2007; 21: 883-92.
182. Litovkina O, Nekipelova E, Dvornyk V, et al. Genes involved in the regulation of vascular homeostasis determine renal survival rate in patients with chronic glomerulonephritis. *Gene* 2014; 546: 112-6.
183. Zsom M, Fülöp T, Zsom L, et al. Genetic polymorphisms and the risk of progressive renal failure in elderly Hungarian patients. *Hemodial Int* 2011; 15: 501-8.
184. Speed JS, Pollock DM. Endothelin, kidney disease, and hypertension. *Hypertension* 2013; 61: 1142-5.
185. Dhaun N, Webb DJ, Kluth DC. Endothelin-1 and the kidney – beyond BP. *Br J Pharmacol* 2012; 167: 720-31.
186. Lim SC, Liu JJ, Low HQ, et al. Microarray analysis of multiple candidate genes and associated plasma proteins for nephropathy secondary to type 2 diabetes among Chinese individuals. *Diabetologia* 2009; 52: 1343-51.
187. Chatsuriyawong S, Gozal D, Kheirandish-Gozal L, et al. Genetic variance in nitric oxide synthase and endothelin genes among children with and without endothelial dysfunction. *J Transl Med* 2013; 11: 227.
188. Vargas-Alarcon G, Vallejo M, Posadas-Romero C, et al. The -974C>A (rs3087459) gene polymorphism in the endothelin gene (EDN1) is associated with risk of developing acute coronary syndrome in Mexican patients. *Gene* 2014; 542: 258-62.
189. Kathiresan S, Newton-Cheh C, Gerszten RE. On the interpretation of genetic association studies. *Eur Heart J* 2004; 25: 1378-81.
190. Yoshida T, Kato K, Yokoi K, et al. Association of genetic variants with chronic kidney disease in Japanese individuals with type 2 diabetes mellitus. *Int J Mol Med* 2009; 23(4): 529-37.
191. Moreno PR, Fuster V. New aspect in the pathogenesis of diabetic atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 2293-300.
192. Booth GL, Kapral MK, Fung K, Tu JV. Relation between age and cardiovascular disease in men and women with diabetes compared with non-diabetic people; A population-based retrospective cohort study. *Lancet* 2006; 368: 29-36.
193. Valdivielso JM, Montero A, Badr KF, Munger KA. Inhibition of 5-lipoxygenase activating protein decreases proteinuria in diabetic rats. *J Nephrol* 2003; 16(1): 85-94.
194. Yoshida T, Kato K, Yokoi K, et al. Association of genetic variants with chronic kidney disease in Japanese individuals with type 2 diabetes mellitus. *Int J Mol Med* 2009; 23(4): 529-37.
195. Moreno PR, Fuster V. New aspect in the pathogenesis of diabetic atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 2293-2300.
196. Booth GL, Kapral MK, Fung K, Tu JV. Relation between age and cardiovascular disease in men and women with diabetes compared with non-diabetic people; A population-based retrospective cohort study. *Lancet* 2006; 368: 29-36.
193. Samuelsson B. The discovery of leukotrienes. *Am J Respir Vrit Care Med* 2000; 161: S2-S6.
194. Wilson KC, Leung L, Gao, Parco M, Siu, C, WK, Lai. Diabetic nephropathy and endothelial dysfunction: Current and future therapies, and emerging of vascular imaging for preclinical renal-kinetic study. *Life Sciences* 2016; 166: 121-30.
195. Rahimi-Madiseh. M, Malekpour-Tehrani A, Bahman M, Rafieian-Kopael M. The reasearch and development on the antioxidants in prevention of diabetic complicatons. *Asian Pacific J of Tropical Medicine* 2016; 9: 825-31.

196. Petrica L, Vlad A, Gluhovschi G, et al. Glycated peptides are associated with the variability of endothelial dysfunction in the cerebral vessels and the kidney in the type diabetes mellitus patients : a cross-sectional study. *J Diabetes Complications* 2015; 29(2): 230-7.
197. Jin X, He Y, Zhu M. The relationship between the polymorphism of SG13S114 A/T in ALOXAP gene and vulnerability of carotid atherosclerosis in Chinese Han population. *Int J Clin Exp Med* 2010; 3(1): 28-32.
198. Kathiresan S, Newton-Cheh C, Gerszten RE. On the interpretation of genetic association studies. *Eur Heart J* 2004; 25: 1378-81
199. Shiro M. Do inflammatory cytokine genes confer susceptibility to diabetic nephropathy?. *Kidney international* 2008; 74: 413-5.
200. Pezzolesi MG, Skupien J, Krolewski AS. Insights to Genetics of Diabetic Nephropathy through a Genome-wide Association Study of the GoKinD Collection. *Semin Nephrol* 2010; 30(2): 126-40.
201. Pezzolesi MG, Poznik GD, Mychaleckyj A, Paterson AD, Baretti MT, Klein JB, et al. Genome-Wide Association Scan for Diabetic Nephropathy Susceptibility Genes in Type 1 Diabetes. *Diabetes* 2009; 58: 1403-10.
202. Tsaih SW, Pezzolesi MG, Yuan R, Warram JH, Krolewski AS, Korstanje R. Genetic analysis of albuminuria in aging mice and concordance with loci for human diabetic nephropathy found in genome-wide association scan. *Kidney International* 2010; 77: 201-10.
203. King CR, Nicolae DL. GWAS to Sequencing: Divergence in Study Design and Analysis. *Genes (Basel)* 2014; 5(2): 460-76.
204. Katsonis P, Koire AK, Wilson SJ, Hsu TK, Lua RC, Wilkins AD, Lichtarge O. Single nucleotide variations: Biological impact and theoretical interpretation. *Protein Sci* 2014; 23(12): 1650-66.
205. Kato M, Natarajan R. Diabetic nephropathy-emerging epigenetic mechanisms. *Nat Rev Nephrol* 2014; 10(9): 517-30.
206. Korte A, Farlow A. The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. *Plant Methods* 2013; 9: 29.

8. ČLANKI KOT DEL DOKTORSKE NALOGE

Šeruga, M., Kariž, S., Makuc, J., Završnik, M., Cilenšek, I., Gazdikova, K., Caprnda, M., Kruzliak, P., & Petrovič, D. (2017). Endothelin-1 Gene Polymorphisms rs5370, rs1476046, and rs3087459 are not Associated with Diabetic Nephropathy in Caucasians with Type 2 Diabetes Mellitus, *Folia Medica*, 59(3), 261-269. doi: <https://doi.org/10.1515/folmed-2017-0033>

Makuc, J., Šeruga, K., Završnik, M., Cilenšek, I., & Petrovič, D. (2017). Angiotensinogen (AGT) gene missense polymorphisms (rs699 and rs4762) and diabetic nephropathy in Caucasians with type 2 diabetes mellitus. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 17(3), 262-267. doi:<http://dx.doi.org/10.17305/bjbms.2017.1823>.

Šeruga, M., Makuc, J., Završnik, M., Cilenšek, I., Ekart, R., & Petrovič, D. (2016). Polymorphism of angiotensin-converting enzyme (rs4340) and diabetic nephropathy in Caucasians with type 2 diabetes mellitus, *Balkan Journal of Medical Genetics*, 19(2), 29-34. doi: <https://doi.org/10.1515/bjmg-2016-0033>

9. PRILOGE

9.1 ŽIVLJENJEPIS

Rodila sem se 14. 4. 1960 v delavski družini mami Eli in očetu Štefanu Šerugi.

Osnovno šolo sem obiskovala v Murski Soboti, prav tako srednjo šolo – Gimnazijo Juša Kramarja. Na Medicinsko fakulteto v Ljubljani sem se vpisala v šolskem letu 1978/79 in diplomirala junija 1985. Staž sem opravljala v Splošni Bolnišnici M. Sobota in nato v matični ustanovi dobila specializacijo iz interne medicine. Specialistični izpit sem opravila aprila 1991. Nekaj let sem delala na področju nefrologije in dialize. Moja želja je bila področje gastroenterologije in ta se mi je po nekaj letih izpolnila. Magistrsko nalogo sem zagovarjala leta 1994 na Medicinski fakulteti v Ljubljani, in sicer s področja gastroenteologije, pod mentorstvom profesorja I. Križmana. Že naslednje leto sem pričela trimesečno izpolnjevanje na področju ultrazvoka na univerzi Thomasa Jeffersona v Filadelfiji, pod vodstvom profesorja Goldberga, in tečaj tudi uspešno zaključila. Leta 1994 sem že obiskala prvi svetovni kongres gastroenterologov v Los Angelesu, kjer sem sodelovala s svojim posterjem, ki je nosil naslov »The Stomach Cancer in Slovenia – An Epidemiology Study«. Naslednje leto smo s sodelavci nastopili na evropskem srečanju gastroenterologov v Berlinu s temo *rak na debelem črevesu in danki*. Od svoje prve zaposlitve naprej sem sodelovala v Društvu za boj proti raku Pomurja in ga eno mandatno dobo tudi vodila. V tem času smo uspešno izbojevali borbo za ustanovitev ambulante za bolezni dojk in za svoje delo sem leta 1998 prejela srebrno plaketo Zveze slovenskih društev za boj proti raku. Zaradi želje po širitvi znanja iz endoskopije sem se v letu 1997 dva meseca izpopolnjevala še pri profesorju Soehendri v Univerzitetni bolnici Hamburg – Eppendorf v letu 1997. Domov sem prinesla metodo ustavljanja krvavitve iz varic požiralnika s pomočjo šestih podvez. O prvih lastnih izkušnjah sem poročala na slovenskem združenju gastroenterologov leta 1998 in z večjo študijo sodelovala še na 2. kongresu Združenja internistov SZD leta 2005. S študijskega potovanja v Nemčiji sem prinesla domov tudi novo metodo hranjenja prek perkutane endoskopske stome, ki je danes uveljavljena metoda hranjenja pri bolnikih z nevrološkimi boleznimi, ki ne morejo požirati. Po vrnitvi iz Amerike sem leta 1996 sodelovala tudi na 1. podiplomskem tečaju iz abdominalne ultrazvočne diagnostike in terapije na temo *ultrazvok vranice*. Leta 2011 nam je po dolgem času ponovno uspelo organizirati UZ šolo abdomna, kjer sem sodelovala s temo *portalna hipertenzija*. Kot član upravnega odbora Sekcije za ultrazvok pri SZD sem si prizadevala za ustanovitev UZ šole abdomna, ki bi služila kot dodatno znanje za interniste in gastroenterologe, vendar ideja ni zaživela. V naši bolnišnici smo organizirali tečaj ultrazvoka leta 2016 pod okriljem WINFOCUS-a z namenom izobraziti mlade specialiste za hitro diagnostiko urgentnih stanj z uporabo ultrazvoka.

Od leta 1995–2000 sem bila tajnik Pomurskega zdravniškega društva. V tem času smo organizirali 135. letno skupščino Slovenskega zdravniškega društva.

Področje portalne hipertenzije in primarni tumorji jeter so mi bili v letih 2001 izziv, zato sem dodatno znanje poiskala pri profesor Bolondiju v Bologni, kamor sem se pozneje večkrat vračala in pošiljala mlajše kolege po dodatno znanje.

Leta 2003 sem bila prvič izvoljena v naziv asistentke za interno medicino na Medicinski fakulteti v Ljubljani in tri leta pozneje sem mandat uspešno ponovila. Leto dni pred izvolitvijo v naziv asistenta za interno medicino sem začela opravljati tudi vlogo glavnega mentorja za specializacijo iz interne medicine in to opravljam še danes s kritičnimi pripombami na potek specializacije.

Danes širim svoje znane s področja paliativne medicine in to vejo medicine vgrajujem v vsakdanje delo v naši bolnišnici in v Sloveniji. Znanje s tega področja medicine sem si nabirala leta 2009 pri prof. F. Ferrisu v San Diegu, kjer sem preživela en mesec.

Sodelovala sem pri izvedbi 2. Slovenskega kongresa o uporabi ultrazvoka, ki je bil marca 2009 v Mariboru.

Ves čas svoje poklicne poti zdravnika sem sodelovala tudi pri izobraževanju prebivalcev domače regije prek lokalnega radia in lokalnih časopisov in neposredno prek predavanj za krajevne skupnosti ali za ciljne skupine bolnikov. Tako in v tem smislu sta v soavtorstvu nastali tudi dve knjigi z naslovom *Dieta pri boleznih jeter, žolča in vnetju trebušne slinavke* in *Prehrana pri boleznih prebavil*, in sicer leta 1998 in 1999. Ves čas svoje poklicne poti sem si prizadevala dokazovati, da je mogoče ustvarjati in nekaj doprinesti k slovenski medicini tudi z drugega skrajnega kota Slovenije, iz periferne bolnišnice M. Sobota. Vedno sem iskale izzive tudi na drugih področjih medicine, tako smo leta 2006 uvedli intragastrični balon kot pomoč za hujšanje, vendar se metoda kot taka ni prijela, ker ni bilo plačnika s strani zavarovalnice. Pet let sem opravljala funkcijo vodje gastroenterologije in hepatologije v Splošni bolnišnici M. Sobota, vse do prihoda mlajše generacije, bila sem vodja pilotskega projekta *paliativna oskrba bolnika*. Naslov primarij mi je bil dodeljen v mesecu juliju 2009, junija leta 2011 mi je bila priznana še specializacija na podlagi dela za področje gastroenterologije. Trenutno sem dejavna na področju paliativne medicine, saj skupaj s slovenskim združenjem za paliativno medicino, katerega ustanovitelj sem, orjemo ledino v naši državi. Opravljam tudi funkcijo regijskega predstavnika Zdravniške zbornice Slovenije, in sicer že drugi mandat. Sem član združenja za klinično prehrano, ultrazvočne sekcije ter združenja gastroenterologov Slovenije in združenja za paliativno medicino.

9.2 ZAHVALA

Moje doktorsko delo presega delo, znanje in zmožnosti posameznika, zato se zahvaljujem vsem, vidnim in nevidnim posameznikom, ki so sodelovali z mano pri posameznih fazah raziskave. Sodelovalo je veliko posameznikov in na listu papirja bi zmanjkalo prostora, da bi naštel vsakega posebej, zato se iskreno zahvaljujem osebju diabetološkega dispanzerja SB M. Sobota, osebju

biokemičnega in urinskega laboratorija SB M. Sobota, osebju endoskopskega odseka SB M. Sobota in laboratoriju za molekularno genetiko Inštituta za histologijo in embriologijo UKC Ljubljana.

Zahvaljujem se mentorjema, red. prof. dr. Danijelu Petroviču, dr. med, in izr. prof. dr. Robertu Ekartu, dr. med, za strokovno svetovanje in usmerjanje, predvsem pa za potrpežljivost in spodbudo pri izvedbi doktorske naloge. Ne morem mimo kolegice asist. dr. Ines Cilenšek, dipl. fiziot., dr. vet. med. za moralno vzpodbudo in svetovanje, predvsem takrat, ko je šel voz po poti navzdol.

Zahvaljujem se vsem bolnikom, ki so sodelovali v raziskavi in pridno hodili na kontrolne preglede.

Posebna zahvala hčeri Ana Eli in teti Majdi, ki sta me spodbujali in prenašali slabo voljo tekom doktorskega študija.

Delo posvečam očetu ŠTEFANU ŠERUGI, ki je ob pričakovanju mojega zaključka doktorskega študija žal preminil.

9.3 IZJAVA DOKTORSKEGA KANDIDATA

UNIVERZA V MARIBORU

IZJAVA DOKTORSKEGA KANDIDATA

Podpisani-a MAJA ŠERUŠA, vpisna številka

izjavljam,

da je doktorska disertacija z naslovom POPLEN IZBRANIH GENSKIH
POLIMORFIZMOV PRI NASTANKU DIABETIČNE LEDVICNE
BOLEZNI PRI BOLNIKIH S SB 2

- rezultat lastnega raziskovalnega dela,
- da so rezultati korektno navedeni in
- da nisem kršil-a avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih.

Podpis doktorskega-e kandidata-ke:

