

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**

**Dipartimento di Fisiopatologia Clinica
Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze Endocrinologiche e Metaboliche
Dottorato di Ricerca in Scienze Endocrinologiche e Metaboliche
XXI ciclo
Settore disciplinare: MED 013**

**GLI AGONISTI DEI PEROXISOME
PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR
GAMMA (PPAR-GAMMA) NELLA PREVENZIONE
DELLA NEFROPATIA DIABETICA**

**Tesi di:
Dr. Gianluca Bardini**

Tutor:
Prof. Carlo Maria Rotella

Coordinatore:
Prof. Gianni Forti

Triennio 2006-2008

Premesse

Il diabete mellito, sia di tipo 1 che, nella forma più diffusa costituita dal tipo 2, rappresenta oggi una vera malattia sociale con diffusione epidemica in tutti gli strati sociali e distribuzione globale, interessando anche i paesi in via di sviluppo. Le stime odierne considerano circa 170 milioni di malati nel mondo, ma se le linee di tendenza nello sviluppo di diabete (soprattutto di tipo 2) non si invertiranno, potremmo assistere ad una prevalenza di circa 360 milioni di malati nel mondo entro il 2030. E' quindi evidente, considerata l'estrema diffusione del diabete tipo 2 che questo costituisce la vera e propria emergenza sia nell'adulto che anche nell'infanzia, strettamente connessa all'incidenza crescente di sovrappeso e obesità ed all'adozione di uno stile di vita sedentario.

E' ormai noto che il diabete mellito espone ad un elevato rischio di comorbidità come ipertensione arteriosa e dislipidemia aterogena che incrementano significativamente il rischio per patologie cardiovascolari, soprattutto a livello coronarico (CHD risk), evidenziando nel paziente diabetico un rischio di infarto miocardico 2-3 volte superiore ad un soggetto non diabetico, e definendo pertanto il paziente diabetico come un soggetto ad elevato rischio cardiovascolare (CHD risk equivalent). La gravità del diabete è data oltre che da la sua cronicità anche per lo sviluppo di complicanze micro- e macro-vascolari, connesse strettamente con il grado di compenso glicometabolico: tutto si traduce nell'insorgenza di neuropatia, retinopatia e nefropatia diabetica, complicanze tutte estremamente invalidanti con gravi riflessi sulla qualità della vita del paziente. Infatti, la neuropatia, sensitivo-motoria ed autonoma, insieme a fenomeni ischemici degli arti inferiori, favorisce lo sviluppo del piede diabetico, la principale causa di amputazioni del piede o dell'arto; la retinopatia diabetica costituisce a tutt'oggi la causa principale di cecità legale nei paesi industrializzati e la nefropatia diabetica risulta essere una tra le principali cause di insufficienza renale terminale, da richiedere in cronico il trattamento dialitico o un eventuale trapianto renale.

In passato si indicava la nefropatia diabetica solo per la presenza di proteinuria >0.5 g/24 h. Solo nei primi anni ottanta, alcuni studi hanno evidenziato che la microalbuminuria (UAE >20 mcg/min e <199 mcg/min) era altamente predittiva per lo sviluppo di proteinuria (macroalbuminuria con UAE >200 mcg/min) sia nel DM tipo 1 che tipo 2. La presenza di microalbuminuria positiva indica la presenza di nefropatia diabetica, in particolare di nefropatia incipiente.

L'incidenza cumulativa di microalbuminuria in pazienti con DM tipo 1 era del 12.6% in 7.3 anni di follow-up del EURODIAB Study e di circa il 33% in uno studio danese con un follow-up di circa 18 anni. In pazienti con diabete tipo 2, l'incidenza di microalbuminuria era del 2.0% l'anno e la prevalenza complessiva nei 10 anni di follow-up dalla diagnosi di diabete era del 25% come evidenziato nello studio britannico UKPDS. La proteinuria si sviluppa nel 15-40% dei pazienti tipo 1 con un picco di incidenza intorno ai 15-20 anni di malattia; nei pazienti con diabete tipo 2, la prevalenza è altamente variabile, oscillando dal 5% fino al 20%. Sono state osservate variazioni di prevalenza e di incidenza della malattia in diverse etnie, così che la nefropatia diabetica risulta essere più frequente tra gli afro-americani, gli asiatici ed i nativi americani (indiani Pima) rispetto ai caucasici.

Quindi vista la diffusione della malattia diabetica, i rischi di mortalità e di compromissione della qualità di vita per il paziente diabetico con grave nefropatia, è necessario inquadrare precocemente la complicanza ed attuare le più efficaci strategie terapeutiche: interventi diagnostici e terapeutici precoci riescono a ridurre sensibilmente i costi sociali ed individuali della malattia.

Epidemiologia della nefropatia diabetica: alcuni dati

Secondo le più recenti statistiche epidemiologiche fino al 40% dei casi di insufficienza renale terminale (ESRD) in paesi industrializzati come Stati Uniti e Giappone. Emerge inoltre, da gli ultimi dati epidemiologici che i diabetici sviluppano la nefropatia tra il 20 ed il 40%; considerando che l'evoluzione della complicanza si svolge nell'arco di anni, i primi segni dell'insorgenza di interessamento renale sono caratterizzati dalla comparsa di microalbuminuria, che se non adeguatamente trattata, evolve verso lo sviluppo di insufficienza renale terminale, con diverso andamento tra il diabete tipo 1 ed il tipo 2. Mentre i diabetici tipo 1 con microalbuminuria sviluppano la nefropatia incipiente in circa l'80% dei casi, i tipo 2, dal 20 al 40% dei casi possono nell'arco di circa 15 anni sviluppare una nefropatia grave. Consideriamo inoltre che la nefropatia diabetica, oltre ad essere il principale fattore di sviluppo di ESRD nel diabetico, è un'importante causa di insorgenza di patologie cardiovascolari e di mortalità: infatti, secondo i più recenti dati, nel primo anno di dialisi si registra un 22% di mortalità e nei primi 5 anni di terapia dialitica un incremento di mortalità di circa il 15% superiore a quella registrata in pazienti dializzati non diabetici.

Lo studio DAI, il principale studio prospettico italiano di valutazione della diffusione ed incidenza della macroangiopatia diabetica nel diabete tipo 2, ha permesso di arruolare 19570 pazienti, sia in terapia con sola dieta, ipoglicemizzanti orali od insulina; dall'analisi dei dati è emersa una prevalenza di nefropatia del 25% tra gli uomini e del 19% tra le donne; considerando la prevalenza di nefropatia diabetica in stadio iniziale (microalbuminuria positiva) abbiamo dati del 15% tra gli uomini e del 11-15% tra le donne delle varie aree geografiche della penisola (1).

Principali meccanismi patogenetici alla base della nefropatia diabetica

Molteplici meccanismi contribuiscono allo sviluppo ed evoluzione della nefropatia diabetica, come l'interazione tra fattori dismetabolici ed iperglicemia, fattori emodinamici come l'ipertensione arteriosa e la predisposizione genetica.

Tra i fattori emodinamici, devono essere ricordati l'attivazione di vari sistemi vasoattivi come il sistema renina-angiotensina-aldosterone (SRA) ed il sistema delle endoteline. In risposta all'attivazione di questi complessi sistemi con azione vasoattiva, si osserva un progressivo incremento della pressione arteriosa sistemica per effetto sui vasi periferici di resistenza e parimenti, un aumento della pressione glomerulare, in particolare all'interno della capsula glomerulare di Bowman. Inoltre, viene attivata la sintesi e rilascio di citochine ad azione profibrotica come il transforming growth factor beta1 (TGF-beta-1) che inducono l'evoluzione verso la fibrosi glomerulare ed il deficit funzionale terminale del neurone. Molto importanti sono i meccanismi molecolari correlati allo scompenso glico-metabolico che sono costituiti dai processi di glicazione, la sintesi dei prodotti di glicazione avanzata (AGEs), un'umentata attività della proteinachinasi C (PKC) ed un alterato metabolismo della via dei polioli. Numerosi studi hanno comunque evidenziato una stretta associazione tra incrementata secrezione di molecole ad attività infiammatoria come numerose citochine, fattori di crescita e metalloproteinasi e lo sviluppo della nefropatia diabetica. Stress ossidativi e quindi lo squilibrio nel complesso sistema endotelio (disfunzione endoteliale) sembra giocare un ruolo determinante in questa patologia.

Sistemi emodinamici coinvolti

La prima alterazione emodinamica a livello renale è costituita dall'aumentata perfusione e conseguente iperfiltrazione glomerulare per vasodilatazione dell'arteriola afferente ed efferente al glomerulo, ma soprattutto di quella afferente. Molti fattori sono stati evidenziati alla base di questo alterato bilancio nel tono vasomotore come alcuni prostanoidi, l'ossido nitrico (NO) ad attività vasodilatante, il vascular endothelial growth factor (VEGF), il TGF-beta-1 e l'attivazione del SRA, in particolar modo nell'angiotensina II (angio II). Queste precoci alterazioni emodinamiche facilitano il passaggio di minime quote di albumina attraverso i capillari glomerulari e la successiva iperproduzione di matrice mesangiale, l'ispessimento della membrana basale glomerulare (GBM) e

il danneggiamento dei podociti. Tutto questo altera l'integrità del filtro glomerulare con la escrezione di minime quote di albumina nell'ultrafiltrato e poi nelle urine (microalbuminuria).

Un ruolo fondamentale in questo processo iniziale è svolto dall'angiotensina II e dall'endotelina con azioni vasoattive, sia con osservazioni in vitro e in modelli animali, poi confermato dall'impiego di farmaci specifici che bloccano il SRA (ace-inibitori e sartanici). Queste molecole preservano la funzionalità del glomerulo antagonizzando gli effetti pro-fibrotici dell'angiotensina II mediante la riduzione della sua stimolazione del TGF-beta-1 con riduzione dei livelli circolanti di quest'ultima (2-8).

Alterazioni indotte dall'iperglicemia

L'iperglicemia protratta è un fattore pivotale per lo sviluppo ed aggravamento delle complicanze croniche del diabete mellito e la nefropatia diabetica non sfugge a questa regola. E' ormai nota l'aumentata incidenza di nefropatia in pazienti con scompenso glicometabolico prolungato e fondamentali sono stati i risultati emersi da studi clinici condotti sia nel diabete tipo 1 come il Diabetes Control and Complications Trial (DCCT), che nel tipo 2, come lo UKPDS ed il Kumamoto Study.

L'iperglicemia è quindi un fattore determinante cruciale nello sviluppo della nefropatia per l'induzione e progressione di cascate infiammatorie e poi di processi fibrotici su le cellule glomerulari e mesangiali. Infatti l'iperglicemia si associa ad un incremento nella proliferazione ed ipertrofia delle cellule mesangiali, incremento nella produzione della matrice ed ispessimento della membrana basale. Inoltre da osservazioni in vitro è emerso un marcato effetto apoptotico con distruzione progressiva del compartimento mesangiale. Inoltre alti livelli glicemici inducono una upregulation nella espressione di VEGF a livello dei podociti, aumentando così i fenomeni di permeabilità vascolare. Le vie attraverso cui l'iperglicemia protratta induce danni sul sistema glomerulare sono essenzialmente costituite dai processi di glicazione (glicosilazione per via non enzimatica) che genera gli AGEs, l'attivazione di fosfochinasi C (PKC) e l'attivazione ed accelerazione delle vie metaboliche connesse con l'aldoso-reduttasi. Inoltre, l'intervento dello stress ossidativi con la produzione di perossidi si associa e sinergizza i danni indotti dall'attivazione di queste 3 vie dismetaboliche (9-12).

Glicazione e formazione degli AGEs

L'iperglicemia cronica determina il legame senza intervento enzimatico (glicazione) di glucosio con residui amminici di vari substrati proteici formando prodotti che sono gli AGEs; numerosi sono i bersagli proteici dei fenomeni di glicazione, di cui quello più noto è costituito dall'emoglobina, ma, considerando il processo della nefropatia diabetica, la membrana basale glomerulare ed altri componenti della matrice nel glomerulo. Questo determina all'inizio, la formazione di prodotti di glicazione reversibili, successivamente il danno diviene definito con la formazione dei prodotti finali del processo di glicazione. Questi AGEs possono alterare i sistemi di segnale intracellulare e nelle forme più avanzate di nefropatia, essere escreti con le urine: L'effetto netto è il loro legame a livello del collagene contribuendo alla genesi delle complicanze microvascolari.

Attivazione della PKC

Questo enzima, una volta attivato, induce un'aumentato rilascio di prostanoidi con azione vasodilatante che contribuiscono, insieme al NO, ad una vasodilatazione glomerulare e quindi iperfiltrazione. Mediante l'attivazione di TGF-beta-1, la PKC può concorrere all'aumentata produzione di matrice extracellulare da parte delle cellule mesangiali. Come l'iperglicemia cronica possa indurre l'attivazione dell'enzima PKC è stato chiarito da osservazioni in vitro; la PKC, una volta attivata, induce a sua volta la sintesi ed attivazione di un'altra kinasi, la mitogen-activated protein kinase (MAPK); la coattivazione di PKC e MAPK in presenza di elevati livelli di glucosio indica che entrambi gli enzimi sono strettamente connessi nei processi di sviluppo della nefropatia.

La via dell'aldoso-reduttasi

La via dei polioli è direttamente coinvolta nella genesi della nefropatia. Oltre ad osservazioni in vitro, anche quelle ottenute in modelli animali hanno evidenziato che il trattamento con specifici inibitori dell'aldoso-reduttasi permettevano una significativa riduzione dell'escrezione renale di albumina.

Il ruolo di alcune citochine: VEGF, TGF-beta ed altre

La sintesi e rilascio di VEGF avviene a livello podocitario, attraverso la GBM ed agisce sulle cellule dell'endotelio glomerulare tramite recettori specifici (VEGFR1 e VEGFR2). Il VEGF incrementa la permeabilità del filtro glomerulare alle proteine, aumentando la loro escrezione urinaria. L'iperglicemia stimola direttamente la sintesi di VEGF che agisce nel diabetico come mediatore di danno endoteliale, con un ruolo determinante, tanto che l'impiego di specifici antagonisti di questo fattore endoteliale ha ridotto l'entità della microalbuminuria in modelli animali di nefropatia. Studi in vitro hanno evidenziato che l'esposizione di cellule endoteliali umane ad alto glucosio unito a TGF-beta1 ed angio II stimola l'espressione genica di VEGF che porta all'aumentata sintesi e rilascio di NO; successivamente si osserva la vasodilatazione glomerulare e l'iperfiltrazione. Il VEGF promuove inoltre la iperproduzione di catene alfa3 di collagene di tipo IV, con un progressivo ispessimento della GBM, elemento istologico tipico della malattia. L'impiego di anticorpi anti-VEGF in modelli animali di nefropatia diabetica, ha permesso di evidenziare un miglioramento delle prime alterazioni funzionali della malattia, con riduzione dell'iperfiltrazione glomerulare ed una diminuita escrezione urinaria di albumina rispetto agli animali di controllo. Elemento caratteristico della nefropatia diabetica è che se nelle prime fasi di sviluppo si assiste ad una upregulation del VEGF podocitario, nelle fasi più avanzate, contraddistinte da marcata proteinuria e riduzione del filtrato glomerulare, si evidenzia una riduzione progressiva dei livelli di VEGF legato ad un marcata podocitopenia glomerulare (13-16).

Accanto al VEGF, l'iperglicemia induce un'aumentata espressione e rilascio di TGF-beta1 a livello dei glomeruli e della matrice, tanto che l'impiego di anticorpi specifici in modelli animali ha evidenziato un blocco nell'espressione genica della citochina. Le più recenti osservazioni, confermano che questa citochina contribuisce all'ipertrofia cellulare ed incrementa la sintesi di collagene, costituendo forse la citochina più importante nelle fasi iniziali della malattia (17-21).

Altre citochine ad azione infiammatoria, vengono attivate, come ad esempio la interleuchina-1 (IL-1), la IL-6, la IL-18 ed il TNF-alfa, ciascuna con attività peculiare; infatti, la IL-1 altera l'espressione di fattori chemotattici e di molecole di adesione, altera i processi emodinamici all'interno del glomerulo ed influenza la permeabilità della parete endoteliale. La IL-6 presenta una stretta associazione con i fenomeni di ispessimento della GBM ed è coinvolta nella permeabilità dell'endotelio e nella proliferazione mesangiale. La IL-18 induce la sintesi e rilascio di altre citochine come IL-1, IFN-gamma, il TNF-alfa e fenomeni di apoptosi dell'endotelio. Il TNF-alfa presenta un'ampia varietà di azioni biologiche, soprattutto flogistiche e citotossiche.

Il ruolo dello stress ossidativo

Sede di questo processo è l'endotelio che vede un continuo bilancio dinamico tra la produzione di fattori pro-ossidanti (specie reattive dell'ossigeno: ROS), radicali liberi e fattori antiossidanti come il NO ed enzimi antiossidanti. Mentre le prime mediano molti negativi effetti biologici come la vasocostrizione glomerulare, la perossidazione delle membrane, la trombosi e l'infiammazione, le seconde permettono la riparazione dei danni endoteliali, la riparazione del DNA, la vasodilatazione; questo delicato bilancio viene ad essere alterato a favore dei fattori ossidativi in corso di iperglicemia protratta, esponendo l'endotelio ad una serie di effetti negativi e deficit funzionali: la disfunzione endoteliale. Markers di DNA legati a stress ossidativo sono risultati essere aumentati in pazienti con proteinuria versus microalbuminuria e prodotti derivanti

dalla glico-ossidazione della matrice mesangiale e dei glomeruli sono di frequente riscontro in biopsie di pazienti con nefropatia diabetica (22-24).

La nefrina

Questa è una proteina prodotta dai podociti, essenziale per il mantenimento della funzionalità della barriera di filtrazione glomerulare. Pazienti con nefropatia diabetica presentano una ridotta espressione di nefrina ed inoltre, l'escrezione urinaria di questa proteina è aumentata del 17-30% in pazienti diabetici con e senza microalbuminuria. Pertanto questo dato indica che la nefrina rientra tra i precoci segnali di sviluppo di nefropatia espressione di danno podocitario (25-30).

Accanto allo sviluppo di vie metaboliche legate all'iperglicemia, alla espressione e sintesi di citochine e fattori endoteliali coinvolti nello sviluppo della nefropatia diabetica, molti elementi caratteristici della citologia glomerulare intervengono nella normale fisiologia della filtrazione glomerulare e della ritenzione proteica: molti di questi componenti del filtro glomerulare vengono alterati pesantemente in corso di nefropatia, favorendo così la proteinuria. Dobbiamo pertanto descriverli, valutando nello sviluppo della nefropatia diabetica oltre a processi biochimici e molecolari anche alterazioni più strettamente meccaniche coinvolte nella micro- e macroalbuminuria.

Considerando che circa il 20% (180 litri) del flusso plasmatici giornaliero viene filtrato di glomeruli, solo una piccola quota di proteine viene evidenziata nelle urine (40-80 mg/die). Transitori incrementi dell'escrezione urinaria proteica sono osservati in corso di febbre, esercizio fisico intenso, aggravamento di scompenso cardiaco congestizio o ipertensione arteriosa scompensata. Tra le proteine urinarie l'albumina costituisce la maggior parte (30-50%); ogni proteina filtrata dal glomerulo viene degradata dalle cellule dell'epitelio tubulare prossimale al glomerulo e riassorbita nei capillari peritubulari. Ora, la microalbuminuria, definita come l'escrezione urinaria di albumina tra i 30 ed i 200 mcg/min, con valori oltre i 200 mcg che costituiscono la macroalbuminuria, permette di identificare i soggetti a rischio di nefropatia diabetica e di patologie cardiovascolari essendo un fattore di rischio per queste patologie altamente specifico e sensibile. Però, studi su popolazione, hanno permesso di identificare la microalbuminuria come un fattore di rischio continuo, associandosi all'incremento per patologie cardiovascolari con l'aumentare della quota di microalbuminuria. A tal proposito, alcuni ricercatori vengono a considerare la proteinuria comunque costituita da micro- o macroalbuminuria.

Dobbiamo considerare che l'albumina, che costituisce circa il 60% delle proteine plasmatiche, viene largamente trattenuta dal glomerulo e solo in minima parte filtra dalla barriera glomerulare. La relativa impermeabilità della barriera capillare glomerulare all'albumina è dovuta sia alle dimensioni, al peso ed alla carica elettrica dell'albumina. L'albumina filtrata viene ricaptata in vescicole di endocitosi dalle cellule tubulari per poi essere frammentata ed immessa al versante opposto, nei capillari peritubulari.

L'elemento caratterizzante la patologia renale nella nefropatia diabetica è dato dall'aumento di volume dell'organo, esito dell'ipertrofia glomerulare e tubulare (glomerulomegalia). I caratteri istologici principali sono dati dall'ispessimento della GBM e dall'espansione mesangiale.

L'ispessimento della GBM, una tra le prime alterazioni istologiche, è dovuto principalmente alla deposizione di normali costituenti della stessa membrana, compreso il collagene IV a catene alfa3, 4 e alfa 5, normalmente prodotte dai podociti.

Fattori emodinamici e meccanici alla base dello sviluppo della nefropatia diabetica

Per comprendere gli eventi emodinamici e istopatologici alla base della nefropatia diabetica, dobbiamo considerare che, nelle fasi iniziali della malattia, il rene va incontro ad un progressivo aumento di volume esito di processi di ipertrofia delle cellule del distretto tubulare e del glomerulo (glomerulomegalia). Solo in fase avanzata della complicanza, si assiste ad un progressivo sviluppo di glomerulosclerosi e fibrosi d'organo con riduzione di volume del rene e deficit funzionale

dell'emuntore. I caratteri istologici principali che caratterizzano l'insorgenza della nefropatia diabetica sono dati dall'ispessimento della GBM e dall'espansione mesangiale.

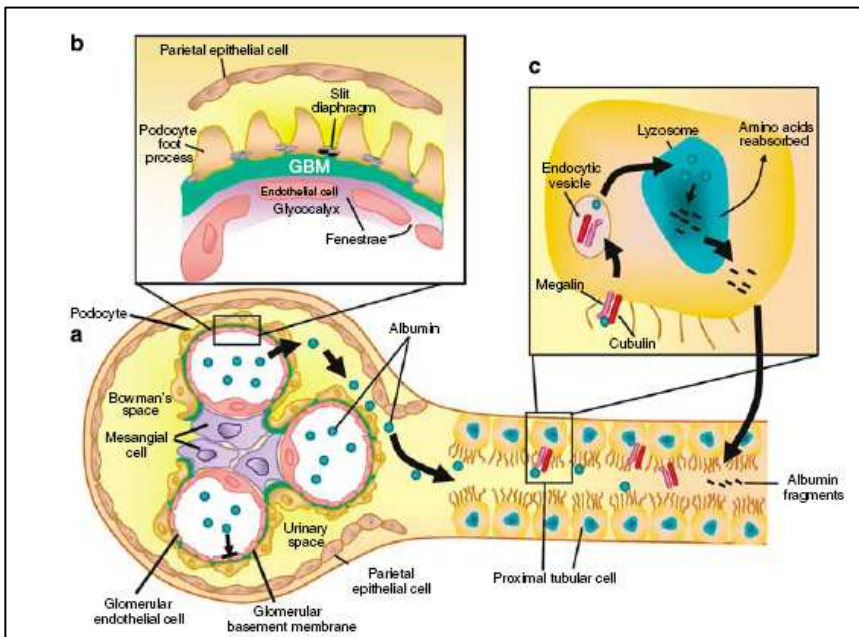


Fig1A. Filtrazione e recupero tubulare dell'albumina.

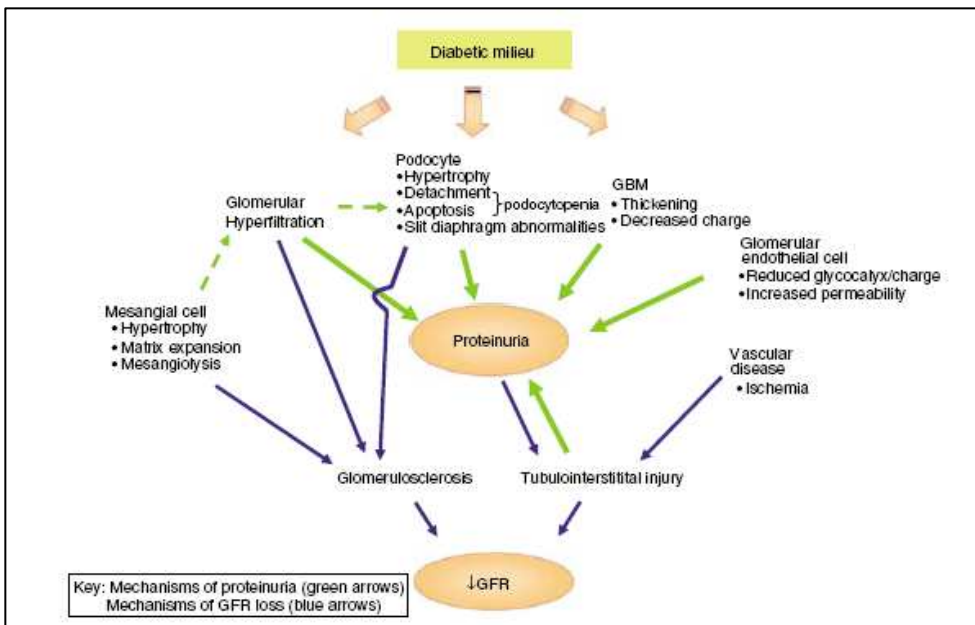


Fig1B. I meccanismi alla base della proteinuria e della riduzione del filtrato glomerulare (GFR) nella nefropatia diabetica.

KEY POINTS

Meccanismi legati alla proteinuria nella nefropatia diabetica

- Alterazioni nella emodinamica glomerulare
- Danni alle cellule glomerulari
- Alterazioni strutturali della GBM
- Danni sui podociti e podocitopenia
- Danni sul tubulo prossimale

Table 1 | Mechanisms of proteinuria in DKD

Site of injury	Effect	Underlying mechanisms
Glomerular hemodynamics	Glomerular hyperfiltration	Afferent arteriole vasodilatation Efferent arteriole vasoconstriction ↑ glomerular capillary pressure
Glomerular endothelial cell	Endothelial cell injury Diminished endothelial glycocalyx Altered VEGF signalling	Hyperglycemia, AGE, ROS Endothelial cell injury or enzymatic cleavage Podocyte injury or loss
GBM	Irregular thickening Decreased negative charge	↓ production and/or ↑ degradation of extracellular matrix proteins ↓ production and/or ↑ degradation of HSPG
Podocyte	Podocytopenia Loss of slit diaphragm integrity Foot process widening and effacement	Detachment Apoptosis Lack of proliferation Decrease or changes in subcellular localization of nephrin Disrupted actin cytoskeleton Loss of slit diaphragm integrity Impaired podocyte GBM interaction
Proximal tubule	Loss negative charge Decreased protein reabsorption	↓ Podocalyxin Tubular injury and interstitial fibrosis

AGE, advanced glycosylation end products; DKD, diabetic kidney disease; GBM, glomerular basement membrane; HSPG, heparin sulfate proteoglycan; ROS, reactive oxygen species; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Fig 2. I principali processi istopatologici nello sviluppo della proteinuria nella nefropatia diabetica.

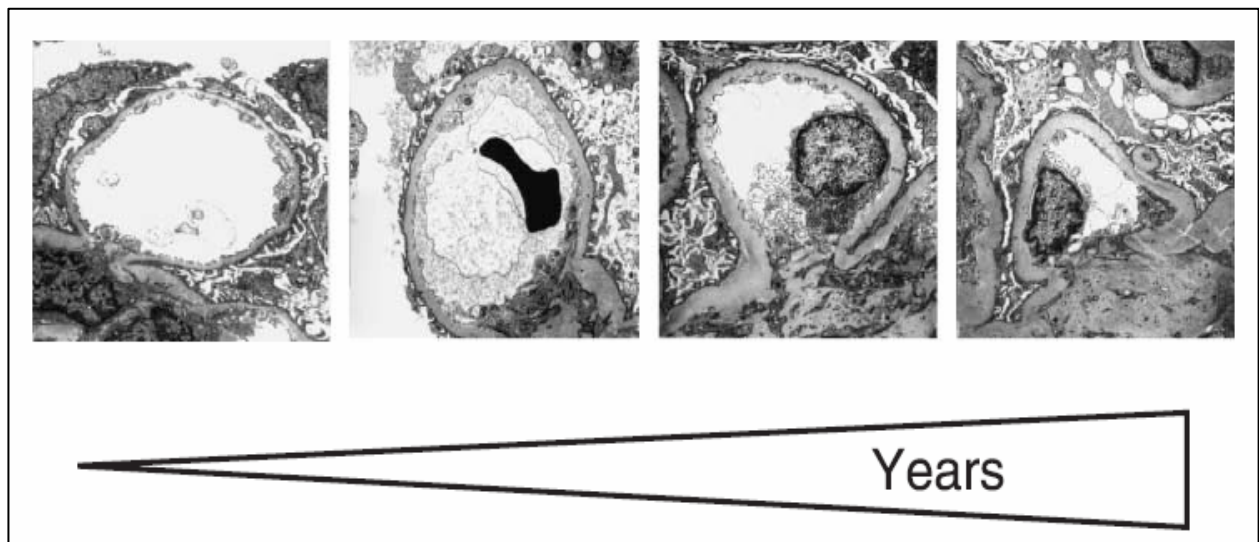


Fig 3. Biopsie renali di pazienti in varie fasi di nefropatia diabetica. Si osserva un progressivo ispessimento della GBM dallo stadio normale (foto a sx) fino al restringimento delle anse dei capillari glomerulari e la massima espansione mesangiale da parte della matrice extracellulare (foto a dx).

L'ispessimento della membrana basale è causato dalla eccessiva deposizione di suoi costituenti come le catene alfa3, alfa4 e alfa5 del collagene tipo IV prodotte dai podociti.

L'espansione del compartimento mesangiale è il risultato dell'incremento di proteine della matrice tra cui il collagene IV (catene alfa1 e alfa 2), fibronectina e laminina oltre ad un'ipertrofia delle stesse cellule mesangiali. Nelle fasi più avanzate della patologia si osserverà una distruzione del mesangio con la formazione di microaneurismi e lo sviluppo dei noduli di fibrosi glomerulare. L'aumentato volume mesangiale si traduce in un deficit dell'area di filtrazione con conseguente riduzione del filtrato glomerulare (GFR). Pertanto dobbiamo considerare la barriera di filtrazione glomerulare come un sistema costituito da vari componenti atti a frenare la proteinuria; infatti essa risulta costituita da alcune strutture anatomiche che separano il lato vascolare (i capillari glomerulari) dallo spazio urinario (spazio di Bowman). La prima barriera è costituita dall'endotelio fenestrato di capillari glomerulari, poi dalla GBM ed infine dalle espansioni dei podociti. Oltre ad un sistema puramente meccanico di barriera all'albumina, la membrana di filtrazione è costituita, forse in modo determinante, dalle dimensioni dei pori dell'endotelio fenestrato glomerulare e dalle cariche elettriche di superficie che condizionano la respinta delle molecole proteiche nelle fasi di pre-filtrazione. Infatti, mentre proteine a basso peso molecolare (<40kDa) possono essere liberamente filtrate, proteine ad elevato peso (>100 kDa) sono completamente trattenute. Elemento interessante è che in pazienti diabetici con nefropatia in stadio iniziale e microalbuminuria lieve (<300 mg/die) non è stata osservata alcuna variazione nelle dimensioni dei pori dell'endotelio, intese come raggio, distribuzione dei pori più piccoli o allargamento di quelli più ampi; solo nelle fasi più avanzate, con l'incremento della microalbuminuria, è stato osservato un aumento dei pori più larghi ed il passaggio di albumina da quelli più piccoli.

Pertanto un ruolo pressochè determinante nel trattenere albumina da parte dell'endotelio glomerulare è svolto dalle cariche elettriche di parete. La struttura anatomica che conferisce questa caratteristica è stata oggetto di vari studi; sembra comunque, da osservazioni recenti, che costituenti

della GBM, dei podociti (podocalixina) ed il glicocalice dell'endotelio siano responsabili della formazione di un microambiente anionico in grado di respingere la maggior parte delle proteine e dell'albumina circolante (31-34).

Inoltre dobbiamo considerare che l'escrezione di albumina può essere incrementata dalle forze di pressione tipo Starling che si realizzano nel bilancio tra i livelli pressori all'esterno ed all'interno dei capillari glomerulari, ed in questi ultimi, la pressione di flusso è legata all'incrementata pressione idrostatica capillare mediata dall'angio II. Osservazioni compiute in pazienti con diabete tipo 1 e tipo 2 microalbuminurici hanno evidenziato aumentati valori della frazione di filtrazione espressione di incremento di pressione a livello glomerulare. Quindi l'endotelio dei capillari all'interno del glomerulo riveste un ruolo molto importante nella dinamica dei fluidi e della fisiologica filtrazione proteica.

Endotelio glomerulare: struttura istologica

E' costituito da un sofisticato, ed estremamente specializzato complesso di strutture anatomiche atte ad un'ultrafiltrazione e trattenuta della maggiore quota di componenti proteiche. E' formato da uno strato di endotelio fenestrato con pori del diametro di 60-100 nm, rivestito da un secondo strato di copertura noto come glicocalice endoteliale formato da una rete di proteoglicani dotati di carica elettrica negativa che costituiscono la matrice extracellulare. In questo modo, se le fenestrature dell'endotelio possono facilitare la filtrazione per elevata permeabilità idrostatica (aumentata pressione intra-capillare), lo strato del glicocalice carico elettricamente permette di restringere ulteriormente la filtrazione respingendo numerose macromolecole proteiche.

Danni all'endotelio in corso di nefropatia diabetica

Caratteristica del diabete è la presenza di disfunzione endoteliale (22-24), un insieme di alterazioni di processi biomolecolari che costituiscono un complessivo deficit dell'organo endotelio con conseguente aumentata permeabilità di parete: un elemento comune è dato dall'alterata produzione di NO, la upregulation di molecole di adesione e di fattori pro-trombotici. Se l'aumentata sintesi di NO permette una vasodilatazione capillare, non si evidenziano almeno nelle fasi iniziali della malattia delle significative alterazioni dei capillari, mentre diverso è il problema riguardo alla copertura del glicocalice. Infatti, è stato evidenziato che l'iperglicemia protratta può ridurre fino al 50% il volume del glicocalice e la stessa iperglicemia può indurre danni sulle molecole costituenti o favorire la sintesi di altre molecole con struttura alterata tale da condizionare la caratteristica carica elettrica di superficie: il risultato è una minore capacità di filtrazione della parete endoteliale e la micro-macroalbuminuria.

VEGF ed angiogenesi

Il VEGF è un fattore angiogenetico prodotto dai podociti che agisce con attività paracrina tramite recettori specifici (VEGFR1 e R2) sulle cellule endoteliali (13-16). Nelle fasi iniziali della nefropatia si è osservato un incremento nella sintesi di VEGF, confermato anche dagli studi in vitro con l'esposizione ad alto glucosio, angio II ed albumina glicata. Il blocco selettivo di questo fattore in modelli sperimentali di nefropatia si associava ad un miglioramento della iperfiltrazione e della quota di albuminuria, indicando un suo ruolo molto importante nello sviluppo della complicanza cronica. Successivamente, con il progredire della nefropatia, si assiste ad una riduzione nella produzione di VEGF, espressione quindi di un avanzato danno glomerulare con perdita dei podociti (podocitopenia).

La membrana basale glomerulare

Un componente fondamentale della barriera glomerulare è costituito dalla membrana basale ed osservazioni recenti indicano nella composizione in eparan-solfati (HSPGs) gli elementi chiave di questa struttura. Infatti è stato descritto in pazienti diabetici una riduzione nella composizione di queste molecole nella membrana risultato o di una ridotta sintesi da parte dei podociti o di

un'augmentata degradazione. Quest'ultimo processo è stato evidenziato in modelli animali resi diabetici (ratti STZ) dove l'iperglicemia prolungata aumenta i processi degradativi della GBM per aumentata espressione dell'eparanasi.

L'ispessimento della GBM è una delle prime fasi dello sviluppo della nefropatia diabetica ed il grado di ispessimento correla positivamente con l'entità della proteinuria. L'ispessimento è legato alla deposizione di matrice extracellulare; comunque, l'aumentato spessore di GBM può iniziare precocemente, già prima della comparsa di albuminuria (anche 2 anni dopo l'insorgenza di diabete), suggerendo che questo fenomeno possa essere legato alla iperglicemia cronica. Il principale responsabile di ispessimento di GBM è costituito dai podociti che sintetizzano elementi costituenti della matrice; infatti, osservazioni in vitro esponendo podociti ad alto glucosio o angioII, induce un fenotipo pro-matrice, cioè stimola la sintesi podocitaria di neoforme di catene di collagene tipo IV. Dobbiamo però considerare la GBM e la stessa matrice come un insieme dinamico, risultato di un continuo bilancio tra processi depositivi e di degradazione: un'augmentata deposizione di componenti ed una ridotta degradazione a favore di quest'ultima, porta ad un accumulo netto di derivati e componenti del collagene tipo IV e quindi ad ispessimento della GBM (35-37).

I podociti: l'ultima barriera alla proteinuria

Il terzo componente della barriera di filtrazione è costituito dai podociti, le caratteristiche cellule endoteliali che con le loro estroflessioni interdigitate formano una rete filtro estremamente importante. Questi processi sono strettamente interconnessi tramite gap junctions e formano piccoli pori (diametro 30-40 nm) per il passaggio di acqua, soluti, ma relativamente impermeabili alle proteine. I pedicelli dei podociti sono sostenuti da un apparato citoscheletrico che assolve non soltanto a funzioni statiche, ma anche dinamiche, permettendo cioè che i podociti possano variare continuamente la loro forma (filtro dinamico). I podociti sono poi ancorati saldamente alla GBM tramite integrine. Come per le cellule endoteliali glomerulari e per la GBM, anche i podociti sono caricati negativamente tramite l'esposizione alla superficie di proteine specializzate come la podocalixina, la podoplanina e la podoendina; le cariche negative di superficie aiutano la barriera glomerulare a limitare il passaggio di molecole cariche negativamente come ad esempio l'albumina. Variazioni nelle dimensioni e nelle cariche elettriche alla superficie dei podociti che intervengono nella nefropatia diabetica alterano significativamente la capacità filtro della barriera glomerulare. Un primo ed importante processo degenerativo è costituito dalla riduzione nel numero dei podociti (38-43).

La podocitopenia (riduzione nel numero dei podociti)

In effetti è necessario un numero minimo di podociti affinché essi possano svolgere efficacemente la loro funzione di barriera-filtro; una loro riduzione porta alla comparsa di proteinuria con vari meccanismi, essenzialmente elettrici e strutturali:

- riduzione complessiva delle cariche elettriche negative di superficie per riduzione delle proteine disponibili (soprattutto la podocalixina)
- alterazione e sconvolgimento della architettura del fisiologico filtro podocitario
- perdita del sostegno alle anse dei capillari glomerulari con loro dilatazione, deformazione che può successivamente facilitare la glomerulosclerosi

E' stato recentemente suggerito che la densità dei podociti (numero di elementi per unità di superficie) sia un maggiore determinante nel danno alla barriera di filtrazione, più che una riduzione nel numero degli stessi podociti; comunque, è ormai noto che sussiste una diretta correlazione tra il livello di riduzione del numero dei podociti e la gravità della proteinuria.

Le cause che conducono ad una riduzione nel numero dei podociti sono numerose, ma le principali riconducibili durante lo sviluppo della nefropatia diabetica sono costituite da:

- distacco dei podociti per perdita di ancoraggio alla sottostante GBM. E' stata infatti osservata podocituria in pazienti diabetici microalbuminurici tipo 1 e tipo 2. La GBM ha un ruolo di supporto meccanico estremamente importante per i podociti e le alterazioni

nell'architettura della membrana basale osservate nel diabetico possono favorire il distacco dei podociti.

- Apoptosi dei podociti: la "morte programmata" dei podociti e di altre cellule (ad esempio le beta cellule pancreatiche) è una caratteristica dello sviluppo del diabete e lo stress ossidativo con conseguente disfunzione endoteliale può svolgere un ruolo causale determinante.
- Alterato turn-over dei podociti, con ridotta neoformazione e/o aumentata distruzione.

Ulteriori alterazioni nel filtro glomerulare: allentamento dei processi giunzionali tra podociti

Questo è un altro importante meccanismo alla base dell'aumentata permeabilità alle molecole proteiche ed un componente chiave in queste strutture è costituito dalla nefrina; è stata infatti evidenziata un'aumentata escrezione di nefrina nei pazienti diabetici microalbuminurici.

Altri danni al filtro glomerulare: allargamento delle espansioni podocitarie

Questo fenomeno si associa strettamente con l'insorgenza della nefropatia e l'aggravamento della stessa e determina una riduzione dei piccoli pori della membrana glomerulare con incremento conseguente dei livelli di proteinuri; importante è l'osservazione di una riduzione e blocco del processo con l'introduzione di farmaci specifici bloccanti il sistema RAA (ace-inibitori, sartanici). Il processo dell'ampliamento delle espansioni interdigitate dei podociti, con la retrazione dei processi podocitari all'interno del corpo cellulare e la conseguente semplificazione dell'architettura ultrastrutturale del filtro glomerulare, determina lo sviluppo di larghe aree di epitelio che ricoprono i loops dei vasi glomerulari e aumentata permeabilità nella filtrazione.

Non dobbiamo dimenticare che le alterazioni strutturali a carico dei podociti sono da imputare a fenomeni degenerativi indotti dall'iperglicemia cronica su strutture chiave podocitarie:

- degenerazione dell'apparato citoscheletrico di sostegno (per riduzione nella sintesi di un componente fondamentale quale l'alfa-actinina-4)
- perdita di cariche elettriche negative di membrana. Infatti i podociti sono fisiologicamente ricoperti dal glicocalice, un mantello di sialo-glicoproteine tra cui la podocalixina e la podocandina, che mantengono uno stabile strato di cariche elettriche negative. L'alto glucosio ha evidenziato ridurre significativamente la presenza di podocalixina nei podociti, rendendo più facile la fuoriuscita di albumina.

L'espansione mesangiale: un altro elemento nello sviluppo della proteinuria

L'espansione del compartimento mesangiale è legato all'aumento di volume delle cellule per fenomeni di ipertrofia ed accumulo di proteine nella matrice extracellulare. Questo comporta un peggioramento nella funzionalità globale dell'organo con riduzione progressiva della superficie di filtrazione e conseguente diminuzione del filtrato glomerulare. L'espansione del mesangio porta successivamente allo sviluppo di processi sclerotici che evolvono nella formazione delle caratteristiche nodulazioni di Kimmestiel-Wilson. Dobbiamo comunque considerare il danno mesangiale come evento secondario e non primario nella dinamica della nefropatia diabetica, in quanto sono i precoci danni a carico della membrana basale e dei podociti i fenomeni determinanti l'insorgenza di proteinuria. I danni a carico del mesangio con fenomeni di lisi di cellule ed espansione della matrice, secondo alcuni ricercatori, indurrebbero un deficit nel sostegno ai loops dei capillari glomerulari, la formazione di microaneurismi e aumento della pressione del glomerulo capillare su gli stessi podociti. La ridotta massa del neurone per riduzione nella sua componente cellulare (cellule mesangiali) determina un incremento della pressione intracapillare nei restanti nefroni, processo che innesca l'inizio degli eventi di fibrosi d'organo. Pertanto, l'ipertensione glomerulare può determinare un danno sui podociti con proteinuria e successivamente, glomerulosclerosi focale con disfunzione renale (44).

Il danno tubulare

Dobbiamo considerare nella fisiologia della filtrazione glomerulare il ruolo di re-uptake proteico delle cellule dell'epitelio tubulare (tubulo prossimale); infatti in modelli animali di microalbuminuria si osserva un deficit nei meccanismi di riassorbimento delle piccole quote di proteine filtrate dalla barriera del glomerulo, processo confermato anche da osservazioni in vitro dove l'esposizione di cellule tubulari prossimali in coltura ad alto glucosio, TGF-beta o angio II riduce la loro capacità di uptake di albumina.

Pertanto, se vogliamo riassumere i principali eventi istopatologici che da un punto di vista strettamente meccanico permettono l'insorgenza di proteinuria nella nefropatia diabetica, questi sono incentrati sulle varie alterazioni della barriera di filtrazione per danneggiamento delle cellule endoteliali glomerulari, della GBM, del mantello di cariche elettriche di superficie e della rete dei podociti. Ciascuno di questi componenti assolve ad un ruolo chiave per trattenere anche macromolecole nel plasma; i successivi processi fisiologici di riassorbimento proteico dell'epitelio del tubulo prossimale possono poi essere ulteriormente compromessi facilitando così l'escrezione di albumina a livello urinario.

Oltre ai meccanismi propri delle alterazioni microstrutturali della membrana glomerulare in corso di nefropatia diabetica, si realizzano importanti reazioni biomolecolari che portano alla sintesi di citochine e fattori con attività infiammatoria e sclerogena. Un ruolo molto importante è svolto dagli AGEs che con gli specifici recettori RAGE attivano in presenza di alto glucosio una cascata di reazioni flogistiche e successivamente sclerogene. Tutto ciò è stato osservato in vitro, in modelli animali sia stimolando il sistema (condizioni di iperglicemia protratta) sia intervenendo con inibitori degli AGEs. La somministrazione di complessi AGEs-albumina in modelli animali ha indotto lo sviluppo di ispessimento della GBM, espansione della matrice mesangiale, aumentata espressione e sintesi di collagene tipo IV e TGF-beta1.

Tra i vari induttori dei processi di danno della membrana glomerulare sicuramente l'iperglicemia e successivamente la formazione di AGEs e lo stress ossidativo con ridotta sintesi di NO sono i fattori chiave nello sviluppo della complicanza diabetica; infatti entrambi riescono ad attivare la PKC ed infine la trascrizione di TGF-beta1.

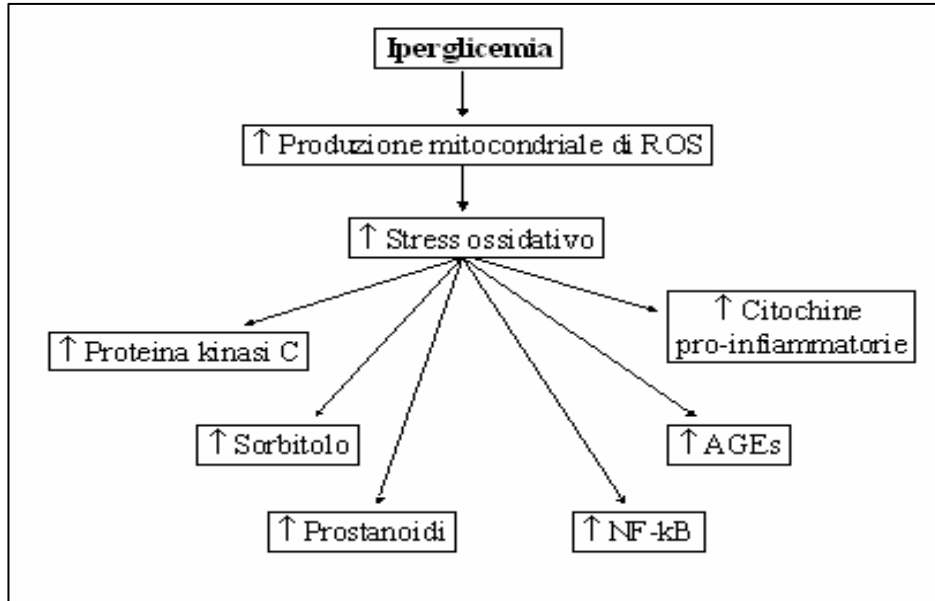


Fig.4. Lo stress ossidativo e la formazione di ROS costituiscono un mediatore comune con l'iperglicemia nella nefropatia diabetica. L'incrementato uptake di glucosio all'interno delle cellule induce la formazione di ROS a livello mitocondriale. Lo stress ossidativo, e quindi il deficit di NO, permette l'attivazione di numerosi processi biomolecolari che interessano la formazione di citochine come la PKC, la NFkB, vari prostanoidi e gli AGEs.

In particolare, recenti osservazioni hanno evidenziato che in corso di iperglicemia protratta, come nel diabete tipo 2, una upregulation nella trascrizione e sintesi dello specifico trasportatore del glucosio a livello glomerulare, il GLUT-1, favorendo così l'uptake di glucosio nelle cellule mesangiali, successiva formazione di AGEs, incrementata sintesi di specie reattive dell'ossigeno (ROS) ed attivazione di mediatori della flogosi e fibrogenesi come ERK, TGF-beta e PKC-beta.

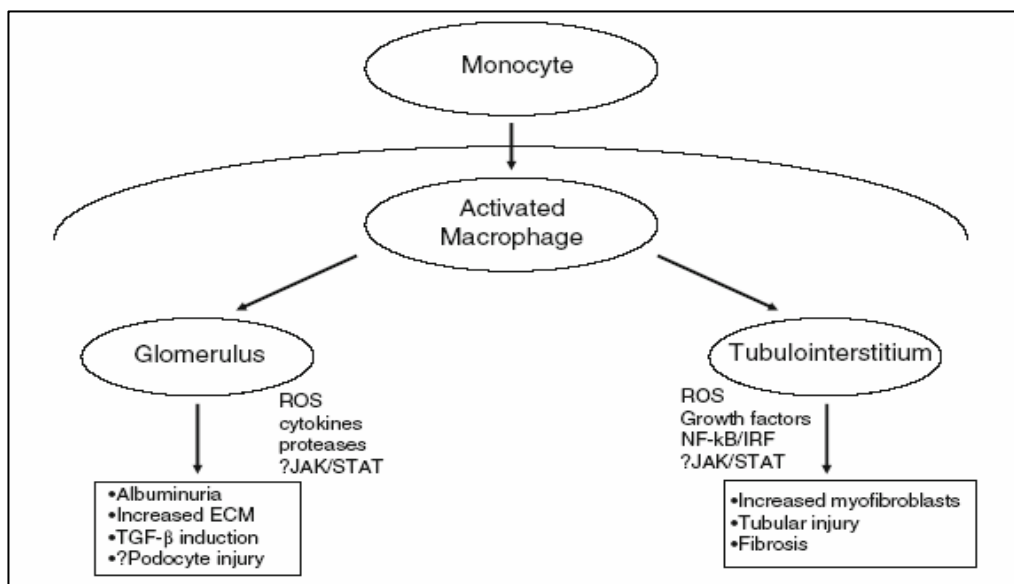


Fig. 5. I processi di flogosi e fibrosi glomerulare.

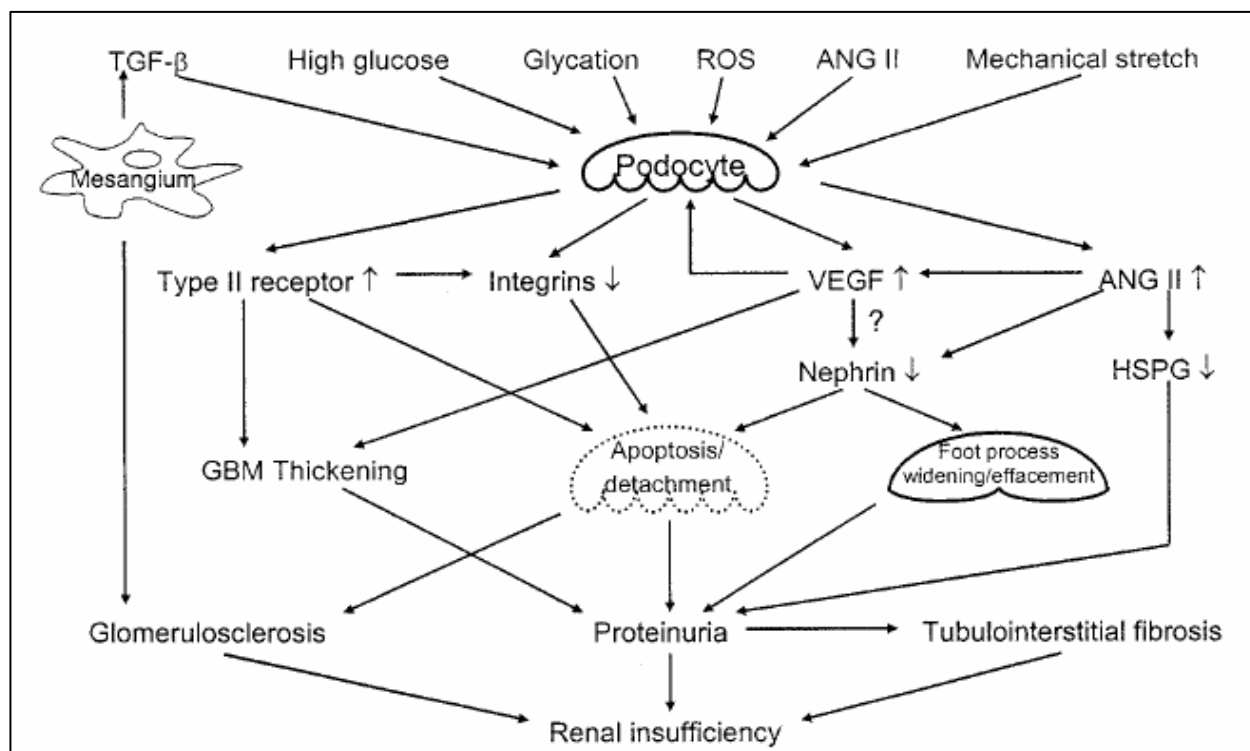


Fig. 6. Iperglicemia, formazione dei ROS, attivazione dell'Angio-II, interventi meccanici contribuiscono insieme a numerose chemochine all'apoptosi dei podociti ed allo sviluppo della fibrosi d'organo. La sintesi glucosio-indotta di molteplici citochine pro-infiammatorie e con attività chemotattica nei confronti di monociti e macrofagi attivati, permette l'infiltrazione di queste cellule infiammatorie nell'interstizio tubulare e nel contesto del glomerulo. Una volta avviato il processo infiammatorio, altre citochine di origine macrofagica permettono l'avvio di processi sclerogeni.

Tra le chemochine dotate di specifica attività chemotattica per monociti e macrofagi a sede glomerulare deve essere ricordata la Monocyte Chemoattractant Protein (MCP-1); alti livelli di glucosio inducono un'aumentata espressione di MCP-1 a livello delle cellule mesangiali e dell'epitelio tubulare. Oltre all'MCP-1, anche la NF-κB è stata dimostrata come potente induttore pro-infiammatorio. Deve essere ricordato che sono molteplici le citochine attivate in corso di iperglicemia e tali da indurre infiltrazione di cellule infiammatorie a livello glomerulare, ma molte di queste riconoscono come comune mediatore l'aumentata sintesi di Angio II e quindi l'attivazione del sistema ACE ha un ruolo importante nello sviluppo della flogosi e successiva fibrogenesi renale.

Il sistema ACE è determinante nello sviluppo della nefropatia diabetica

Questo è stato confermato da osservazioni sia in vitro, sia in modelli animali che nell'uomo in vari trials clinici. Infatti l'AngioII induce la sintesi di citochine con attività chemotattica ed infiammatoria per monociti e macrofagi ed il trattamento con ACE-inibitori o antagonisti dei recettori AT1 (ARBs o sartanici) è capace di ridurre i fenomeni infiammatori e di nefrosclerosi attivati in corso di nefropatia diabetica. Inoltre, la formazione glomerulare di AngioII in condizioni di iperglicemia prolungata sopprime la sintesi locale di nefrina, riducendo l'ancoraggio dei podociti al supporto della GBM, riducendo così l'efficacia ultrafiltrante della membrana glomerulare. Oltre a questi effetti, l'AngioII induce iperfiltrazione, apre pori non selettivi nella barriera di filtrazione, modifica la composizione della GBM favorendo il disancoraggio e distacco dei processi podocitari, oltre a ridurre direttamente la sintesi di nefrina. L'AngioII incrementa anche il riassorbimento di proteine ultrafiltrate, contribuendo allo sviluppo della flogosi tubulo-interstiziale ed eventuale fibrosi (2-8).

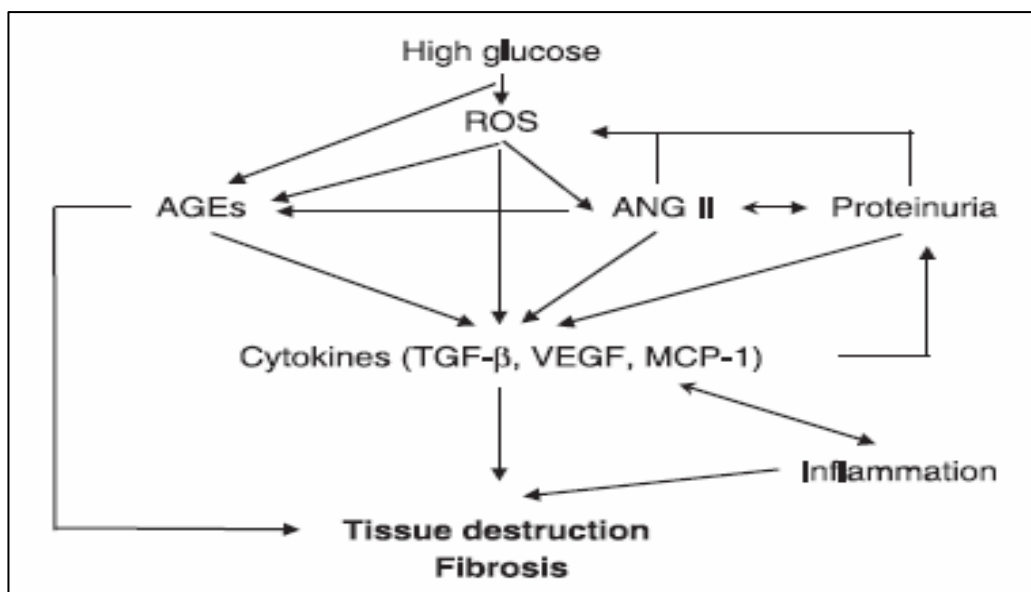


Fig.7. Iperglicemia, stress ossidativi, infiammazione e fibrosi. Sono numerosi i processi che interagiscono nella formazione ed evoluzione della nefropatia diabetica con l'esito nella proteinuria, insufficienza renale terminale e nefrosclerosi. L'iperglicemia cronica, induce lo stress ossidativi, la sintesi di vari ROS (specie reattive dell'ossigeno) e la formazione degli AGEs (prodotti di glicazione avanzati).

I ROS favoriscono la sintesi di AngioII che promuove la proteinuria, che a sua volta potenzia la sintesi tubulare di Angio-II. Questa molecola incrementa la sintesi degli AGEs e permette l'upregulation di varie citochine e fattori di crescita (TGF-beta, VEGF) per lo sviluppo della matrice extracellulare a danno della componente capillare glomerulare, mentre altre citochine come la MCP-1 mediano direttamente la chemotassi delle cellule infiammatorie, successiva distruzione podocitaria e tissutale e fibrogenesi.

La nefropatia diabetica: uno sguardo alla clinica. La classificazione di Mogensen.

Sono stati descritti 5 caratteristici stadi di evoluzione clinica della malattia a cui corrispondono delle precise alterazioni funzionali del rene e che evolvono verso la insufficienza renale terminale.

- Stadio I: ipertrofia funzionale ed anatomica

In questa fase si osserva un aumento del filtrato glomerulare (GFR) con un aumento di circa il 20% delle dimensioni del rene.

- Stadio II: comparsa di alterazioni istologiche

La quota di albumina escreta con le urine (Albumin Excretion Rate, AER) è normale con livelli pressori normali o lievemente aumentati; si evidenziano ispessimento di GBM, espansione del volume mesangiale o talora i primi noduli fibrotici di Kimmestiel.

- Stadio III: la microalbuminuria (nefropatia incipiente)

Compare un incremento di AER >20 mcg/min (20-200 mcg/min) o un rapporto albumina/creatinina urinarie >2.5 mg/mmol. Si osserva frequentemente ipertensione arteriosa (circa 50% dei casi).

- Stadio IV: proteinuria (nefropatia conclamata e/o sindrome nefrosica)

Si osserva proteinuria persistente con livelli di AER >200 mcg/min, ipertensione arteriosa e talora riduzione del GFR. In questa fase, al danneggiamento della componente microvascolare renale si può associare l'interessamento del microcircolo retinico (retinopatia diabetica) con neoformazione di vasi (retinopatia diabetica proliferativa). Importante ricordare in questa fase lo sviluppo di una caratteristica dislipidemia, (triade lipidica) con incremento di lipoproteine aterogene VLDL e LDL piccole e dense, altamente aterogene. Questo è indotto sia da dall'insulino-resistenza che riduce l'attività della lecitina-colesterolo acil-transferasi (LCAT) sia da una ridotta attività della lipoproteinlipasi, secondaria all'ipoalbuminemia per proteinuria.

- Stadio V: insufficienza renale terminale

Si osserva marcata riduzione del GFR, proteinuria (AER >200 mcg/min), ipertensione arteriosa, ipoalbuminemia, evoluzione verso la fibrosi renale.

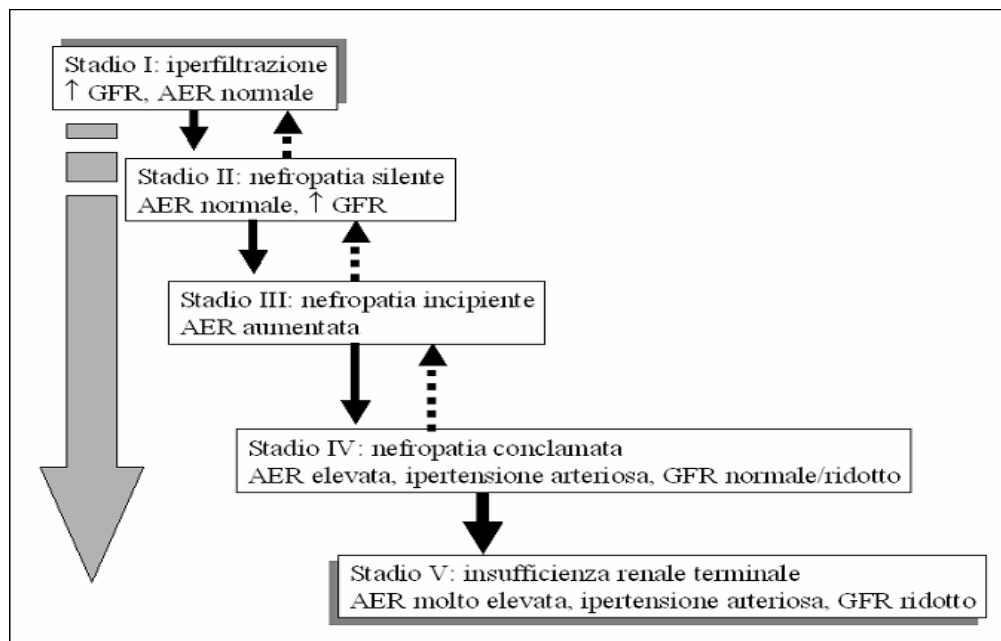


Fig. 8. I vari stadi di evoluzione clinica della nefropatia diabetica: partendo dalla fase iniziale di iperfiltrazione fino all'esito nell'insufficienza renale terminale. E' possibile che i primi stadi possano essere bloccati o addirittura revertiti con terapie specifiche (controllo glico-metabolico, controllo dei valori pressori, impiego di ACE-inibitori e/o antagonisti dei recettori AT1 dell'Angio II (ARBs).

La nefropatia diabetica: interventi terapeutici

Il controllo glicemico

L'adeguato controllo glicometabolico è uno dei cardini nella prevenzione delle complicanze croniche sia sul versante micro- che macrovascolare e numerosi sono gli studi che hanno evidenziato la sua importanza nel prevenire o ritardare lo sviluppo della nefropatia diabetica.

Dobbiamo infatti ricordare per il diabete tipo 1 il DCCT (45) che ha permesso di evidenziare come la terapia insulinica intensiva, con impiego di insulina ai pasti ed insulina NPH per il controllo basale notturno ed al mattino della glicemia, sia risultata nettamente superiore nel migliorare il controllo glicemico, rispetto ad una terapia insulinica tradizionale con 1-2 somministrazioni/die di insulina ad azione protratta. In particolare, una riduzione di 2 punti netti di HbA1c, dal 9% al 7% si associava ad una riduzione di comparsa di nefropatia diabetica del 54%. Altri dati molto significativi sono emersi per il diabete tipo 2 dal UKPDS e dal Kumamoto study.

Lo studio britannico UKPDS 35 ha evidenziato come una riduzione di HbA1c dal 9% al 7% si associava ad una riduzione di comparsa di nefropatia diabetica dal 24% al 33%; in particolare, ciascuna riduzione di 1% di HbA1c era associata con una riduzione del 21% del rischio per ogni endpoint associato al diabete, in particolare con una riduzione del 37% nella comparsa di complicanze microvascolari. Il trattamento intensivo del diabete ha raggiunto livelli medi di HbA1c del 7.0% rispetto a valori medi di 7.9% del gruppo con trattamento convenzionale. Inoltre si è osservata a 12 anni di follow-up una riduzione del rischio di comparsa di microalbuminuria del 25% del gruppo di controllo intensivo vs il gruppo di controllo glicemico convenzionale (46).

Lo studio giapponese Kumamoto ha confrontato pazienti con diabete tipo 2 in terapia insulinica divisi in 2 coorti, una con AER<30 mg/24/h e l'altra con AER<300 mg/24 h, randomizzati con un regime terapeutico insulinico intensivo (MIT) costituito da almeno 3 somministrazioni/die di insulina o con schema insulinico convenzionale (1-2 iniezioni/die: CIT). La percentuale cumulativa di pazienti che sviluppavano nefropatia dopo 8 anni di osservazione era significativamente più bassa nel gruppo MIT (11.5%) vs CIT (43.5%); le soglie di controllo glicemico atte a prevenire l'insorgenza e progressione delle complicanze croniche microvascolari erano date da livelli di HbA1c<6.5%, glicemia a digiuno<110 mg/dl, glicemia 2 ore post-prandiale <180 mg/dl (47).

Il controllo dei livelli pressori

Sempre lo UKPDS (UKPDS 36) ha evidenziato come la riduzione di 10 mm Hg di sistolica si associava ad una riduzione del rischio di qualsiasi complicanza cronica del 12% e del 13% di complicanze microvascolari, con il minimo rischio di complicanze per livelli di sistolica<120 mm Hg.

Questo ha poi portato a considerare l'importanza di uno stretto controllo pressorio come importante fattore di prevenzione nello sviluppo delle complicanze croniche correlate al diabete. In particolare, lo UKPDS 38 ha evidenziato come il braccio di pazienti sottoposti ad uno stretto controllo dei valori pressori (pressione arteriosa media 144/82 mm Hg) presentava una riduzione del rischio di complicanze microvascolari del 37% rispetto al gruppo con un controllo pressorio meno intensivo (pressione arteriosa 154/87 mm Hg).

La terapia farmacologica con impiego di ACE-inibitori e/o ARBs

L'angiotensina II (angio-II) è il principale effettore del sistema RAS (renina-angiotensina-aldosterone), capace di intensificare il tono vascolare sia su arteriose glomerulari afferenti ed efferenti, regolando anche la pressione nei capillari del glomerulo. Inoltre, l'angio-II interviene sulla permeabilità selettiva della barriera glomerulare, permettendo alle proteine di fuoriuscire più facilmente nello spazio tubulare. Inoltre, entrambe le classi di antiipertensivi sono state dimostrate efficaci nel bloccare l'avvio della cascata di citochine ad azione pro-infiammatoria e pro-fibrotica che si attiva con la comparsa delle prime fasi della nefropatia diabetica.

Numerosi sono i trials clinici pubblicati riguardo all'azione nefroprotettiva degli ACE-inibitori e sartanici (ARBs).

Efficacia degli ACE-inibitori

Il trial MICRO-HOPE ha evidenziato come la terapia con ramipril riduca del 24% lo sviluppo di nefropatia incipiente in pazienti diabetici (48).

Lo studio BENEDICT ha evidenziato come l'impiego di trandolapril ritardava lo sviluppo di microalbuminuria in pazienti diabetici ipertesi normoalbuminurici. In particolare, dopo un follow-up di 3 anni, questo effetto era indipendente dal controllo pressorio comunque ottenuto con altri farmaci non ace-inibitori e differenti dal trandolapril (49).

Lo studio ADVANCE (50), molto esteso perché condotto su 11140 pazienti diabetici, ha permesso di evidenziare come l'associazione tra perindopril e indapamide permetta una riduzione del 21% nella comparsa di microalbuminuria in pazienti con diabete tipo 2. Dopo un follow-up medio di 4.3 anni, pur con un modesto effetto nel controllo dei livelli pressori, la terapia combinata permetteva una riduzione del 21% nello sviluppo di microalbuminuria e di eventi renali (insufficienza renale).

Il problema dell'impiego degli ACE-inibitori è legato al fatto che questi farmaci non bloccano completamente la formazione di angio II perché enzimi non-ACE come le chimasi permettono di aggirare il blocco enzimatico esercitato da queste molecole e con il tempo si assiste ad una up-regulation di queste vie enzimatiche non-ACE stimolato proprio dall'impiego di ACE-inibitori. Quindi è importante valutare se un blocco ancora più a valle della cascata del sistema ACE possa essere più efficace in termini di nefroprotezione: per questo è stato proposto l'impiego dei sartanici (ARBs) nei vari trials relativi.

Efficacia degli ARBs

Il trial RENAAL condotto su oltre 1500 pazienti con diabetici ha permesso di evidenziare dopo un follow-up di 3.4 anni, come il losartan in pazienti con diabete tipo 2 e nefropatia incipiente abbia ridotto del 25% l'incidenza del raddoppio della creatinina sierica e del 28% lo sviluppo di insufficienza renale terminale (51).

Lo studio IDNT ha valutato l'efficacia di irbesartan vs amlodipina nel ritardare la comparsa di nefropatia in pazienti con diabete tipo 2 ipertesi con persistente microalbuminuria (20-200 mcg/min): è emerso che dopo 2.6 anni di follow-up il 5.2% di pazienti in terapia con irbesartan 300 mg/die ed il 9.7% di soggetti trattati con 150 mg/die sviluppavano nefropatia diabetica vs 15% dei pazienti in placebo; la terapia con irbesartan permetteva una riduzione dell'albuminuria del 2% e del 38% con 150 mg e, rispettivamente 300 mg di irbesartan (52).

Lo studio IRMA-2 in pazienti con diabete tipo 2 ipertesi e microalbuminuria ha evidenziato come l'irbesartan si associava ad una significativa riduzione del numero di soggetti che progrediva dalla micro- alla macroalbuminuria ed incrementava il numero di pazienti che revertiva completamente alla normoalbuminuria (53).

Un recente studio (INNOVATION) ha evidenziato come il telmisartan 40 o 80 mg/die riduca l'incidenza di transizione dalla microalbuminuria alla nefropatia incidente in pazienti con diabete tipo 2 microalbuminurici. In particolare, dopo un follow-up di appena 1.3 anni, la regressione nei livelli registrati di microalbuminuria era del 13% e del 21%, nei pazienti trattati con 40 mg/die e con 80 mg/die, rispettivamente (54).

ACE-inibitori+ARBs

Considerando che gli ACE-inibitori non bloccano completamente la formazione di angio II perché enzimi non-ACE come le chimasi (55) attivano meccanismi di escape, è stato proposto introdurre un doppio blocco del sistema RAS con l'impiego di entrambe le classi di antiipertensivi

Lo studio DETAIL (telmisartan e enalapril): la variazione della filtrazione glomerulare nei 2 bracci di trattamento non differiva ed entrambi fornivano adeguata nefroprotezione.

Lo studio CALM è stato prodotto per valutare l'efficacia della terapia combinata con candesartan e lisinopril sull'escrezione urinaria di albumina in pazienti ipertesi con diabete tipo 2. La terapia combinata permetteva una riduzione del rapporto albuminuria/creatininuria del 50% versus il solo impiego di candesartan (riduzione del 24%) o di lisinopril (39%).

Il recente trial ONTARGET (telmisartan e ramipril) ha evidenziato su 25620 pazienti la non inferiorità degli ARBs vs gli ACE-inibitori sulla riduzione degli outcomes renali primari; in particolare, però, la terapia combinata (ramipril 10 mg/die+telmisartan 80 mg/die) si associava ad un incremento di outcomes secondari (dialisi o raddoppio di creatinina) con HR 1.24 (1.01-1.51) rispetto alla terapia con i singoli farmaci, telmisartan e ramipril (57).

Antagonisti del recettore dell'aldosterone

L'aldosterone promuove l'infiammazione e lo sviluppo di fibrosi e stimola la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) espressione di danno endoteliale, stimola la proliferazione e la crescita cellulare. L'impiego di eplerenone, un inibitore selettivo dell'aldosterone, ha permesso di ottenere una sufficiente nefroprotezione in diabetici tipo 1 e tipo 2 da solo o aggiunto ad ARBs, ma l'elevato rischio di sviluppo di iperpotassiemia, soprattutto in pazienti con GFR<60 ml/min, ne fa un farmaco da impiegare con attenzione.

Inibitori della renina

Aliskiren è il primo di questa classe di farmaci che da solo non si è rivelato superiore ad ACE-inibitori o ARBs sulla riduzione dei livelli pressori, ma in associazione a questi, soprattutto ARBs, ha permesso di ottenere un efficace controllo sulla pressione sistolo-diastolica. Importante risulterà l'impiego futuro del farmaco nel trattamento della nefropatia diabetica; dai primi risultati dello studio AVOID condotto su 600 pazienti con diabete tipo 2 e nefropatia, con la somministrazione di aliskiren+losartan si è osservata una riduzione del 20% nella UACR alla 24esima settimana di terapia, indipendentemente dal controllo dei valori pressori.

Queste molecole però, oltre ad indurre una riduzione significativa dell'attività reninica, portano anche ad un accumulo dello stesso ormone la cui sintesi non viene inibita. In questo modo vengono attivate delle vie alternative enzimatiche, chimasi ed altre, capaci comunque di attivare il sistema RAS, ed anche la sintesi di molecole ad attività fibrogenica, per cui mancano a tutt'oggi dati sulla reale nefroprotezione ed inibizione della sclerosi dell'organo renale (58-65).

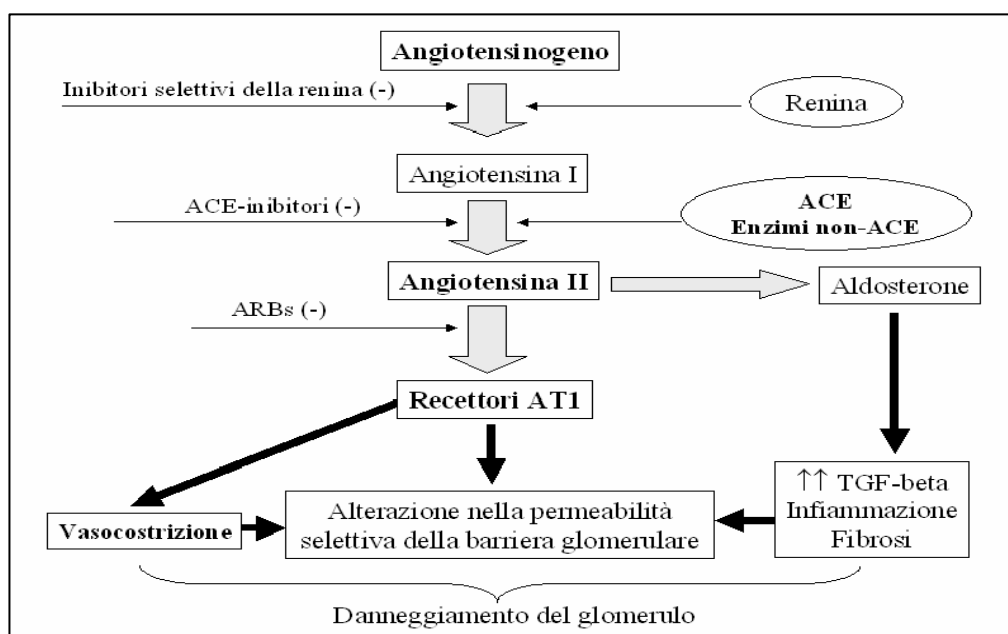


Fig 9. Le principali strategie farmacologiche per bloccare l'attivazione del sistema RAS: inibitori selettivi della renina (Aliskiren), ACE-inibitori, ARBs.

I tiazolidinedioni (TZDs)

I TZDs (pioglitazone e rosiglitazone) sono una classe di farmaci ipoglicemizzanti ed insulino-sensibilizzanti agonisti dei recettori nucleari PPAR-gamma ed attivi su numerosi tessuti bersaglio come tessuto adiposo, fegato, muscolo scheletrico e miocardico, pancreas endocrino, arterie periferiche e coronariche, rene... La loro azione ipoglicemizzante permette il controllo dell'iperglicemia post-prandiale per aumentata sintesi dei recettori GLUT4 insulino-sensibili, pur tuttavia stimolando la differenziazione degli adipociti con incremento delle masse adipose (prevalentemente sottocutanee) e ritenzione di fluidi. L'interesse della ricerca però si è indirizzato quando sono state individuate importanti azioni protettive vascolari arteriose nel blocco dei processi aterogenetici e infiammatori, con riduzione del rischio cardiovascolare ad essi connesso. Correlato con gli effetti vascolari è che i TZDs stimolano la sintesi e secrezione di adiponectina, un ormone adipocitario, down-regolato in presenza di obesità viscerale, insulino-resistenza, diabete tipo 2 e malattia coronarica, sia per azione della stessa insulina che per azione di citochine infiammatorie

come il TNF-alfa. L'adiponectina è stato dimostrato essere un ormone fortemente protettivo nei confronti dell'aterogenesi.

Riesaminando le azioni dei TZDs, recenti evidenze hanno dimostrato il loro ruolo nefroprotettivo sia in modelli animali che nell'uomo. Infatti, in roditori resi diabetici tipo 2, la somministrazione dei TZDs è stata capace di nella prevenzione e nella progressione dell'albuminuria e della fibrosi renale.

Inoltre, dobbiamo ribadire il ruolo pivotale del TGF-beta nello sviluppo della nefropatia diabetica e successiva evoluzione fibrogenica, in quanto permette lo sviluppo di processi di produzione ed accumulo di matrice mesangiale bloccando nel contempo i fisiologici processi di degradazione della stessa, alterando così il bilancio produzione/degradazione a favore della prima; ebbene, è stato dimostrato che i TZDs sono attivi nel bloccare l'espressione genica di TGF-beta, bloccando così i fenomeni di apposizione di matrice a livello glomerulare. Inoltre, i TZDs si sono dimostrati capaci di diminuire l'apoptosi dei podociti e la conseguente podocitopenia.

Così vari trials clinici sono stati messi a punto nell'uomo ed hanno confermato questo effetto probabilmente legato sia all'azione insulino-sensibilizzante, ma anche anti-apoptotica, anti-infiammatoria ed anti-fibrotica dei TZDs sul rene (66-72).

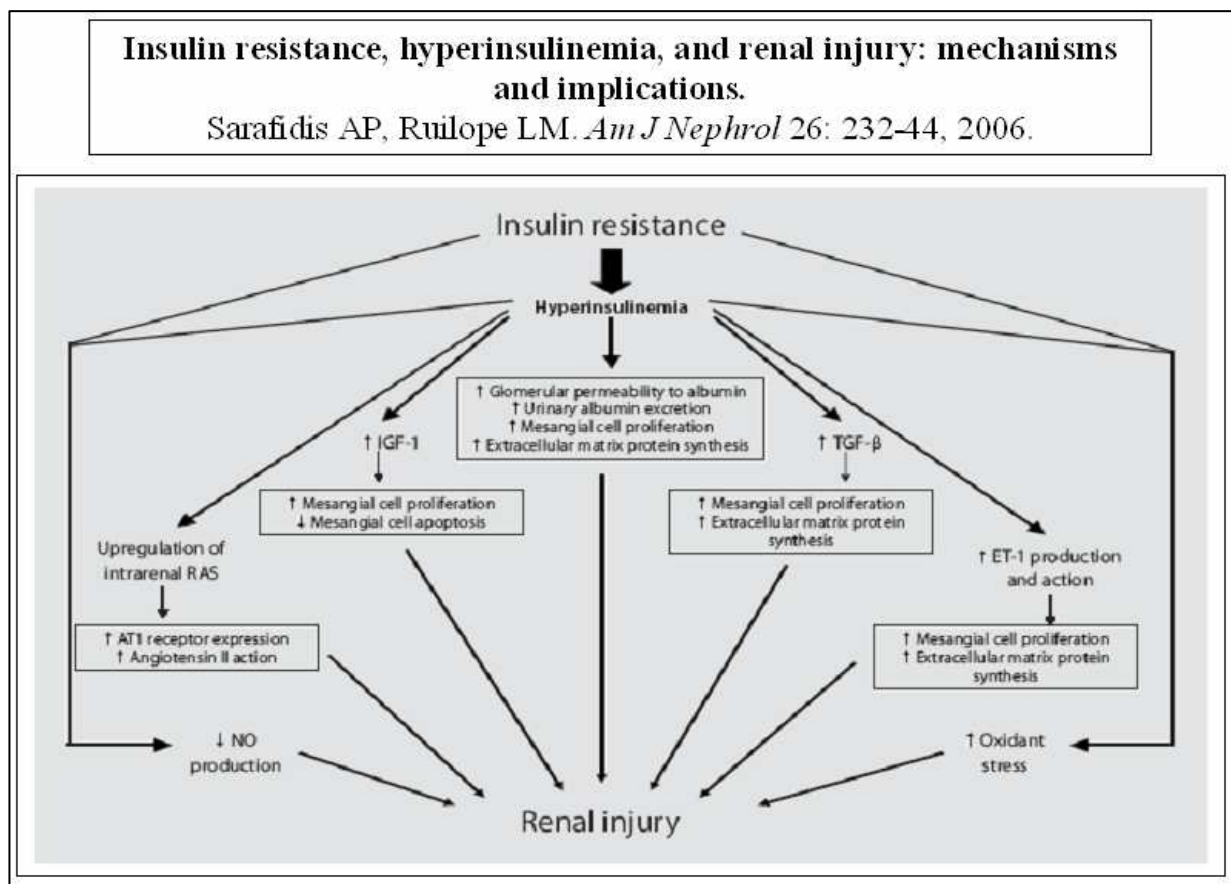


Fig 10. I danni dell'insulino-resistenza a livello renale.

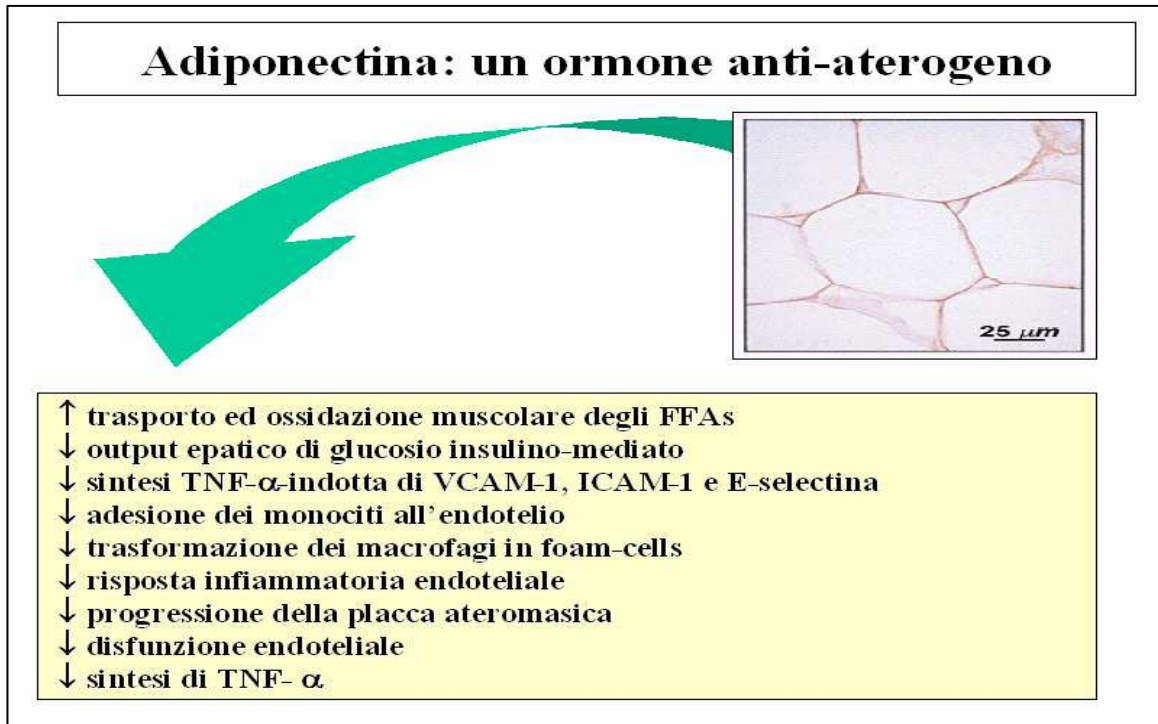
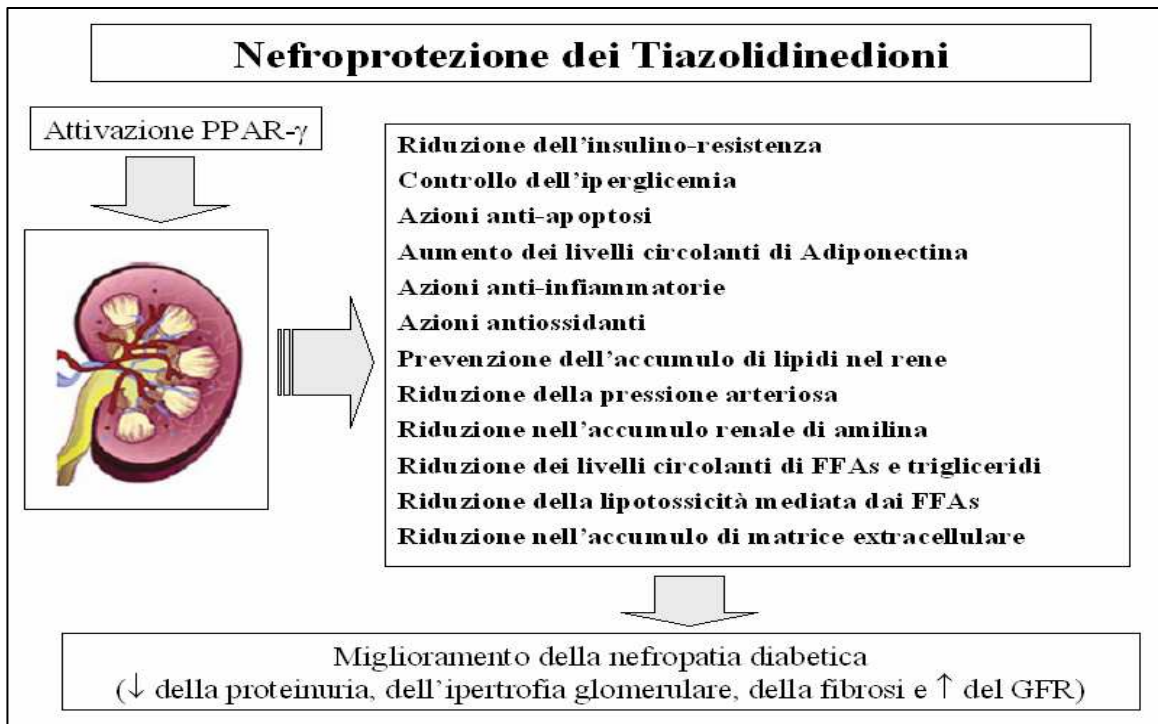


Fig11. Azioni anti-aterogene dell'adiponectina.



Le prime osservazioni sul ruolo nefroprotettivo dei TZDs sono state condotte da Lebovitz e coll., che hanno evidenziato in 493 pazienti con diabete tipo 2 microalbuminurici, una riduzione della UCR del 39% e del 41% con rosiglitazone 4 mg e 8 mg/die, rispettivamente.

Importanti conferme dell'efficacia dei TZDs nella riduzione della microalbuminuria sono emerse dal recente studio di Miyazaki e coll. dove il rosiglitazone 8 mg/die per 12 settimane in 15 pazienti diabetici tipo 2 ha indotto una significativa riduzione nell'escrezione urinaria di albumina (UACR) rispetto al gruppo dei soggetti trattati con sola metformina (riduzione rapporto albuminuria/creatininuria di -8.7 ± 1.7 mcg/mg *versus* -1.2 ± 1.1 con sola metformina, $p < 0.001$).

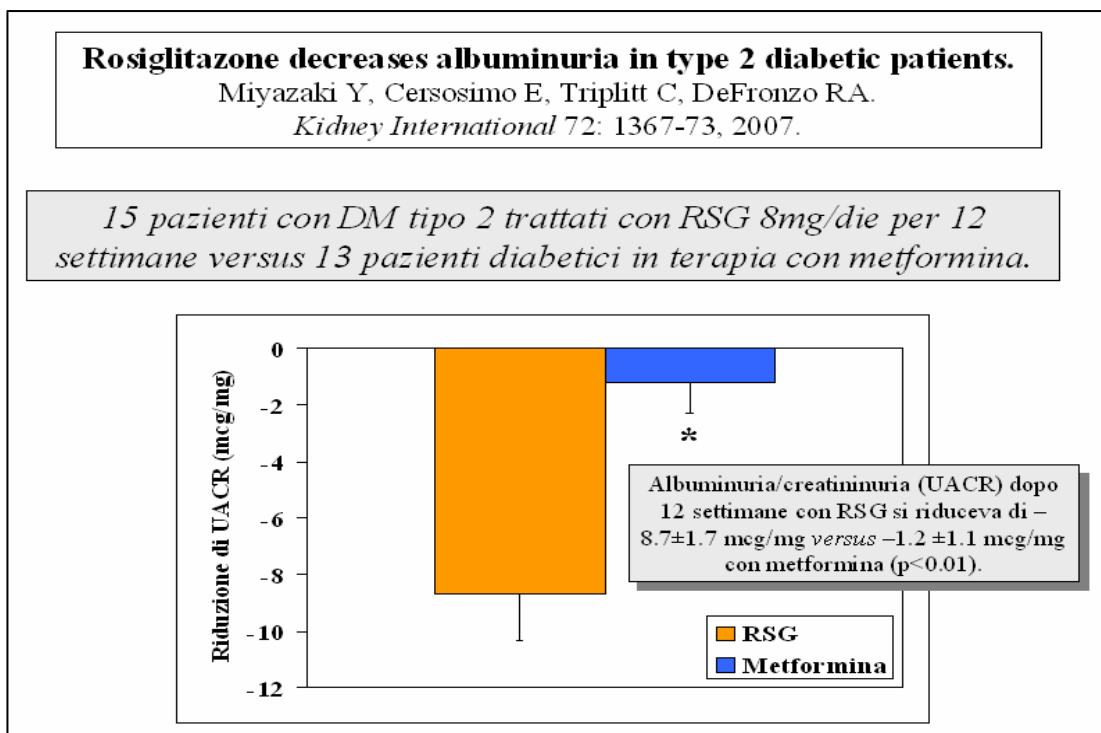


Fig12. Efficacia del rosiglitazone nella riduzione della microalbuminuria (UACR).

Studio TRESOR-kidney

(Tuscany Regional Studies On Rosiglitazone)

TRIAL CLINICO RANDOMIZZATO IN DOPPIO CIECO PER VALUTARE L'EFFICACIA DI ROSIGLITAZONE VERSUS PLACEBO NELLA PREVENZIONE DELLA NEFROPATIA DIABETICA IN PAZIENTI CON DIABETE MELLITO TIPO 2

OBIETTIVI DELLO STUDIO

Scopo dello studio era la valutazione degli effetti del trattamento con rosiglitazone rispetto al placebo sull'insorgenza di microalbuminuria in pazienti diabetici tipo 2 normoalbuminurici.

OBIETTIVI PRIMARI

Valutazione dell'obiettivo primario di efficacia: riduzione dell'incidenza di microalbuminuria (Albumin Excretion Rate ≥ 30 $\mu\text{g}/\text{min}$ sulle 24 ore).

OBIETTIVI SECONDARI

Obiettivi secondari di efficacia:

- 1) Prevenzione degli eventi macrovascolari (infarto, ictus, rivascolarizzazioni, amputazioni);
- 2) Effetti del trattamento sull'albuminuria, determinata quantitativamente come parametro continuo;
- 3) Prevenzione delle complicanze oculari del diabete (incidenza di retinopatia, trattamento fotocoagulativo argon laser, cecità);
- 4) Effetti del trattamento sull'assetto lipidico (colesterolo totale, HDL, trigliceridi);
- 5) Effetti del trattamento sulla terapia ipoglicemizzante, antiipertensiva, ipolipemizzante.

DISEGNO E DURATA DELLO STUDIO

DISEGNO DELLO STUDIO

Studio multicentrico, prospettico, randomizzato, in doppio cieco, 2 bracci di trattamento, a gruppi paralleli, controllato verso placebo, per valutare l'efficacia di *rosiglitazone* (Avandia®) nella prevenzione della nefropatia diabetica in pazienti affetti da diabete mellito tipo 2.

- *Screening*: pazienti diabetici tipo 2 normoalbuminurici (AER < 30 $\mu\text{g}/\text{min}$ sulle 24 ore), in sufficiente-buon compenso glicometabolico (HbA1c $\leq 8,5\%$)
- *Randomizzazione*: fase di trattamento, in doppio cieco, versus placebo, in cui ciascun paziente è stato assegnato ad 1 dei 2 bracci trattamento (rosiglitazone 8 mg o placebo) con rapporto 1:1 per ciascun centro. In fase di randomizzazione, è stata effettuata una stratificazione per presenza o assenza di trattamento con ACE-inibitori o antagonisti recettoriali dell'angiotensina II (sartanici), in modo da evitare che eventuali differenze nell'incidenza di tali trattamenti tra il gruppo trattato con rosiglitazone ed il gruppo di controllo possano interferire con i risultati.
- *Visite previste*: visita di screening, visita per la randomizzazione, visite di controllo ogni 3 mesi, esecuzione semestrale di microalbuminuria con HbA1C ed esecuzione annuale della visita oculistica per la valutazione delle complicanze oculari.
- *Esami di laboratorio*: prelievi ematici per HbA1c e campioni urinari delle 24 ore per la microalbuminuria (laboratori periferici dopo controllo di qualità); adiponectina e cistatina C

(centralizzata, con campioni ematici a temperatura controllata di -80°C) solo in alcuni dei centri partecipanti.

- *Targets*: $\text{HbA1c} \leq 7\%$; pressione arteriosa $< 130/85$ mm Hg.

Se i targets non venivano raggiunti, si interveniva con terapie specifiche.

PRODOTTI IN STUDIO, DOSAGGI, METODI DI SOMMINISTRAZIONE

Rosiglitazone 8 mg o placebo in capsule somministrate oralmente.

DURATA DELLO STUDIO

- *Durata dell'arruolamento*: 1 anno
- *Durata del trattamento*: 3 anni
- *Fase dello studio*: fase III

SELEZIONE DEI PARTECIPANTI ALLO STUDIO

NUMERO DEI PAZIENTI

In questo studio dovevano essere arruolati 2500 pazienti da randomizzare nei due bracci di trattamento (1:1) in doppio cieco. Per ogni centro era quindi previsto l'arruolamento di 250 pazienti. La popolazione in studio era composta da uomini e donne, di età compresa tra i 35 ed i 70 anni con diabete tipo 2 in sufficiente controllo (livelli di $\text{HbA1c} \leq 8.5\%$) normoalbuminurici

NUMERO DEI CENTRI PARTECIPANTI

Partecipanti allo studio 10 centri diabetologici toscani. Il centro coordinatore è stato l'Unità Operativa di Endocrinologia, Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, Università degli Studi di Firenze (Responsabile Prof. Mario Serio).

CRITERI DI INCLUSIONE

I soggetti in studio erano consenzienti ed in grado di fornire il loro consenso informato per scritto.

1. pazienti con diabete mellito tipo 2 di ambo i sessi di età compresa tra i 35 ed i 70 anni in trattamento con sola dieta o ipoglicemizzanti orali (metformina, sulfaniluree o glinidi).
2. $\text{HbA1c} \leq 8,5\%$
3. C-peptide a digiuno $> 0,2$ nmol/L
4. Indice di massa corporea (BMI) compreso tra 25 e 40 kg/m^2

CRITERI DI ESCLUSIONE

Sono stati esclusi tutti i soggetti rispondenti anche ad uno solo dei seguenti criteri:

1. $\text{HbA1c} > 8,5\%$
2. C-peptide a digiuno $< 0,2$ nmol/L
3. Indice di massa corporea (BMI) < 25 o $> 40 \text{ kg/m}^2$
4. Ipertensione arteriosa non controllata (SBP > 180 mm Hg e/o DBP > 110 mm Hg).
5. Scopenso cardiaco congestizio
6. Insufficienza renale grave (creatinina sierica > 2.0 mg/l)
7. Microalbuminuria $> 30 \mu\text{g/min}$ nelle 24 ore
8. Storia di neoplasia
9. Disordini psichiatrici maggiori instabili o trattamento in corso con agenti neurolettici.

10. Storia di sierologia positiva per malattie del fegato inclusi anticorpi anti-HAV (IgM), HbsAg, anti-HCV. I pazienti che abbiano isolati valori positivi per anticorpi anti-HBs possono essere inclusi nello studio.
11. Patologia epatica in fase attiva e/o storia di epatopatia correlata all'assunzione di tiazolinedioni (troglitazone, pioglitazone, rosiglitazone), disfunzione epatica o ittero.
12. Funzionalità epatica significativamente alterata definita da AST e/o ALT > 2.5 x ULN e/o bilirubinemia totale > 2.0 x ULN.
13. Creatinina sierica > 1.5 mg/dl per gli uomini e > 1.4 mg/dl per le donne.
14. Anemia di qualsiasi eziologia definita come emoglobina ≤ 12.0 g/dl per gli uomini e ≤ 11.0 g/dl per le donne.
15. Ipersensibilità ai tiazolinedioni.
16. Ipersensibilità a qualsiasi agonista dei recettori PPAR (Peroxisome Proliferator Activated-Receptor) α, γ, α e γ attualmente disponibile (es. Gemfibrozil, fenofibrato) o in via di sviluppo.

SOGGETTI IN ETÀ FERTILE

Le donne in età fertile potevano essere arruolate soltanto nel caso di adottare una efficace contraccezione: associazione di due metodi contraccettivi fra i seguenti: estrogeni, IUD, metodi di barriera, al fine di evitare la gravidanza durante tutto lo studio. In caso di gravidanza o di allattamento la paziente veniva automaticamente esclusa dallo studio.

Non essendo stati dimostrati nella sperimentazione preclinica (animali da laboratorio), né osservati nell'uso clinico danni riproduttivi nel sesso maschile, nonostante l'ampia diffusione del farmaco, non sono state richieste particolari cautele in tale sesso, analogamente a quanto riportato nella scheda tecnica.

TERAPIE CONCOMITANTI

TERAPIE IPOGLICEMIZZANTI E PRESCRIZIONI NON FARMACOLOGICHE

Il trattamento ipoglicemizzante (metformina, sulfaniluree o glinidi) nonché le prescrizioni dietetiche sono state aggiustate al fine di ottenere un controllo glicemico ottimale, aggiungendo un nuovo farmaco o aumentando le dosi dei farmaci esistenti se la HbA1c è > 7%. Tutte le terapie concomitanti (comprese quelle ipoglicemizzanti, antiipertensive ed ipolipemizzanti) sono state segnalate nella scheda del paziente.

La terapia con ACE-inibitori o sartanici veniva segnalata al momento dell'arruolamento per la stratificazione della randomizzazione.

TERAPIE E SITUAZIONI INCOMPATIBILI CON LA SPERIMENTAZIONE

Le seguenti terapie e situazioni sono state valutate all'inizio e durante il corso dello studio; in presenza di anche uno solo delle sotto elencate condizioni il paziente veniva automaticamente escluso dallo studio.

1. Insulina (nei 6 mesi precedenti lo studio)
2. Trattamento con atorvastatina o con rosuvastatina (consigliato attento monitoraggio nei pazienti in terapia con altre statine)¹.
3. Trattamento con fibrati.
4. Trattamenti cronici o periodici ripetuti di corticosteroidi; possono essere arruolati pazienti in trattamento stabile con terapie sostitutive di corticosteroidi.

¹ L'uso dell'atorvastatina come farmaco concomitante alla metformina e al rosiglitazone è stato visto che aumenta il rischio di effetti collaterali rispetto all'uso di simvastatina. La rosuvastatina veniva evitata in quanto sono stati riportati casi di proteinuria indotta da tale farmaco.

5. Donne con un test di gravidanza positivo al momento dell'arruolamento o prima della somministrazione del farmaco in studio.
6. Abuso di alcool e/o droghe nel corso dell'ultimo anno.
7. Somministrazione di qualsiasi farmaco sperimentale entro 30 giorni dal previsto arruolamento nel presente studio.
8. Donazione di sangue o partecipazione in studio clinico con prelievo di sangue >400 ml nelle 6 settimane antecedenti l'arruolamento nello studio in oggetto.
9. Qualsiasi condizione clinica che renda il paziente incapace di completare lo studio o che comporti un rischio significativo al paziente.

EVENTI AVVERSI

EVENTI AVVERSI NON GRAVI

Gli eventi avversi non gravi sono stati segnalati nella cartella clinica del paziente.

EVENTI AVVERSI GRAVI

Gli eventi avversi gravi (necessità di ricovero o potenziale rischio di vita per il paziente) sono stati segnalati al Centro Coordinatore entro 24 ore dall'evento stesso.

CAUSE DI INTERRUZIONE DELLO STUDIO

Il trattamento veniva immediatamente sospeso e l'evento riferito al Centro Coordinatore, per l'eventuale necessità di apertura del codice di randomizzazione, se:

1. Eventi avversi gravi.
2. Comparsa di segni o sintomi riferibili a scompenso cardiaco, a giudizio del medico.
3. Reperto di frazione di eiezione del ventricolo sinistro <50% ad uno dei controlli ecocardiografici previsti nel protocollo.
4. creatinina sierica >1,5 mg/dl o transaminasi oltre 2 volte il limite superiore della norma.
5. HbA1c >8.0% in 2 rilevazioni consecutive nonostante il trattamento concomitante con dosi massimali di sulfaniluree o glinidi.
6. Necessità di iniziare la terapia insulinica, per qualsiasi motivo.
7. Donazione di sangue.
8. Qualsiasi condizione clinica tale da rendere il paziente incapace di completare lo studio o che comporti un rischio significativo al paziente.

PROCEDURE STATISTICHE

Variabile principale in analisi

Comparsa di microalbuminuria ($AER \geq 30\mu\text{g}/\text{min}$ sulle 24 ore).

Variabili secondarie in analisi

Le variabili secondarie in analisi sono state:

1. comparsa di eventi macrovascolari (infarto, ictus, rivascolarizzazioni, amputazioni);
2. valutazione quantitativa albuminuria,
3. complicanze oculari (incidenza di retinopatia, trattamento fotocoagulativo argon laser, cecità);
4. variazioni assetto lipidico (colesterolo totale, HDL, trigliceridi);
5. adiponectina globulare e totale;

6. cistatina-C (su sottogruppi selezionati);
7. variazioni nella terapia ipoglicemizzante, antiipertensiva, ipolipemizzante.

Variabili di sicurezza

Sono stati considerati tutti gli eventi avversi (gravi o non gravi) riportati dagli sperimentatori.

METODI STATISTICI

L'analisi è stata condotta per intenzione al trattamento.

Parametro principale di efficacia: Per confrontare l'incidenza di microalbuminuria tra i due gruppi (placebo e farmaco attivo), si è utilizzata una regressione di Cox, con età, sesso e trattamento con farmaci attivi sul sistema renina-angiotensina all'arruolamento (S/N) quali covariate.

Parametri secondari di efficacia: Analoghe analisi sono state condotte riguardo all'incidenza di eventi maggiori cardiovascolari e complicanze oculari. Inoltre, la stessa analisi è stata applicata ad un endpoint composito di microalbuminuria, complicanze oculari ed eventi cardiovascolari maggiori.

Gli effetti del trattamento sulla HbA1c e su colesterolo, trigliceridi, colesterolo HDL, pressione arteriosa sistolica e diastolica sono stati valutati applicando una analisi della covarianza (ANCOVA), con la variazione del singolo parametro rispetto al basale quale variabile dipendente e trattamento, semisomma tra valore basale e valore finale, sesso ed età quali variabili indipendenti. Analoga analisi è stata effettuata per valutare gli effetti del trattamento sulla albuminuria, considerata quale parametro quantitativo continuo.

Ulteriori analisi: Al fine di verificare l'impatto di condizioni concomitanti sull'incidenza di microalbuminuria, si è effettuata un'analisi di tipo epidemiologico sui dati raccolti nel corso del trial, tramite analisi di Cox con l'insorgenza di microalbuminuria come variabile dipendente e sesso, età, indice di massa corporea, trattamenti concomitanti, trattamento con il farmaco attivo, colesterolo, colesterolo HDL, trigliceridi, pressione arteriosa sistolica e diastolica ed emoglobina glicata quali covariate. Simili analisi sono state condotte sull'incidenza di eventi macrovascolari maggiori e di complicanze oculari.

ANALISI AD INTERIM

L'incidenza di microalbuminuria (endpoint primario) e quella di eventi cardiovascolari maggiori ed eventi avversi gravi sono state confrontate tra i due gruppi di trattamento ogni anno, ad opera del Centro di Bergamo. Eventuali differenze tra i gruppi di trattamento sono state discusse con il coordinatore della sperimentazione per valutare la precoce interruzione del trial.

DETERMINAZIONE DELLA NUMEROSITA' DEL CAMPIONE

La determinazione della numerosità del campione è stata effettuata considerando un'incidenza attesa a tre anni di microalbuminuria nel gruppo di controllo pari al 9%, che corrisponde a quanto osservato su un campione simile nello studio BENEDICT (6). Per avere una potenza dell'80% con significatività per $p < 0.05$, ipotizzando una riduzione della incidenza di microalbuminuria pari al 33% nel gruppo trattato con il farmaco attivo ed un'incidenza di drop-out del 10%, era necessario randomizzare almeno 2498 pazienti (arrotondati a 2500).

SCHEMA E PROCEDURE DELLO STUDIO

Visita di screening

La visita di screening prevedeva: firma della scheda di consenso informato, raccolta completa anamnesi, esame obiettivo completo, misura di peso ed altezza per il calcolo di BMI, ECG, esame

urine, revisione terapia in atto (farmaci concomitanti), test di screening per epatite, determinazione di HbA1c (centralizzata), glicemia a digiuno, insulinemia a digiuno, C-peptide a digiuno, quadro lipidico (colesterolo totale, HDL, LDL, trigliceridi), funzionalità epatica (ALT, AST, GGT, bilirubina), CPK, urea, creatinina, emocromo, test di gravidanza (urine).

Fase di arruolamento

Dopo 7 giorni (± 3 giorni) dalla visita di screening se gli esami eseguiti risultavano compatibili con il protocollo previsto, avveniva la randomizzazione per l'assegnazione ad uno dei due bracci di trattamento, eventuale consegna di reflattometro per rilevazioni glicemiche ai pazienti che ne fossero sprovvisti.

Periodo di trattamento

- Visite di controllo: rilevazione profilo glicemico ogni 3 mesi (± 3 giorni).
- Visite di controllo: ogni 6 mesi (± 7 giorni) prelievo ematico per HbA1c (centralizzata) ed adiponectina, e con frequenza annuale controllo di GOT, GPT, γ GT, colesterolo totale, HDL, LDL, trigliceridi, urea, creatinina ed emocromo. In caso di reperto di microalbuminuria $>30 \mu\text{g}/\text{min}$ sulle 24 ore, è necessario ripetere il dosaggio dopo 7 giorni (se confermato il reperto, il paziente veniva considerato con nefropatia iniziale).

Gestione dei dati raccolti

La randomizzazione di ciascun soggetto partecipante allo studio è stata fatta con l'assegnazione di uno specifico codice per ogni paziente da un centro che non partecipava attivamente allo studio (Istituto Mario Negri, Centro di Ricerca Farmacologia, Clinica e delle Malattie Rare, Aldo e Cele Dacco, Villa Camozzi, Ranica, Bergamo). I dati sono stati inviati al centro del Prof. Remuzzi per le valutazioni in itinere e dei risultati finali.

RISULTATI

Sono stati randomizzati 315 pazienti (159 con terapia 1 e 156 con terapia 2). I 2 gruppi sono sovrapponibili per caratteristiche basali.

Il follow-up medio è stato di 10.9 ± 7.1 mesi.

Le principali caratteristiche cliniche ed antropometriche sono riassunte nella tabella 1.

Parametri	Risultati
Età (anni)	60.4 ± 8.1
BMI (kg/m^2)	29.5 ± 3.8
Durata del diabete (anni)	6.7 ± 6.6
HbA1c basale (%)	7.0 ± 0.9
PAS (mm Hg)	134.3 ± 15.0
PAD (mm Hg)	79.7 ± 8.8
C-peptide (ng/ml)	1.5 ± 0.9
Colesterolo totale (mg/dl)	189.5 ± 33.7
Colesterolo HDL (mg/dl)	49.2 ± 12.6
Colesterolo LDL (mg/dl)	113.1 ± 30.0
Trigliceridi (mg/dl)*	120 [90.5-167]
Microalbuminuria base (mcg/ml)	8.7 ± 5.2
Insulina (mcU/ml)*	9 [6-13]
GOT (U/L)	19.7 ± 6.5
GPT (U/L)	24.4 ± 12.3
GGT (U/L)	27.3 ± 15.8

Tab. 1. Le principali caratteristiche demografiche, antropometriche e cliniche dei soggetti randomizzati: i dati sono espressi come medie \pm DS o come mediane [quartili]*.

Complessivamente i soggetti randomizzati in terapia con ARBs erano il 25.2%, con ACE-inibitori il 30.7%, con calcio-antagonisti il 5.7%, la terapia antiaggregante/anticoagulante era presente nel 21.3%, l'impiego di statine (diverse dalla atorvastatina) presente nel 21.0% dei soggetti.

La terapia con ipoglicemizzanti orali era suddivisa nel 77.1% di metformina, 27.3% di secretagoghi, 1.6% di acarbose, % di terapia combinata.

Il follow-up medio è risultato essere di 10.9 ± 7.1 mesi.

Si è osservato con le 2 diverse terapie:

terapia 1: rosiglitazone

terapia 2: placebo

Terapia 1

Microalbuminuria basale 8.4 ± 5.3 , a 12 mesi 8.1 ± 5.9 , a 24 mesi 6.3 ± 4.9

HbA1c basale 6.9 ± 0.7 , a 12 mesi 6.6 ± 0.7 , a 24 mesi 6.8 ± 0.6 ($p < 0.05$)

BMI basale 29.7 ± 4.0 , a 12 mesi 29.9 ± 4.0 , a 24 mesi 28.8 ± 3.4

PAS: 132.9 ± 13.7 basale, 127.0 ± 15.0 dopo 1 anno, 126.0 ± 9.6 a 2 anni

PAD: 79.3 ± 8.6 basale, 74.0 ± 7.3 dopo 1 anno, 71.0 ± 5.5 a 2 anni.

Terapia 2

Microalbuminuria basale 9.0 ± 5.0 , a 12 mesi 11.3 ± 11.5 , a 24 mesi 7.5 ± 3.3

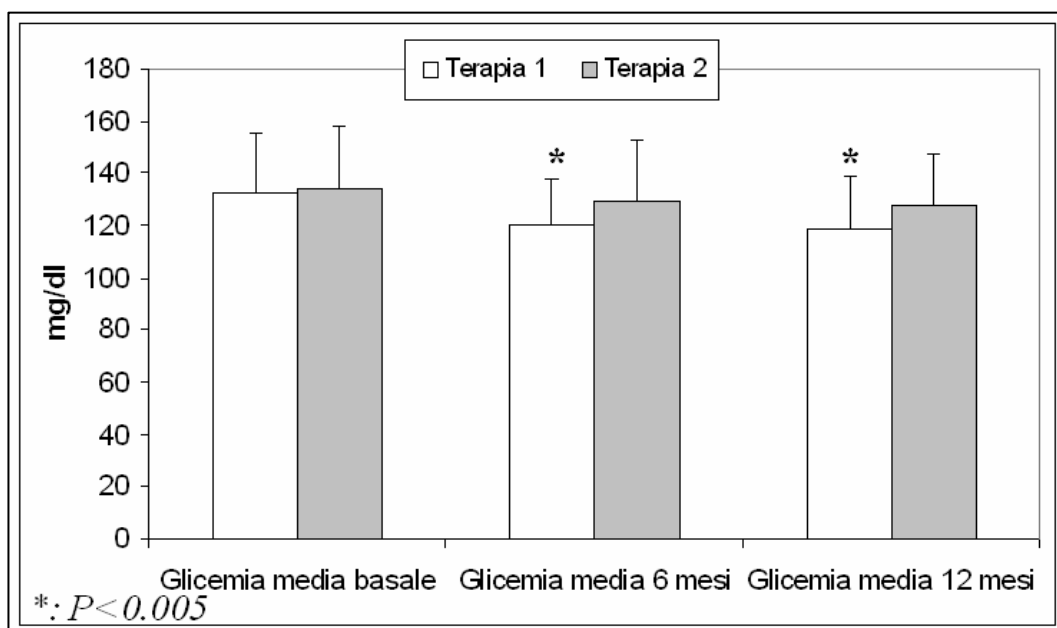
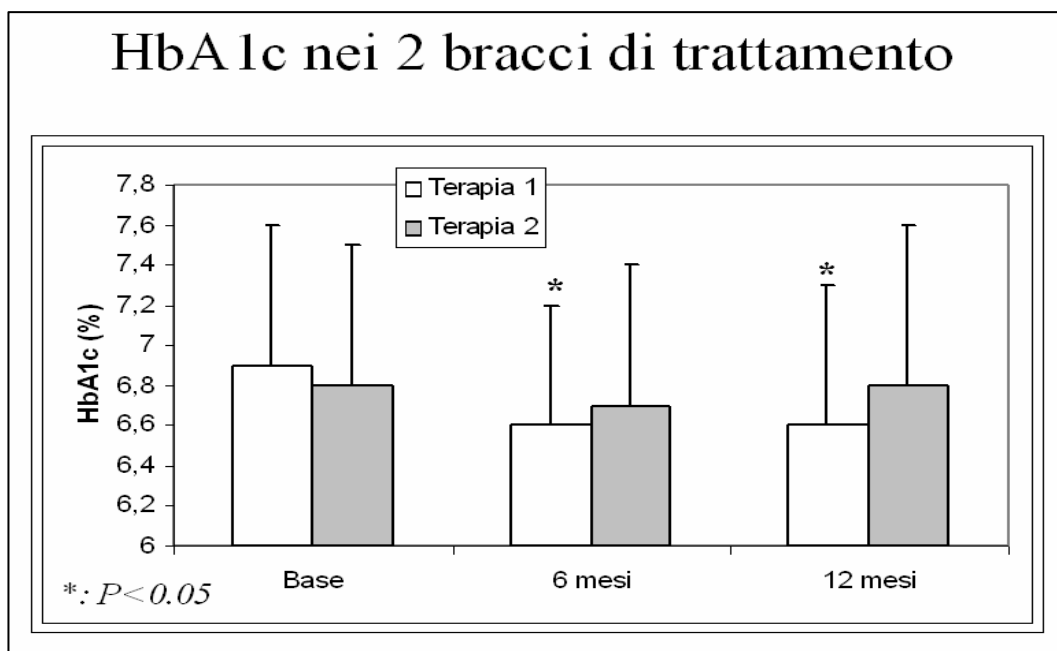
HbA1c basale 7.0 ± 0.8 , a 12 mesi 6.8 ± 0.8 , a 24 mesi 6.9 ± 0.7 (NS)

BMI basale 29.3 ± 3.7 , a 12 mesi 29.6 ± 4.3 , a 24 mesi 28.4 ± 3.0

PAS: 135.7±16.2 basale, 130.9±12.0 dopo 1 anno, 136±10.8 a 2 anni

PAD: 80.2±9.0 basale, 78.4±7.0 dopo 1 anno, 84.0±9.6 a 2 anni

In particolare si è osservato che la terapia 1 determina una riduzione significativa della HbA1c (6.9±0.7 baseline, 6.6±0.6 a 6 mesi, 6.6±0.7 a 12 mesi), che non si osserva però con la terapia 2 (6.8±0.7 baseline, 6.7±0.7 a 6 mesi, 6.8±0.8 a 12 mesi) e questo riflette le glicemie medie rilevate (media delle glicemie a digiuno, 2 ore dopo colazione, 2 ore dopo pranzo, 2 ore dopo cena) che si sono ridotte significativamente ($p<0.05$) a 6 mesi e 12 mesi con rosiglitazone vs placebo, come evidenziato nelle figure sottostanti.



	<i>Numerosità</i>	<i>Media</i>	<i>Deviazione standard</i>	<i>Minimo</i>	<i>Massimo</i>
Glicemia media base	55	132,141	22,7361	88,8	184,8
Glicemia media 6 mesi	90	119,9583	18,04762	89,50	176,75
Glicemia media 12 mesi	66	118,5038	19,99608	79,75	176,25

a Gruppo_terapia = 1 (Rosiglitazone)

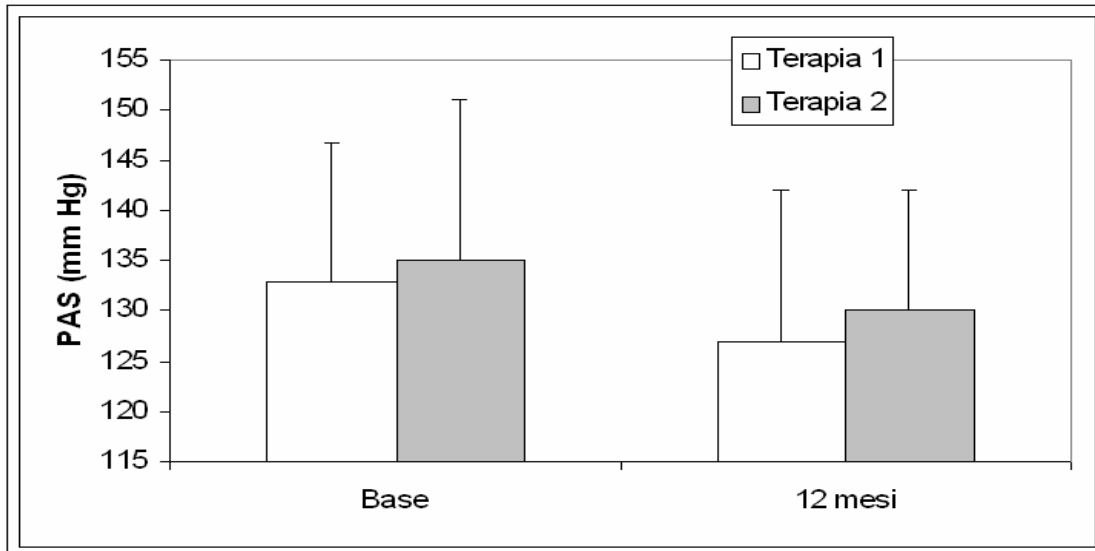
	<i>Numerosità</i>	<i>Media</i>	<i>Deviazione standard</i>	<i>Minimo</i>	<i>Massimo</i>
Glicemia media base	64	134,320	23,7524	82,0	239,5
Glicemia media 6 mesi	85	129,2235	23,48011	70,25	195,00
Glicemia media 12 mesi	54	127,8565	19,79527	84,50	185,50

a Gruppo_terapia = 2 (placebo)

I pazienti usciti dallo studio (per raggiungimento dell'endpoint, eventi avversi o altri motivi) sono stati 95 con terapia 1 e 91 con terapia 2. L'attrition diventa particolarmente alta (con ambedue le terapie) successivamente ai 18 mesi di terapia.

Gli eventi avversi seri riportati sono 15 (5 con terapia 1, 10 con terapia 2); gli eventi avversi non seri sono 36 (18 per ciascun gruppo). Gli eventi avversi cardiovascolari (non tutti seri, non tutti compresi nell'endpoint composito principale) sono 16 (6 con terapia 1, 10 con terapia 2). Non risulta alcun decesso.

Interessanti risultano i dati riferiti ai livelli di pressione arteriosa nei 2 bracci di terapia: infatti mentre non si sono osservate variazioni significative nei livelli pressori sia di sistolica che diastolica al basale, dopo 1 anno di trattamento i pazienti sottoposti a terapia 1 mostrano significative riduzioni dei livelli di pressione arteriosa diastolica (74.0 ± 7.3 mm Hg con terapia 1 versus 78.4 ± 8.0 mm Hg con terapia 2; $p < 0.05$). Non si sono osservate variazioni significative nei livelli di pressione arteriosa sistolica nei 2 bracci di trattamento (Fig 13.).



PAD nei 2 bracci di trattamento

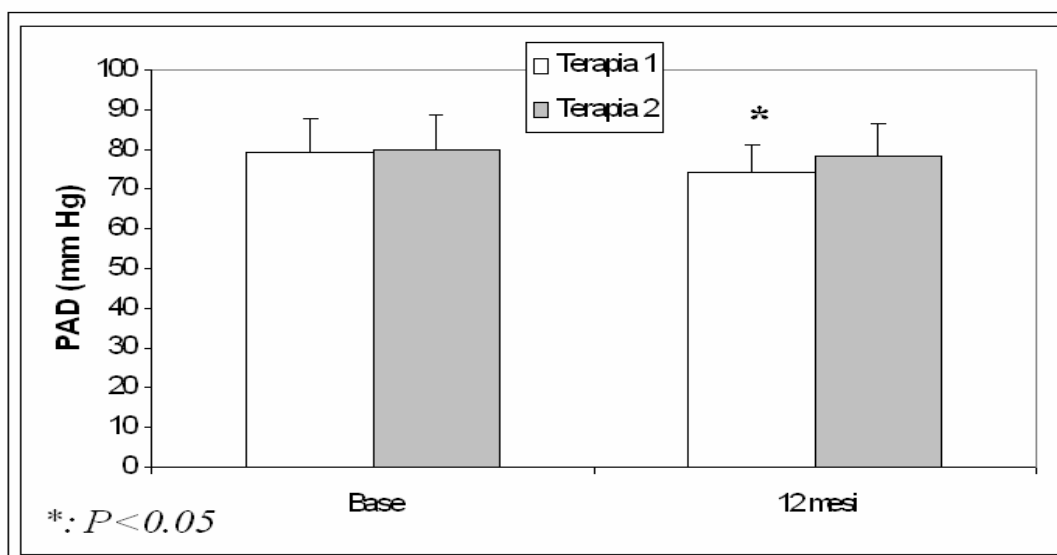


Fig 13. Livelli di PAS e PAD nei 2 bracci di terapia.

E' importante ricordare che i glitazoni, e tra questi ovviamente il rosiglitazone, si associano a ritenzione di liquidi e ad una live anemizzazione del paziente dovuta ad emodiluizione; i dati relativi all'ematocrito e ad i parametri della serie rossa basali e ad 1 anno di terapia sono indicati nella tabella sottostante.

Terapia 1		
	Base	12 mesi
GR	4.7±0.5	4.3±0.3*
Hb	14.3±1.0	13.0±0.9**
Hct	42±4.0	39.3±2.5*
VGM	87.4±8.9	82.7±18.3
EGM	29.5±2.4	29.7±1.4

Terapia 2		
	Base	12 mesi
GR	4.7±0.5	4.8±0.4
Hb	14.2±0.9	14.2±1.0
Hct	42±3.2	44.8±11.0
VGM	86.8±7.3	87.0±3.3
EGM	29.8±2.4	31.0±1.8

Tab. 2. Variazioni dei parametri eritropoietici nei 2 bracci di terapia; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.001$ terapia 1 (rosiglitazone) vs terapia 2 (placebo).

L'azione del rosiglitazone oltre ad essere insulino-sensibilizzante ed ipoglicemizzante, è nota anche sul versante flogistico, dimostrando, al pari del pioglitazone attività anti-infiammatorie. Un parametro indicativo dello stato di attivazione infiammatoria presente nel paziente è dato dai livelli di leucociti rilevati. Nello studio è stata osservata una significativa riduzione dei globuli bianchi dopo 1 anno di terapia nel braccio di trattamento 1 (rosiglitazone) vs terapia 2 (placebo), come evidenziato nella tabella 3.

	Base	12 mesi
Leucociti (rosiglitazone)	6.7±1.4	5.8±1.3*
Leucociti (placebo)	6.5±1.6	7.1±1.3

Tab. 3. Livelli di leucociti nei pazienti nelle 2 terapie. *: $p < 0.05$ terapia 1 vs terapia 2.

Il rosiglitazone si può associare a variazioni del quadro lipidico, con incremento dei livelli di trigliceridi e/o di LDL; si sono osservate variazioni significative solo per i livelli di trigliceridi, con un incremento significativo ($p < 0.05$) nel braccio di terapia con rosiglitazone (terapia 1) vs placebo (terapia 2) come evidenziato nella tabella sottostante.

Rosiglitazone		
	Base	12 mesi
Colesterolo totale	189.8±33.0	187.9±30.3
HDL	50.4±13.3	53.5±13.9
LDL	113.8±28.5	109±28.6
Trigliceridi	113 [90-154]	121 [88.2-184.7]*

Placebo		
	Base	12 mesi
Colesterolo totale	189.3±34.6	184.0±32.6
HDL	48.0±11.8	51.6±11.7
LDL	113.5±29.5	113.4±29.0
Trigliceridi	124.5 [91-176]	109.5 [90.5-142]

Tab. 4. Quadro lipidico nei 2 bracci di trattamento; * $p < 0.05$.

L'endpoint principale era un composito di microalbuminuria (incidente) e eventi cardiovascolari maggiori.

Gli eventi registrati sono 19, di cui 5 nella terapia 1 e 14 nella terapia 2 ($p=0.015$).

Con la analisi di Cox, HR di 1 vs 2 è risultato essere di 0.31 [0.11-0.86] ($p=0.024$), unadjusted. Aggiustando per microalbuminuria baseline (come parametro continuo, si ha HR 0.32 [0.11-0.89] ($p=0.029$); aggiungendo al modello statistico la terapia con ACE-i o ARBs, si ha HR 0.31 [0.11-0.87] ($p=0.026$).

Le differenze nell'endpoint principale sono interamente dovute alla presenza di microalbuminuria incidente (2 casi in terapia 1, 10 casi in terapia 2); infatti, gli eventi CV maggiori sono solo 3 nel gruppo in terapia 1 e 4 nel braccio in terapia 2. Considerando da sola la microalbuminuria incidente (uno dei nostri endpoint secondari predefiniti) si ha, in analisi di Cox, 0.18 [0.04-0.82] ($p=0.027$) unadjusted, 0.19 [0.04-0.86] ($p=0.031$) aggiustato per microalbuminuria, 0.16 [0.04-0.76] ($p=0.021$) aggiustato per microalbuminuria e ACEi/ARBs.

In conclusione, l'endpoint principale si può considerare raggiunto anche in assenza del numero complessivo di pazienti randomizzati.

Malgrado la relativa esiguità del campione di pazienti che si è potuto randomizzare, l'incidenza complessiva di eventi e l'effetto importante e statisticamente significativo del farmaco rosiglitazone sono risultati assai maggiori rispetto alle previsioni in sede di calcolo di potenza, giustificando quindi i risultati ottenuti.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Studio DAI. *Ann. Ist. Super. Sanità*, vol. 37, n. 2, 289-96, 2001.
- 2) Wolf G, Butzmann U, Wenzel UO. The renin-angiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology. *Nephron Physiol* 2003;**93**: P3-13.
- 3) Chen S, Wolf G, Ziyadeh FN. The renin-angiotensin system in diabetic nephropathy. *Contrib Nephrol* 2001;**135**: 212-21.
- 4) Wolf G, Ziyadeh FN. The role of angiotensin II in diabetic nephropathy: emphasis on nonhemodynamic mechanisms. *Am J Kidney Dis* 1997;**29**: 153-63.
- 5) Vidotti DB, Casarini DE, et al. High glucose concentration stimulates intracellular renin activity and angiotensin II generation in rat mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;**286**: F1039-45.
- 6) Singh R, Sing AK, Alavi N, Leehey DJ. Mechanism of increased angiotensin II levels in glomerular mesangial cells cultured in high glucose. *J Am Soc Nephrol* 2003;**14**: 873-80.
- 7) Zatz R, Dunn BR, Meyer TW, Anderson S, Rennke HG, Brenner BM. Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. *J Clin Invest* 1986;**77**: 1925-30.
- 8) Anderson S, Rennke HG, Brenner BW. Therapeutic advantage of converting enzyme inhibitors in arresting progressive renal disease associated with systemic hypertension in the rat. *J Clin Invest* 1986;**77**: 1993-2000.
- 9) Algenstaedt P, Schaefer C, Biermann T et al. Microvascular alterations in diabetic mice correlate with level of hyperglycemia. *Diabetes* 2003; 52: 542-549.
- 10) Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 2001;**44**: 129-46.
- 11) Ziyadeh FN, Mogyorosi A, Kalluri R. Early and advanced non-enzymatic glycation products in the pathogenesis of diabetic kidney disease. *Exp Nephrol* 1997;**5**: 2-9.
- 12) Heidland A, Sebekova K, Schinzel R. Advanced glycation end products and the progressive course of renal disease. *Am J Kidney Dis* 2001;**38** (Suppl. 1):S100-6.
- 13) Sung SH, Chen S, Laping NJ, Ziyadeh FN: Albuminuria is ameliorated by an inhibitor of VEGF receptors, SU5416, in diabetic db/db mice but is unaffected in Smad3-knockout mice rendered diabetic with streptozotocin (Abstract). *J Am Soc Nephrol* 15: 720A-721A, 2004.
- 14) Foster RR, Hole R, et al. Functional evidence that vascular endothelial growth factor (VEGF) may act as an autocrine factor on human podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F1263-F73, 2003.
- 15) Hohenstein B, Hausknecht B, Boehmer K et al. Local VEGF activity but not VEGF expression is tightly regulated during diabetic nephropathy in man. *Kidney Int* 2006; 69: 1654-61.
- 16) Hoshi S, Nomoto K, Kuromitsu J et al. High glucose induced VEGF expression via PKC and ERK in glomerular podocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290: 177-184.
- 17) Sharma R, Khanna A, Sharma M, Savin VJ: Transforming growth factor-beta1 increases albumin permeability of isolated rat glomeruli via hydroxyl radicals. *Kidney Int* 58: 131-136, 2000.
- 18) Benigni A, Zoja C, et al. Add-on anti-TGF-beta antibody to ACE inhibitor arrests progressive diabetic nephropathy in the rat. *J Am Soc Nephrol* 14: 1816-1824, 2003.
- 19) Chen S, Jim B, Ziyadeh FN: Diabetic nephropathy and TGF-beta: transforming our view of glomerulosclerosis and fibrosis build-up. *Semin Nephrol* 23: 532-543, 2003.
- 20) Abbate M, Zoja C, et al. Transforming growth factor-beta1 is up-regulated by podocytes in response to excess intraglomerular passage of proteins: a central pathway in progressive glomerulosclerosis. *Am J Pathol* 161: 2179-2193, 2002.
- 21) Ziyadeh FN. Mediators of diabetic renal disease: the case for TGF- β as the major mediator. *J Am Soc Nephrol* 15 (Suppl. 1): S55-S57, 2004.

- 22) De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J et al. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 963–974.
- 23) Du XL, Edelstein D, Dimmeler S et al. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest* 2001; 108: 1341–48.
- 24) Rask-Madsen C, King GL. Mechanisms of disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007; 3: 46–56.
- 25) Tryggvason K: Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol* 10: 2440–2445, 1999.
- 26) Patari-Sampo A, Ihalmo P, Holthofer H. Molecular basis of the glomerular filtration: nephrin and the emerging protein complex at the podocyte slit diaphragm. *Ann Med* 2006; 38: 483–492.
- 27) Patari A, Forsblom C, Havana M et al. Nephrinuria in diabetic nephropathy of type 1 diabetes. *Diabetes* 2003; 52: 2969–2974.
- 28) Cooper ME, Mundel P, Boner G. Role of nephrin in renal disease including diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* 2002; 22: 393–398.
- 29) Langham RG, Kelly DJ, Cox AJ et al. Proteinuria and the expression of the podocyte slit diaphragm protein, nephrin, in diabetic nephropathy: effects of angiotensin converting enzyme inhibition. *Diabetologia* 2002; 45: 1572–1576.
- 30) Coward RJ, Welsh GI, Koziell A et al. Nephrin is critical for the action of insulin on human glomerular podocytes. *Diabetes* 2007; 56: 1127–1135.
- 31) Ohlson M, Sorensson J, Haraldsson B. A gel-membrane model of glomerular charge and size selectivity in series. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280: F396–F405.
- 32) Comper WD, Glasgow EF. Charge selectivity in kidney ultrafiltration. *Kidney Int* 1995; 47: 1242–1251.
- 33) Jeansson M, Haraldsson B. Morphological and functional evidence for an important role of the endothelial cell glycocalyx in the glomerular barrier. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290: F111–F116.
- 34) Nieuwdorp M, Mooij HL, Kroon J et al. Endothelial glycocalyx damage coincides with microalbuminuria in type 1 diabetes. *Diabetes* 2006; 55: 1127–1132.
- 35) Osterby R, Gundersen HJ. Glomerular size and structure in diabetes mellitus. I. Early abnormalities. *Diabetologia* 1975; 11: 225–229.
- 36) Mauer SM. Structural–functional correlations of diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1994; 45: 612–622.
- 37) Van den Born J, van den Heuvel LP, et al. Distribution of GBM heparan sulfate proteoglycan core protein and side chains in human glomerular diseases. *Kidney Int* 1993; 43: 454–463.
- 38) Li JJ, Kwak SJ, Jung DS et al. Podocyte biology in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* 2007; S36–S42.
- 39) Meyer TW, Bennett PH, Nelson RG. Podocyte number predicts long-term urinary albumin excretion in Pima Indians with Type II diabetes and microalbuminuria. *Diabetologia* 1999; 42: 1341–44.
- 40) Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S et al. Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *J Clin Invest* 1997; 99: 342–348.
- 41) Petermann AT, Pippin J, Krofft R et al. Viable podocytes detach in experimental diabetic nephropathy: potential mechanism underlying glomerulosclerosis. *Nephron Exp Nephrol* 2004; 98: E114–E123.
- 42) Foster RR, Saleem MA, et al. Vascular endothelial growth factor and nephrin interact and reduce apoptosis in human podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F48–F57, 2004.
- 43) Nakamura T, Ushiyama C, et al. Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 15: 1379–1383, 2000.

- 44) Herrera GA. Plasticity of mesangial cells: a basis for understanding pathological alterations. *Ultrastruct Pathol* 2006; 30: 471–479.
- 45) DCCT Study Group. *N Engl J Med* 329: 977-86, 1993.
- 46) UKPDS Study Group (UKPDS 35) *Lancet* 352: 837-53, 1998.
- 47) Okkubo Y, et al (Kumamoto Study Group). *Diabetes Res Clin Pract* 28 : 103-17, 1995.
- 48) MICRO-HOPE Study Group. *Lancet* 355 : 253-9, 2000.
- 49) Ruggenenti P, et al. Preventing microalbuminuria in type 2 diabetes (BENEDICT Study). *N Engl J Med* 351: 1941-51, 2004.
- 50) Patel A, et al. (ADVANCE trial). *Lancet* 370: 829-40, 2007.
- 51) Brenner BM, et al. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 345: 861-9, 2001.
- 52) IDNT Study Group. *N Engl J Med* 345 : 851-60, 2001.
- 53) Parving HH, Lehnert H, Bröchner-Mortensen J, et al. Irbesartan in Patients with Type 2 Diabetes and Microalbuminuria Study Group (IRMA-2). The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2001; 345 (12): 870-8.
- 54) Makino H, Haneda M, et al. INNOVATION Study Group. Prevention of transition from incipient to overt nephropathy with telmisartan in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30(6): 1577-8.
- 55) Huang XR, Chen WY, Truong LD, Lan HY: Chymase is upregulated in diabetic nephropathy: implications for an alternative pathway of angiotensin II-mediated diabetic renal and vascular disease. *J Am Soc Nephrol* 14: 1738–1747, 2003.
- 56) Mogensen CE, et al (CALM study Group). *BMJ* 321: 1440-4, 2000.
- 57) Yusuf S, Teo KK, Pogue J, et al. ONTARGET Investigators. Telmisartan, ramipril, or both in patients at high risk for vascular events. *N Engl J Med* 2008 ; 358 (15): 1547-59.
- 58) Alan H. Gradman, Roland E, et al. Aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor, provides dose-dependent antihypertensive efficacy and placebo-like tolerability in hypertensive patients. 2005;111;1012-1018; *Circulation*
- 59) Oparil S, et al. Efficacy and safety of combined use of aliskiren and valsartan in patients with hypertension: a randomised, double-blind trial. *Lancet* 370: 221-9, 2007.
- 60) Müller DN, et al. Aliskiren—mode of action and preclinical data. *J Mol Med* (2008) 86:659–662.
- 61) Moiz M, et al. Oral direct renin inhibition: premise, promise, and potential limitations of a new antihypertensive drug. *The American Journal of Medicine* (2008) 121, 265-271
- 62) Parving HH, et al. Aliskiren combined with losartan in type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 2008;358: 2433-46.
- 63) Jensen C, et al. Aliskiren: the first renin inhibitor for clinical treatment. *Nat Rev Drug Discov* 399-410, 2008.
- 64) Persson F, et al. Time course of the antiproteinuric and antihypertensive effects of direct renin inhibition in type 2 diabetes. *Kidney International* (2008) 73, 1419–25.
- 65) Ingelfinger JR. Aliskiren and dual therapy in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 358; 23: 2503-05, 2008.
- 66) Mykkanen L, et al. Microalbuminuria is associated with insulin resistance in nondiabetic subjects: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Diabetes* 47: 793-800, 1998.
- 67) Ekstrand AV, et al. Insulin resistance precedes microalbuminuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 1998.
- 68) Lebovitz HE, et al. Rosiglitazone monotherapy is effective in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 280-8, 2001.
- 69) Pistrosch F, et al. Rosiglitazone improves glomerular hyperfiltration, renal endothelial dysfunction, and microalbuminuria in patients with incipient diabetic nephropathy. *Diabetes* 54 : 2206-11, 2005.

- 70) Panchapakesan U, et al. Drug insight: thiazolidinediones and diabetic nephropathy, relevance to renoprotection. *Nature Clin Pract Nephrol* 1: 33-45, 2005.
- 71) Zheng F, Guan Y. Thiazolidinediones: a novel class of drugs for the prevention of diabetic nephropathy? *Kidney International* 72: 1301-03, 2007.
- 72) Miyazaki Y, Cersosimo E, Triplitt C, DeFronzo RA. Rosiglitazone decreases albuminuria in type 2 diabetic patients. *Kidney International* 72: 1367-73, 2007.