



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

**Маријана Петровић**

**Супституција витамина D и концентрација VEGF-A у крви и TGF- $\beta_1$  и  
нефрина у урину код болесника са дијабетес мелитусом тип 2**

докторска дисертација

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

Крагујевац, 2018. год.

## **Апстракт**

**Увод/Циљ:** Недостатак витамина D је често присутан код пацијената са дијабетес мелитусом тип 2 и може бити фактор ризика за бржу прогресију дијабетесне нефропатије и већу инциденцу кардиоваскуларних догађаја. Циљ наше студије је био да се испита утицај надокнаде витамина D на параметре глокорегулације, инфламације, липидног статуса, албуминурију и биомаркере оштећења бубрежног ткива – нефрин, VEGF-A и TGF- $\beta_1$  код пацијената са дијабетес мелитусом тип 2 и недостатком витамина D.

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

**Резултати:** Најнижи ниво витамина D пре терапије имали су пацијенти у групи са макропротеинуријом, док је на крају испитивања статистички значајно повишен ниво витамина D у све три групе. Након шестомесечне примене витамина D, постигнуто је статистички значајно снижење нивоа албумин/креатинин односа, 24-часовне протеинурије, укупног холестерола, триглицерида и хемоглобин A1ц и VEGF-A у урину у све три испитиване групе, Ц-реактивног протеина у групи са нормалном протеинуријом и микропротеинуријом, нефрина у урину у групи са микроалбуминуријом и TGF- $\beta_1$  у урину у групи са макроалбуминуријом.

**Закључак:** Надокнада витамина D високим дозама холекалциферола и његова превентивна примена код пацијената са ДМ тип 2 (са или без протеинурије) снижава Ц-реактивни протеин, хемоглобин A1ц, укупни холестерол, триглицериде, у крви и албумин/креатинин однос, 24-часовну протеинурију, VEGF-A TGF- $\beta_1$  и нефрин у урину .

**Кључне речи:** дијабетес мелитус тип 2, дијабетесна нефропатија, Хемоглобин А1ц, Ц-реактивни протеин, липиди, витамин Д, албумин/креатинин однос, холекалциферол, нефрин, VEGF-A и TGF- $\beta_1$ .

## 1. Увод

### 1.1. Историјат

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

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

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

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

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

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

*Roger Hinsworth* 1935. године је на основу различитог одговора на инсулинску терапију потврдио да постоје две врсте дијабетеса: "инсулин-зависан" (тип 1) и "инсулин-независан" (тип 2) (1). Почетком педесетих година прошлог века за лечење дијабетеса произведени су први перорални хипогликемици – препарати сулфониуреа, а затим наредних деценија и друге врсте ових лекова. (8) Високо пречишћени инсулин, идентичан човековом ендегеном инсулина, уведен је у употребу 1970-их година (9).

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

## 1.2. Епидемиологија

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

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

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

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

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

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

У порасту је и број оболелих о ДМ тип 1, а доња старосна граница се све више спушта, тако да се процењује да ће број новооткривених случајева у европској популацији деце млађе од пет година бити дуплиран у периоду од 2005. до 2020. године. Најчешће се јавља у Европи и Северној Америци. Постоји значајна географска варијација у инциденци овог оболења, а вероватноћа да неко оболи од ДМ тип 1 у Финској је око 400 пута већа него у Венецуели (12,14,15). Фактори ризика за настанак ДМ ти 1 су: генетска предиспозиција, вирусне инфекције, нарочито ентеровирусне инфекције, имунизација (само код генетских предиспонираних), исхрана, посебно излагање крављем млеку у раном животној добу, виши социоекономски статус, гојазност [38-40], недостатак витамина Д, перинатални фактори као што су старост мајке, историја прееклампсије и неонатална жутица. Супротно од ДМ тип 2, ниска тежина на рођењу смањује ризик од развоја ДМ тип 1 (15).

Колико ДМ представља велики здравствени проблем говори и податак да је у 2015. око пет милион смртних случајева настало као последица ДМ. Чак 72.7% умрлих је било малђе од 60 година (12,16). Трошкови лечења су веома високи, процењује се да је 2015. године широм света за лечење оболелих од ДМ потрошено чак 673 милијарде америчких долара, што представља билзу 12% од укупног светског здравственог фонда (12,17). У

Великој Британији, 80% од укупних трошкова за лечење ДМ се троши на лечење компликација у склопу ДМ (11,18).

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

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

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

### **1.3. Класификација дијабетес мелитуса и дијагностички критеријуми**

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

#### **Етиолошка класификација дијабетеса**

##### **I. Тип 1 дијабетеса**

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

а. Посредован имунолошким процесом

Б. Идиопатски

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

### **III. Други специфични типови дијабетеса**

#### **A. Генетски дефицити функције $\beta$ ћелија услед мутација на гену за:**

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

#### **Б. Генетски условљени дефект у дејству инсулин:**

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

#### **Ц. Дијабетес мелитус услед болести егзокриног панкреаса:**

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

#### **Д. Дијабетес мелитус у оквиру ендокриних болести:**

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

#### **Е. Дијабетес мелитус индукован лековима или хемикалијама:**

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

#### **Ф. Дијабетес мелитус индукован инфекцијама:**

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



## Г. Ретки облици имунолошки посредованог дијабетес мелитуса:

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

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

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

## IV. Гестациски дијабетес (ГД)

### 1.3.1. Дијагностички критеријуми

За постављање дијагнозе ДМ у употреби су дијагностички критеријуми СЗО, у којима је мерило гликорегулације гликемија наше и тест оптерећења глукозом (ОГТТ). Према препорукама СЗО, ради одређивања стања глукозне толеранције ОГТТ је потребно применити код особа са гликемијом наше између 6.1–6.9 ммол/л (23). Табела 1.

Табела 1. Дијагностички критеријуми СЗО за дијабетес и стања хипергликемије

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

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

Поред наведених критеријума актуелни су и Дијагностички критеријуми за дијабетес према Америчкој асоцијацији за дијабетес - *American Diabetes Association* (АДА) који су наведени у табели 2. Међународни експертски комитет, Америчке асоцијације за дијабетес (АДА), Европске асоцијације за студије у дијабетесу (ЕАСД) и Међународне дијабетесне федерације (ИДФ), издао је консензус препорука и поред ОГТТ уврстио *HbA1c* као критеријум и за постављање дијагнозе дијабетеса. Гликозилирани хемоглобин (*HbA1c*) одражава просечну вредност гликемије у плазми током претходна 2–3 месеца у једном

мерењу, које може бити спроведено било када у току дана и не захтева посебне припреме укључујући и стање гладовања (24).

Табела 2. Дијагностички критеријуми за дијабетес према АДА

<i>Дијабетес</i>
<b>1. ХбА1Ц <math>\geq</math> 6.5% или,</b>
<b>2. Гликемија наше <math>\geq</math> 7,0 mmol/l (126 mg/dL) или</b>
<b>3. Гликемија у току ОГТТ-а са 75 g глукозе у 120. минути <math>\geq</math> 11,19 mmol/l или</b>
<b>4. Гликемија у било ком случајном узорку крви (без обзира на оброк) <math>\geq</math> 11,19 mmol/l уз присуство типичних дијабетесних симптома (полиурија, полидипсија, губитак у телесној тежини).</b>

## 1.4. Етиопатогенеза

### 1.4.1. Етиопатогенеза дијабетес мелитуса тип 1

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

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

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

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

1) Аутоантитела на ћелије острвца - *Islet cell autoantibodies (ICA)*: примарна антитела на цитоплазматске протеине ћелија острваца, идентификују се код 85% новооболелих од ДМ тип 1, и предиктор су развоја ДМ тип 1 (28,29).

2) Аутоантитела на инсулин - *Insulin autoantibodies (IAA)*, су често прва аутоантитела која се могу идентификовати, а обзиром да се антитела стварају и на инсулин који се даје у терапијске сврхе, након започињања инсулинске терапије ова антитела се више не могу користити као маркер аутоимуне етиологије ДМ тип 1 (28,29),

3) Аутоантитела на ензим декарбоксилазу глутаминске киселине (*GADA*), присутна су код око 70% пацијената у време постављања дијагнозе (28,29).

4) Аутоантитела на *IA-2* и *IA-2 $\beta$* , ова аутоантитела су у време постављања дијагнозе пронађена у серуму код око 58% пацијената. Обично се појављују касније у односу на аутоантитела на инсулина и *GAD* (28,29).

5) Аутоантитело на цинк транспортер - 8 (*ZnT-8*) присутна су код 60% до 80% пацијената са де ново дијагностификованим ДМ тип 1. Око 26% оболелих од ДМ тип 1 са негативним антителима (*IAA*, *GADA*, *ICA*, *IA-2*) имају *ZnT-8* аутоантитела (28,29).

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

### 1.3.2. Етиопатогенеза дијабетес мелитус тип 2

ДМ тип 2 настаје када бета ћелије панкреаса више нису у могућности да задовоље потребе организма за инсулином. Сматра се да су два патолошка процеса одговорна за настанак ДМ тип 2 (31). Примарни патолошки процес је инсулинска резистенција, односно смањена осетљивост периферних ткива на инсулин. Други процес представља дисфункција  $\beta$  ћелија, које у почетку у циљу компензације инсулинске резистенције појачано луче

инсулин, али временом њихови капацитети се троше и долази до недостатка инсулина.. Инсулинска резистенција је обично присутна неколико година пре постављања дијагнозе ДМ тип 2 (31).

Као и код ДМ тип 1 за испољавање ДМ тип важна је комбинације генетских и фактора спољне средине. У прилог томе говоре резултати испитивања у које су укључене нормогликемичне особа чији су родитељи имали ДМ тип 2, утврђено је да је њихова осетљивост на инсулин иста као код здравих особа које немају позитивну породичну анамнезу за ДМ тип 2 (односи се на најближе сроднике), ако су њихове телесне масе близу идеалних вредности, међутим са повећањем степена гојазности имамо прогресивно смањење инсулинске сензитивности само код особа са позитивном породичном анамнезом за ДМ тип 2. Сматра се да је вероватноћа настанка болести у породици где постоји дијабетес мелитус тип 2 око 3,5 до 4 пута већа него у општој популацији, а и до 6,1 пута већа ако су оболела оба родитеља. (31,32).

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

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

У условима нормогликемије инсулин настаје из проинсулина и секретује се у циркулацију. Од укупне количине излученог инсулина око 10% - 15% чини проинсулин. Међутим у условима инсулинске резистенције проценат излученог проинсулина износи и до 40%. Предпоставља се да је проценат проинсулина повећан зато што је обрада инсулина у бета ћелијама поремећена или услед повећаних потреба за инсулином нема довољно времена за правилно сазревање гранула тако да ослобађају више проинсулина (32).

У секреторним гранулама бета ћелија панкреаса се налази амилин (амилоид полипептид) који се косекретује са инсулином. Примећено је да се код болесника с ДМ тип 2 налази повећана концентрација амилина у ткиву панкреаса. Високе концентрације

амилина смањују преузимање глукозе од стране периферних ткива и секрецију инсулина (32).

У последње време инфламација се издваја као један од најважнијих фактора у патогенези ДМ тип 2. Појачана секреција проинфламаторних цитокина, фактор некрозе тумора алфа (TNF- $\alpha$ ), инхибитор активатора плазминогена 1 (PAI-1), интерлеукина 6 (IL-6), IL-12, IL-8, IL-1 $\beta$ , је доказана код оболелих од ДМ тип 2, као и повишен ниво Ц реактивног протеина (CRP). Потврђено је и да адипокини који се ослобађају из масних ћелија стимулишу запаљенску реакцију, и тиме потенцирају инсулинску резистенцију (32,35).

### **1.3.3. Други специфични типови дијабетеса**

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

### **1.3.4. Гестацијски дијабетес мелитус**

Гестацијски ДМ представља хипергликемију различитог степена, откривену први пут током трудноће, која у већини случајева ишчезава након порођаја. Јавља се код 2-5% свих трудноћа. Не искључује се могућност да је хипергликемија постојала и пре трудноће и да ће се задржати и након порођаја. (36) Као терапија препоручује се придржавање хигијенскодијететског режима, а уколико се ниво гликемије не може контролисати дијететским мерама током трудноће се спроводи терапија инсулином. Тестирање за гестацијски дијабетес се спроводи између 24-28 гестацијске недеље, а тестирање након порођаја у циљу провере гликорегулације у периоду од 4-12 постпорођајне недеље. Дијагноза се може поставити на основу теста оптерећења глукозом са 75 gr глукозе, или се прво уради ОГТТ са 50 gr глукозе, па уколико је позитиван онда се уради и ОГТТ са 100 gr глукозе (36). Фактори ризика за настанак гестацијског дијабетес мелитуса су макрозомија, полицистична болест јајника, гојазност, труднице старије од 25 година, перзистентна гликозурија и породична предиспозиција за дијабетес. Препоруке су да се код жена са гестацијским дијабетесом у личној анамнези, током целог живота сваке треће године спроводи тестирање на дијабетес или преддијабетес, такође током целог живота је неопходно придржавање хигијенскодијететског режима и промена стила живота. Уколико се женама са

историјом ГД открије предијабетес, саветује се промена животног стила, или увођење метформин као превенција дијабетеса (36).

#### 1.4. Клиничка слика

Клиничка презентација ДМ тип 1 и тип 2 може се значајно разликовати. У ДМ тип 1 клиничка слика се креће од потпуно асимптоматског оболења до изражене полидипсије, полиурије и полифагије са губитком у телесној тежини, осећајем умора, што трајати неколико дана до неколико недеља и месеци. Код чак 40% деце старости до 3 године, ДМ тип 1 се дијагностикује у стању дијабетичне кетоацидозе, код деце старије од 6-11 година као и код одраслих овај проценат је значајно нижи. Могући разлог високог процента кетоацидозе као првог симптома код мале деце је немогућност деце да јасно опишу своје симптоме и тегобе, те се оне касно препознају (32,27).

Код ДМ тип 2 пацијенти могу годинама бити без било какве симптоматологије, тако да је код неких од њих у тренутку постваљања дијагнозе већ дошло до развоја хроничних компликација, најчешће микро или макроваскуларних компликација (исхемијска болест срца, цереброваскуларни инзулт, полинеуропатија, ретинопатија, нефропатија) (32,37). Најчешће присутни симптоми као што је умор, парестезије доњих екстремитета, гљивичне инфекције, нарочито баланитис код мушкараца и вагинална инфекција код жена, сметње са видом, интермитентна ноктурија, полидипсија и полифагија могу перзистирати годинама. У случајевима дуготрајно непрепознате хипергликемије може се развити хиперосмоларно стање или кетоацидоза, истина значајно ређе у односу на ДМ тип 1 (37).

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

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

Дијабетес	Тип 1	Тип 2
<b>Клиничка презентација</b>	млађи од 20 година нормално ухрањени снижена секреција инсулина Ат против ћелија панкреаса честа кетоацидоза	углавном старији од 30 година гојазни нормална или повећана секреција инсулин нема Ат против ћелија панкреаса ретка кетоацидоза
<b>Патогенеза</b>	аутоимуни, имунопатогенетски механизам озбиљан инсулински дефицит	инсулинска резистенција релативан инсулински дефицит

<b>Генетика</b>	50% удруженост код близанаца повезаност са HLA	60-80% удруженост код близанаца нема повезаности са HLA
<b>Ћелије острваца панкреаса</b>	рани инсулитис атрофија и фиброза озбиљна ћелијска деплеција	нема раног инсулитиса фокална атрофија и депозити амилоид умерена ћелијска деплеција

## 1.5 Компликације дијабетес мелитуса

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

### 1.5.1 Акутне компликације

Акутне компликације дијабетес мелитуса су дијабетесна кетоацидоза, хиперосмоларно хипергликемично стање, хипогликемија и лактатна ацидоза (22,38).

#### 1.5.1.1 Дијабетесна кетоацидоза

Дијабетесна кетоацидоза представља најчесталију и најтежу акутну компликацију дијабетеса, са високом стопом морбидитета. Карактеристична симптоматологија је: хипергликемија, хиперкетонемија уз метаболичку ацидозу, то уједно представља и дефиницију дијабетесне кетоацидозе. Дијагностички критеријуми за дијабетесну кетоацидозу су: гликемија  $> 14 \text{ mmol/l}$ ,  $pH$  крви  $< 7.3$ , ниво бикарбоната  $< 15 \text{ mEq/l}$ , уз присутну кетонурију или кетонемију. (22) Преваленца кетоацидозе представља добар индикатор квалитета лечења. Узрок дијабетесне кетоацидозе може бити: неадекватна доза инсулина, бактеријске или друге инфекције, акутни инфаркт миокарда, цереброваскуларни инзулт, трудноћа, употреба опијата, грубље грешке у исхрани уз примену недовољних доза инсулина као и емоционални стрес, нарочито код адолесцената с рекурентном дијабетесном кетоацидозом. Манифестује се појавом мучнине и повраћања, жеђи, болова у стомаку, слабошћу мишића, грчевима у ногама, тахикардијом, тахипнеом (Кусмаулово дисање), дехидрације, хипотензије, слетаргије, а може настати и кома (22,38).

#### 1.5.1.2. Лактатна ацидоза

Лактатна ацидоза је метаболичка ацидоза праћена порастом нивоа лактата у крви више од  $5 \text{ mmol/l}$ . Морталитет је висок и достиже чак 30%. У патогенези лактатне ацидозе лежи дисбаланс између продукције и реутилизације лактата. До повећане продукције лактата може доћи: у условима ткивне хипоксије, смањеног клиренса (шокна стања, ацидоза или отежана глуконеогенеза у јетри), или њиховим комбинованим присуством. Лактатна ацидоза у дијабетесу може бити присутна асимптоматски, а третман се заснива на адекватној надокнади бикарбоната (22).

### 1.5.1.3 Дијабетесно хиперосмоларно стање

Дијабетесно хиперосмоларно некетогено стање карактерише: хипергликемија (која може ићи и до  $50 \text{ mmol/l}$ ), дехидратација са пререналном уремијом, депресија функције нервног система са могућом комом, а кетоза није присутна. Значајна карактеристика овог стања је хипергликемија без кетонурије и ацидозе. Дијабетесно хиперосмоларно стање настаје углавном код старијих пацијената са дијабетес мелитусом тип 2, а манифестује се вишедневном полиуријом, смањеним уносом течности и развојем менталне конфузије до летаргије и коме. (22,38)

Дијагностички критеријуми за дијабетесно хиперосмоларно стање су: гликемија  $> 33 \text{ mmol/l}$ ,  $\text{pH kрvi} > 7.3$ , хиперосмоларност ( $> 350 \text{ mOsm/l}$ ), ниво бикарбоната  $> 15 \text{ mEq/l}$ , уз минималну или одсутну кетонурију или кетонемију. Концентрација јона  $\text{Na}^+$  у плазми зависи од укупног губитка воде (22).

### 1.5.1.4 Хипогликемија

Хипогликемија представља стање снижене вредности серумске гликемије, граница испод које се вредност гликемије сматра сниженом креће се од  $3,5\text{-}3,9 \text{ mmol/l}$  уз пратеће симптоме, а уколико је вредност испод  $2,5\text{-}2,8 \text{ mmol/l}$  симптоми не морају бити присутни. (38) Најчешћи пропратни симптоми су: слабост, малаксалост, умор, презнојавање, главобоља, конфузност, палпитације, поспаност, сметње у виду. Могући узроци хипогликемије су: неадекватна доза инсулина, смањен унос глукозе, повећана потрошња глукозе, (већа физичка активност), смањена ендогена продукција глукозе (услед конзумирања алкохола и неких лекова), повећана инсулинска сензитивност (физичка активност, боља гликорегулација, губитак телесне масе, лекови) и смањен клиренс инсулина (ренална инсуфицијенција) (22).



## **1.5.2. Хроничне компликације**

Независно од типа дијабетеса, хроничне компликације се могу поделити на васкуларне и не васкуларне. (38)

### **1.5.2.1. Неваскуларне компликације**

У не васкуларне компликације ДМ убрајају се: учестале инфекције (у склопу ДМ постоји општа склоност ка инфекцијама), као што су акутни циститис, акутни и хронични пијелонефритис, папиларна некроза, перинефритички апсцес, инфекције респираторног и гастро тракта, гљивичне мукокутане инфекције, поремећаји у склопу гастро тракта (учестало повраћање, дијареје), затим депресије и деменције код оболелих се такође повезује са ДМ. (39,40)

### **1.5.2.2. Васкуларне компликације**

Васкуларне компликације настале у склопу ДМ могу се поделити на - микроваскуларне компликације у које спадају нефропатија, ретинопатија, и неуропатија и макроваскуларне атеросклеротске компликације, где спадају коронарна артеријска болест, болест периферних артерија и цереброваскуларна болест. Према истраживањима *Krentz-a* и сарадника и *Al-Wakeel* и сарадника микроваскуларне и макроваскуларне компликације се развијају симултано, док *Matheus u Gomes* тврде супротно. (41,42,43)

#### **1.5.2.2.1. Макроваскуларне компликације**

Основни патогенестки процес који је одговоран за настанак макроваскуларних компликација у склопу ДМ је убрзана атеросклероза. Услед инсулинске резистенције и последичне хипергликемије активирају се хронични инфламаторни процеси, интезивира се производња завршних продуката гликозилације (*advanced glycation end-products AGEs*) и повећава митохондријална продукција слободних кисеоничних радикала (*ROS*), који пак блокирају два кључна антиатеросклеротка ензима азот оксид синтетазу (*eNOS*) и простациклин синтетазу. У процес инфламације су укључени бројни хемокини међу којима се издваја моноцитни хемоатрактантни протеин-1 (*MCP-1*), који игра важну улогу у развоју раних атеросклеротских промена. *MCP-1* поспешује трансформацију моноцита у макрофаге

који затим инфилтрирају зид крвног суда, стимулише продукцију цитокина, *IL-6*, *TNF- $\alpha$* , затим потенцирају пролиферацију глатке мускулатуре и појачано депоновање колагена. Услед наведених промена нарушава се нормална структура зида крвног суда, као и ендотелна функција што доводи до стварања атеросклеротских плакова, повећава се склоност ка коагулацији, појачава се агрегабилност тромбоцита, а услед повећаног нивоа инхибитора активатора плазминогена 1 нарушава се процес тромболизе (39,44).

ДМ представља снажан независни предиктор ризика од можданог удара, цереброваскуларних болести и болести коронарних артерија. Жене са ДМ у животној доби изнад 40 година, имају значајно виши ризик за смртни исход изазван исхемијском болешћу срца (45).

#### **1.5.2.2.2. Микроваскуларне компликације**

Микроваскуларне компликације у склопу ДМ су: дијабетесна нефропатија, ретинопатија и неуропатија.(39) Ове компликације представљају захватање ситних крвних судова као што су артериоле, капилари и венуле, а они су одговорни за контролу пермеабилности крвних судова, мишићног тонууса који прилагођава проток крви метаболичким потребама ткива. ДМ изазива патогномичне промене у малим крвним судовима, захватајући базалну мембрану артериола у гломерулу, ретини, миокарду, кожи и мишићима, доводећи до њеног задебљања (39).

##### **1.5.2.2.2.1. Дијабетесна нефропатија**

Дијабетесна нефропатија (ДН) је хронична микроваскуларна компликација ДМ, која се испољава као клинички синдром који карактерише перзистентна албуминурија (вредност албумин/креатинин односа (UACR) > 300 mg/g), хипертензија, стално прогресивно снижење јачине гломерулске филтрације (ЈГФ) и пораст учесталости кардиоваскуларних догађаја и кардиоваскуларних догађаја са смртним исходом (31). У току развоја ДН разликујемо 5 развојних фаза: 1. Фаза гломерулске хиперфилтрација, 2. Фаза нормоалбуминурије, 3. Фаза инципијентне нефропатије (микроалбуминурија, 30-300 mg/24h), 4. Фаза манифестне протеинурије, 5. Фаза бубрежне инсуфицијенције (46). Појава микроалбуминурије је први манифестни знак дијабетесне нефропатије, може трајати годинама, а као таква штетно утиче на функцију бубрежних структура. Микроалбуминурија означава повишену уринарну екскрецију албумина у интервалу од 30-300 mg/24h у бар два узастопна узорка урина у периоду од три до шест месеци. (*National Kidney Foundation Kidney disease Outcomes Quality*

*Initiative KDOQI 100*) (46). Промене у склопу прве три фазе су реверзибилне. Микроалбуминурија даље прогредира ка макроалбуминурији ( $UACR > 300 \text{ mg/g}$ ) затим ка протеинурији (макропротеинурија преко  $500 \text{ mg/24h}$ ), која када се једном јави, води даљем паду ЈГФ. (46,47)

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

Два главна фактора ризика за развој дијабетесне нефропатије (ДН) су лоша гликорегулација и дужина трајања ДМ (48). Механизми којима хипергликемија изазива ДН су комплексни и многобројни, међу њима се као главни издвајају: поремећај реналне хемодинамике, поремећен метаболизам глукозе, исхемија, појачан оксидативни стрес, инфламација и појачана активност ренин ангиотензин система на нивоу бубрега (47).

У условима нормалне гликорегулације 90% глукозе која је филтрирана у гломерулима се реапсорбује у *S1* сегменту проксималног тубула преко *SGLT2* рецептора на четкастом епителу, а само 10 % преко *SGLT1* рецептора који се налазе у каснијим деловима проксималних тубула (49). У условима хипергликемије услед велике количине глукозе која се филтрира у гломерулу и покушаја проксималног тубула да реапсорбује ту глукозу, долази до хипертрофије проксималног тубула. Апсорбција глукозе и натријумхлорида преко *SGLT2* рецептора је повезана, па услед хипертрофије проксималног тубула и појачане реапсорбције глукозе појачана је и реапсорбција натријумхлорида, због тога мања количина натријумхлорида стиже у дистални тубул што макула денса препознаје као снижену ЈГФ и услед тога смањује тубулогломеруску повратну спрегу (*tubuloglomerular feedback TGF*) (46,49). *TGF* је механизам којим макула денса контролише вазоконстрикцију аферентне артериоле отпуштањем аденозина, и других сигналних молекула. Блокирањем *TGF* долази до вазодилатације аферентне артериоле посредством вазоактивних медијатора као што су инсулину сличан фактор раста 1 (*IGF-1*), азот моноксид (*NO*), простагландини, глукагон (48,49). Истовремено услед појачаног локалног дејства ангиотензина II у условима хипергликемије имамо појачану вазоконстрикцију еферентне артериоле и последични поремећај ауторегулације са развојем интрагломерулске хипертензије. Тако у дијабетсној болести бубрега имамо испољен „натријум парадокс“, што је у исхрани рестрикција натријумхлорида већа то мања количина натријум хлорида стиже у дистални тубул и ЈГФ се повећава. ЈГФ може бити повећана и до 40% у односу на нормалне вредности. (49). У условима нормогликемије осцилације у системском перфузионом притиску се не преносе

на интрагломерулски притисак због строге ауторегулације, али с обзиром да је код дијабетес мелитуса ауторегулација компромитована, системски перфузиони притисак се слободно преноси на капиларну гломерулску мрежу. (46,49).

Функционалне промене у протоку крви и гломерулском притиску провоцирају настанак структурних промена. Повећан интрагломерулски притисак механичким путем оштећује ендотелну површину гломерулских капилара, ремети нормалну структуру гломерулске баријере, индукује експресију цитокина и фактора раста који изазивају појачану синтезу колагена, фибронектина, ламинина и слично. Хиперфилтрација је удружена са гломеруломегалијом и увећањем бубрега. Гломеруларно увећање настаје услед повећања броја капиларних петљи са последичним повећањем филтрационе површине и умножавањем мезангијалног матрикса (47). Поред гломерула промене захватају и тубуларне ћелије у смислу пролиферације и повећања целуларне величине. Механизми којим повећана концентрација глукозе у крви изазива хипертрофију подразумевају стимулацију и појачану експресију више фактора раста у бубрегу, укључујући инсулину сличан фактор раста (*IGF-1*), епидермални фактор раста, тромбоцитни фактор раста (*PDGF*), васкуларни ендотелни фактор раста (*VEGF*) и трансформишући фактор раста бета1 (*TGF-β1*) (47,50).

#### 1.5.2.2.1.1. Улога протеин киназе Ц

Један од главних нежељених ефеката хипергликемије јесте појачана активација протеин киназе Ц (*PKC*). *PKC* је ензим из породице серин-треонин киназа који регулишу различите васкуларне функције укључујући контрактилност, проток крви, ћелијску пролиферацију и васкуларну пермеабилност. Активност *PKC* код болесника са ДМ је посебно повећана на површини ћелија ретине, аорте, срца и гломерулским ћелијама укључујући подоците, предпоставља се због појачане де ново синтезе диацилглицерола који је главни ендогени активатор *PKC* (51). Постоји више изоформи *PKC*, али се сматра да је за патогенезу ДН највише одговорна *PKC α*. Главна улога *PKC α* је у појачаној ендоцитози нефрина који је једна од главних компоненти слит дијафрагме (СД) (52). Појачана експресија *PKC α* на подоцитима у особа са ДМ повећава ендоцитозу нефрина и тиме доводи до нестабилности СД (53).

Поред *PKC α* у патофизиологији ДН значајну улогу игра и изоформа *PKC β*. Док је *PKCα* одговорна за појаву албуминурије и нарушавање структуре гломерулске филтрационе баријере, *PKC β* је одговорна за хипергликемијом изазвану реналну фиброзу, преко усходне

регулације *TGF-β* који доприноси развоју гломеруларне фиброзе. Поред *PKC β* на дејство *TGF-β1* утиче и *PKC α* која им улогу у сигналном одговору након активације *TGF-β1* (51).

Изоформа *PKC с* која бива активирана од стране *AGEs* доводи до појачане експресије на подоцитима *VEGF164* и *VEGF165* изоформи које код анималних модела доводе до структурних и функционалних реналних промена које се виде код ДН, укључујући протеинурију, гломерулску хипертрофију, задебљање гломерулске базалне мембране, пролиферацију мезангијума и губитак СД и стопаластих продужетака (53).

#### **1.5.2.2.2.1.2. Ефекти завршних продуката гликозилације**

Хронична хипергликемија доводи до неензимске гликозилације аминокиселина и протеина. Глукоза се неензимски везује за слободне аминок групе формирајући нестабилне продукте – *Schiff-ove* базе. Додатним реаранжманом формирају се нешто стабилнији али још увек реверзибилни Амадори продукти. Током времена ови продукти претрпе додатна умрежавања и претварају се у иреверзибилне завршне продукте гликозилације (*AGEs*). *AGEs* посредују у различитим ћелијским активностима укључујући експресију и адхезију молекула, ћелијску хипертрофију, синтезу екстрацелуларног матрикса, епително мезенхимску трансформацију тубулских ћелија, инхибицију синтезе азот монооксида. Могу се везати за различите врсте ћелија, укључујући макрофаге и мезангијалне ћелије. Везујући се за макрофаге доводе до повећаног стварања и ослобађања проинфламаторних медијатора: *TNF-α*, интерлеукина тромбоцитног фактора раста (*PDGF*), *IGF-1*. Ослобођени медијатори стимулишу мезангијске ћелије на појачану синтезу мезангијалног матрикса што доприноси гломерулосклерози (48,54). *AGEs* стимулишу епителне ћелије проксималних тубула на појачану синтезу и ослобађање *TGF-β1* што доводи до фиброзе тубулоинтерстицијума (55). *AGEs* своје ефекте испољавају преко рецептора *RAGE*. *RAGE* се налазе на површини тубулских ћелија и у мањој мери на гломерулским ћелијама. Након стварања комплекса *AGEs - RAGE* у ћелијама се појачано стварају слободни кисеонични радикали који доводе до апоптозе ћелија. Једна од функција *RAGE* је активација нуклеарног фактора *κβ* који је значајан за одклањање – клиренс *AGEs*. (54,55).

#### **1.5.2.2.2.1.3. Ефекти сорбитола**

Хипергликемија стимулише полиолски пут метаболизма глукозе и појачано стварање сорбитола. У ткивима у која глукоза улази независно од инсулина, као што су ретина, очно сочиво, бубрег, хронична хипергликемија доводи до пораста концентрације глукозе. (46). Глукоза у реналне ћелије улази преко *GLUT-1* рецептора који се налазе на површини ћелија.

Повећана концентрација глукозе у крви доводи до појачане експресије *GLUT-1 mRNA* и појачане продукције *GLUT-1* протеина у мезангијалним ћелијама што за последицу има појачан улазак глукозе у ћелије (54,57). Повећана концентрација глукозе у ткиву доводи до нагомилавања сорбитола који настаје као последица повећаног метаболизма глукозе уз деловање ензима алдозо-редуктазе (*AP*). Активност *AP* зависи од никотинамид аденин динуклеотид фосфата (*NADPH*). Депоновање сорбитола у епителним ћелијама проксималних тубула доводи до смањења слободног миоинозитола, смањења активности *Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze*, повећања потрошње кофактора ензима *NADPH* и *NAD<sup>+</sup>*, што има за последицу промену у ћелијском оксидативном потенцијалу и поремећај ћелијске функције (48,54).

#### **1.5.2.2.1.4. Ренин ангиотензин систем у дијабетској нефропатији**

Код болесника са ДМ повећана је локална активност ренин ангиотензин систем (*RAS*), тј. повећана је активност у гломерулу и реналним крвним судовима. Повећано је стварање проренина, а проренин се веже за специфичне проренин-ренин рецепторе, након чега долази до неензимске активације проренина у ренин, затим ренин изазива локално стварање ангиотензина II. Парадоксано појачаној активности *RAS -a*, плазма ренинска активност је ниска, претпоставља се због пораста екстрацелуларног волумена (48). Појачана је експресија ангиотензин тип 1 рецептора (*AT-1R*), преко којих ангиотензин II као снажан вазоконстриктор изазива вазоконстрикцију еферентне артериоле, што уз дилатацију аферентне артериоле доводи до пораста хидростатског притиска у гломерулским капиларима и пораста гломерулске филтрације. Повећана активност ангиотензина II доводи до пораста и системског крвног притиска (48,54). Поред хемодинамског ефекта ангиотензин II директно стимулише реналну продукцију *TGF-β1* у мезангијуму и епителним тубуларним ћелијама, подстиче стварање и других цитокина и фактора раста у реналним ћелијама као што су ендотелин-1, моноцитни хемотаксични протеин – 1 (*MCP-1*), *IL-6*, *RANTES*, остеопонтин (6,54). Ангиотензин II повећава ослобађање *VEGF* из подцита што доприноси поремећају филтрационе баријере и прогресије протеинурије. Сви ослобођени медијатори доприносе развоју гломерулосклерозе, ожиљавању тубулоинтерстицијума. Алдостерон такође убрзава прогресију реналног оштећења независно од ангиотензина II. Споредена испитвања су доказала да блокадом рецептора за минералокортикостероиде се снижава протеинурија (54). Инхибитори ангиотензин конвертујућег ензима (*ACE* инхибитори) поред снижавања интрагломерулског притиска редукују реналну експресију *TGF-β1* (55).

#### 1.5.2.2.1.5. Инфламација у дијабетесној нефропатији

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

Најзначајније инфламаторне ћелије које су укључене у развој дијабетесне нефропатије су макрофаги (M1 и M2 макрофаги) и Т лимфоцити. M1 макрофаги активирани *Th1* ћелијама повећавају инфламаторни одговор појачаном експресијом цитокина (интерлеукина, тумор некрозис фактора, и интерферона  $\gamma$ ), за разлику од њих M2 макрофаги активирани *Th 2* ћелијама доводи до појачане експресије антиинфламаторних цитокина. M1 макрофаги појачавају инфламаторни одговор и појачаном продукцијом слободних кисеоничних радикала (35).

У ДМ типу 1, Т лимфоцити се акумулирају у јукстагломерулском ткиву што доводи до појачане гломерулске секреције албумина и смањења јачине гломерулске филтрације (26). *Lei* и сарадници су потврдили позитивну корелацију између *CD8* лимфоцита у циркулацији са албуминуријом код болесника са ДМ типом 2 (35,54).

Бројни хемокини су укључени у инфламаторни одговор у ДН, међу њима најзначајнији и први описани је моноцитни хемоатрактантни протеин-1 (*MCP-1*), који игра и важну улогу у раној фази развоја атеросклерозе. *MCP-1* утиче на трансформацију моноцита у макрофаге, који затим појачано продукују цитокине *IL-6*, *TNF- $\alpha$* , а они пак доводе до почетних атеросклеротских промена у зиду крвног суда што резултује прогресијом болести (35). *Takebawasahi* и сарадници су потврдили код пацијената са присутном албуминуријом присуство повишене вредности *MCP-1* у циркулацији (58). Предпоставља се да се *MCP-1* не синтетише само у васкуларном зиду већ и у тубуларним епителним ћелијама (35).

Још је 1991. године по први пут сугерисано да инфламаторни цитокини учествују у развоју ДН. Данас се зна да инфламаторни цитокини играју веома важну улогу у развоју ДН и да су укључени у развој микроангиопатских компликација ДМ (35).

Код оболелих од ДМ појачана је секреција проинфламаторних интерлеукина 1, 6, 18 (35,59). Интерлеукин 1 (*IL-1*) изазива појачану експресију адхезионих молекула у гломерулским ендотелним ћелијама и другим бубрежним структурама. У мезангијалним ћелијама и епителним тубуларним ћелијама бубрега појачава експресију интрацелуларног адхезионог молекула-1 (*ICAM-1*), као и Е селектина, додатно *IL-1* индукује синтезу простагландина Е2 у мезангијалним ћелијама што доводи до промена у гломерулској хемодинамици. *IL-1* модификује васкуларну пропустљивост и повећава експресију

хемокина што води ка пролиферацији и синтези екстрацелуларног матрикса у мезангијуму (26,29). Интерлеукин 6 (*IL-6*) везано за ДН има плејотропне ефекте, има директан ефекат на гломерулску инфилтрацију ћелијама, пролиферацију екстрацелуларног матрикса, задебљање гломерулске мембране, сматра се одговорним за прогресију ДН (35,59,60). Интерлеукин 18 (*IL-18*) у бубрегу особа са ДМ синтетишу Т лимфоцити, макрофаги, моноцити и ћелије проксималних тубула. Он појачава експресију *ICAM-1*, као и продукцију других инфламаторних цитокина у мезангијалним ћелијама, сматра се одговорним са ендотелну апоптозу. Његова концентрација је повећана код болесника са ДН. Потврдјена је директна корелација између *IL-18* и појачане уринарне екскреције албумина, чак се по неким ауторима сматра раним показатељем дијабетесне нефропатије (35,59).

*TNF α* има вишеструку улогу у инфламаторном одговору, синтетишу га моноцити, макрофаги и Т лимфоцити као и неке ћелије бубрега. Доводи до активације секундарних гласника, транскриптивних фактора, фактора раста, адхезионих молекула, експресије или синтезе других цитокина. Када се *TNF α* веже за рецептор на површини ћелије, активира више сигналних путева, који доводе до експресије одређених гена у бубрежним ћелијама што на крају резултује апоптозом или некрозом. *TNF α* као и претходно наведени интерлеукини у реналним структурама мења хемодинамику унутар гломерула, повећава васкуларну пермеабилност, повећава инфилтрацију инфламаторним ћелијама, појачано стварање екстрацелуларног матрикса, појачану продукцију слободних кисеоничних радикала (35,59,60).

Адхезионе молекуле *ICAM-1* и *VCAM-1* омогућавају везивање леукоцита за васкуларни зид и њихов улазак у интиму, где луче протеолитичке ензиме одговорне за оштећење ткива и развој атеросклерозе (35,59).

Адипонектин и резистин су први описани адипокинихормони које луче адипоцити и који могу мењати активност инсулина. (35,59).

#### **1.5.2.2.2.1.6. Оксидативни стрес у дијабетесној нефропатији**

Оксидативни стрес игра значајну улогу у развоју микроваскуларних компликација ДМ. Метаболичке абнормалности у ДМ, а пре свега хипергликемија доводи до појачане продукције слободних кисеоничних радикала (РОС) у митохондријама. Појачана продукцију РОС на нивоу митохондрија изазива активирање пет главних путева укључених у развој микроваскуларних компликација ДМ. То су: полиолски пут, повећано стварање АГЕс, појачана експресија рецептора за АГЕс и активирање лиганда, активација *PKC* изоформи и повећана активност хексозаминског пута (35,61). Механизми којима ови путеви

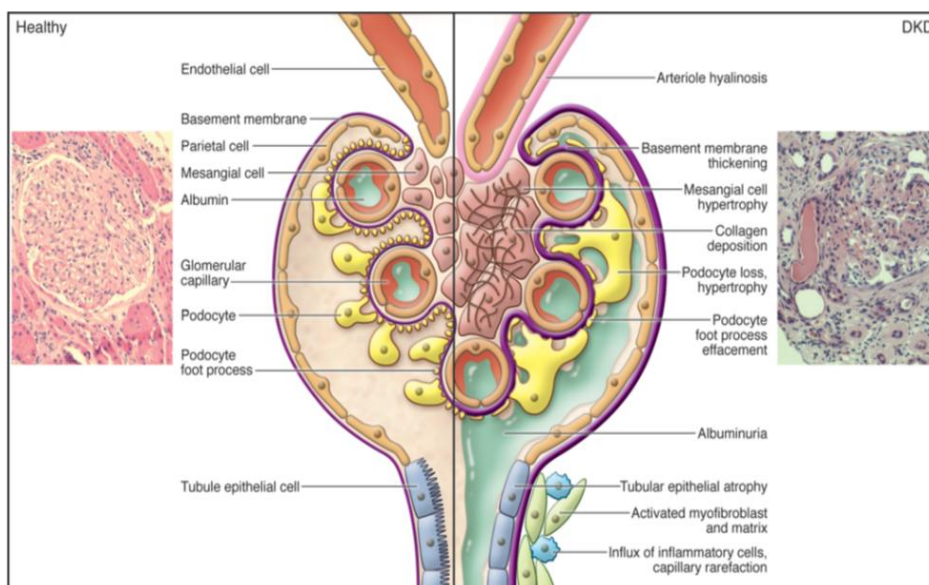


доведе до развоја ДН су описани у претходном делу текста. У условима хипергликемије и инсулинске резистенције глюкоза након уласка у ћелију прелази у глюкозу 6-фосфат, затим у фруктозу 6-фосфат, и уместо укључивања фруктозе 6-фосфата у гликолизни пут разградње као што се дешава у стању нормогликемије, он под дејством ензима фруктозе 6-фосфат аминотрансферазе (*GFAT*) прелази у глюкозамин 6-фосфат, који се даље конвертује до *UDP-N*-ацетилглюкозамина након чега улази у ћелијско једро. У једру *UDP-N* ацетилглюкозамин мења активност транскриптивних фактора што води појачаној синтези *TGF-β1* и *PAI-1*. (60).

Преко наведених путева, повећана концентрација интрацелуларних РОС изазива промену у ангиогенези као одговор на исхемију, активира бројне проинфламаторне путеве и изазива дугоделујуће епигенетске промене. Ове епигенетске промене воде ка перзистентној експресији проинфламаторних гена и након нормализације глюкозе у крви (такозвана „хипергликемијска меморија“) (59). Перзистентна експресија проинфламаторних гена остварује се преко више сигналних путева али се посебно истиче значај *JAK/STAT* (61).

#### 1.5.2.2.1.7. Структурне промене у бубрезима

Микроскопске промене на ниво гломерула су хијалиноза артериола, задебљање гломерулске базалне мембране, умножавање мезангијалних ћелија и увећање мезангијалног матрикса са депоновањем колагена, хипертофија и смањење броја подоцита уз губитак стопаластих продужетака (слика 1.) (62).



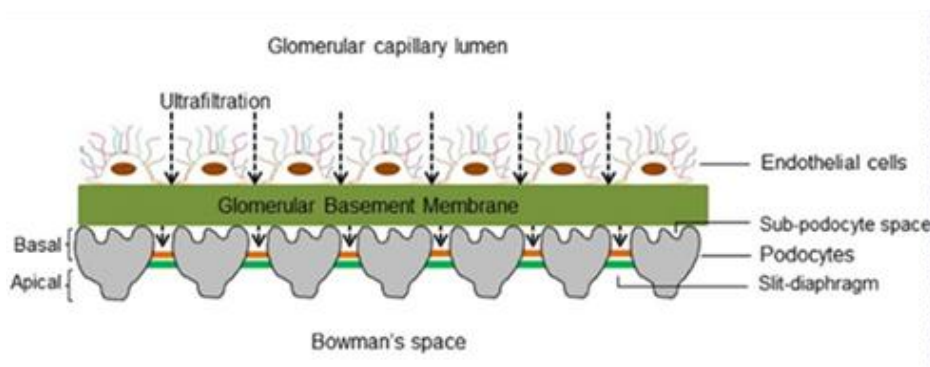
Слика 1. Патолошке промене у гломерулу у склопу дијабетесне нефропатије

Наведене промене доводе до поремећаја пермеабилитета гломерулске филтрационе баријере и појаве албуминурије а касније кроз мембрану пролазе и молекуле веће молекулске масе. Мезангијална експанзија је у негативној корелацији са капиларном филтрационом површином и јачином гломерулске филтрације (62).

Гломерулска филтрациона баријера се састоји од ендотелних капиларних ћелија, базалне мембране и висцералних епителних ћелија тј. подоцита који својим стопаластим продужецима налажу на базалну мембрану (слика 2.) (63). Гломерулска филтрациона баријера је негативног наелектрисања за шта су одговорни хепарин сулфат протеоглици, који улазе у састав микроструктура гломерулске базалне мембране. Поред тога хепарин сулфат протеогликан је снажан инхибитор пролиферације мезангијалних ћелија (64). Сматра се да је генски полиморфизам ензима одговорног за метаболизам хепарин сулфата разлог поремећаја његове синтезе код болесника са лошом гликорегулацијом. Смањеним стварањем хепарин сулфат протеогликана смањује се негативно наелектрисање гломерулске мембране која постаје пропусна за негативно наелектрисане албумине - селективна албуминурија. Напредовањем промена тј. оштећењем подоцита и нарушавањем цитоскелета гломерулске мембране расте величина пора на мембрани што омогућава излазак и протеина веће молекулске масе – неселективна протеинурија (64,54).

#### **1.5.2.2.1.7.1. Подоцитопатија**

У склопу ДН прве и најважније промене на нивоу гломерула дешавају на подоцитима. Подоцити су терминално диферентоване висцералне епителне ћелије које се налазе са уринарне стране гломерулске базалне мембране (ГБМ) и чине око 30% од укупног броја гломерулских ћелија (54). Први пут у литератури подоцити су описани 1929. од стране *Karl Zimmermann* (65). Подоцит се структурно састоји од волуминозног тела са више органела, примарних процесуса и секундарних процесуса или стопаластих продужетака. Стопаласте продужетке су грађени од актинских филамената који играју кључну улогу у везивању подоцита за ГБМ. Стопаласте продужетке суседних подоцита су међусобно повезани адхерентним везама које чине такозвану слит дијафрагму (СД) (Слика 2) (54).



Слика 2. Структура гломерулске филтрационе баријере

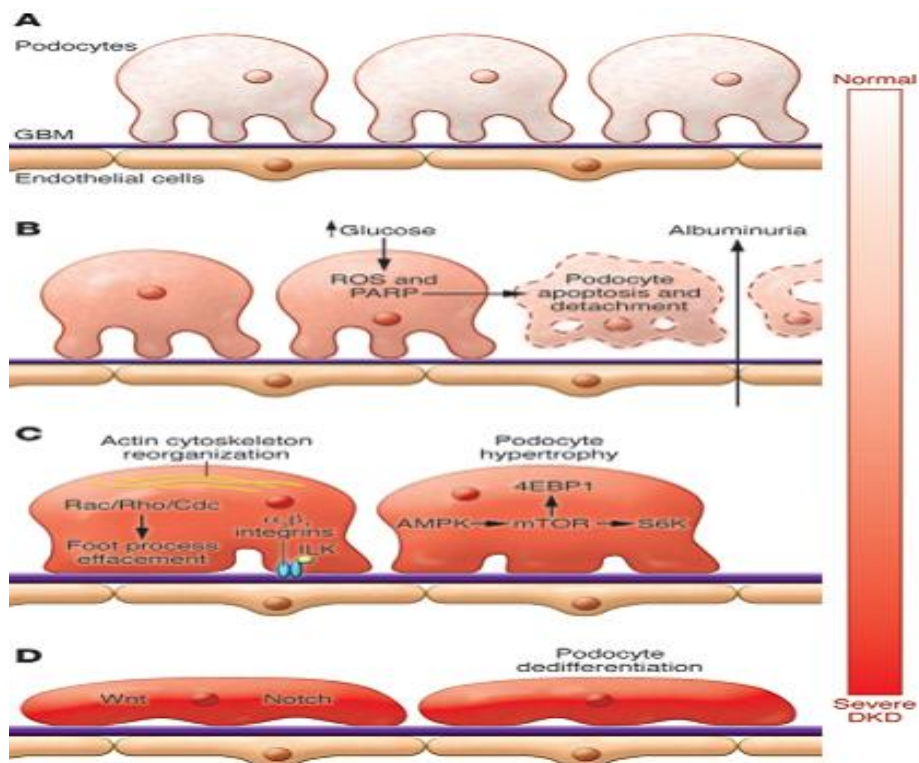
СД диктира пропустљивост ГБМ, тако да кроз њу слободно могу да пролазе само вода и молекуле мале молекулске тежине растворене у води, док је непропустљива за молекуле велике молекулске тежине (54).

Многобројни протеини као што су нефрин, *CD2* удружени протеин, *ZO-1* подоцин, *P*-кадхерин детерминишу структуру СД и одговорни су за селективну пропустљивост СД према величини и облику молекула. Површина подоцита је подељена на два дела: апикалну мембрана и базалну мембрана. Апикална мембрана подоцита је строго негативно наелектрисана захваљујући гликопротеину гликокаликсину и хепарин сулфат протеогликану. Гликокаликсин одбија негативно наелектрисане серумске албумине и онемогућава пролазак албумина кроз гломерулску базалну мембрану. Базална површина подоцита је одговорна за интеграцију подоцита у гломерулску базалну мембрану. Простор између доње површине подоцита тј. стопаластог продужетка и ГБМ означава се као суб-подоцитни простор, он покрива око 50-60% филтрационе површине ГБМ. Суб-подоцитни простор доприноси ултрафилтрационом и хидрауличном отпору што игра веома важну улогу у гломерулској пропустљивост (54).

Од претходно поменутих структурних протеина подоцита који су одговорни за функцију СД по свом значају се издваја нефрин. Нефрин је одговоран за контролу цитоскелетне архитектуре, облик и виабилност подоцита, а има и улогу сигналног молекула. За адекватну гломерулску функцију неопходан је одређени ниво експресије нефрина. Код пацијената са ДМ ниво експресије нефрина на нивоу бубрега је снижен. Код оболелих од ДМ мутације и других гена као што су ген за подоцин *NPHS2*,  $\alpha$ -актин-4 (*ACTN4*), ламинин  $\beta 2$  (*LAMB2*), *TRCP6* и фосфолипазе *Cε1* (*PLCE1*) ремете функцију подоцита и доприносе развоју протеинурије (50,54,66).

Сви претходно наведени механизми којима хипергликемија мења функцију бубрега актуелни су и на нивоу подоцита. Повећан активност РАС локално у бубрегу, повећано стварање *AGEs*, појачана експресија *TGF-β1* и *VEGF*, епително мезенхимска трансформација уз појачану експресију АТ-1Р убрзава апоптозу подоцита. Блокадом АТ-1Р смањује се губитак нефрина и превенира брисање стопалстих продужетака (66). Покреће се заправо читав низ сигналних путева који су приказани на слици који на крају воде до апоптозе подоцита (Слика 3.).

Слика 3. Структурне промене на подоцитима у склопу дијабетесне нефропатије



На основу наведеног закључује се да подоцити играју квантитативно и квалитативно кључну улогу у адекватној гломерулској филтрацији (50,56).

Имајући у виду да су подоцити терминално диферентоване нерегенеративне ћелије њихово оштећење и апоптоза доводе до иреверзибилног смањења броја подоцита и поремећаја пермеабилности гломерулске мембране уз пролазак протеина из циркулације кроз мембрану. Иако су подоцити висцералне епителне ћелије, они имају експресију мезенхимних маркера што у ДМ доводи до њихове епително мезенхимске трансформације (54).

Хипергликемија директно утиче на подоците, нарушавањем њиховог структурног интегритета, вијабилности и функције. Глукоза у подоцит улази углавном преко *GLUT1* и *GLUT4* рецептора. Хипергликемија доводи до појачне експресије *GLUT-1 mRNA* и појачане продукције *GLUT-1* што доводи до појачаног уласка глукозе у подоците. Хипергликемија такође повећава стварање слободних кисеоничних радикала преко *NADPH* оксидазе и индукује апоптозу подоцита активирањем митоген активирајуће протеин киназе *MAPK* и *caspase -3* каскаде (46,54,56). Хипергликемија такође доводи до појачане експресије јонских канала *TRPC6* на површини подоцита што доводи до пораста интрацелуларног  $Ca^{2+}$  и апоптозе подоцита. Један од путева апоптозе јесте активација калцинеурина и нуклеарни фактор активираних Т ћелија (*NFAT2*) услед пораста интрацелуларног  $Ca^{2+}$ , што доводи до *Bax* експресије а затим и апоптозе подоцита (67).

#### 1.5.2.2.1.7.2. Мезангијалне промене

Промене у мезангијуму корелирају са задебљањем ГБМ. Долази до пролиферације мезангијалних ћелија и појачане синтезе екстрацелуларног мезангијалног матрикса, односно стварају се депозити компоненти екстрацелуларног матрикса укључујући колаген тип I, IV и V, ламинин и фибронектин. У каснијем току долази до генералног губитка мезангијалне целуларности уз стварање хомогених ацелуларних нодуса (Киммелстиел-Вилсон) који се примарно састоје од колагена тип IB. Мезангијална експанзија настаје као последица директног дејства хипергликемије и *AGEs* на мезангијалне ћелије, али и посредством повећане синтезе и експресије више фактора раста (46). Највише је испитана улога *TGF- $\beta$ 1*. О механизмима којим *TGF- $\beta$ 1* утиче на пролиферацију мезангијалних ћелија и експанзију екстрацелуларног матрикса делом је писано у претходном тексту а делом ће бити изнешено у посебном одељку о дејству *TGF- $\beta$ 1* на нивоу бубрега. (55).

Поред *TGF- $\beta$ 1* значајна улога приписује се тромбоцитном фактору раста бета (*PDGF- $\beta$* ). Појачана активност *PDGF* изазива појачану експресију гена за *TGF- $\beta$ 1*.(46,68).

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

коцентрације *GH* у плазми. *IGF-1* поред појачане синтезе ламинина, фибронектина, протеогликана и колагена тип IV у мезангијалним ћелијама код особа са ДМ изазива смањену активност матрикс металопротеиназе *MMP2* што доводи до смањене разградње и акумулације екстрацелуларног матрикса, слично дејство има и *TGF-β1* (46,54,56,69).

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

#### 1.5.2.2.1.7.3. Тубулоинтерстицијске промене

У склопу ДН на нивоу тубулоинтерстицијума се јавља задебљање тубулоинтерстицијске базалне мембране, тубуларна атрофија, интерстицијска перитубуларна фиброза и атеросклероза. Најбитније промене за патогенезу ДМ дешавају се на ниво проксималног тубула, где хипергликемија изазва оштећење епителних ћелија проксималног тубула и доводи до нагомилавања фибробласта у перитубулском ткиву (70). Оштећења су посредована: вазоактивним пептидима (ангиотензин II, ендотелин-1), *AGEs*, проинфламаторним цитокинима, факторима раста – *TGF-β1*, полиолским путем метаболизма глукозе, директним и индиректним ефектима протеинурије. Ослобођени медијатори одговорни су за инфилтрацију интерстицијума моноцитима, макрофагима који покрећу додатне инфламаторне процесе. Преоптерећење епителних ћелија проксималног тубула са протеинима доводи до промене ћелијског фенотипа, активације проинфламаторног нуклеарног фактора  $\kappa\beta$  који изазива секрецију низа цитокина и хемокина. Веома битан фактор који доприноси оштећењу тубулоинтерстицијума је и хипоксија која је изазвана прогресивном хијалинозом аферентних и еферентних артериола са последичним губитком перитубуларних капила (46,54,66).

*Tervaret* и сарадници су предложили униформну класификацију морфолошких промена на нивоу бубрега гломерула и мезангијума у ДН према којој разликујемо IV категорије (71):

Тип I: Задебљање гломерулске базалне мембране – присутне су промене на ГБМ уз одсуство експанзије мезангијума, као и нодуларних промена у мезангијском матриксу.

Тип II: Мезангијумска експанзија – дефинише се као повећање мезангијумског екстрацелуларног матрикса тако да ширина међупростора достиже два нуклеуса мезангијумских ћелија у бар два гломерула. Мезангијумска експанзија може бити блага (II а) и тешка (II б).

Тип III: Нодулска склероза (*Kimmelstiel-Wilson* промене) – представљају фокалне, овалне или округле мезангијумске лезије састављене од ацелуларног хијалинизованог језгра које је

окожуено ретким полумесечастим мезангијским једрима. Довољно је да се на препарату види једна упечатљива *Kimmelstiel-Wilson* промена и ако не постоји више од 50% глобалне глоерулске склерозе промене се сврставају у Тип III.

Тип IV: Глобална (дифузна) дијабетесна гломерулокслероза – завршна фаза коју карактерише нагомилавање протеина екстрацелуларног матрикса у мезангијумском простору уз формирање бројних *Kimmelstiel-Wilson* промена.

На основу података из литературе закључено је да су промене на нивоу бубрега у случајевим потпуне контроле гликемије у дужем временском периоду реверзибилне. *Fioretto* и сар. сау доказали да након трансплантације панкреаса код 13 болесника са ДМ тип 1 након 10 година долази до значајне редукације дебљине ГБМ. Услов за реверзибилност промена је вишегодишња нормогликемија, јер се сматра да ћелије бубрега развијају такозвану меморију за хипергликемијске услове, тако да је неопходно више година да се та меморија избрише. Наравно уколико је дошло до развоја значајних склеротичних промена реверзибилност више није могућа (72).

#### **1.5.2.2.1.8. Дијагноза дијабетесне нефропатије**

Пошто је ДН најчешћи узрок ТБИ неопходно је дијагнозу поставити у што ранијем стадијуму и што пре започети лечење. Још увек се као главни дијагностички критеријум користи албуминурија. Према препорукама Америчке асоцијације за дијабетес (*American Diabetes Association - ADA*) и америчке Националне фондације за болести бубрега (*National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF KDOQI)*) за дијагнозу перзистентне микроалбуминурије неопходан је позитиван налаз у бар два од три узорка урина у размаку од 3-6 месеци (24,73). Албуминурија се може одређивати у спот узорку јутарњег урина када је најбоље израчунату албумин/креатинин однос (*UACR*). Нормалном албуминуријом се сматара *UACR* мањи од 30 mg/g, микроалбуминуријом вредност *UACR* измђу 30 и 300 mg/g, макроалбуминуријом вредност *UACR* већа од 300 mg/g. Осим из јутарњег урина албуминурија се може израчунати из узорка 24-часовног урина, где се вредност албуминурије до 150 mg/24h сматра нормоалбуминуријом, микроалбуминурија износи од 150-300 mg/24h, и макроалбуминурија преко 300 mg/24h. Осим анализе урина неопходно је одредити и ниво серумског креатинина у циљу израчунавања ЈГФ (73,74).

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

представља и најјачи независни фактор кардиоваскуларног ризика код оболелих. Код ДМ тип 1 започети скрининг прегледе 5 година након постављања дијагнозе дијабетеса. Преваленца микроалбуминурије код оболелих од ДМ тип 1 варира од 7%-22%, и углавном је присутна код пацијената који имају лошу гликорегулацију (74,75).

Код оболелих од ДМ тип 2 већ у тренутку постављања дијагнозе 6,5% има присутну микроалбуминурију, а око 28% и придружену хипертензију и облитерантну ангиопатију. Микроалбуминурија код ДМ тип 2 није високо специфична за почетну ДН јер она може бити присутна заједно са инсулинском резистенцијом, гојазношћу и повишеим крвним притиском, али у сваком случају представља независни фактор ризика за кардиоваскуларни морбидитет и морталитет. Између 40% и 50% болесника са ДМ тип 2 и континуираном микроалбуминуријом умире од кардиоваскуларних догађаја што је око три пута већи проценат у ондосу на кардиоваскуларни морталитет дијабетичара са нормоалбуминуријом. Код оболелих од ДМ тип 2 са скрининг прегледима за ДН се почиње одмах по постављању дијагнозе (22,76).

Према препорукама *NKF KDOQI* и *ADA*, скрининг прегледи се обављају једном годишње уз обавезну проверу албуминурије и процену ЈГФ. Ако се у спот узорку урина верификује микроалбуминурија, неопходно је израчунати секрецију албумина у урину током 24 часа (24,73).

Уколико се верификује макроалбуминурија код оболелих од ДМ тип 1 у раној фази болести, или је пак присутна брза прогресија албуминурије – протеинурије код оболелих од ДМ тип 2 неопходно је мислити и на друга обољења бубрега, превентивно примарне или секундарне гломерулонефритисе. (22,77)

Код одређеног броја дијабетичара верификовано је значајно снижење ЈГФ али без присутне микроалбуминурије, овај тип дијабетичне болести се означава се као „неалбуминурични“ фенотипи. Он вероватно презентује другачији образац губитка бубрежне функције, а може се испољити и код тип 1 и тип 2 ДМ. Удруженост овог фенотипа показује слабу корелацију са ретинопатијом, степеном гликемијске контроле и хипертензијом, али показује линеарну корелацију са женским полом, непушење цигарета и процентом кардиоваскуларних компликација. Те особе имају тенденцију ка краћој еволуцији ДМ. У једној студији у којој је испитивано 600 пацијената са ДМ тип 2, нормоалбуминуријом и сниженом ЈГФ, показано је да су те особе имале виши степен инсулинске резистенције, виши ниво серумских триглицерида и укупног и *LDL* холестерола, односно израженији метаболички синдром у односу на оне са очуваном ЈГФ (78). Све наведено указује на могућу патофизиолошку повезаност тог фенотипа са макроангиопатијом а не микроангиопатијом. *Krolewski* у свом раду износи теорију да неалбуминурични фенотипи



дијабетесне болести бубрега настаје примарно на терену инфламације и тубулске лезије пре него у склопу гломерулопатије (79), док *Reutens* сматра да кључну улогу у неалбуминуричној дијабетесној болести бубрега имају понављане и нелечене епизоде акутног бубрежног оштећења (80).

Пошто албуминурија као што смо претходно навели не мора увек да буде показатељ почетних промена у склопу ДН покушавају се идентификовати нови биомаркери бубрежног оштећења који би помогли у раном постављању дијагнозе, као и започињању лечења, што би имало за циљ успоравње прогресије ДН. (81) Из досадашњих истраживања издвојило се неколико уринарних биомаркера. Биомаркери гломерулског оштећења: нефрин, VEGF-A, колаген тип IV, трансферин, подокаликсин, албумин, имуноглобулини, церулоплазмин, ламинин, фибронектин, гликозаминогликани. Од тубуларних биомаркера: липокалин са желатиназом неутрофила (NGAL), алфа 1- микроглобулин, молекул оштећења бубрега-1 (*KIM-1*), *MCP-1*, N-acetyl- $\beta$ -D глукосаминидаза, цистатин C, везујући протеин масних киселина јетре (*L-FABP*), и други. (81) Подаци у литератури везани за наведене биомаркере још увек се односе на испитивања која су спроведена на мањем броју пацијената тако да је неопходно планирати студијска испитивања са укључењем већег броја пацијената.

#### **1.5.2.2.2.1.8.1. Уринарни биомаркери**

##### **1.5.2.2.2.1.8.1.1. Трансформишући фактор раста $\beta$ 1**

TGF- $\beta$ 1 је мултифункционални цитокин за који се сматра да игра једну од кључних улога у патофизиологији ДМ. У условима хипергликемије имамо појачано стварање TGF- $\beta$ 1 у готово свим ћелијама бубрега, његова експресија је појачана како у гломерулу тако и у тубулоинтерстицијуму. Доказана је појачана експресија *mRNA* за TGF- $\beta$ 1 у свим структурама у бубрежног ткива. Код оболелих од ДМ, поред хипергликемије на појачану синтезу TGF- $\beta$ 1 утичу: *AGEs*, оксидативни стрес, интрагломерулска хипертензија, активација *PKC*, де ново синтеза диацилглицерола и повишени нивои вазоактивних супстанци као што су ангиотензин II и ендотелин (51). TGF- $\beta$ 1 се сматра главним кривцем за развој реналне фиброзе у склопу ДН. TGF- $\beta$ 1 стимулише синтезу екстрацелуларног матрикса. Рецептори за TGF- $\beta$ 1 могу се уочити на свим структурама гломерула. Као одговор на дејство TGF- $\beta$ 1 мезангијумске и епителне ћелије појачавају синтезу протеогликана, фибронектина, колагена и ламинина. TGF- $\beta$ 1 са друге стране инхибира синтезу колагеназа, а стимулише ткивну продукцију инхибитора матеалопротеиназа смањујући тако активност матрикс металопротеиназа које су иначе одговорне за разградњу екстрацелуларног матрикса. Матрикс металопротеиназе садрже интерстицијску колагеназу, стромелизине и тип IV

колагеназе, међу њима главна колагеназа коју продукују мезангијумске ћелије јесте матрикс металопротеиназа 2 (*MMP-2*). У хуманом биоптичком матреијалу бубрега код болесника са ДН показана је нисходна регулација гена за *MMP-2*. Такође је потврђено да су компоненте матрикса настале као продукти гликозилације резистентне на разградњу(56). У лабораторијским условима је потврђено да систем *TGF-β1* почиње са својом активношћу 48-72 часа после излагања условима хипергликемије. Након 6 дана наступа појачана синтеза фибронектина и колагена IV, док у року од 9 дана наступа хипертрофија гломерула. На анималним моделима (пацови са сатрептозотоцин изазваним ДМ) појачана синтеза протеина матрикса може се смањити применом анти- *TGF-β1*-Ат, док се гломерулска хипертрофија у потпуности превенира (56). Ангиотензин II директно стимулише реналну продукцију *TGF-β1* у мезангијуму и епителним тубуларним ћелијама, такође доводи до усходне регулације експресије рецептора за *TGF-β1*, повећава њихову продукцију и сензитивност мезангијумских ћелија на овај фактор раста (51)

Осим појачане синтезе екстрацелуларног матрикса и његове смањене разградње *TGF-β1* индукује трансформацију тубулских епителних ћелија у фибробласте, овај процес је одговоран за реналну фиброзу као резултат перзистентне инфламације (35,82). Сматра се да инхибиција *TGF-β1* на нивоу проксималног тубула више утиче на смањење албуминурије и реналне фиброзе, док инхибиција на нивоу гломерула више утиче са очување ЈГФ.

Ефекти *TGF-β1* везани за инфламацију остварују се углавном преко *SMAD-ova*. *SMAD* су породица интрацелуларних протеина од којих су неки сигнални молекули а неки транскриптивни фактори који преносе екстрацелуларни сигнал након везивања *TGF-β1* за рецептор до једра а након тога коче или стимулишу експресију одређених гена (35). Познате су три породице *SMAD-ova*: рецептор регулишући *SMAD-ovi* (*R- SMAD*.) где спадају *SMAD 1*, *SMAD 2*, *SMAD 3*, *SMAD 5* и *SMAD 8/9*, затим заједнички-медијатор *SMAD (co- SMAD)* где спада само *SMAD 4* који је у интеракцији са *R- SMAD* и антагонистички или инхибиторни *SMAD-ovi* у које спадају *SMAD6* и *SMAD7*. Кључну улогу у проинфламаторном дејству *TGF-β1* изгледа има *SMAD4*, док је *SMAD7* одговоран за антиинфламаторно дејство. Доказано је да појачана разградња *SMAD7* убрзава фиброзу посредовану са *TGF-β1* (82).

На основу података из литературе можемо закључити да се уринарни *TGF-β1* може сматрати биомаркером реналног оштећења у ДН, ниво *TGF-β1* по неким ауторима корелира са албуминуријом и падом (ЈГФ ). *Min Joeng Kim* и сарадници (83), као и *Yanian Tian* и сарадници су доказали да примена препарата витамина D може редуковати ниво *TGF-β1* у урину са последичним снижавањем албуминурије (84). *Zhang Z.* и сарадници су изнели да примена  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  доводи до нисходне регулације *TGF-β1* сигналног пута снижавајући

експресију *SMAD 3* у бубрежном ткиву (85). Предпоставља се да само инхибиција  $TGF-\beta 1$  у урину, односно супресија на нивоу бубрега има значајна за успоравање прогресије ДН. Супресија  $TGF-\beta 1$  на системском нивоу утиче на метаболизам воде и натријума доводећи до примарнох хипералдостеронизма. Сматра се да би у циљу превенције и успоравања прогресије ДН у будућности требало испититати могућности локалне супресије  $TGF-\beta 1$  (86).

#### 1.5.2.2.2.1.8.2. Нефрин

Нефрин је структурни и сигнални протеин који припада породици имуноглобулини. Нефрин је један од структурних протеина који детерминишу структуру СД и одговоран је за њену селективну пропустљивост. Нефрин је одговоран за контролу цитоскелетне архитектуре, облик и виабилност подоцита (66). За адекватну гломерулску функцију неопходан је одређени ниво експресије нефрина. Код пацијената са ДМ ниво експресије нефрина на нивоу бубрега је снижен. Мутације на нефринском гену *NPHS1* и редукција експресије *NPHS1* је одговорна за поремећај пропустљивости гломерулске мембране и појаву албуминурије. Quack et al. (87) су спроведеним испитивањима дошли до закључка да је један од главних механизма у настанку протеинурије код дијабетичних пацова појачана ендцитоза нефрина, која је посредована комплексом који се састоји од *PKC  $\alpha$* , протеина који је у интеракцији са *c* киназом-1 (*PICK1*) и бета арестина 2. Хипергликемија повећава везивање бета-арестина и нефрина ин витро као и ин виво само уколико томе претходи активација нефрина *PKC  $\alpha$*  фосфорилацијом. Наведена испитивања показују да је експресија *PKC  $\alpha$*  контролисана нивоом глукозе у крви веома битна за одржавање СД (87).

Менне и колеге су доказали да је хипергликемијом изазвана смањена синтеза нефрина вероватно изазвана *PKC  $\alpha$*  посредованом редукцијом транскриптивног фактора *Wilms tumor 1 (WT-1)* који се директно веже за промотор гена за нефрин (88,89).

Поред улоге структурног протеина нефрин има и улогу сигналног протеина који се налази на површини  $\beta$  ћелија панкреаса. Фосфорилација нефрина посредује у ослобађању инсулина из  $\beta$  ћелија панкреаса. Uchida K. и сарадници су на експерименталном нивоу доказали да дефосфорилација нефрина која се дешава у бубрегу у склопу ДН игра значајну улогу у развоју албуминурије (90).

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

Zhang и сарадници тврде да примена препарата витамина Д код оболелих од ДМ и ДН појачава експресију нефрина у култури подоцита (85).

#### 1.5.2.2.1.8.1.3. (VEGF A)

*VEGF A* спада у групу про-агиогених гликопротеина, неопходан је за преживљавање, пролиферацију и диференцијацију ендотелних ћелија, подоцита и мезангијалних ћелија, а сматра се одговорним и за нормалну гломерулогенезу. На нивоу бубрега стварају га подоцити и епителне ћелије проксималног тубула. *VEGF A* заједно са нефрином улази у састав СД и контролишу њену пермеабилност. У условима хроничне хипергликемије његова синтеза и ослобађање су појачани (62). Хистопатолошки налаз биопсије бубрега у раном стадијуму ДН, показује појачану експресију *mRNA VEGF A* (91). Повећана синтеза *VEGF A* снижава ниво експресије нефрина у бубрежном ткиву преко рецептора *VEGFR2*, кочећи фосфорилацију нефрина и поспешујући његову ендцитозу, што изазива поремећај пермеабилности СД и албуминурију (91). *VEGF A* у условима хипергликемије стимулише активност  $TGF-\beta 1$  и доприноси мезангијалној пролиферацији, фибрози а касније и гломерулоскелрози. Такође *VEGF A* снижава ниво азот монооксида уз последичну ендотелну дисфункцију. Високе концентрације *VEGF A* дговоране су за патолошку ангиогенезу како у бубрегу тако и у другим ткивима (56,91).

Изоформа *PKC $\epsilon$*  која бива активирана од стране *AGEs* у условима хипергликемије доводи до појачане експресије на подоцитима *VEGF164* и *VEGF165* изоформи које код анималних модела доводе до структурних и функционалних реналних промена које се виде код ДН, укључујући протеинурију, гломерулску хипертрофију, задебљање гломерулске базалне мембране, пролиферацију мезангијума и губитак СД и стопаластих продужетака (92). *Sun L.* са сарадницима је у мета анализи на 14000 испитаника уочио да *rs 2010963* и *rs 3025039* полиморфизми у оквиру гена за *VEGF* утичу на ризик за развоја ДН нарочито у азијатској популацији дијабетичара (93).

У периоду почетног и умереног оштећења бубрежног ткива ниво *VEGF A* је повишен, међутим временом како оштећење подоцита и ћелија проксималног тубула напредује, како је фиброза све више изражен ниво *VEGF A* се снижава јер су ћелије које га секретује дефинитивно оштећене. На основу спроведених истраживања претпоставља се да ће у будућности кључну улогу у успоравању прогресије ДН имати стабилизација функције подоцита и контрола дејства *VEGF A* (56,91).

#### 1.5.2.2.2. Дијабетесна ретинопатија

Дијабетесна ретинопатија (ДР), представља најчешћу микроваскуларну компликацију у склопу ДМ. Фонг и сарадници су изнели податак да на годишњем нивоу у Сједињеним Америчким Државама 10 000 нових случајева слепила је изазвано ДР. (39) Број оболелих од ДМ код којих се као компликација развија ДР је у сталном порасту, тако је 2010. тај број износио 126,6 милиона, а процењује се да ће 2030. порастати на 191 милион. (39) док ће број оболелих са дијабетесном ретинопатијом опасном по вид порастати са 37,3 милиона на 56,3 милиона. (39, 94) На основу података добијених у *Prospective Diabetes Study (UKPDS)*, доказано је да се ретинопатија код оболелих од ДМ тип 1 развија отприлике након 20 година од постављања дијагнозе, а код оболелих од ДМ тип 2 након 7 година од постављања дијагнозе (95). У *Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes*, Светске здравствене организације, присуство ретинопатије је повезано се инцидентом инфаркта миокарда и смрти изазване кардиоваскуларним болестима (96). Међутим, супротно томе *Matheus and Gomes* су описали пацијенте са кардиоваскуларним догађајима без присутне ретинопатије (43).

Патогенеза ДР је мултифакторијална, сматра се да хипергликемија покреће оштећења посредована појачаном продукцијом *AGEs*, оксидатвним стресом и појачана активација полиолног пута. Услед хипергликемије већа количина глукозе се метаболише у сорбитол уз помоћ алдолазе редуктазе кроз полиолни пут. Нагомилавања сорбитола у ћелијама изазива структурне промене на зидовима малих крвних судова ретине тј. микроанеуризматска проширења, уз задебљање њихове базалне мембране, и поремећај пермеабилитета. Појачана синтеза *AGEs* и слободних кисеоничних радикала такође доприноси развоју претходно наведених промена (39,94).

Фактори ризика за настанак ДР су поред лоше гликорегулације, повећан крвни притисак, дужина трајања дијабетеса, микроалбуминурија и протеинурија, повишен ниво триглицерида и анемијски синдром. Сматра се да повишен холестерол нема утицај на настанак и прогресију ДР, него је задужен за појаву макуларних ексудата и едема (39,94).

У патогенези ДР значајо место заузимају и фактори раста, васкуларни ендотелни фатор раста (VEGF) који је одговоран за неоваскуларизацију и трансформишући фактор раста  $\beta$  (TGF  $\beta$ ). који је одговоран за процес фиброзе (91).

Клинички се ДР дели на непролиферативну и пролиферативну. Код непролиферативне ретинопатије присутне су претходно описане структурне промене на зидовима малих крвних судова, у смислу микроанеуризматских проширења и задебљања базалне мембране, са последичним поремећајем пермеабилности. Приликом прегледа очног

дна микроанеуризматска проширења се виде као црвенкасте тачке а едем ретине је последица поремећене пермеабилности крвних судова, могућа су и мања крварења у средњим слојевима ретине која се означавају као тачкаста крварења (94). Следећа фаза дијабетесне ретинопатије је пролиферативна фаза, коју карактерише неоваскуларизација – стварање нових крвних судова на површини ретине, за шта је одговорна хипоксија и појачано стварање VEGF (91). Даљим напредовањем промена на ретини могућа су крварења из новостворених крвних судова у стакласто тело и аблација ретине што може бити узрок слепило. На очном дну се наведене промене виде као памучне мрље. (94)

#### 1.5.2.2.3. Дијабетесна неуропатија

Дијабетесне неуропатија представља оштећење периферног и аутономног нервног система у склопу ДМ, уз претходно искључење других узрочника полинеуропатије. Готово половина оболелих од ДМ има манифестну полинеуропатију. (97) Тачни патогенетски механизми нису потпуно јасни, али се сматра да хипергликемија покреће оштећења посредована појачаном продукцијом *AGEs*, оксидатвним стресом и акумулацијом полиола.

Класификација дијабетесне неуропатије врши су на основу дела нервног система који је захваћен променама: (97)

1. Дистална симетрична полинеуропатија – најчешћи тип дијабетесне неуропатије, сматра се синонимом за дијабетесну неуропатију. Карактерише је прогресивни губитак дисталног сензибилитета који је у корелацији са оштећењем сензорних неурона, а у тешким случајевима може доћи и до оштећења моторних неурона. Типичан је губитак сензибилитета по типу „чарапе-рукавице“ (98).
2. Аутономна неуропатија - услед неуропатије овог типа може се испољити постурална хипотензија, гастропареза, ентеропатија са пропратним повраћањем, опстипацијом, дијареом, боловима у стомаку, атонија мокраћне бешике (97)
3. Полирадикулопатија – углавном захвата коренове торакалних и лумбалних нерава. (97).
4. Дијабетична неуропатска кахексија - представља редак али препознатљив синдром који се манифестује дифузном полирадикулопатијом која се надовезује на тешку периферну неуропатију, уз губитак у телесној маси и депресију. (97,99)
5. Мононеуропатије - постоје две врсте мононеуропатије, кранијална и периферна мононеуропатија. Кранијална мононеуропатија захвата кранијалне нерве који инервишу екстраокуларне мишиће и то III (*n.oculomotorius*), VI (*n.abducens*), и IV кранијални нерв (*n.trochlearis*). Код ових пацијената је присутна офталмоплегија, бол, птоза капака и

диплопија. Периферна мононеуропатија најчешће захвата *nervus medianus* на горњим и *nervus peroneus* на доњим екстремитетима (97,99).

## **1.6. Лечење и превенција ДМ**

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

У типу 2 дијабетеса пожељна је стриктнија контрола гликемије са циљним вредностима *HbA1c* <6,5% за следеће групе пацијената: 1. са краћим трајањем болести, 2. без кардиоваскуларних обољења, 3. код којих је могуће достићи циљ без ризика од хипогликемија (22).

Мање стриктни циљеви у постизању циљне гликемије и *HbA1c* између 7,5 и 8,0% примењиви су за пацијенте: 1. који не препознају хипогликемије, 2. имају лимитиран животни век, 3. друа обољења уз која је практично немогуће остварити стриктну контролу гликемија чак и на комбинованој терапији (22).

У типу 1 дијабетеса, може се толерисати постпрандијална гликемија <10 mmol/l, уколико се не може постићи постпрандијална гликемија према наведеним критеријумима без хипогликемијских епизода (22).

### **1.6.1. Немедикаментна терапија**

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

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

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

### **1.6.2. Медициментна терапија**

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

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

Медикаментна терапија у типу 2 ДМ не захтева стриктно примену инсулина. Који модалитете лечења ће бити укључен зависи од више фактора, а то су почетне вредности гликемије и *HbA1c*, животна доб болесника, као и придружене болести. Уколико вредности гликемије и *HbA1c* дозвољавају, лечење се започиње хигијенскодијететским мерама. Ако оне не дају задовољавајуће резултате креће се са медикаментозном терапијом. Терапија подразумева индивидуализирану и секвенцијалну примену агенса у 4 основна корака. У сваком од корака, увођење монотерапије или комбинације агенса се одређује индивидуално, узимајући у обзир потребну ефикасност агенса у постизању циљних вредности *HbA1c*, склоност ка хипогликемијским епизодама, промене у телесној тежини при примени агенса, главна нежељена дејства и трошкове примене терапијског агенса (22).

Примена инсулинске терапије има посебно место у медикаментном лечењу типа 2 ДМ, због тога што врло ефикасно омогућава рано постизање и одржавање терапијских циљева. Основни ставови у терапији тип 2 ДМ су: 1. терапијски циљеви и поступци треба да буду индивидуализовани, 2. исхрана, физичка активност и едукација остају неопходна основа успешне медикаментне терапије, 3. ако не постоје ограничења, метформин је лек избора за започињање терапије, 4. ако се на самом почетку болести региструје висок ниво *HbA1c* (> 9,0%), препоручује се започињање терапије комбинацијом оралних агенаса, 5. ако на самом почетку болести пацијент има изражене симптоме хипергликемије, уз изузетно високе вредности гликемија (> 16 mmol/l), или висок *HbA1c* (>10,0%), препоручује се увођење инсулинске терапије која може бити привремена (22).

Инсулин је код дијабетес мелитуса тип 2, као први терапијски избор, индикован само код трудница и уколико је прва манифестација болести дијабетична кетоацидоза, или хиперосмоларно хипергликемично стање.

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

### 1.6.3. Терапија компликација



У лечењу и праћењу пацијената оболелих од ДМ теба регулисати вредности гликемије тако да се компликације јављају што ређе. Уколико се и поред свих мера превенције развију компликације, у зависности од типа компликација ДМ приступа се и лечењу.

### **1.6.3.1. Терапија акутних компликација**

Терапијске мере код акутне кетоацидозе подразумевају адекватну рехидратацију пацијената и надокнада електролита је од виталног значаја. Надокнада течности и електролита мора да се врши лагано, у дужем временском периоду, јер циљ терапије није само постићи нормогликемију, него успоставити електролитни баланс у организму, без последица по живот (22)

Терапијске мере код лактатне ацидозе подразумевају интравенску апликацију бикарбоната до нормализације рН крви. Новији терапијски аспекти подразумевају употребу еквимоларне количине натријум-бикарбоната и натријум-карбоната. Како би се избегла пратећа хипернатријемија препоручује се дијализа. Уколико је терапија бигванидима узрок препоручује се такође дијализа (22).

Терапија хипогликемије зависи од степен хипогликемије, блажи недостатак решава се пер ос узимањем хране од стране болесника, озбиљнија хипогликемија захтева парентералну примену глукозе (22).

Успех терапије код некетогеног хиперосмоларног стања зависи од правовременог постављања дијагнозе, јер је смртност висока најчешће због инфекција и тромбоемболија. Приступ терапији дијабетесног некетогеног хиперосмолалног стања садржи три главна аспекта: 1. иницијална терапија (надоканада течности) 2. терапија тромбоемболијских компликација, 3. каснији антидијабетесни третман.

### **1.6.3.2. Терапија и превенција хроничних компликација**

**Макроваскуларне компликације** - строга контрола гликемије у значајној мери редукује развој макроваскуларних компликација, што је потврђено великом студијом *United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS)*, где је доказано да строжија гликорегулација смањује релативни ризик од развоја инфаркта миокарда (95). Слично доказује и студија *the Prospective Pioglitazone Clinical Trial in Macrovascular Events* где је доказано да употреба Пиоглитазоне у циљу гликорегулације у односу на плацебо групу снижава ризик од кардиоваскуларног морталитета, нефаталног инфаркта миокарда и možданог удара. (45). Осим строжије контроле гликорегулације препоручује се строга контрола крвног притиска

уз употребу лекова из групе АЦЕ инхибитора и блокатора АР, и контрола липидног статуса употребом хиполипемика, нарочито из групе статина (22,45). Размотрити примену аспирина (75–162 mg/дан) као примарну превенцију кардиоваскуларних болести у пацијената са ДМ тип 1 и тип 2 и повишеним кардиоваскуларним ризиком: мушкарци старији од 50 год и жене старије од 60 година који имају бар један фактор ризика (позитивна породична анамнеза за КВБ, хипертензија, пушење, дислипидемија, албуминурија) (22).

**Микроваскуларне компликације:**

**Дијабетесна нефропатија** – према препорукама националног водича добре клиничке праксе за дијагностиковање и лечење ДМ, терапија у фази инципијентне нефропатије, се своди на контролу артеријског притиска (< 130/80 mmHg) и стриктне контроле гликорегулације (успостављање циљних вредности гликемије и *HbA1c* у задовољавајућем опсегу). (22,73) У табелама 4. и 5. су дати терапијски алгоритми за дијабетесну нефропатију.

Табела 4. Терапија инципијентне нефропатије

<i>Терапија инципијентне нефропатије</i>
<b>Стриктна контрола артеријског притиска</b>
ТА < 130/80mmHg (АЦЕ инхибитори, АТ блокатори, диуретици Хенлеове петље, антагонисти калцијумских канала, блокатори алфа адренергијских рецептора и др.
<b>Стриктна контрола гликорегулације</b>
- ДМ тип 1: интензивирана инсулинска терапија
- ДМ тип 2: интензивирана терапија: орални агенси, орални агенси + инсулин, монотерапија инсулином, интензивирана инсулинска терапија

У фази манифестне нефропатије, контрола артеријског притиска сразмерна степену очуване бубрежне функције има највећи значај, док нешто мањи значај има успостављање оптималне гликорегулације а повољан ефекат се може постићи отклањањем поремећаја нивоа липопротеина, анемије, инфекције, редукцијом уноса протеина, као и ранијом применом терапије замене бубрега (22,73).

Табела 5. Терапија манифестне нефропатије

<i>Терапија манифестне нефропатије</i>
контрола артеријског притиска
контрола гликорегулације
отклањање поремећаја нивоа липопротеина
отклањање анемије

отклањање инфекције
редукција уноса протеина (< 0.8 g/kg ТТ)
редукција уноса протеина (< 0.8 g/kg ТТ)

**Дијабетесна ретинопатија** - задовољавајућом гликорегулацијом и редовним контролама, може се спречити или бар одложити развој ДР код великог броја пацијаната оболелих од ДМ. За сада једини терапијски поступак који се показао као ефикасан у лечењу ДР је ласерфотокоагулација под условом да је претходно постигнута задовољавајућа гликорегулација и контрола крвног притиска. У дугорочним студијама као што су *Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)* и *United Kingdom Prospective Diabetes Study* доказано је да се адекватном контролом гликемије може смањити инциденца ДР.(22)

**Дијабетесна полинеуропатија** - основни циљ у лечењу дијабетесне полинеуропатије је смањење бола, тако да се препоручује примена лекова за ублажавање специфичних симптома дисталне и аутономне полинеуропатије. Најчешће се примењују антидепресиви, укуључујући и трицикличне антидепресиве, антиконвулзивни, а повремено и опијатни аналгетици. (22)

## 1.7. Витамин D

### 1.7.1. Историјат

Витамин D спада у групу липосолубилних витамина и већ дуже време се налази у жижи научних истраживања услед многобројних ефеката које остварује у људском организму. Још почетком 20. века научници су указивала на значај овог витамина у минерализацији и развоју скелетног система (100).

Британски научник *Edward Mellanby* је 1919. изавао рахитис код паса хранећи их оброцима који нису садржали млеко, маст, и хлеб и држећи их у затвореном простору, не изалажући их сунчевој светлости. Даљим истраживањем *Mellanby* је утврдио да одређене дијететске мере као што су додавање путера или рибљег уља имају значаја у превенцији рахитиса. Амерички биохемичар *McCullum* је 1922. године вршећи експеримент на пацовима оболелим од рахитиса показао да рибље уље садржи одређени фактор који утиче на превенцију и лечење рахитиса и доделио му назив витамин Д (101)

Немачки физичар *Huldschinsky* је 1919. утврдио корисно дејство излагања ултравиолетном зрачењу (УВ) деце оболеле од рахитиса. Професор биохемије *Steenbock*, је излагао УВ зрачењу и експерименталне животиње и њихову храну и долазио до позитивних закључака, тј. да у храни и кожи постоји одређена липидна фракција која под утицајем УВ

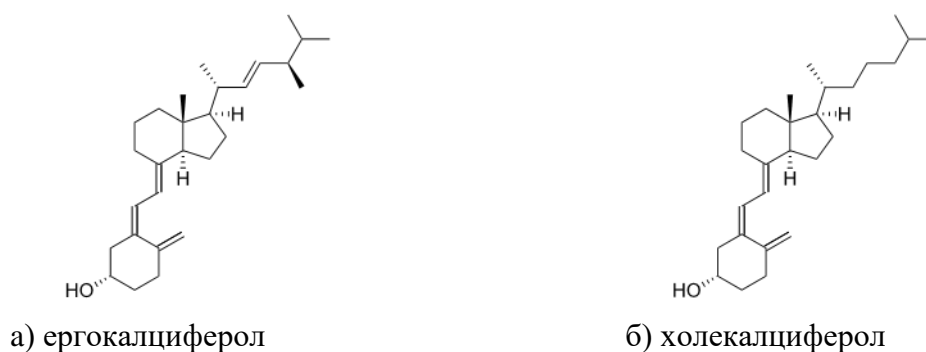
зрака прелази у супстанцу која остварује терапијски ефекат. *Hess-e*, немачки физичар, са својим сарадницима 1925. поставља хипотезу да је супстанца која се активира под УВ зрацима можда холестерол а како би доказао хемијску структуру непознате супстанце 1926. започиње сарадњу са *Windaus-ом*, и *Rosenheim-ом*. Већ током 1926. показали су да је испитивана супстанца хемијски сродна холестеролу. Ову супстанцу означили су прекурсором витамина D. Затим је дефинисана структура витамина D2 а након четири године детерминисана је најпре структуру 7- дехидрохолестерола (*7DHC*) а затим и структура витамина D3 (101).

### 1.7.2. Хемијска структура витамина D и његова синтеза

Витамин D је секостеродни молекул. Под термином витамин D подразумева се више различитих форми једињења који су деривати холестерола а од којих најзначајнији физиолошки ефекат остварују две форме: витамин D2 тј. ергокалциферол и витамин D3, тј. холекалциферол (102). Ове две форме витамина D разликују се међусобно по хемијској структури, пореклу и биолошкој активности. Витамин D2 је „богатији“ за једну двоструку везу између угљеникових C атома на позицији 22 и 23 и једну метил групу на позицији C24. Поред структурне, разлика постоји и у пореклу, ергокалцифеол потиче од биљака док холекалциферол настаје у људској и животињској кожи након излагања сунчевој светлости тј. ултравиолетном зрачењу Б типа (УВБ). Резултати спроведених студија су показали да услед постојећих структурних и метаболичких разлика холекалциферол показује ефекат који је 3 до 4 пута потентнији у односу на ефекат ергокалциферола (103).

Особина витамина D да поред егзогених поседује и ендогени извор чини га јединственим у групи витамина. Квантитет витамина D може бити изражен тежинским јединицама или интернационалним јединицама (ИЈ), при чему 1 ИЈ витамина D одговара 0,025  $\mu\text{g}$  (104).

Слика 1. Хемијска структура а) витамина D2 и б) витамина D3



Са хемијског аспекта посматрања након излагања 7-ДХЦ УВБ зрачењу долази до кидања везе између угљеникових (C) атома на позицији 9 и 10 и последичног формирања двоструке везе на позицији C10 и C19 тј. формирања превитамина D3 (103). Превитамин D3, се налази у свим слојевима коже при чему се око 2/3 налази у епидермису а остатак у дермису. Након синтезе превитамина D3 изомеризацијом под утицајем телесне температуре настаје витамин D3 који је за разлику од превитамина D3 термостабилан. (105).

Након синтезе у кожи, витамин D3 прелази у екстрацелуларни простор одакле бива процесом дифузије дистрибуиран у циркулацију путем које, везујући се за витамин D везујући протеин (*vitamin D binding protein- DBP*), бива транспортован у друге органе. Мишићно и масно ткиво у одређеној мери представљају депо за синтетисани витамин D (106).

Синтеза витамина D2 се састоји из идентичних етапа као и синтеза витамина D3, при чему је полазна супстанца ергостерол који под утицајем УВБ зрачења подлеже фотолитичкој реакцији при којој се формира превитамин D2 који је попут превитамина D3 термо-нестабилан и чијом изомеризацијом настаје витамин D2 (105).

Три основна извора витамина D јесу храна која садржи витамина D, излагање коже сунчевим зрацима и суплементи. Чак 80% серумске концентрације витамина D јесте ендогеног порекла. Храна богата витамином D је: путер, млеко, морска риба, рибље уље, жуманце, цигерица, печурке (105).

### **1.7.3. Фармакокинетика витамина D**

#### **1.7.3.1. Апсорпција витамина D**

Процес апсорпције витамина D, било да је унет путем хране или синтетисан у кожи, се одвија већински у проксималном делу танког црева. Услед липофилне структуре витамина D неопходан фактор за апсорпцију јесте нормална жучна секреција тј. инкорпорирање неполарних молекула витамина D у мицеле жучних соли након чега се могу нормално апсорбовати у течној фази. Апсорпција витамина D, осим секреције жучних соли и мицеларног формирања зависи и од желудачне и панкреасне секреције, процеса дифузије кроз водене слојеве и мембрану четкастог покрива тј. транспорта из интестиналних ћелија. (107).

Код пацијената са одређеним интестиналним обољењима као што су билијарна опструкција, хронични панкреатитис, инсуфицијенција јетре, цистична фиброза, Кронова болест постоји смањење апсорпције витамина D (107).

### 1.7.3.2. Дистрибуција витамина D

Егзогени витамин D након апсорпције у танком цреву се преноси у лимфу, где је присутан у облику хиломикрона, путем које се преноси у циркулацију и везује за витамин D везујући протеин (*DBP*) путем чега се даље преноси у јетру. За разлику од егзогеног, ендогени витамин D се након синтезе у кожи преноси путем крви до јетре помоћу везивних фракција. Транспорт ендогеног витамина D се врши након његовог везивања за *DBP*, у великом проценту, и за албумине плазме, у знатно мањем проценту. Негативан утицај на ниво *DBP* је показан код обољења јетре, нефротског синдрома и малнутриције а на супрот томе позитиван утицај постоји током трудноће и естрогенске терапије (108).

### 1.7.3.3. Метаболизам витамина D

Метаболизам витамина D се врши у јетри и бубрезима. Метаболички пут обухвата две реакције хидроксилације које се одвијају у присуству ензима цитохрома П450 који функционишу као оксидазе. Одвијање реакција хидроксилације је од суштинског значаја за испољавање биолошких ефеката витамина D услед стварања биолошки активних облика витамина D из неактивних форми витамина D<sub>2</sub> и D<sub>3</sub> (109).

Метаболизам витамина D започиње у јетри хидроксилацијом у присуству митохондријалне 25 $\alpha$ -хидроксилазе, изоформе 27A1 цитохрома П450 (*CYP27A1*), на 25 C атому калциферола чиме се формира 25-хидрокси витамин D (25(OH)D) тј. калцидиол или 25-хидроксиholesкалциферол, који је такође биолошки неактивна форма (109).

Иако је присуство 25-хидроксилазе најинтензивније у јетри, доказано је њено постојање и у кожи, бубрезима и цревима. Од укупне количине синтетисаног и унетог витамина D чак 75% се метаболише приликом првог проласка кроз јетру. Након формирања 25(OH) D везан за *DBP* се транспортује у бубреге где се најпре филтрира и реапсорбује у проксималним бубрежним тубулима. Доказано је присуство површинског ћелијског рецептора, мегалин-кубулина који олакшава процес ендцитозе 25(OH) D везаног за *DBP* коју врше како бубрежне ћелије тако и друге ћелије организма (Jones et al. 2014). У бубрезима се хидроксилацијом 25(OH)D у присуству 1 $\alpha$ - хидроксилазе (*CYP27B1*) формира поларније једињење 1,25-дихидрокси витамин D (1,25(OH)<sub>2</sub> D) тј. калцитириол који

представља физиолошки активан облик витамина D и на основу чијих физиолошких ефеката витамин D се не класификује само као витамин већ и као хормон (110).

Реакције хидроксилације које се одвијају у јетри и бубрезима се осим по врсти ензима неопходних за њихову реализацију разликују и по условљености ендокриним механизмима. Формирање 1,25(OH)<sub>2</sub>D у бубрезима се налази у негативној повратној спрези са паратироидним жлездама тј. индуковано је паратироидним хормоном (*PTH*), хипокалцијемијом и хипофосфатемијом, док инхибиторни ефекат на синтезу показује хиперфосфатемија, фактор раста фибробласта 23 и сам 1,25(OH)<sub>2</sub> D. Индуктивни и инхибиторни ефекат наведени фактори остварују мењањем интензитета активности ензима 1- $\alpha$  хидроксилазе. Реакција формирања про-хормона, 25(OH) D, није ендокрино регулисана и зависи искључиво од присутне концентрације витамина D унетог путем хране или синтетисаног у кожи (105).

Поред бубрега присуство ензима 1 $\alpha$ -хидроксилазе се може детектовати и у остеобластима, плаценти, простати, кератиноцитима, макрофагима, Т-лимфоцитима, канцерогеним ћелијама, хипоталамусу, церебелуму и црној супстанци (*substantia nigra*) па и у самој паратироидној жлезди (105).

Осим поменутих 25 $\alpha$  и 1 $\alpha$ -хидроксилазе, у метаболизму витамина D учествује и 24-хидроксилаза (*CYP24A1*) која је задужена за катаболизам оба метаболита витамина D, при чему је показано да настају биолошки неактивни, хидросолубилни, метаболити попут билијарних метаболита, калцитронске киселине или 26,23-лактона и др. Други ензим који врши катаболичке реакције у јетри и танком цреву је *CYP3A4* (110).

Биолошки активан метаболит, 1,25(OH)<sub>2</sub> D, може да оствари свој ефекат тек након везивања за витамин D рецептор (*VDR*) путем чега бива транспортован до циљаног ткива у хуманом организму (111).

#### **1.7.3.4. Екскреција витамина D**

Витамин D и његови метаболити излучује се већинским делом путем жучи и фецеса, док се један мањи део излучује путем урина (105). Експериментална студија која је испитивала метаболизам 24,25-дихидроксиовитамина D<sub>3</sub> код паса је опсервирала да је 90% екскретованог метаболита детектовано у фецесу (105).

#### **1.7.4. Процена статуса витамина D у хуманом организму**

Након вишегодишњих испитивања научници су закључили да је серумска концентрација 25(OH) D најпоузданији маркер статуса витамина D у организму, при чему су се сложили да концентрација 25(OH)D одражава збир ендогено синтетисаног и егзогеног витамина D. Синтеза калцидиола није ендокрино регулисана за разлику од синтезе калцитриола и калцидиол се карактерише знатно дужим временом полуелиминације које просечно износи око 2 недеље (креће се у опсегу од 10 дана до 3 недеље) док је код калцитриола свега од 4 до 6 сати (112). Јединична вредност 25(OH) D се може изразити као ng/ml или nmol/L при чему 1 ng/ml еквивалент 2,5 nmol/L (112).

Након вишегодишњих научних дебата о адекватном нивоу 25(OH)D, већина научних удужења (American Academy of Developmental Medicine and Dentistry; European Menopause Andropause Society; European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis; European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition; European Vitamin D Association; Brazilian Society of Endocrinology and Metabology) је прихватила следећу класификацију статуса витамина D: дефицијенција представља ниво 25(OH)D <50 nmol/l (20 ng/ml), инсуфицијенција је у опсегу вредности од 50 nmol/l до 75 nmol/l (од 21 до 29 ng/ml), док суфицијенција праћена опсегом од 75 nmol/l до 250 nmol/l (од 30 до 100 ng/ml). Дати су и предлози минималних нивоа 25(OH) D у крви који су неопходни за позитиван утицај витамина D у одређеним болестима. Тако је за позитиван утицај витамина D у мускулоскелтним болестима пожељан минимални ниво 25(OH) D у крви од 50 nmol/L -80 nmol/L, код кардиоваскуларних обољења 75 nmol/L – 100 nmol/L, код малигних обољења 100 nmol/L, код респираторних болести 75 nmol/L – 100 nmol/L, код дијабетес мелитуса 100 nmol/L, код аутоимуних болести и инфекције 100 nmol/L, код неуролошких поремећаја 75 nmol/L – 100 nmol/L, у трудноћи 75 nmol/L (113).

### **1.7.5. Преваленца дефицијенције и инсуфицијенције витамина D**

Дефицијенција и инсуфицијенција витамина D попримају пандемијске размере широм света и могу се срести у различитим старосним популацијама. Пандемијска појава дефицијенције витамина D у многим крајевима није препозната и није адекватно третирана. Алармирајући податак је да тренутно у свету код 1 билиона људи постоји дефицијенција или инсуфицијенција витамина D (113).

Два основна узрочника настанка дефицијенције јесу недовољна изложеност сунчевим зрацима или неадекватан нутритивни унос витамина D. Осим ова два узрока доказано је значај и других фактора попут старости, типа коже, индекса телесне масе, географског подручја становања, употребе крема за сунчање са заштитним фактором и други (113).



### **1.7.6. Дистрибуција витамина D у односу на старосну доб и географско подручје**

Дефицијенција у дечијем периоду је повезана са појавом рахитиса док је у периоду одраслих и старијих везана за појаву остеомаластије, остеопорозе и последично настанка фрактура. Сматра се да особе женског пола чешће имају недостатак витамина D, што се донекле објашњава већим садржајем масти код жена са последичним стварањем депоа витамина D у организму (113).

Постојање дефицијенције витамина D се повезује са повећањем морбидитета за кардиоваскуларна, канцерогена, метаболичка (дијабетес мелитус), имунолошка, психолошка и друга хронична обољења (113).

Преваленца дефицијенције витамина D је висока у земљама широм света, у Италији преваленца у општој популацији износи 17%, у Шпанији 33.9%, Немачкој 50% док је у Великој Британији 87,1% (113).

Дефицијенција/инсуфицијенција витамина D у трудноћи је честа појава па је према резултатима спроведених студија њена преваленца код трудница у Ирану 5,7%, Грчкој 19,5% , Индији 31% док је у Пекингу код чак 90%. (113).

### **1.7.7. Физиолошки ефекти витамина D**

Физиолошки ефекат витамина D се може поделити у две велике категорије а то су скелетни ефекат и ван скелетни ефекти.

#### **1.7.7.1. Скелетни ефекат витамина D**

##### **1.7.7.1.1. Улога витамина D у минералној хомеостазу**

Основна улога витамина D у људском организму јесте одржавање хомеостазе калцијума и фосфора. Током одређених периода када постоји повећана потреба организма за Ca<sup>2+</sup>, као што је развој, гравидитет и лактација, може се апсорбовати чак 60-80% количине Ca<sup>2+</sup> унете храном ако је статус витамина D суфицијентан.(114).

Смањење серумске концентрације Ca<sup>2+</sup>, које се најчешће дешава услед смањеног уноса путем хране, делује као окидач на паратиреоидне жлезде доводећи до секреције PTH који утиче позитивно на активност 1 $\alpha$ - хидроксилазе доводећи до повећања обима продукције калцитриола у бубрезима који се затим везује за VDR и доводи до повећање

апсорпције калцијума и фосфора из интестиналног тракта. Настали комплекс 1,25(OH)<sub>2</sub> D - *VDR* доводи до повећане експресије епителних Ca<sup>2+</sup> канала и калцијум везујућег протеина. Лабораторијска испитивања су показала да *PTH* смањује уринарну екскрецију Ca<sup>2+</sup> а поспешује уринарну елиминацију фосфора. Још једна особина *PTH* битна за коштани систем а која карактерише и 1,25(OH)<sub>2</sub> D при малом уносу Ca<sup>2+</sup> путем хране јесте њихов утицај на активацију остеобласта које доводе до формирања остеокласта из преостеокласта након чега остеокласти утичу на разарање коштаног матрикса доводећи до преузимања калцијума из коштаног депоа што може резултовати најпре појавом остеопеније која даљом прогресијом доводи до појаве остеопорозе и настанка прелома костију (114).

Дефицијенција витамина D код деце у периоду раста и развоја доводи до појаве рахитиса док код одраслих изазива секундарни хиперпаратиреоидизам, остеомалацију и остеопорозу. У патолошком смислу рахитис се карактерише поремећајем раста, обликовања и ремоделовања коштаног ткива, док се остеомалација карактерише поремећајем у ремоделовању коштаног ткива па је клинички и радиолошки теже препознатљива од рахитиса. (114).

#### **1.7.7.2. Нескелетни ефекат витамина D**

Вишеструки ванскелетни ефекти витамина D објашњавају се присуством *VDR* у већини ткива и органа у организму. Осим присуства *VDR* једна од потенцијалних теорија за настанак овако широког спектра дејства је да, након што серумска концентрација 25(OH) D достигне вредност > 85 nmol/L, постоји довољно супстрата за локалну продукцију активног хормона, 1,25(OH)<sub>2</sub> D, у кожи, колону, простати, плућима и другим ткивима а данас је познато да наведени облик витамина D врши инхибицију ћелијске пролиферације и индукцију терминалне диференцијације као и да поседује способност дешифровања генетских информација за више од 200 гена (115).

##### **1.7.7.2.1. Улога витамина D у превенцији карцинома**

Епидемиолошка испитивања о утицају сунчеве светлости на превенцију канцерогених обољења датирају још из 1936. а 1942. *Apperly* је потврдио је смртност услед карцинома мања у сунчаним пределима САД-а а тек 1989. *Garland* са сарадницима доказује корелацију између 25(OH) D и ризика од канцера (116). Подаци из литературе потврђују негативну корелацију између витамина D и скоро 15 врста карцинома (105). Објашњење за антиканцерогени механизам дејства витамина D јесте да калцитриол путем *VDR*-а регулише

процесе пролиферације, диференцијације, апоптозе и ангиогенезе нормалних и малигнух ћелија (105).

#### 1.7.7.2.2. Улога витамина D у превенцији кардиоваскуларних обољења

Кардиоваскуларна обољења су водеће узрок смрти у свету. Процењено је да су кардиоваскуларна обољења у 2015. години били узрок смрти код 17,9 милиона људи, а предпоставља се да ће до 2030.године тај број порастати до 22,2 милиона људи (45).

Улога витамина D у превенцији кардиоваскуларних обољења може бити вишеструка. Присуство *VDR* на ендотелу, васкуларним глатким мишићима и кардиомиоцитима омогућава антиатеросклеротски ефекат витамина D услед инхибиторног ефекта на формирање пенастих ћелија и пролиферацију глатких мишићних ћелија, експресију адхезионих молекула на ендотелним ћелијама и ослобађање инфламаторних медијатора (117).

Антихипертензивни ефекат витамина D објашњава се инхибиторним дејством на ренин-ангиотензин систем (РАС) у јукстагломеруларном апарату бубрега и то нисходном регулацијом транскрипције гена за ренин од стране 1,25(OH)<sub>2</sub> D тј. *VDR* са лигандом, калцитролом, који инхибира експресију ренина услед везивања за транскрипциони фактор циклични аденозин монофосфат (сАМФ)-CRE-везујући протеин (*Cyclic AMP-Response Element – CRE*) онемогућавајући реналну транскрипцију. Поред утицаја на ренин, хипотензиван ефекат настаје и услед директног ефекта на васкуларне ћелије и метаболизам калцијума и превенцију примарног хиперпаратиреоидизма (117,118). Према подацима из литературе утврђена је негативна корелација између серумске концентрације витамина D и висине крвног притиска (119).

Корекција недостатака витамина D, према искуствима неких аутора поправља липидни статус пацијената, те на тај начин може утицати позитивно на превенцију кардиоваскуларних болести (120). *Xiao Fei Qin* са сарадницима је доказао да примена витамина D код пацијената са сниженим нивоом витамина D, хиперлипидемијом и терапијом статинима, након заједничке употребе статина и витамина D (2000IU/дневно) током шест месеци, доводи до значајног снижења нивоа и триглицерида и холестерола у односу на пацијенте које су уз статине корисили плацебо (121). *Paloma Muñoz-Aguirre* је такође након примене витамина D у дози од 4000 IU/дневно код постменопаузалних жена

са ДМ тип 2 постигао значајно снижење нивоа триглицерида, ту су још бројни аутори за позитивним али и негативним искуством по питању липидног статуса након корекције недостатка витамина D (122).

Витамину D се приписује и антиинфламаторни ефекат, који као такав може утицати на спорији развој атеросклеротских промена и мању инциденцу кардиоваскуларних догађаја. (35).

### 1.7.7.2.3. Улога витамина D у превенцији и лечењу дијабетеса

Како ДМ тип 2 представља један од водећих здравствених проблема у свету подаци о позитивном ефекту корекције недостатака витамина D код ових пацијената навела је научнике на велики број истраживања. Ефекат витамина D у превенцији дијабетес мелитуса заснован је на експресији *VDR-a* на бета ћелијама панкреаса и стимулативном утицају калцитриола на секрецију инсулина, затим на редукцију инсулинске резистенције у мишићима, као и на пораст нивоа остеокалцина синтетисаног у остеобластима који повећава синтезу инсулина у панкреасу и редукује инфламацију која је присутна у инсулинској резистенцији (85,123). Сматра се да би витамина D могао да оствари свој ефекат у смислу снижавања инсулинске резистенције, потребан је његов оптимални ниво у крви између 80 и 119  $nmol/L$  (113). Спроведена истраживања су показала да примена витамина D може у одређеној мери да редукује ризик од настанка дијабетеса. Тако је опсервациона студија у Данској „*Copenhagen City Heart Study*“, спроведена на 9841 испитаник без ДМ, пратила пацијенте током 29 година, и показала да испитаници који су имали просечну вредност 25(OH) D <12.5  $nmol/L$  имали 22% већи ризик од настанка ДМ тип 2 у односу на испитанике где је серумска концентрација 25(OH) D  $\geq 50 nmol/L$ , испитаници код којих је 25(OH)D  $\geq 75 nmol/L$  су имали 8% мањи ризик обољевања у односу на испитанике код којих је ниво 25(OH)D био између 50  $nmol/L$  -75  $nmol/L$  (124).

Дупло слепа, рандомизирана, плацебо контролисана студија спроведена на 118 пацијената са дијабетес мелитусом тип 2 и витамин D инсуфицијенцијом показала је да је осмонедељна комбинована примена витамина D у дози 50000 IU/недељно и 1,000 mg/дневно калцијума знатно ефикаснија у смањену нивоа инсулина и гликозилираног хемоглобина (HbA1c) у односу на ефекат примене појединачних компоненти или плацеба (125).

Поред побољшања гликоругалиције истиче се да корекција недостатака витамина D има значајан антиинфламаторни ефекат код оболелих од ДМ тип 2, што би могло бити од

великог значаја знајући да се инфламацији приписује скоро централна улога у патофизиолошком механизму настанка ДМ тип 2. Доказано је да примена витамина D снижава ниво проинфламаторних интерлеукина, смањује макрофагну инфилтрацију и поспешује секрецију антинфламаторног IL-10. (35,126,127).

Такође од стране више аутора потврђен је антипротеинурички ефекат корекције недостатка витамина D код оболелих од ДМ тип 2. Пошто се протеинурија истиче као главна циљна мета на коју треба деловати у смислу успоравања прогресије ДМ тип 2, овај ефекат треба посебно истакнути (118,128,129,130,131).

Корекција липидног стауса након корекције недостатка витамина D може утицати на смањење инциденце кардиоваскуларниг догађаја који су код оболелих од ДМ водећи узрок смрти (120,121,122).

На основу претходно изнетих података закључујемо да корекција недостатка витамина D код оболелих од ДМ тип 2 побољшањем гликорегулације, снижавањем протеинурије, антихипертензивним ефектом, инхибицијом RAS, антиинфламаторним ефектом, има значајан ренопротективни ефекат. Знајући да једна трећина оболелих од ДМ развија ДН и да је ДН водећи узрок терминалне бубрежне слабости, ренопротективно дејство витамина D треба посебно истаћи и што детаљније истражити. Ренопротективни ефекат огледа се и у антифибротичком дејству витамина D, јер је доказано да код оболелих од ДМ примена витамина D оводи до снижавања нивоа *TGF-β1* у урину, а *TGF-β1* се сматра главним кривцем за развој реналне фиброзе (83,84,86). Такође корекција недостатака витамина D код оболелих од ДМ тип 2 редукује и неке друге факторе раста као што је *VEGF*, *MCP-1*, нефрин (118). Дејство витамина D на нивоу бубрега захтева још додатних испитивања ако је могуће на већем броју пацијената и у дужем временском периоду.

Наравно да неки аутори нису потврдили позитиван утицај витамина D у склопу ДМ. Мета анализа која је обухватала 35 студија нису показали позитиван ефекат примене витамина D на глукозну хомеостазу и превенцију дијабетеса (132,133). Претпоставља се да су за различите резултате о ефекту витамина D код оболелих од ДМ тип 2 одговорни некохерентни подаци, мали борј испитаника и кратак период праћења боленика. Додатна мултицентрична испитивања могу пружити прецизније податке.

#### **1.7.7.2.4. Улога витамина D у аутоимуним обољењима**

Улога витамина D у превенцији настанка и модификовању тока аутоimunих болести екпериментално је објашњена утицајем витамина D на продукцију цитокина,

смањење секреције проинфламаторних интерлеукина, индуковање имуних ћелија и утицаја на интеракцију између лимфоцита и антиген презентујућих ћелија. Витамин D утиче на повећање активност Th2 лимфоцита и индукује пролиферацију дендритичних ћелија делујући имунорегулаторно и антиинфламаторно (134). Као што је претходно наведено ћелије имуног система врше екстраареналну продукцију 1,25(OH)<sub>2</sub> D који паракриним утицајем на T и B - лимфоците остварује имуномодулаторни ефекат. Најчешће је испитиван утицај витамина D на аутоимуна обољења попут дијабетес мелитуса тип 1, мултипле склерозе, реуматоидног артритиса (РА) и Кронове болести (135).

#### **1.7.7.2.5. Улога витамина D у психичким обољењима**

Присуство 1 $\alpha$ -хидроксилазе и VDR-a у мозгу јесу фактори захваљујући којима витамина D има улогу у развоју и физиолошком остваривању можданих функција. Епидемиолошка испитивања спроведена на европској и америчкој популацији су показала корелацију хиповитаминозе D са слабљењем когнитивне функције, (113,136). Серумска концентрација 25(OH)D  $\leq$ 46 nmol/L током трудноће резултује поремећајем у говору код потомства (Whitehouse et al. 2012). Недостатак витамина D повезује се већим ризиком за развој депресије, Алцхајмерове болести, деменције. (137).

#### **1.7.8. Препоруке за превенцију и лечење недостатака витамина D**

На основу резултата бројних испитивања и студија усаглашени су ставови више научних удружења као што су *European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO)* [83], *European Menopause and Andropause Society (EMAS)* [81], *Kidney Disease: Improving Global Outcomes Clinical Practice (KDIGO)* [87], or *American Geriatrics Society* [84], *American Academy of Developmental Medicine and Dentistry (AADMD)* и састављене су препоруке за употребу витамина D. Пре свега препоручује се да минимални ниво 25(OH) D у крви износи 75 nmol/L, али да ипак треба преферирати нешто виши ниво од 100–150 nmol/L (113).

У циљу превенције дефицијенције витамина D код здраве популације се препоручује употреба следећих доза витамина D: код беба до 1 године старости препоручује се употреба 400 – 1000 IU/дневно (10-25  $\mu$ g /дневно) витамина D, код деце старије од 1 годину 600 – 1000 IU/дневно (15-25  $\mu$ g /дневно) , код одраслих 1500 – 2000 IU/дневно (37,5-50  $\mu$ g /дневно), код гојазних особа са BMI > 30 kg/m<sup>2</sup>, могу се употребљавати и до три пута веће дозе од препоручених за особе за нормалном телесном тежином (113).

Када се витамин D употребљава у циљу корекције дефицијенције препоруке за употреби су следеће: витамин D се код беба млађих од 1 месеца примењује у дози од 1000 IU/дневно ( $25 \mu\text{g}$  /дневно), код беба и деце узраста од 1 месеца до 10 година у дози од 2000 IU/дневно ( $50 \mu\text{g}$ /дневно), код деце и адолесцената од 11-18 година у дози од 4000 IU/дневно ( $100 \mu\text{g}$ /дневно), код одраслих и старијих особа у дози од 4000 – 10000 IU/дневно ( $100 - 250 \mu\text{g}$  /дневно). Ако су присутна обољења гастроинтестиналног тракта која отежавају цревну апсорпцију витамина D дозе могу бити и значајно више (113).

Интоксикација витамином D дешава се при нивоу  $25(\text{OH})\text{D} > 375 \text{ nmol/l}$  ( $150 \text{ ng/ml}$ ) и сматра се веома ретком компликацијом. Прва манифестација интоксикације витамином D је појачана екскреција калцијума путем урина, смањивањем реапсорпције калцијума у проксималним тубулима. Када компензаторни механизми више не могу да повећавају излучивање калцијума урином, његова концентрација у крви расте. Хиперкалциемија снижава ниво *PTH*, што последично смањује излучивања фосфора путем бубрега. Високе концентрације  $25(\text{OH})\text{D}$  директно преко *VDR* у цреву додатно повећава интестиналну апсорпцију калцијум и фосфора, што додатно повећава њихов ниво у крви, а услед тога расте калцијум/фосфор производ и јављају се калцификације у неким ткивима, ткиву бубрега (нефрокалциноза), али и зидовима крвних судова. Хиперкалцемија такође изазива опстипацију, вазоконстрикцију са последичном артеријском хипертензијом, депресију, конфузију, полиурију, полидипсије и срчане аритмије (113).

## 2. Хипотезе и циљеви

### 2.1. Хипотезе студије:

1. Концентрација албумина у урину је значајно нижа након надокнаде витамина D.
2. Концентрација нефрина и *VEGF A* у урину и крви је значајно нижа након надокнаде витамина D.
3. Концентрација *TGF-β<sub>1</sub>* у урину је значајно нижа након надокнаде витамина D.
4. Вредност *HbA1c*, *CRP*-а, укупног холестерола и триглицерида у крви је значајно нижа након надокнаде витамина D.
5. Ниво *HbA1c*, *CRP*-а, укупног холестерола и триглицерида у крви, као и концентрација албумина, нефрина, *TGF-β<sub>1</sub>* и *VEGF A* у урину и нефрина и *VEGF A* у крви, након надокнаде витамина D, значајно се снижава само код непушача.

### 2.2. Циљеви студије:

1. Анализирати социо-демографске карактеристике (пол, старост, индекс телесне масе и пушачки статус), албуминурију, ниво витамина D у крви, *HbA1c*, јутарњу гликемију, албумине, серумско гвожђе, *CRP*, укупни холестерол, триглицериде и клиренс креатинина код пацијента са дијабетес мелитусом тип 2 и недостатком витамина D.
2. Испитати утицај надокнаде витамина D на концентрацију албумина, нефрина, *TGF-β<sub>1</sub>* и *VEGF A* у урину и нефрина, *TGF-β<sub>1</sub>* и *VEGF A* у крви.
3. Испитати утицај надокнаде витамина D на ниво *HbA1c*, *CRP*-а, укупног холестерола и триглицерида у крви.
4. Испитати утицај нивоа витамина D у крви на почетку испитивања на ефекте надокнаде витамина D.
5. Испитати утицај нивоа витамина D на крају испитивања на ефекте надокнаде витамина D.
6. Испитати утицај статуса пушења цигарета на ефекат надокнаде витамина D код болесника са дијабетес мелитусом тип 2.



### 3. Пацијенти и методе

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

#### 3.1. Врста студије

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

#### 3.2. Популација која је анализирана

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

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

#### 3.3. Узорковање

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

Критеријуми за укључивање су били:

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

Критеријум за искључивање:

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

Студија је обухватила пацијенте који су амбулантно и хоспитално лечени у Клиници за нефрологију и Клиници за ендокринологију Војномедицинске академије.

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

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

### **3.4. Варијабле које су мерене у студији**

Свим пацијентима је пре укључења у студију узета анамнеза, урађен физички преглед. Праћене су следеће варијабле: пол, старост, пушачки статус, телесна маса, телесна висина, индекс телесне масе.

**Праћени су следећи хематолошки и биохемијски параметри:**

1. Основни хематолошки и биохемијски профил: хемоглобин, уреа, креатинин, јутарња гликемија, албумини, калцијум, фосфор, укупни холестерол, триглицериди, као и  $CRP$ ,  $HbA1c$  и  $iPTH$ ; сви параметри су одређени на почетку студије и након шестомесечне надокнаде витамина D. Једино је вредност калцијума, фосфора и

- витамина D проверена и два месеца након започињања надокнаде због евентуалне корекције дозе препарата витамина D.
2. Албуминурија је одређена односом албумин/креатинин (*UACR*) у јутарњем узорку урина, на почетку студије и шест месеци након употребе витамина D.
  3. Клиренс креатинина је израчунат применом *CKD-EPI* формуле на почетку студије и шест месеци након употребе витамина D.
  4. Концентрација нефрина је одређена у узорку венске крви, и у урину, где је одређена апсолутна концентрација и коригована концентрација нефрина (нефрин/креатинин однос) у јутарњем узорку урина на почетку студије и након шестомесечне примене витамина D.
  5. Концентрација *TGF-β<sub>1</sub>* је одређена у узорку венске крви, и у урину, где је одређена апсолутна концентрација и коригована концентрација *TGF-β<sub>1</sub>* (*TGF-β<sub>1</sub>*/креатинин однос) у јутарњем узорку урина на почетку студије и након шестомесечне примене витамина D.
  6. Концентрација *VEGF A* је одређена у узорку венске крви, и у урину, где је одређена апсолутна концентрација *VEGF A* и коригована концентрација (*VEGF A* /креатинин однос) у јутарњем узорку урина на почетку студије и након шестомесечне супституције витамина D.

### 3.4.1. Хематолошке и биохемијске анализе

**Хематолошке и биохемијске анализе** крви, хемоглобин, албумин, серумско гвожђе, јутарња гликемија, калцијум, фосфор, *CRP*, *HbA<sub>1c</sub>*, *iPTH*, витамин D су урађени у Институту за биохемију Војномедицинске академије, а *VEGF A*, нефрин и *TGF-β<sub>1</sub>* у крви и урину урађени су у Институту за медицинска истраживања Војномедицинске академије.

#### **Крвна слика**

Параметри крвне слике су анализирани из вакутајнера са љубичастом бојом чепа (пуна крв), који као антикоагуланс садрже K2ЕДТА (1,8 mg K2ЕДТА по ml крви). Крвна слика је одређена методом проточне цитометрије (*Flow cytometry*), за ћелијске елементе, на апарату: *Advia 120*, произвођача, *Siemens*, а **хемоглобин** је одређен фотометријски. Хемоглобин (Hgb) - референтна вредност 115-165 g/L,

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Клиренс креатинина:** је одређен применом *CKD-EPI* формуле ( $GFR = 141 \times \min(S_{cr}/\kappa, 1)^\alpha \times \max(S_{cr}/\kappa, 1) - 1.209 \times 0.993$  ж. доб  $\times 1.018$  [ако је особа женског пола]) и изражен у *ml/min/1,73 m2*.

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

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

**Одређивање нефрина у урину и крви:** анализе су урађене из предходно узетих узорка јутарњег урина и крви. Да би се одстранио талог, узорци су центрифугирани на 1000g у трајању од 15 минута. Течни део је одливен у епендорфе запремине 1,5 *ml* и до момента анализе замрзнути на -80°C. Концентрација нефрина у крви и урину одређена је применом ELISA комерцијалног имуноензимског теста, коришћен је *Human NPHN (Nephrin) ELISA Kit*, *Catalog No : E-EL-H1901, Elebscience Biotech Co.Ltd, Wuhan, Hubei Province*. Тест за одређивање нефрина се заснива на квантитативној сендвич ензим имуноесеј техници. У тесту су коришћене полистиренске плоче са 96 бунарчића. Дно сваког бунарчића је обложено моноклонским антителима специфичним за нефрин. Узорци урина или крви су додати у сваки бунарчић и уколико је нефрин присутан, везивао се за антитело којим је претходно обложен бунарчић. Након испирања, у сваки простор

микроплоче додат је коњугат кога су чинила поликлонска антитета авидин везана за пероксидазу рена (*Avidin-HRP*) специфичну према нефрину, а након одређеног инкубационог периода је дошло до реакције између нефрина и коњугата и промене боје (ствара се плава боја). Реакција је завршена додавањем сумпорне киселине, као раствора за стопирање процеса при чему је дошло до појаве жуте боје. Интензитет боје је био пропорционалан количини везаног нефрина, а одређен је спектрофотометријски на таласној дужини од  $450\text{ nm}\pm 2\text{ nm}$ . Минимална концентрација нефрина у урину и крви (*Human NPHN*) која се може измерити овим тестом (сензитивност теста) је  $0,1\text{ ng/ml}$ . Детекциони ранг износи:  $0.16-10\text{ ng/mL}$ . Концентрација нефрина у сваком узорку урина исказана је у апсолутној концентрацији, у  $\text{pg/ml}$  и коригованој концентрацији према вредности креатинина у датом узорку урина, у  $\text{ng/g}U_{Cr}$ , концентрација креатинина у урину је одређена модификованом *Jaffe* методом (Cockcroft DW). Док су концентрације у крви изражене у апсолутним концентрацијама у  $\text{pg/ml}$ .

**Одређивање TGF- $\beta$ 1 у крви и урину:** анализе су урађене из предходно узетих узорака јутарњег урина и крви. Да би се одстранио талог, узорци су центрифугирани на  $1000\text{ g}$  у трајању од 15 минута. Течни део је одливен у епандорфе запремине  $1,5\text{ ml}$  и до момента анализе замрзнути на  $-80^\circ\text{C}$ . Концентрација TGF- $\beta$ 1 у крви и урину одређена је применом ELISA комерцијалног имуноензимског теста, коришћен је Human TGF- $\beta$ 1 (Transforming Growth Factor Beta 1) ELISA Kit, Catalog No: E-EL-H0110, *Elebscience Biotech Co.Ltd, Wuhan, Hubei Province*. Тест је заснован на квантитативној сендвич ензим имуноесеј техници. У тесту су коришћене полистиренске плоче са 96 бунарчића. Дно сваког бунарчића обложено је антителима специфичним за TGF- $\beta$ 1. У сваки бунарчић микроплоче обложен биотин-коњугованим поликлонским антителима специфичним за TGF- $\beta$ 1 и Авидином који је коњугован са пероксидазом рена, додат је узорак урина или крви. Слободне компоненте су испране. Присуство TGF- $\beta$ 1 у узорку урина или крви изазвало је промену боје, тј. јавља се плава боја која је након додавања сумпорне киселине, као раствора за заустављање процеса прешла у жуту боју. Интензитет жуте, измерен спектрофотометријски на таласној дужини од  $450\text{ nm}\pm 2\text{ nm}$ , је директно пропорционалан количини везаног TGF- $\beta$ 1. Минимална концентрација TGF- $\beta$ 1 у урину која се може измерити овим тестом (сензитивност теста) је  $18.75\text{ pg/mL}$ . Детекциони ранг износи:  $31.25-2000\text{ pg/mL}$ , коефицијент варијације је  $< 10\%$ . Концентрација TGF- $\beta$ 1 у сваком узорку урина исказана је у апсолутној концентрацији, у  $\text{pg/ml}$  и коригованој концентрацији према вредности креатинина у датом узорку урина, у  $\text{ng/g}U_{Cr}$ , док су концентрације у крви изражене у апсолутним концентрацијама у  $\text{pg/ml}$ .

**Одређивање VEGF A у крви и урину:** анализе су као и код претходна два биомаркеу урађене из предходно узетих узорак јутарњег урина и крви, који су до момента анализе замрзнути на  $-80^{\circ}\text{C}$ . Концентрација VEGF A у крви и урину одређена је применом ELISA комерцијалног имуноензимског теста, коришћен је Human VEGF-A (Vascular Endothelial Cell Growth Factor A) ELISA Kit Catalog No : E-EL-H0111, *Elebscience Biotech Co.Ltd, Wuhan, Hubei Province*. Тест је заснован на квантитативној сендвич ензим имуноесеј техници. У тесту су коришћене полистиренске плоче са 96 бунарчића. Дно сваког бунарчића обложено је антителима специфичним за VEGF A У сваки бунарчић микроплоче обложен биотин-коњугованим поликлонским антителима специфичним за VEGF A и Авидином који је коњугован са пероксидазом рена, додат је узорак урина или крви. Слободне компоненте су испране. Присуство VEGF A у узорку урина или крви изазвало је промену боје, тј. јавља се плава боја која је након додавања сумпорне киселине, као раствора за заустављање процеса прешла у жуту боју. Интензитет жуте, измерен спектрофотометријски на таласној дужини од  $450\text{nm} \pm 2\text{nm}$ , је директно пропорционалан количини везаног VEGF A. Минимална концентрација VEGF-A у урину која се може измерити овим тестом (сензитивност теста) је  $18.75 \text{ pg/mL}$ . Детекциони ранг износи:  $31.25\text{--}2000 \text{ pg/mL}$ . Концентрација VEGF A у сваком узорку урина исказана је у апсолутној концентрацији, у  $\text{pg/ml}$  и коригованој концентрацији према вредности креатинина у датом узорку урина, у  $\text{ng/gU}_{\text{Cr}}$ , док су концентрације у крви изражене у апсолутним концентрацијама у  $\text{pg/ml}$ .

### 3.5.Терапијски протокол

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

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

На основу нивоа витамина D у крви, након двомесечне надокнаде, одређена је доза витамина D коју је пацијент користио наредна четири месеца. Код пацијената који су нормализовали ниво витамина D у крви супституција је наредна четири месеца настављена

са холекалциферол капима у дози од 5000 IU два пута недељно. Код пацијената код којих је ниво витамина D остао снижен, наредна четири месеца супституција је настављена са холекалциферол капима у дози од 20 000 IU два пута недељно.

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

### **3.6. Статистичка обрада података**

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



## 4. Резултати

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

### 4.1. Социодемографске и антропометријске карактеристике пацијената

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

Просечна старост пацијената у групи са нормоалбуминуријом износила је 62.00 године (58,00-69,00), у групи са микроалбуминуријом 62.00 године (52.50-69.00), а у групи са макроалбуминуријом 66.00 година (62.25-69.50). Табела 1.

Табела 6. Социодемографске карактеристике пацијената

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

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

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

Табела 7. Антропометријске карактеристике пацијената

UACR:	Телесна висина; m	Телесна маса; kg	БМИ; kg/m <sup>2</sup>
-------	-------------------	------------------	------------------------

	Медијана (IQR)		
<b>Нормоалбуминурија</b>	1.70 (1.65-1.77)	80.00 (74.25-85.00)	27.50 (25.62-28.70)
<b>Микроалбуминурија</b>	1.73 (1.70-1.83)	89.00 (79.88-91.25)	27.45 (26.52-30.12)
<b>Макроалбуминурија</b>	1.71 (1.68-1.80)	87.50 (79.00-91.00)	28.40 (26.31-31.62)
<b>р вредност</b>	<b>р = 0.035*</b>	<b>р = 0.010*</b>	р = 0.120*

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

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

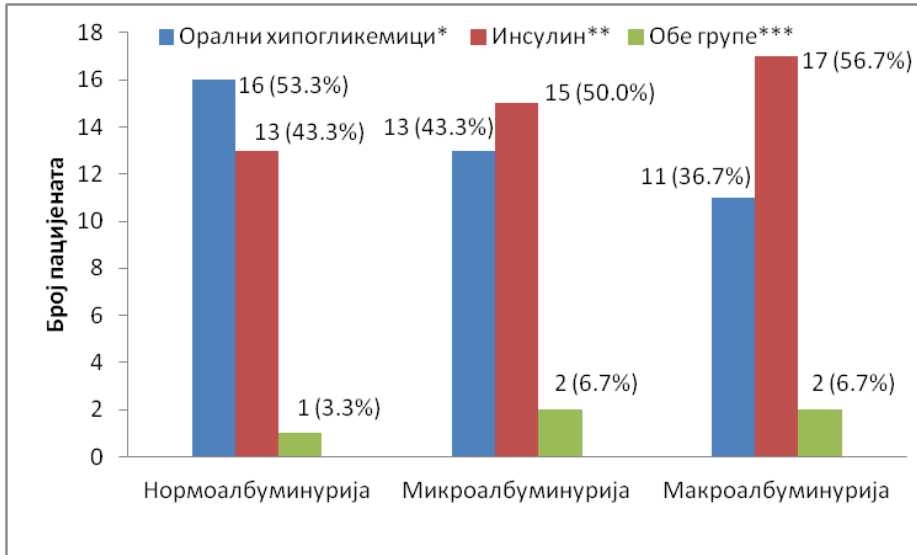
Табела 8. Укупно трајање болести

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

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

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

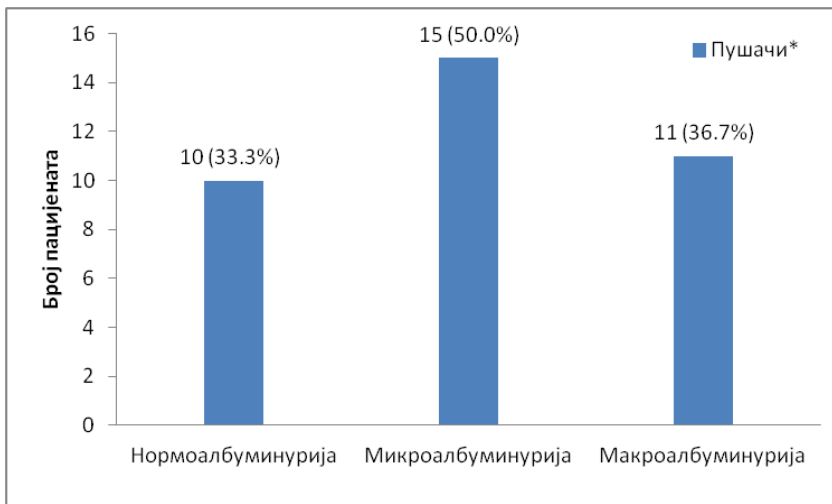
Графикон 1. Дистрибуција пацијената у односу на врсту терапије за дијабетес мелитус



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

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

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



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

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

Инсуфицијенцију витамина D имало је 22 пацијента (24.44%), док је дефицијенцију имало 68 пацијената (75.55%). Најнижи ниво витамина D на почетку испитивања имали су

пацијенти у групи са макропротеинуријом, просечно 28,49 nmol/L (22,40-47,67). Након шестомесечне примене витамина D, статистички значајан пораст вредности витамина D имамо код пацијената у све три групе. У групи пацијената са нормоалбуминуријом ниво витамина D је након шестомесечне супституције се повисио са 42.53 nmol/L (30.40-46.25) на 79.65 nmol/L (69.09-92.12)( $p < 0.001$ ), у групи са микроалбуминуријом ниво витамина D се повисио са 47.03 nmol/L (33.18-53.88) на 86.65 nmol/L (70.50-92.85) ( $p < 0.001$ ) док је у групи са макропротеинуријом пораст са 28.49 nmol/L (22.40-47.67) на 69.22 (54.74-78.04) ( $p < 0.001$ ). Табела 9.

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

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

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

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

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

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

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

### 4.3. Основни биохемисјки параметри

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

На почетку студије најниже нивое хемоглобина и серумског гвожђа имамо у групи пацијената са макроалбуминуријом, али је разлика без статистичке значајности, такође након завршене терапије ниво хемоглобина и серумског гвожђа је најнижи у истој групи али је опет разлика без статистичке значајности. Табела 11.

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

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

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

Ниво албумина у крви на почетку испитивања је био највиши у групи пацијената са микроалбуминуријом 43.00 g/L (40.75-44.00), затим у групи са нормоалбуминуријом 42.50 g/L (41.00-44.25), док су најнижевредности имали пацијенти са макроалбуминуријом 41.00 g/L (36.75-42.00), разлика између група је статистички значајна ( $p = 0.001$ ). Пораст нивоа

албумина има статистичку значајност само у групи пацијената са нормоалбуминуријом где имамо пораст са 42,50 g/L (41,00-44,25) на 44,00 g/L (42,00-46,00) -  $p = 0,001$ . Табела 11.

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

UACR:	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	p вредност
	Хемоглобин (g/L)		
	Медијана (IQR)		
Нормоалбуминурија	136.50 (120.75-143.25)	133.00 (119.75-145.00)	$p = 0.097^{**}$
Микроалбуминурија	140.50 (128.75-144.25)	137.50 (128.75-145.00)	$p = 0.710^{**}$
Макроалбуминурија	126.50 (122.25-132.75)	128.00 (122.75-142.00)	$p = 0.141^{**}$
<b>p вредност</b>	$p = 0.092^*$	$p = 0.197^*$	
UACR:	Уреа (mmol/L)		
	Медијана (IQR)		
	Нормоалбуминурија	5.95 (5.10-7.13)	
Микроалбуминурија	6.90 (5.47-8.20)	6.20 (5.20-7.95)	$p = 0.147^{**}$
Макроалбуминурија	8.40 (5.37-9.72)	8.15 (5.47-9.22)	$p = 0.484^{**}$
<b>p вредност</b>	$p = 0.004^*$	$p = 0.003^*$	
UACR:	Креатинин ( $\mu\text{mol/L}$ )		
	Медијана (IQR)		
	Нормоалбуминурија	76.50 (66.75-90.25)	
Микроалбуминурија	82.00 (71.00-96.75)	83.50 (70.50-94.25)	$p = 0.090^{**}$
Макроалбуминурија	86.00 (74.75-106.00)	82.00 (71.50-104.75)	$p = 0.022^{**}$
<b>p вредност</b>	$p = 0.149^*$	$p = 0.136^*$	
UACR:	Клиренс креатинина (mL/min)		
	Медијана (IQR)		
	Нормоалбуминурија	84.30 (64.05-91.55)	
Микроалбуминурија	68.60 (61.00-94.25)	74.15 (63.82-90.70)	$p = 0.049^{**}$
Макроалбуминурија	63.20 (60.57-89.97)	68.80 (62.00-90.07)	$p = 0.040^{**}$
<b>p вредност</b>	$p = 0.101^*$	$p = 0.143^*$	
UACR:	Албумин (g/L)		
	Медијана (IQR)		
	Нормоалбуминурија	42.50 (41.00-44.25)	
Микроалбуминурија	43.00 (40.75-44.00)	42.00 (40.00-45.00)	$p = 0.586^{**}$
Макроалбуминурија	41.00 (36.75-42.00)	41.50 (35.00-43.00)	$p = 0.104^{**}$
<b>p вредност</b>	$p = 0.001^*$	$p = 0.001^*$	
UACR:	Гвожђе ( $\mu\text{mol/L}$ )		

	Медијана (IQR)		
<b>Нормоалбуминурија</b>	15.50 (12.00-17.77)	15.00 (12.75-17.25)	p = 0.260**
<b>Микроалбуминурија</b>	15.00 (12.00-17.00)	13.50 (11.75-21.50)	p = 0.609**
<b>Макроалбуминурија</b>	14.10 (12.75-17.25)	13.50 (11.00-16.00)	p = 0.162**
<b>p вредност</b>	p = 0.998*	p = 0.430*	

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

#### 4.4. Параметри инфламације и гликорегулације

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

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

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

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

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

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

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

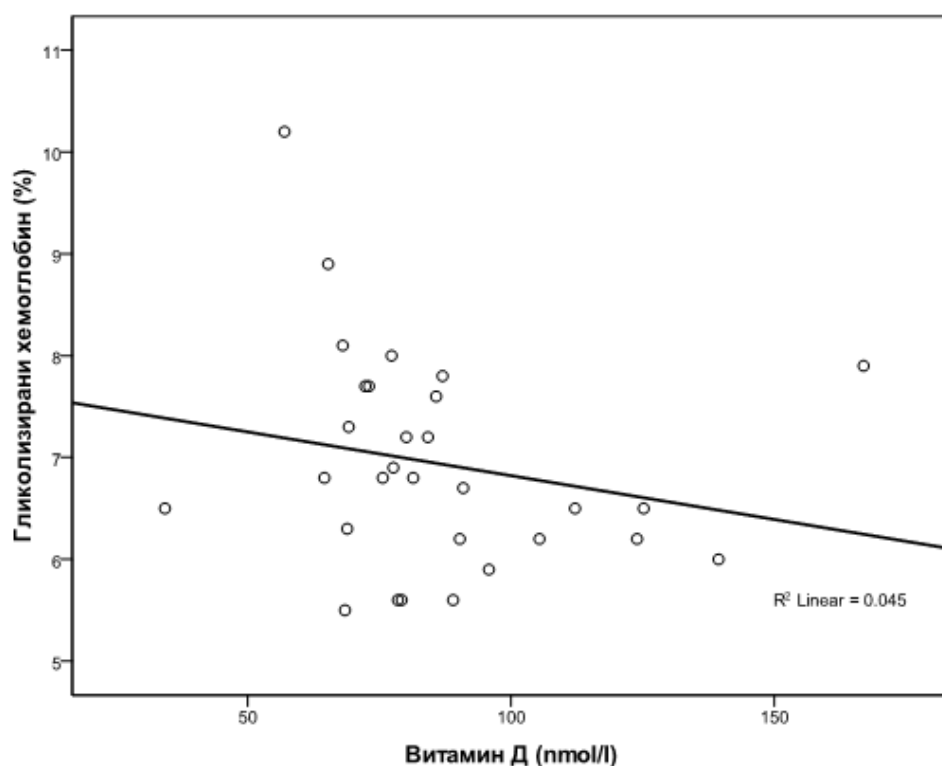
Табела 13. Корелација између нивоа витамина Д и нивоа *CRP-a*, *FBG* and *HbA1c* након шестомесечне надокнаде витамина Д у групи пацијената са нормоалбуминуријом (Spearman's rho)

		Vitamin D	CRP	FBG	HbA1C
Vitamin D	r coefficient	1.000			
	p value				
CRP	r coefficient	0.121	1.000		
	p value	0.525			
FBG	r coefficient	-0.061	0.148	1.000	



	<b>p value</b>	0.750	0.435		
<b>HbA1C</b>	r coefficient	<b>-0.342</b>	-0.133	0.578	1.000
	<b>p value</b>	<b>0.064</b>	0.485	0.001	

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

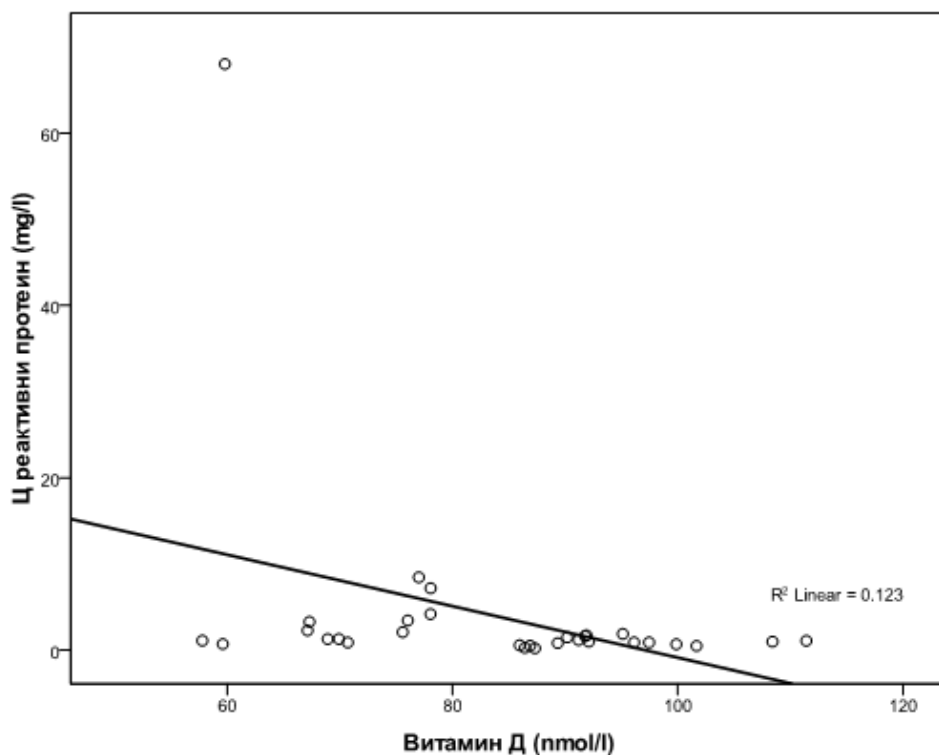


У групи пацијената са микроалбуминуријом доказана је негативна корелација између нивоа витамина D и нивоа *CRP*-а након шестомесечне надокнаде витамина D ( $r = -0.368$ ;  $p = 0.046$ ) Табела 14. и Графикон 4.

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

		<b>Vitamin D</b>	<b>CRP</b>	<b>FBG</b>	<b>HbA1C</b>
<b>Vitamin D</b>	r coefficient	1.000			
	<b>p value</b>				
<b>CRP</b>	r coefficient	<b>-0.368</b>	1.000		
	<b>p value</b>	<b>0.046</b>			
<b>FBG</b>	r coefficient	0.241	0.282	1.000	
	<b>p value</b>	0.199	0.131		
<b>HbA1C</b>	r coefficient	0.266	0.114	0.327	1.000
	<b>p value</b>	0.156	0.550	0.078	

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

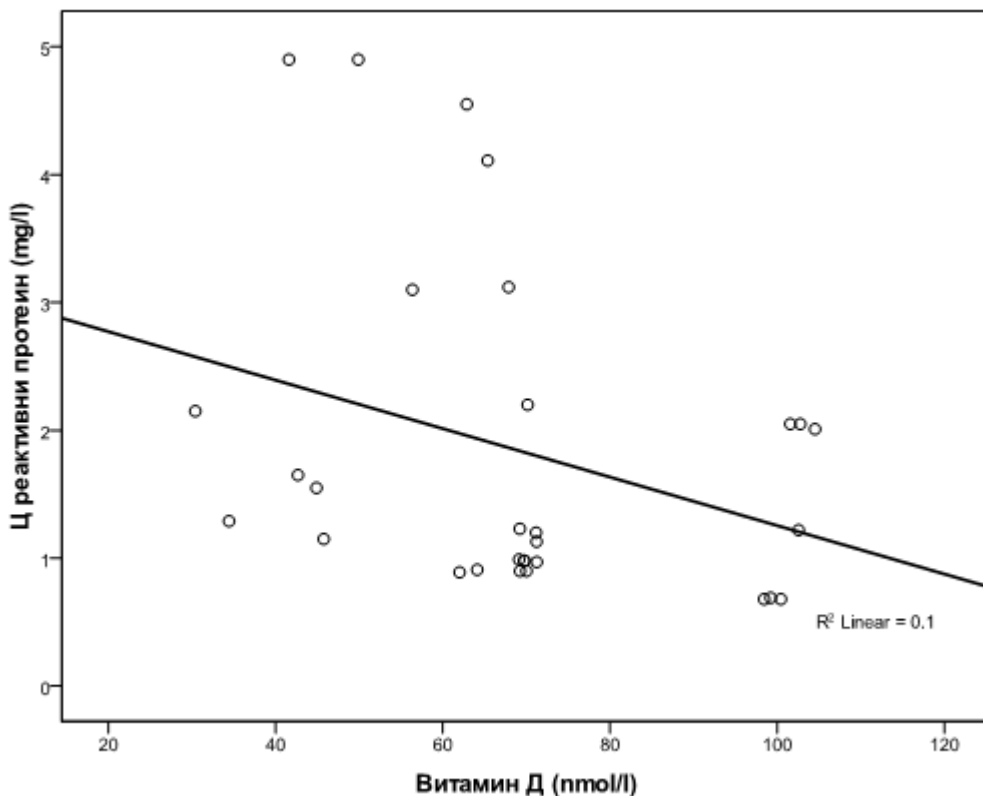


У групи пацијената са макроалбуминуријом негативна корелација је доказана такође између нивоа витамина D и нивоа *CRP*-а након шестомесечне надокнаде витамином D ( $r = -0.375$ ;  $p = 0.041$ ). Табела 15. Графикон 5.

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

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

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



#### 4.5. Калцијум, фосфор и *iPTH*

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

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

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

*iPTH* је на почетку испитивања био најнижи у групи пацијената са нормоалбуминуријом 3.40 (2.18-5.05), затим у групи са микроалбуминуријом 5.05 (4.00-6.15), а највиши је био у групи пацијената са макроалбуминуријом 7.10 (5.48-9.20), постоји и статистички значајна разлика између група ( $p < 0.001$ ). Након завршене супституције ниво *iPTH* статистички је значајно снижен у групи пацијената са нормалном протеинуријом – на почетку студије *iPTH* је износио 3,40 pmol/L (2,18-5,05) а након супституције 3,25 pmol/ (2,10-4,50) ( $p = 0,003$ ), док је у групи са микропротеинуријом ниво *iPTH* у статистички значајном порасту са 5,05 pmol/L (4,00-6,15) на 5,10 pmol/L (3,35-6,22) ( $p = 0,021$ ). Tabela 16.

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

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

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

#### 4.6. Параметри липидног статуса

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

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

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

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

UACR:	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	p вредност
	Укупни холестерол (mmol/L)		
	Медијана (IQR)		
Нормоалбуминурија	5.01 (4.36-5.39)	4.45 (3.90-5.10)	<b>p &lt; 0.001**</b>
Микроалбуминурија	5.52 (4.84-6.32)	4.66 (4.14-5.30)	<b>p &lt; 0.001**</b>
Макроалбуминурија	5.66 (4.73-6.36)	4.79 (4.39-5.77)	<b>p &lt; 0.001**</b>
<b>p вредност</b>	<b>p = 0.032*</b>	<b>p = 0.333*</b>	
UACR:	Триглицериди (mmol/L)		

	Медијана (IQR)		
<b>Нормоалбуминурија</b>	1.81 (1.31-2.41)	1.44 (1.10-1.77)	<b>p &lt; 0.001**</b>
<b>Микроалбуминурија</b>	2.16 (1.61-2.80)	1.43 (1.16-1.71)	<b>p &lt; 0.001**</b>
<b>Макроалбуминурија</b>	1.81 (1.58-2.90)	1.49 (1.40-2.22)	<b>p &lt; 0.001**</b>
<b>p вредност</b>	p = 0.194*	p = 0.116*	

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

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

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

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

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

#### 4.7. UACR, 24-часовна протеинурија

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

Након шестомесечне надокнаде витамин D у све три групе пацијената смо забележили статистички значајно снижење нивоа UACR: у групи са нормоалбуминуријом UACR је снижен са 26.70 mg/g (18.22-28.60) на 22.80 mg/g (11.67-27.45) (p = 0.028), у групи са

микроалбуминуријом са 100.40 mg/g (81.02-122.02) на 58.30 mg/g (33.77-83.05) ( $p < 0.001$ ), док је у групи са макроалбуминуријом пад са 520.75 mg/g (359.87-2726.07) на 329.40 mg/g (152.22-2948.25) ( $p = 0.015$ ). Табела 19.

Такође након завршене надокнаде у све три групе имамо статистички значјно снижење нивоа 24-часовне протеинурије: у групи са нормоалбуминуријом 24-часовна протеинурија је снижена са 0,071 gr/24h (0,046-0,101) на 0,060 gr/24h (0,026-0,085) ( $p = 0,003$ ), у групи са микроалбуминуријом са 0,221 gr/24h (0,182-0,273) на 0,136 gr/24h (0,100-0,200) ( $p < 0,001$ ), и у групи са макроалбуминуријом са 0,967 gr/24h (0,707-4,993) на 0,664 gr/24h (0,319-5,140) ( $p = 0,015$ ). Табела 19.

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

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

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

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

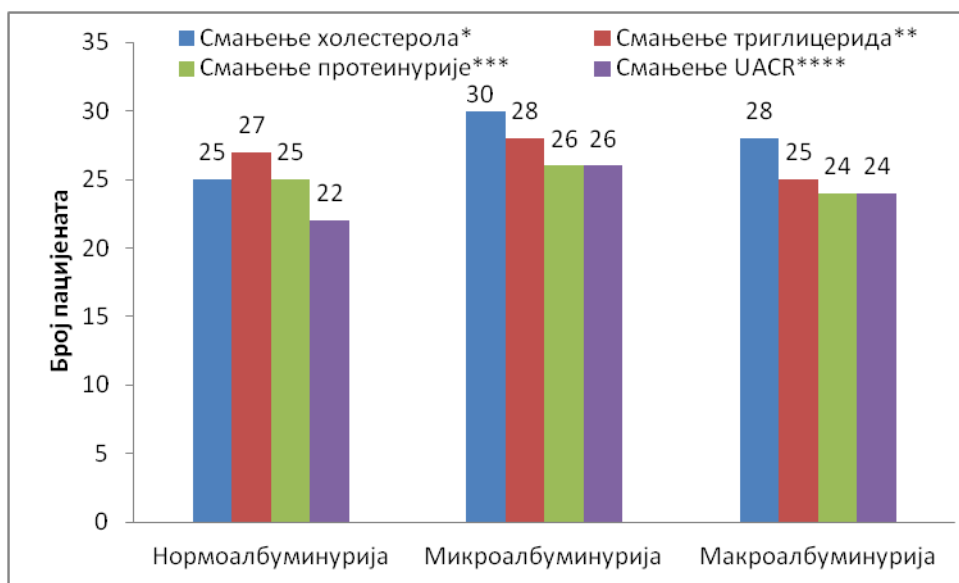
Табела 20. Процентуално смањење UACR и 24-часовне протеинурије након надокнаде витамина D у односу на базалне вредности

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

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

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

Графикон б. Дистрибуција пацијената у односу на смањење холестерола, триглицерида и протеинурије након терапије витамином Д



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



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

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

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

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

UACR- албумин/креатинин однос у урину

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

		Витамин D	Холестерол	Триглицериди	Протеинурија	UACR
Витамин D	г коефицијент	1.000				
	р вредност					
Холестерол	г коефицијент	-0.040	1.000			
	р вредност	0.834				
Триглицериди	г коефицијент	-0.072	0.044	1.000		

	р вредност	0.707	0.818			
<b>24-часовна протеинурија</b>	г коефицијент	0.114	0.050	0.272	1.000	
	р вредност	0.549	0.794	0.145		
<b>UACR</b>	г коефицијент	0.117	0.038	0.270	<b>0.983</b>	1.000
	р вредност	0.537	0.843	0.149	<b>&lt; 0.001</b>	

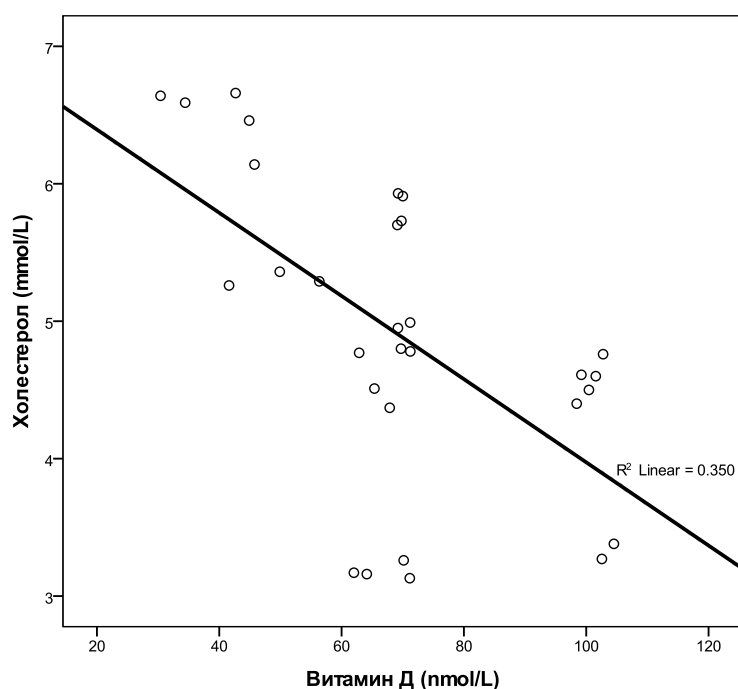
UACR- албумин/креатинин однос у урину

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

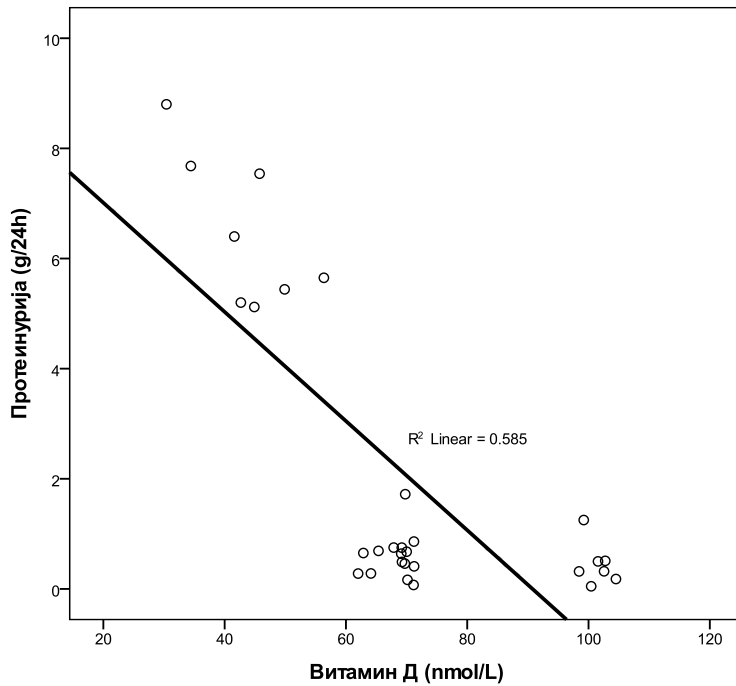
		Витамин D	Холестерол	Триглицериди	Протеинурија	UACR
<b>Витамин D</b>	г коефицијент	1.000				
	р вредност					
<b>Холестерол</b>	г коефицијент	<b>-0.570</b>	1.000			
	р вредност	<b>0.001</b>				
<b>Триглицериди</b>	г коефицијент	-0.056	0.357	1.000		
	р вредност	0.769	0.053			
<b>24-часовна протеинурија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

UACR- албумин/креатинин однос у урину

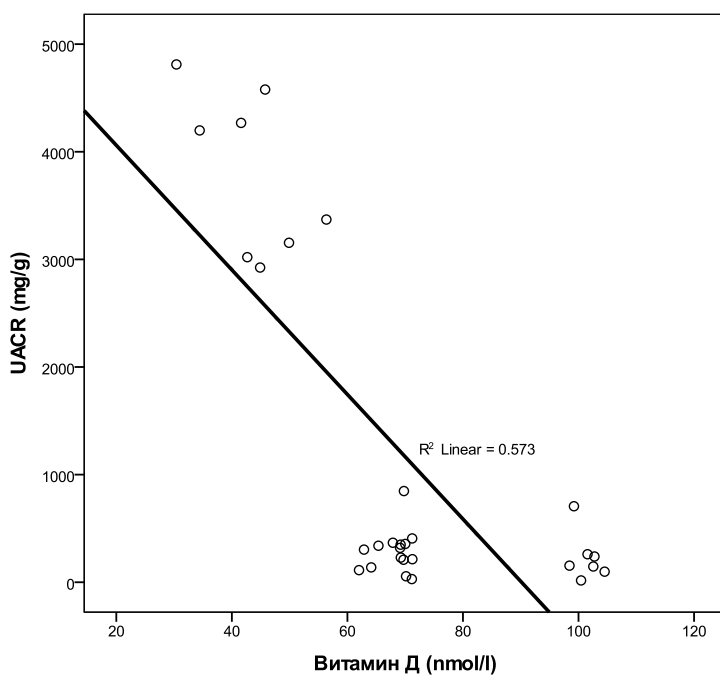
Графикон 7. Корелација између нивоа витамина D и укупног холестерола након надокнаде витамина D, у групи са макроалбуминуријом (*Spearman's rho* = -0.570;  $p < 0.001$ )



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



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



## 4.7. Биомеркери у серуму и урину

### 4.7.1 Нефрин у крви и урину

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

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

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

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

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

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

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

#### 4.7.2. TGF-β1 у урину и крви

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

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

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

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

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

UACR:	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	p вредност
	TGF- $\beta$ 1 - урин (pg/mL)		
	Медијана (IQR)		
Нормоалбуминурија	50.50 (45.75-64.00)	52.00 (45.00-63.25)	p = 0.897**
Микроалбуминурија	59.00 (51.75-67.25)	54.00 (49.00-61.75)	p = 0.080**
Макроалбуминурија	54.00 (49.75-58.25)	48.50 (37.00-51.00)	<b>p &lt; 0.001**</b>
<b>p вредност</b>	p = 0.100*	<b>p = 0.001*</b>	
	<b>TGF-<math>\beta</math>1 - урин коригована конц. (ng/gU<sub>Cr</sub>)</b>		
Нормоалбуминурија	55.84 (50.08-69.44)	58.81 (45.78-71.85)	p = 0.943**
Микроалбуминурија	61.67 (49.88-70.95)	57.17 (52.12-67.90)	p = 0.336**
Макроалбуминурија	56.41 (46.33-62.30)	46.03 (39.28-57.25)	<b>p &lt; 0.001**</b>
<b>p вредност</b>	p = 0.342*	<b>p = 0.001*</b>	
	<b>TGF-<math>\beta</math>1 - крв (pg/mL)</b>		
	Медијана (IQR)		
Нормоалбуминурија	54.50 (37.25-81.00)	48.50 (40.75-51.75)	p = 0.201**
Микроалбуминурија	47.50 (40.25-90.25)	47.00 (45.00-72.25)	p = 0.638**
Макроалбуминурија	42.00 (33.50-61.50)	51.00 (41.50-67.50)	p = 0.313**
<b>p вредност</b>	p = 0.285*	p = 0.649*	

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

#### 4.7.2. VEGF A у урину и крви

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

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

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

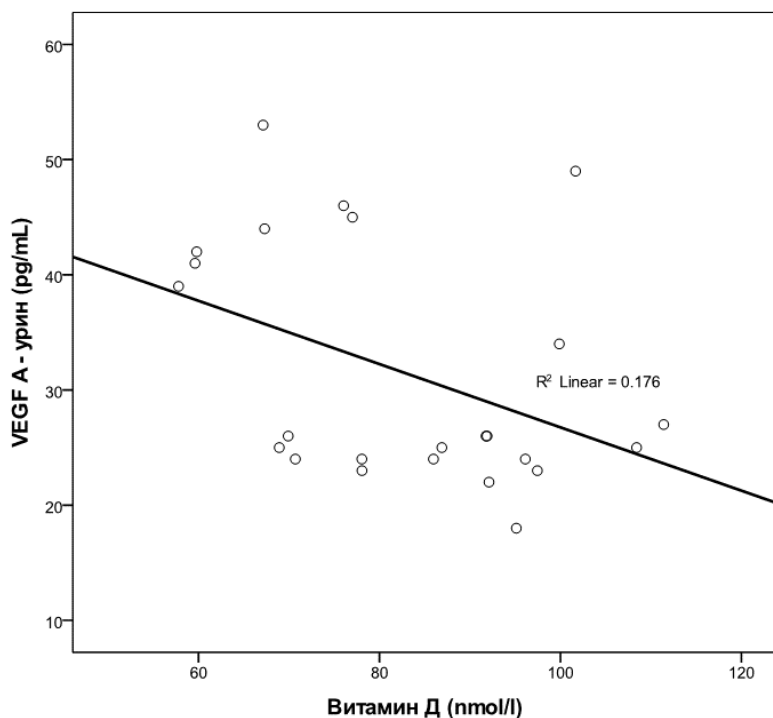
Кад је у питању ниво VEGF A у крви пре започете супституције најниже вредности су измерене код пацијената у групи са нормоалбуминуријом 34.00 pg/mL (29.00-44.25), затим у групи са микроалбуминуријом 35.00 pg/mL (29.00-50.25), док су највише вредности имали пацијенти у групи са макроалбуминуријом 43.00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

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

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

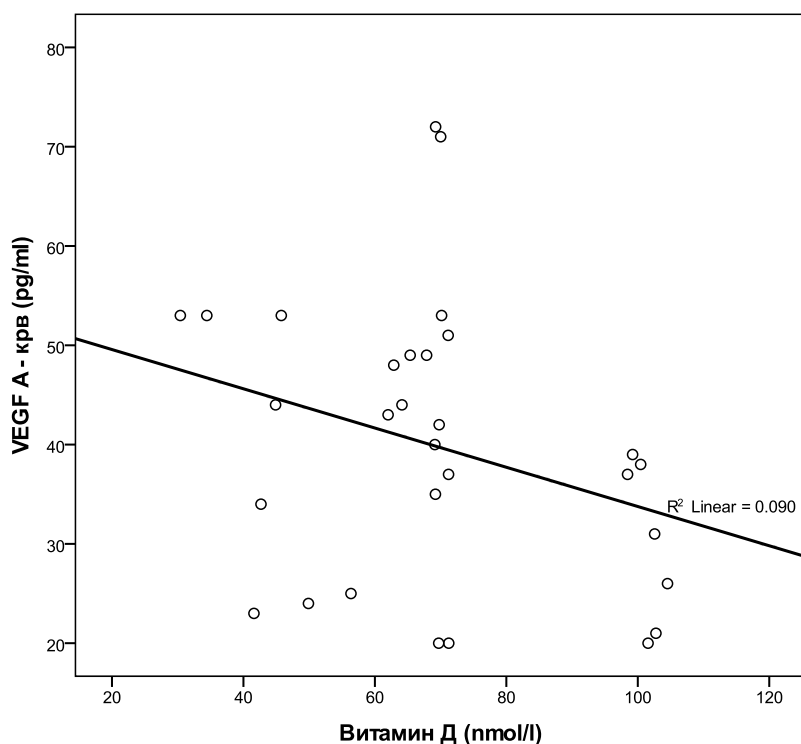
\*- Kruskal Wallis test; \*\*- Wilcoxon Signed Ranks test; UACR- албумин/креатинин однос у урину; IQR- интерквartilни опсег: 25-75 перцентил

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





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



#### 4.8. Анализа резултата у односу на ниво витамина D у крви на почетку студије

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

##### 4.8.1. Параметри инфламације и гликорегулације у односу на ниво витамина D у крви на почетку студије

На почетку испитивања пацијенти који су имали дефицијенцију витамина D имали су нижи ниво *CRP-a* (1,37 mg/L (0,98-2,47)) у односу на пацијенте са инсуфицијенцијом витамина D (1,60 mg/L (0,97-2,22)), међутим након шестомесечне надокнаде витамина D у

обадве групе пацијената постигнут је статистички значајно нижи ниво *CRP-a*. Табела 27. Није било статистички значајне разлике између група ни на почетку студије ни након завршене супституције.

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

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

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

Витамин Д:	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	р вредност	
	<b><i>CRP</i> (mg/L)</b>			
	Медијана (IQR)			
<b>Дефицијенција</b>	1,37 (0,98-2,47)	1,23 (0,90-3,05)	<b>p = 0,002**</b>	
<b>Инсуфицијенција</b>	1,60 (0,97-2,22)	1,27 (0,91-2,06)	<b>p = 0,003**</b>	
<b>р вредност</b>	p = 0,836*	p = 0,929*		
Витамин Д:	<b>Гликемија (mmol/L)</b>			
	Медијана (IQR)			
	<b>Дефицијенција</b>	8,90 (6,62-10,07)	7,70 (5,98-8,57)	<b>p &lt; 0,001**</b>
<b>Инсуфицијенција</b>	7,95 (7,37-10,37)	8,05 (7,28-9,03)	p = 0,821**	
<b>р вредност</b>	p = 0,622*	p = 0,067*		
Витамин Д:	<b>Гликозилирани хемоглобин (%)</b>			
	Медијана (IQR)			
	<b>Дефицијенција</b>	7,35 (6,60-8,47)	7,05 (6,50-7,70)	<b>p &lt; 0,001**</b>
<b>Инсуфицијенција</b>	7,15 (6,60-7,82)	6,80 (6,40-7,30)	<b>p = 0,014**</b>	
<b>р вредност</b>	p = 0,672*	p = 0,392*		

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

#### 4.8.2. Азотне материје и клиренс креатинина у односу на ниво витамина D у крви на почетку студије

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

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

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

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

#### 4.8.3. Липидни статус у односу на ниво витамина D у крви на почетку студије

Ниво укупног холестерола на почетку испитивања је виши у групи пацијената са дефицијенцијом витамина D 5,39  $\text{mmol/L}$  (4,63-6,09), у односу на пацијенте са

инсуфицијенцијом витамина D 5,06 mmol/L (4,31-5,68), међутим након шестомесечне надокнаде ниво укупног холестерола је статистички значајно нижи у обадве групе. Није било сатистички значајне разлике између група ни на почетку студије ни након завршене супституције. Табела 29.

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

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

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

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

#### 4.8.4. UACR и 24-часовна протеинурије и у односу на ниво витамина D у крви на почетку студије

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

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

Витамин D:	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	p вредност
------------	--------------	--------------------------	------------

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

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

#### 4.8.5. Нефрин у односу на ниво витамина D у крви на почетку студије

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

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

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

<b>Витамин Д:</b>	<b>Пре супституције</b>	<b>Након 6 месеци супституције</b>	<b>p вредност</b>
	<b>Нефрин - урин (pg/mL)</b>		
	Медијана (IQR)		
<b>Дефицијенција</b>	571,50 (290,00-1064,75)	501,00 (293,50-621,25)	<b>p = 0,017**</b>
<b>Инсуфицијенција</b>	459,50 (285,00-596,75)	542,00 (293,75-1115,75)	<b>p = 0,626**</b>
<b>p вредност</b>	p = 0,350*	p = 0,803*	
<b>Нефрин - урин коригована конц. (ng/gU<sub>Cr</sub>)</b>			
<b>Дефицијенција</b>	565,08 (328,02-716,48)	454,58 (308,18-671,96)	<b>p = 0,036**</b>
<b>Инсуфицијенција</b>	399,55 (299,04-646,03)	460,79 (254,65-963,17)	<b>p = 0,848**</b>

<b>р вредност</b>	$p = 0,268^*$	$p = 0,660^*$	
<b>Витамин Д:</b>	<b>Нефрин - крв (pg/mL)</b>		
	Медијана (IQR)		
<b>Дефицијенција</b>	398,50 (280,25-7783,25)	1142,50 (298,25-11280,75)	$p = 0,158^{**}$
<b>Инсуфицијенција</b>	148,00 (0,00-582,75)	567,00 (290,25-3762,50)	$p = 0,006^{**}$
<b>р вредност</b>	$p = 0,055^*$	$p = 0,229^*$	

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

#### 4.8.6. TGF- $\beta$ 1 у односу на ниво витамина D у крви на почетку студије

Ниво апсолутних и коригованих концентрација TGF- $\beta$ 1 у урину на почетку испитивања је виши код пацијената са дефицијенцијом витамина D у односу на пацијенте са инсуфицијенцијом, али као и код нефрина после надокнаде витамина D у овој групи имамао статистички значајан пад апсолутних концентрација TGF- $\beta$ 1 са 55,00 pg/mL (48,25-61,75) на 50,50 pg/mL (43,00-58,75) ( $p = 0,001$ ), и значајан пад коригованих концентрација TGF- $\beta$ 1 са 57,83 ng/gUCr (49,56-64,80) на 54,52 ng/gUCr (43,95-64,77) ( $p = 0,018$ ). Није било статистички значајне разлике апсолутних и коригованих концентрација TGF- $\beta$ 1 у урину између група ни на почетку студије ни на крају. Табела 32.

TGF- $\beta$ 1 у крви је такође вишег нивоа на почетку испитивања у групи пацијената са дефицијенцијом витамина D у односу на групу са инсуфицијенцијом, и као код нефрина након шестомесечне супституције имамо у групи пацијената са инсуфицијенцијом витамина D статистички значајан пораст нивоа TGF- $\beta$ 1. Табела 32.

Табела 32. Апсолутне и кориговане концентрације TGF- $\beta$ 1 у урину и концентрација TGF- $\beta$ 1 у крви у односу на ниво витамина D на почетку испитивања.

<b>Витамин Д:</b>	<b>Пре терапије</b>	<b>Након 6-месечне терапије</b>	<b>р вредност</b>
	<b>TGF-<math>\beta</math>1 - урин (pg/mL)</b>		
	Медијана (IQR)		
<b>Дефицијенција</b>	55,00 (48,25-61,75)	50,50 (43,00-58,75)	$p = 0,001^{**}$
<b>Инсуфицијенција</b>	52,50 (47,75-66,25)	50,00 (47,00-67,50)	$p = 0,363^{**}$
<b>р вредност</b>	$p = 0,873^*$	$p = 0,338^*$	
	<b>TGF-<math>\beta</math>1 - урин коригована конц. (ng/gUCr)</b>		
<b>Дефицијенција</b>	57,83 (49,56-64,80)	54,52 (43,95-64,77)	$p = 0,018^{**}$
<b>Инсуфицијенција</b>	54,70 (45,84-71,63)	54,05 (49,50-67,16)	$p = 0,355^{**}$
<b>р вредност</b>	$p = 0,903^*$	$p = 0,476^*$	
<b>Витамин Д:</b>	<b>TGF-<math>\beta</math>1 - крв (pg/mL)</b>		

	Медијана (IQR)		
<b>Дефицијенција</b>	48,00 (37,00-69,00)	47,00 (41,00-52,00)	p = 0,111**
<b>Инсуфицијенција</b>	44,50 (38,75-62,00)	60,50 (47,00-88,25)	<b>p = 0,044**</b>
<b>p вредност</b>	p = 0,818*	<b>p = 0,013*</b>	

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

#### 4.8.7. VEGF A у односу на ниво недостатака витамина D на почетку студије

Као и код претходна два биомаркера, виши ниво апсолутних концентрација VEGF A у урину на почетку испитивања имали су пацијенти са дефицијенцијом витамина D. Након шестомесечне надокнаде витамина D у обадве групе пацијената имамо статистички значајан пад апсолутних и коригованих концентрација VEGF A, с тим што је у групи пацијената са дефицијенцијом витамина D, ниво апсолутних концентрација на крају испитивања нижи у односу на пацијенте са инсуфицијенцијом, иако је њихов ниво на почетку испитивања био више. Табела 28.

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

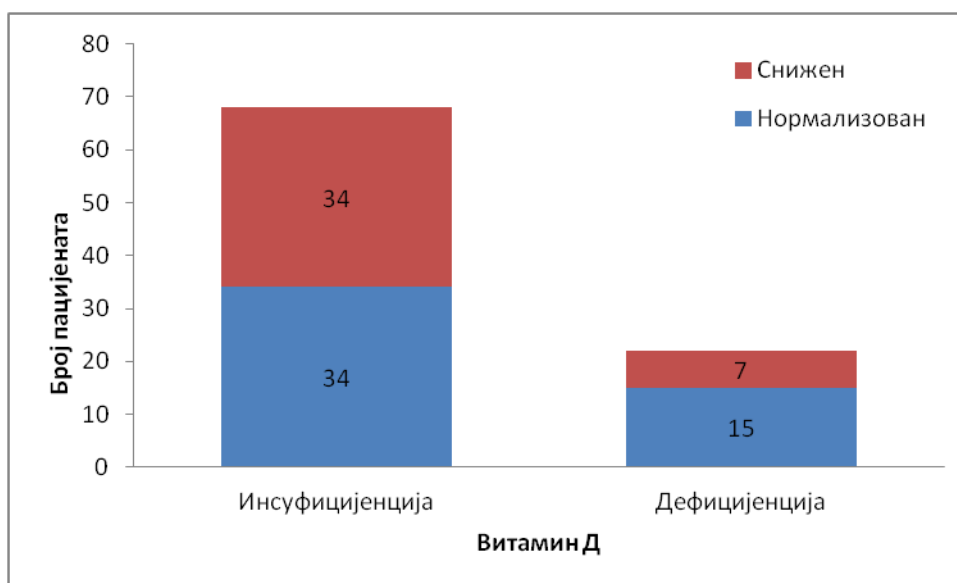
Табела 33. Апсолутне и кориговане концентрације VEGF A у урину и концентрација VEGF A у крви у односу на ниво витамина D на почетку испитивања.

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

#### 4.9. Анализа резултата у односу на ниво витамина D у крви на крају студије

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

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



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

##### 4.9.1. Параметри инфламације и гликорегулације у односу на ниво витамина D у крви на крају студије



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

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

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

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

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

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

#### 4.9.2. Азотне материје и клиренс креатинина у односу на ниво витамина D у крви на крају студије

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

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

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

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

Витамин D:	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	p вредност
	Креатинин ( $\mu\text{mol/L}$ )		
	Медијана (IQR)		
Нормализован	81,00 (69,00-100,50)	81,00 (71,50-90,00)	<b>p = 0,037**</b>
Снижен	82,00 (66,50-103,50)	80,00 (61,50-101,00)	<b>p = 0,033**</b>
<b>p вредност</b>	p = 0,935*	p = 0,706*	
<b>Клиренс креатинина (<math>\text{mL/min}</math>)</b>			
Витамин D:	Медијана (IQR)		
Нормализован	72,30 (61,00-90,60)	74,70 (66,55-87,95)	p = 0,059**
Снижен	66,60 (61,10-90,90)	77,80 (62,00-95,12)	<b>p = 0,039**</b>
<b>p вредност</b>	p = 0,789*	p = 1,000*	

Витамин Д:	Уреа (mmol/L)		
	Медијана (IQR)		
Нормализован	6,70 (5,30-7,80)	6,20 (5,32-7,55)	p = 0,320**
Снижен	7,15 (5,35-9,05)	6,20 (5,20-8,70)	p = 0,007**
р вредност	p = 0,176*	p = 0,573*	

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

#### 4.9.3. Липидни статус у односу на ниво витамина D у крви на крају студије

Ниво укупног холестерола у крви је статистички значајно нижи на почетку студије у групи пацијената која је на крају студије имала ниво витамина D у референтним границама у односу на групу код које је ниво витамина D остао снижен - ( $p < 0,001$ ). На крају студије у обадве групе пацијената имамо статистички значајно снижење нивоа укупног холестерола, са тим што је у групи пацијената са нормализованим витамином D ниво холестерола статистички значајно нижи у односу на групу са сниженим нивоом витамина D на крају студије. Табела 36.

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

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

Витамин Д:	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	р вредност
	Укупни холестерол (mmol/L)		
	Медијана (IQR)		
Нормализован	4,87 (4,33-5,60)	4,40 (3,92-4,94)	p < 0,001**
Снижен	5,68 (5,04-6,43)	5,01 (4,48-5,71)	p < 0,001**
р вредност	p < 0,001*	p = 0,008*	
Витамин Д:	Триглицериди (mmol/L)		
	Медијана (IQR)		
Нормализован	1,84 (1,42-2,52)	1,45 (1,14-1,77)	p < 0,001**
Снижен	1,82 (1,57-3,16)	1,49 (1,34-2,24)	p < 0,001**
р вредност	p = 0,461*	p = 0,127*	

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

#### 4.9.4. Вредност 24-часовне протеинурије и UACR у односу на ниво витамина Д у кви на крају студије

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

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

Витамин Д:	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	p вредност
	24-часовна протеинурија (g/24h)		
	Медијана (IQR)		
Нормализован	0,180 (0,081-0,290)	0,100 (0,050-0,185)	<b>p &lt; 0,001**</b>
Снижен	0,605 (0,134-1,142)	0,300 (0,087-0,805)	<b>p = 0,004**</b>
<b>p вредност</b>	<b>p &lt; 0,001*</b>	<b>p &lt; 0,001*</b>	
<b>UACR (mg/g)</b>			
Витамин Д:	Медијана (IQR)		
Нормализован	81,90 (27,30-123,40)	33,70 (21,65-80,30)	<b>p &lt; 0,001**</b>
Снижен	314,20 (49,90-594,60)	138,00 (28,25-387,10)	<b>p = 0,003**</b>
<b>p вредност</b>	<b>p &lt; 0,001*</b>	<b>p &lt; 0,001*</b>	

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

#### 4.9.5. Нефрин у урину и крви у односу на ниво витамина Д у крви на крају студије

Након завршене шестомесечне супституције витамина D анализирали смо ниво апсолутних и коригованих концентрација нефрина у урину и ниво нефрина у крви у зависности да ли је на крају студије ниво витамина D био у референтним границама, или је остао снижен. Анализирани су нивои на почетку студије и на крају студије. Ниво апсолутних концентрација нефрина је на почетку и на крају студије био виши у групи пацијената који су на крају студије имали витамин D у референтним границама у односу на

пацијенте који код којих је ниво витамина D остао снижен, али разлика није била статистички значајна. Такође ниво нефрина на крају студије снижен је у обадве групе у односу на почетне вредности, али без статистичке значајности. Табела 38.

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

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

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

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

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

#### 4.9.6. TGF-β1 у урину и крви у односу на ниво витамина D у крви на крају студије

Ниво апсолутних и коригованих концентрација TGF-β1 у урину је на почетку испитивања био нижи у групи пацијената код којих је ниво витамина D остао снижен на крају испитивања. Након завршене надокнаде у обадве групе пацијената имамо статистички значајно ниже нивое апсолутних концентрација TGF-β1 у урину, али су нивои у групи

пацијената са сниженим нивоом витамина D на крају испитивања статистички значајно нижи ( $p = 0,004$ ). Табела 39.

Ниво TGF- $\beta$ 1 у крви је на почетку испитивања нижи у групи пацијената са сниженим нивоом витамина D на крају студије у односу на пацијенте са нормализованим нивоом витамина D на крају студије. Након шестомесечне надокнаде у групи пацијената са витамином D у референтним границама на крају испитивања имамо нумерички значајан пад нивоа са 54,00 pg/mL (46,00-75,50) на 48,00 pg/mL (38,50-52,00) али без статистичке значајности ( $p = 0,276$ ), док у групи пацијената са сниженим нивоом витамина D на крају испитивања немамо пад вредности након супституције витамина D. Табела 39.

Табела 39. Апсолутне и кориговане концентрације TGF- $\beta$ 1 у урину и концентрација TGF- $\beta$ 1 у крви у односу на ниво витамина D на крају испитивања

Витамин Д:	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	p вредност
	TGF- $\beta$ 1 - урин (pg/mL)		
	Медијана (IQR)		
Нормализован	58,00 (48,50-66,50)	54,00 (49,00-60,00)	<b>p = 0,018**</b>
Снижен	52,00 (47,50-58,00)	49,00 (39,00-53,50)	<b>p = 0,022**</b>
<b>p вредност</b>	<b>p = 0,030*</b>	<b>p = 0,004*</b>	
	TGF- $\beta$ 1 - урин коригована конц. (ng/gU <sub>Cr</sub> )		
Нормализован	60,19 (52,54-70,49)	56,50 (49,89-67,67)	p = 0,134**
Снижен	51,74 (45,94-64,13)	47,48 (39,98-63,01)	p = 0,054**
<b>p вредност</b>	<b>p = 0,056*</b>	<b>p = 0,027*</b>	
	TGF- $\beta$ 1 - крв (pg/mL)		
	Медијана (IQR)		
Нормализован	54,00 (46,00-75,50)	48,00 (38,50-52,00)	p = 0,276**
Снижен	41,00 (35,00-64,50)	50,00 (43,00-65,00)	p = 0,610**
<b>p вредност</b>	<b>p = 0,012*</b>	<b>p = 0,286*</b>	

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

#### 4.9.6. VEGF A у урину и крви у односу на ниво витамина D у крви на крају студије

Ниво апсолутних и коригованих концентрација VEGF A у урину је на почетку испитивања био нижи код пацијената који су на крају испитивања имали ниво витамина D у референтним границама у односу на пацијенте код којих је ниво витамина D остао снижен. Након завршене супституције апсолутне и кориговане концентрације VEGF A у урину статистички су значајно снижене у обадве групе, при чему су вредности у групи пацијената

која је на крају студије имала витамин D у референтним границама ипак ниже, али без статистичке значајности у разлици. Табела 40.

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

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

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

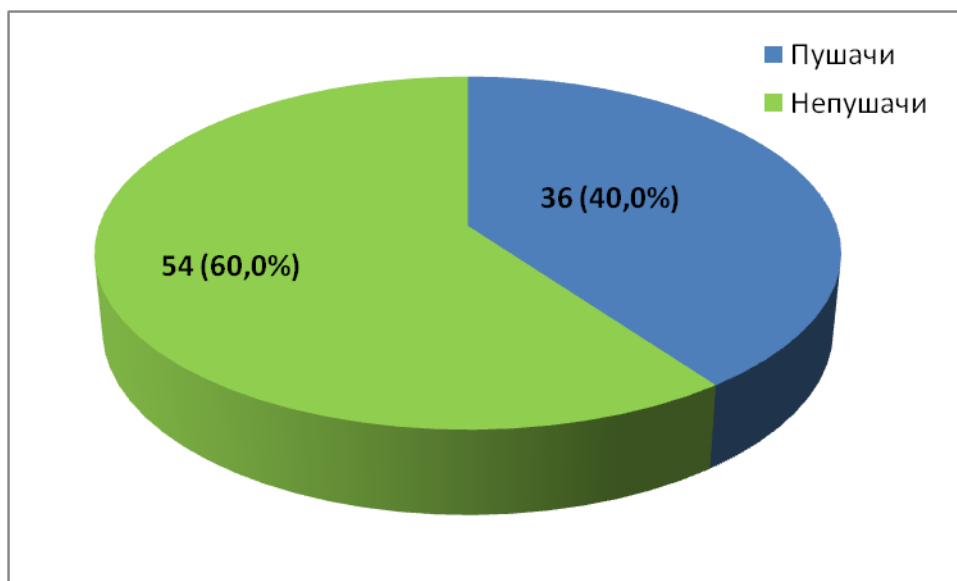
\*- Mann-Whitney U test; \*\*- Wilcoxon Signed Ranks test; IQR- интерквartilни опсег: 25-75 перцентил

#### 4.10. Анализа резултата у односу на пушачки статус пацијената

Све пацијенте смо на основу пушаког статуса, невезано за вредност протеинурије на почетку студије поделили у две групе. Прву групу чине пацијенти који не пуше цигарете, а другу групу чине пацијенти који пуше цигарете. У првој групи било је 54 (60.00%)

пацијента, а у другој групи 36 (40.00%) пацијената. Графикон 13. Анализирани су сви резултати на почетку студије и након шестомесечне надокнаде витамина D.

Графикон 13. Дистрибуција пацијената у односу на пушачки статус



#### 4.10.1. Социодемографске и антропометријске карактеристике пацијената у односу на пушачки статус

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

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

Табела 41. Социодемографске карактеристике пацијената у односу на пушачки статус

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

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



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

Табела 42. Антропометријске карактеристике пацијената у односу на пушачки статус

Пушачки статус:	Телесна висина; m	Телесна маса; kg	БМИ; kg/m <sup>2</sup>
	Медијана (IQR)		
<b>Непушачи</b>	1.70 (1.68-1.78)	82.00 (77.00-89.00)	27.65 (25.85-29.57)
<b>Пушачи</b>	1.74 (1.68-1.83)	89.00 (79.63-91.75)	27.95 (26.60-30.10)
<b>p вредност</b>	<b>p = 0.047*</b>	<b>p = 0.030*</b>	p = 0.387*

\*- Mann-Whitney U test; БМИ- Индекс телесне масе; IQR- интерквартилни опсег: 25-75 перцентил

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

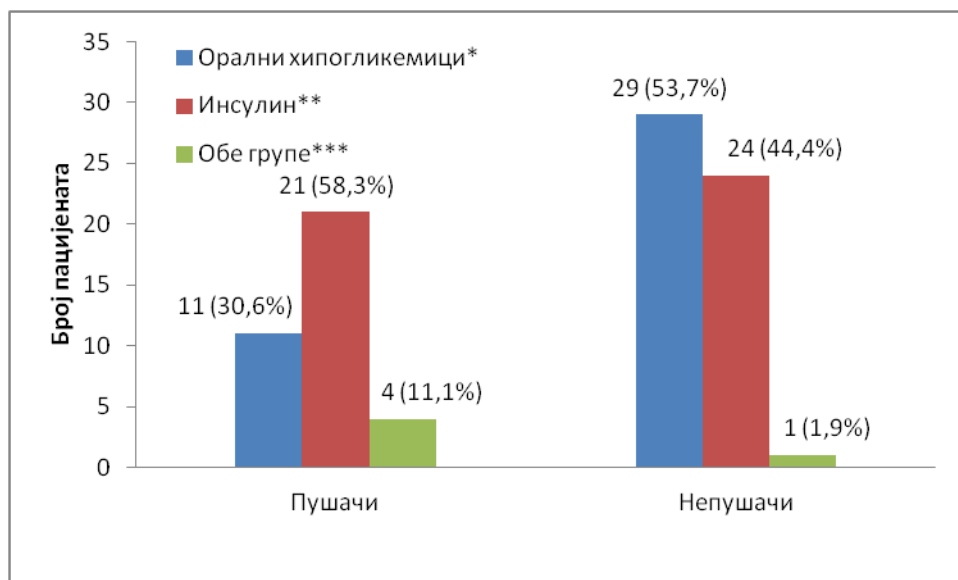
Табела 43. Укупно трајање болести у односу на пушачки статус пацијената

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

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

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

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



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

#### 4.10.2. Витамин D у односу на пушачки статус пацијената

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

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

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

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

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

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

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

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

#### 4.10.3. Основни биохемисјки параметри у односу на пушачки статус

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### 4.10.4. Параметри инфламације и гликорегулације у односу на пушачки статус

Ниво *CRP-a* на почетку испитивања је био нижи у групи пацијената који не пуше цигарете у односу на пацијенте који пуше цигарете али је разлика без статистичке значајности. Након спроведене супституције витамином D у обадве групе имао

статистички значајно снижење нивоа *CRP-a*, али разлика у нивоу између група није статистички значајна. Табела 47.

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

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

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

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

#### 4.10.5. Липидни статус у односу на пушачки статус пацијената

Када је у питању липидни статус, ниво укупног холестерола и триглицерида у крви је у групи пацијената који не пуше цигарете на почетку студије био нижи у односу на пацијенте који пуше цигарете, али разлика без статистичке значајности. Након завршене супституције витамином D у обадве групе пацијената имамо статистички значајно ниже

нивое укупног холестерола и триглицерида у крви ( $p < 0.001$ ). Разлике у вредности укупног холестерола и триглицерида између две групе не показују статистичку значајност. Табела 48.

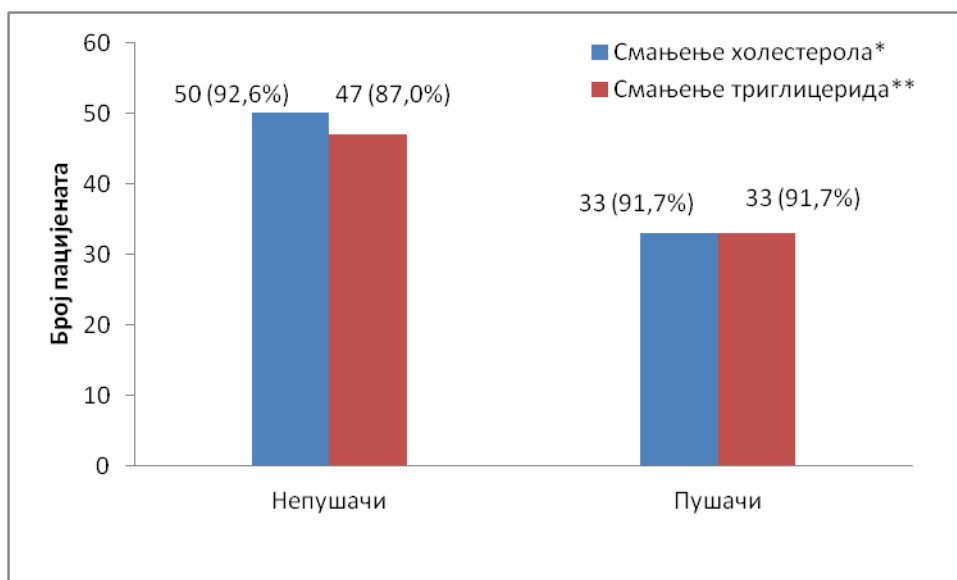
Табела 48. Ниво укупног холестерола и триглицерида у крви, пре и након шестомесечног терапије витамином Д, у односу на пушачки статус пацијената

Пушачки статус:	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	p вредност
	Укупни холестерол (mmol/L)		
	Медијана (IQR)		
Непушачи	5.20 (4.64-5.70)	4.60 (3.94-5.12)	<b>p &lt; 0.001**</b>
Пушачи	5.42 (4.43-6.65)	4.84 (4.19-5.60)	<b>p &lt; 0.001**</b>
<b>p вредност</b>	p = 0.286*	p = 0.166*	
Пушачки статус:	Триглицериди (mmol/L)		
	Медијана (IQR)		
Непушачи	1.82 (1.45-2.63)	1.53 (1.28-2.15)	<b>p &lt; 0.001**</b>
Пушачи	1.86 (1.57-2.65)	1.41 (1.18-1.79)	<b>p &lt; 0.001**</b>
<b>p вредност</b>	p = 0.587*	p = 0.174*	

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

		Витамин D	Холестерол	Триглицериди
Витамин D	г коефицијент	1.000		
	р вредност			
Холестерол	г коефицијент	-0.097	1.000	
	р вредност	0.486		
Триглицериди	г коефицијент	-0.034	0.285	1.000
	р вредност	0.809	0.037	

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

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

		Витамин D	Холестерол	Триглицериди
Витамин D	г коефицијент	1.000		
	р вредност			
Холестерол	г коефицијент	<b>-0.543</b>	1.000	
	р вредност	<b>0.001</b>		
Триглицериди	г коефицијент	-0.100	0.247	1.000
	р вредност	0.561	0.147	

#### 4.10.6. UACR и 24-часовна протеинурија у односу на пушачки статус пацијената

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

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

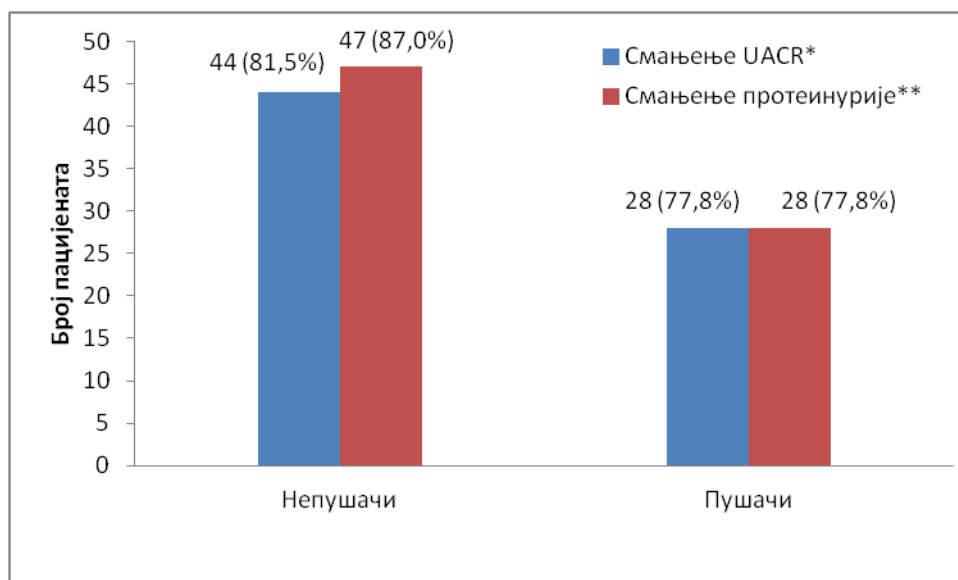


Пушачки статус:	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	p вредност
	24-часовна протеинурија (g/24h)		
	Медијана (IQR)		
Непушачи	0.203 (0.087-0.682)	0.113 (0.060-0.341)	<b>p &lt; 0.001**</b>
Пушачи	0.251 (0.112-0.907)	0.156 (0.090-0.455)	<b>p = 0.004**</b>
<b>p вредност</b>	p = 0.273*	p = 0.199*	
<b>UACR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

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

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

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



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

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

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

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

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

Након завршене шестомесечне надокнаде витамина D, корелирали смо ниво витамина D и вредности 24-часовне протеинурије, UACR, нивоа укупног холестерола и триглицерида. У групи пацијенат који не пуше цигарете добили смо негативну корелацију између нивоа витамина D и 24-часовне протеинурије ( $r = -0.419$ ,  $p = 0.002$ ) и витамина D и UACR ( $r = -0.453$ ,  $p = 0.001$ ). Табела 54.

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

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

		Витамин D	Холестерол	Триглицериди	Протеинурија	UACR
Витамин D	р коефицијент	1.000				
	р вредност					
Холестерол	р коефицијент	-0.097	1.000			

	р вредност	0.486				
Триглицериди	г коефицијент	-0.034	0.285	1.000		
	р вредност	0.809	0.037			
Протеинурија	г коефицијент	<b>-0.419</b>	0.146	0.085	1.000	
	р вредност	<b>0.002</b>	0.291	0.541		
UACR	г коефицијент	<b>-0.453</b>	0.128	0.055	<b>0.991</b>	1.000
	р вредност	<b>0.001</b>	0.356	0.692	<b>&lt;0.001</b>	

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

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

		Витамин Д	Холестерол	Триглицериди	Протеинурија	UACR
Витамин Д	г коефицијент	1.000				
	р вредност					
Холестерол	г коефицијент	<b>-0.543</b>	1.000			
	р вредност	<b>0.001</b>				
Триглицериди	г коефицијент	-0.100	0.247	1.000		
	р вредност	0.561	0.147			
Протеинурија	г коефицијент	-0.117	<b>0.503</b>	<b>0.493</b>	1.000	
	р вредност	0.495	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>		
UACR	г коефицијент	-0.109	<b>0.480</b>	<b>0.480</b>	<b>0.993</b>	1.000
	р вредност	0.525	<b>0.003</b>	<b>0.003</b>	<b>&lt;0.001</b>	

#### 4.10.7. Нефрин у урину и крви у односу на пушачки статус пацијената

Анализирали смо ниво апсолутних концентрација нефрина у урину и коригованих концентрација нефрина у урину и ниво нефрина у крви на почетку студије и након

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

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

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

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

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

<b>p вредност</b>	$p = 0.796^*$	$p = 0.445^*$	
-------------------	---------------	---------------	--

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

#### 4.10.8. TGF- $\beta$ 1 у урину и крви у односу на пушачки статус пацијената

Анализирали смо ниво апсолутних концентрација TGF- $\beta$ 1 у урину и коригованих концентрација TGF- $\beta$ 1 у урину и ниво TGF- $\beta$ 1 у крви на почетку студије и након завршене супституције витамина Д у односу на пушачки статус пацијената. Ниво апсолутних и коригованих концентрација TGF- $\beta$ 1 у урину на почетку испитивања је био статистички значајно нижи у групи пацијената који не пуше цигарете, док је на крају испитивања ниво апсолутних концентрација TGF- $\beta$ 1 у урину снижен у обадве групе али статистички значајан пад имамо само у групу пацијената који пуше цигарете ( $p = 0.001$ ). Табела 57.

Ниво TGF- $\beta$ 1 у крви на почетку и на крају испитивања је нижи у групи пацијената који не пуше цигарете али разлика је без статистичке значајности. Такође упоредивши ниво TGF- $\beta$ 1 у крви на почетку и на крају студије у обадве групе нивои су снижени али не статистички значајно. Табела 57.

Табела 57. Апсолутне и кориговане концентрације TGF- $\beta$ 1 у урину и концентрација TGF- $\beta$ 1 у крви у односу на пушачки статус пацијената

Пушачки статус:	Пре терапије	Након 6-месечне терапије	p вредност
	TGF- $\beta$ 1 - урин (pg/mL)		
	Медијана (IQR)		
Непушачи	52.00 (47.00-58.25)	50.50 (43.00-61.00)	$p = 0.183^{**}$
Пушачи	59.50 (49.50-68.00)	50.50 (45.00-59.00)	$p = 0.001^{**}$
<b>p вредност</b>	<b><math>p = 0.004^*</math></b>	$p = 0.814^*$	
	<b>TGF-<math>\beta</math>1 - урин коригован (ng/gU<sub>Cr</sub>)</b>		
Непушачи	54.32 (45.97-62.73)	56.23 (44.43-67.95)	$p = 0.494^{**}$
Пушачи	62.58 (51.74-72.12)	52.49 (45.86-62.07)	$p = 0.003^{**}$
<b>p вредност</b>	<b><math>p = 0.020^*</math></b>	$p = 0.718^*$	
	<b>TGF-<math>\beta</math>1 - крв (pg/mL)</b>		
	Медијана (IQR)		
Непушачи	47.00 (37.00-66.00)	47.00 (37.00-63.00)	$p = 0.181^{**}$
Пушачи	48.00 (37.25-72.00)	50.00 (46.00-74.00)	$p = 0.350^{**}$
<b>p вредност</b>	$p = 0.970^*$	$p = 0.079^*$	

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

#### 4.10.9. VEGF A у урину и крви у односу на пушачки статус пацијената

Анализирали смо ниво апсолутних концентрација VEGF А у урину и коригованих концентрација VEGF А у урину и ниво VEGF А у крви на почетку студије и након завршене супституције витамина Д у односу на пушачки статус пацијената.

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

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

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

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

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

## 5. Дискусија

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

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

Већ је доказано да промене стила живота успорава прогресију ДН. Ренопротективно дејство приписује се и следећим лековима: АЦЕ инхибитори и блокатори АТ рецептора, алскирен, не хидропиридински блокатори калцијумских канала, фенофибрати, спиринолакто, хидрохлортиазид (137,138,49).

Према досадашњим сазнањима ренопротективна улога приписује се и витамину Д. Витамин Д је есенцијални хормон који се у организам уноси путем хране (10-20%) или синтезом у кожи. Поред његове основне функције одржавање хомеостазе калцијума и фосфора, приписују му се и многа друга дејства као што су антифибротичко, антиинфламаторно дејство, протективно дејство у стабилизацији кардиомиоцита, снижавање инсулинске резистенције, инхибиција ренин ангиотенсин система (РААС), снижавање албуминурије код пацијената са хроничном бубрежном болести као и код пацијената са ДМ.(85,123). На основу наведеног можемо закључити да надокнада витамина Д код особа са недостатком витамина Д може имати ренопротективно дејство, односно утицати да спорију прогресију ДН.

С обзиром да је одређивање нивоа витамина Д у крви технички лако изводљиво и да надокнада истог није скупа терапија одлучили смо да спроведемо испитивање код болесника са ДМ тип 2 и недостатком (инсуфицијенција/дефицијенција) витамина Д.

Спровели смо проспективну, кохортну студију, током које смо код 90 пацијената са ДМ тип 2 и инсифицијенцијом/дефицијенцијом витамина Д, током 6 месеци вршили надокнаду витамина Д са холекалциферол капима пер ос. На основу искустава других аутора у периоду корекције недостатака витамина Д, ординирали смо више дозе холелакциферола 20 000 и.ј. два пут недељно, а након нормализације нивоа витамина Д настављала се супституција са стандардним дозама (83). Након завршене супституције анализирали смо како корекција недостатака витамина Д утиче на основне биохемијске параметре, липидни статус, параметре гликорегулације и инфламације, као и вредност UACR и 24-часовне протеинурије и клиренса креатинина.

Поред претходно наведених параметара одлучили смо да пратимо ефекат надокнаде витамина Д и на следеће биомаркере: TGF- $\beta$ 1, нефрин и VEGF A у крви и урину. TGF- $\beta$ 1 стимулише синтезу екстрацелуларног матрикса и смањује активност матрикс металопротеиназа. С обзиром да се рецептори за TGF- $\beta$ 1 уочавају се на свим структурама гломерула и да глукоза и завршни продукти гликозилације стимулишу продукцију TGF- $\beta$ 1 у готово свим ћелијама, те је његова експресија у гломерулу и у тубулоинтерстицијуму оболелих од ДМ појачана. Хтели смо да испитамо да ли надокнада недостатака витамина Д може довести до смањења његове експресије на нивоу бубрега (85,86). Нефрин и VEGF A се сматрају показатељима функције финих структура гломерула односно подоцита. Нефрин је један од протеина СД, који детерминишу њену структуру и одговоран је за њену селективну пропустљивост. Нефрин је одговоран и за контролу цитоскелетне архитектуре, облик и вијабилност подоцита и има улогу сигналног молекула. За адекватну гломерулску функцију неопходан је одређени ниво експресије нефрина (66,91)). VEGF A је протеин који у бубрегу секретују подоцити, и ендотелне ћелије проксималних тубула, одговоран је за патолошку ангиогенезу како у бубрегу тако и у другим ткивима (92). У условима хроничне хипергликемије његова синтеза и ослобађање су појачани (92). VEGF A заједно са нефрином утиче на регулацију функције СД (66,92). Хистопатолошки налаз биопсије бубрега у раном стадијуму ДН, показује појачану експресију mRNA VEGF A (91). На основу спроведених истраживања научници претпостављају да ће у будућности кључну улогу у успоравању прогресије ДН имати стабилизација функције подоцита и VEGF A. Наша идеја је била да ће корекција недостатака витамина Д позитивно утицати на стабилизацију функције подоцита.

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



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

### **5.1. Социодемографске и антропометријске карактеристике наших пацијената**

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

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

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

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

података који су добијени из мета анализа жене ипак имају већу тенденцију да буду гојазне од мушкараца (2). Нарочито након 45. године живота код жене расте склоност ка гојазности, док је код мушкараца прекомерна тежина чешћа у млађој животној доби (12,144).

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

## 5.2. Анализа резултата пре и након шестомесечне примене витамина Д

Најнижи ниво витамина Д на почетку испитивања имали су пацијенти у групи са макроалбуминуријом, код њих је и након супституције ниво витамина Д остао најнижи. Ови пацијенти су имали и највише стартне вредности серумског креатинина и најниже стартне вредности клиренса креатинина, што се слаже са подацима других аутора да је недостатак витамина Д чешћи код пацијената са ДМ тип 2 и макроалбуминуријом и ХБИ (123,140). Након шестомесечне примене холекалциферола ниво витамина Д је статистички значајно повишен у све три групи пацијената.

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

Статистички значајно снижење вредности *iPTH* забележено је у групи пацијената са нормоалбуминуријом. Пошто су сви пацијенти у тој групи имали нормалне вредности *iPTH*, питање да ли овај пад има значаја у пракси. Међутим с обзиром да витамин Д има позитиван ефекат на метаболизам костију тј. “боне турновер” повећавајући активност остеокласта, повећавајући волумен кости и трабекуларно задебљање, вероватно и ово снижење *iPTH*, које смо ми забележили може бити од користи (123,141).

На почетку испитивања, основни биохемијски параметри које смо пратили у принципу су одговарали степену албуминурије и јачини бубрежне функције, односно нивоу клиренсу

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

Као параметре гликорегулације пратили смо вредности *HbA1c* и ниво јутарње гликемије. На почетку испитивања најнижи ниво *HbA1c* имали су пацијенти из групе са нормоалбуминуријом, затим пацијенти из групе са микроалбуминуријом, а највиши ниво пацијенти из групе са макроалбуминуријом, тако је било и на крају испитивања. Ниво *HbA1c* и јутарње гликемије након шестомесечне примене холекалциферола је у све три групе пацијената значајно нижи. Разлика у нивоу *HbA1c* на почетку и на крају испитивања између група не показује статистичку значајност. За *HbA1c* је доказана и умерена негативна корелација ( $r = -0.342$ ;  $p = 0.064$ ) између пораста нивоа витамина Д и пада вредности *HbA1c*, али само у групи пацијената са нормоалбуминуријом. И други аутори наводе позитиван ефекат витамина Д на гликорегулацију код пацијената са ДМ тип 2 (142,143). Сматра се да се тај ефекат остварује повећањем инсулинске сензитивности преко стимулације и експресије инсулинских рецептора у скелтним мишићима и преко активације *peroxisome proliferator activator receptor  $\delta$  (PPAR  $\delta$ )*, и инхибиције система ренин ангиотензин алдостерон (који је познат као инхибитор дејства инсулина на периферна ткива). Такође, витамин Д утиче на појачано ослобађање инсулина повећавајући интрацелуларни ниво калцијума у бета ћелијама панкреаса. Витамин Д може имати и директан ефекат на функцију бета ћелија, који се остварује везивањем његовог активног облика у крви за *VDR*, који је изражен у бета ћелијама панкреаса. Доказано је да мишеви без функционалног *VDR* -а показују оштећену секрецију инсулина након оптерећења глукозе (85,142).

Сматра се да хронична инфламација има централну улогу у развоју ДМ и ДН, а да витамин Д може директно или индиректно смањити ефекат те системске инфламације код пацијената са ДМ. Анти-инфламаторни ефекат се огледа у смањеном ослобађања бројних проинфламаторних цитокина, као што су  $TNF-\alpha$ ,  $IL-6$ ,  $IL-12$ ,  $IL-18$ ,  $IL-1\beta$ ,  $INF-\gamma$ , блокади

диференцијације дендритичких ћелија, инхибицији лимфоцитне пролиферације, инхибицији формирања пенстих ћелија, смањеном уносу холестерола у макрофаге и побољшаном регулаторном развоју Т лимфоцита или пак у појачаном ослобађању анти-инфламаторних цитокина, као што је IL-10 (35,141). Као параметар анти-инфламаторног дејства витамина Д пратили смо ниво *CRP*. Након шестомесечне надокнаде, статистички значајно снижење нивоа *CRP* имамо у групи пацијената са нормоалбуминуријом и микроалбуминуријом, док је методом корелације доказана умерена негативна корелација између пораста вредности витамина Д и пада нивоа *CRP*. у групи пацијената са микроалбуминуријом ( $r = -0.368$ ;  $p = 0.046$ ) и макроалбуминуријом ( $r = -0.375$ ;  $p = 0.041$ ). Тиме смо код наших пацијената потврдили антиинфламаторни ефекат витамина D.

О утицају витамина D на липидни статус постоје различита мишљења. *Xiao Fei Qin* са сарадницима је доказао да примена витамина D код пацијената са сниженим нивоом витамина D, хиперлипидемијом и терапијом статинима, након заједничке употребе статина и витамина D (2000IU/дневно) током шест месеци, доводи до значајног снижења нивоа и триглицерида и холестерола у односу на пацијенте које су уз статине корисили плацебо (121). *Paloma Muñoz-Aguirre* је такође након примене витамина D у дози од 4000 IU/дневно код постменопаузалних жена са ДМ тип 2 постигао значајно снижење нивоа триглицерида (122). Код наших пацијената на почетку испитивања најнижи ниво укупног холестерола имали су пацијенти у групи са нормоалбуминуријом, затим пацијенти у групи са микроалбуминуријом а највиши ниво пацијенти у групи са макроалбуминуријом, присутна је и статистичка значајност у разлици нивоа укупног холестерола између група. На крају испитивања статистички значајно је снижен ниво укупног холестерола код пацијената у све три групе. У групи пацијената са макроалбуминуријом доказана је јака негативна корелација ( $r = -0.570$ ;  $p < 0.001$ ), између пораста вредности витамина D и пада вредности холестерола. Ниво триглицерида је на крају испитивања такође статистички значајно нижи у све три групе пацијената у односу на почетне вредности, али између група не постоји статистички значајна разлика у нивоу, нити значајна корелација између нивоа витамина D и нивоа триглицерида.

Протеинурија, према већини аутора, представља главну мету на коју треба деловати у циљу превенције и успоравања ДН, као и снижавања инциденце кардиоваскуларних догађаја. реф Антипротеинурички ефекат витамин D остварује инхибицијом система ренин ангиотензин алдостерон и смањењем реналне фиброзе редукцијом TGF- $\beta$ /SMAD пута. Витамин D, поред инхибиције РААС на нивоу бубрега, снижава експресију ренина на нивоу срца, чиме утиче на снижавање вредности крвног притиска. Осим тога, успоравањем фиброзе превенира и успорава прогресију хипертрофије леве коморе и развој срчане

слабости, снижава ниво *BNP*, редукује експресију гена укључених у атеросклерозу као и васкуларних фактора раста (118,128,129,139,131). Код наших пацијената као параметар протеинурије пратили смо *UACR* и 24-часовну протеинурију, након 6 месеци примене витамина D статистички значајно је снижен ниво и *UACR* и 24-часовна протеинурија у све три групе пацијената. У групи пацијената са макроалбуминуријом доказана је и јака негативна корелација између нивоа витамина D и нивоа *UACR* ( $r = - 0.676$ ;  $p < 0.001$ ) и између нивоа витамина D и 24-часовне протеинурије ( $r = - 0.685$ ;  $p < 0.001$ ). Такође у групи пацијената са макроалбуминуријом постоји јака позитивна корелација између нивоа укупног холестерол и *UACR* ( $r = 0.796$ ,  $p < 0.001$ ), и између укупног холестерола и 24-часовне протеинурије ( $r = 0.788$ ,  $p < 0.001$ ). Код наших пацијената из све три групе надокнада витамина D имала је снажан антипротеинурички ефекат. Такође потврђеном јаком позитивном корелацијом између *UACR* и протеинурије и холестерола можемо тврдити да снижавањем протеинурије примена витамина D индиректно утиче и на поправљање липидног статус, првенствено укупног холестерола.

За адекватну гломерулску функцију неопходан је одређени ниво експресије нефрина. У условим хипергликемије се у структурама гломерула снижава експресија нефрина, али повећава екскреција нефрина у урину (88,89,90). *Petrica L* је показала да концентрација нефрина у урину корелира са нивоом протеинурије код пацијената са ДМ тип 2 и ДН. Код наших пацијената није био такав случај. На почетку испитивања апсолутне и кориговане концентрације нефрина у урину су биле највише у групи пацијената са нормоалбуминуријом, затим код пацијената са микроалбуминуријом и најниже код пацијената са макроалбуминуријом. Након шестомесечне примене витамина D, само су пацијенти у групи са микроалбуминуријом статистички значајно снижили почетне вредности. Пацијенти из групе са нормоалбуминуријом су имали и највише концентрације нефрина у крви, а након примене витамина D ни у једној групи пацијената нема статистички значајног снижења нивоа нефрина.

С обзиром да се рецептори за  $TGF-\beta_1$  уочавају се на свим структурама гломерула и да глукоза и завршни продукти гликозилације стимулишу продукцију  $TGF-\beta_1$  у готово свим ћелијама, те је његова експресија у гломерулу и у тубулоинтерстицијуму оболелих од ДМ појачана (83,84). *Kim MJ* и сарадници су доказали да концентрација  $TGF-\beta_1$  у урину расте пропорционално прогресији дијабетесне нефропатије, као и да примена виших доза холекалциферола у периоду корекције недостатка витамина D значајно снижава ниво  $TGF-\beta_1$  у урину, и то нарочито код непушача. Код наших пацијената најниже апсолутне и кориговане концентрације  $TGF-\beta_1$  у урину имали су пацијенти у групи са нормоалбуминуријом, затим пацијенти у групи са макроалбуминуријом, а највише

пацијенти у групи са микроалбуминуријом, нивои између група нису били статистички значајно различити. Након шестомесечне примене витамина D апсолутне и кориговане концентрације су снижене код пацијената у групи са микроалбуминуријом и макроалбуминуријом, а статистички значајна разлика присутна је само у групи пацијента са макроалбуминуријом. На основу ових података можемо закључити, да корекција недостатка витамина D, може утицати на снижавање нивоа TGF- $\beta_1$  у урину, код пацијената са ДМ и већ испољеним знацима ДН, односно присутном албуминуријом. Када је у питању концентрација TGF- $\beta_1$  у крви, код наших пацијената стање је обрнуто у односу на вредности у урину, најниже концентрације имали су пацијенти са макроалбуминуријом, затим пацијенти са микроалбуминуријом, а највише пацијенти са нормоалбуминуријом, разлика није статистички значајна између група. Подаци других аутори који су анализирају ниво TGF- $\beta_1$  у крви су различити, тако су су *Kim MJ* и сарадници потврдили да ниво TGF- $\beta_1$  у крви корелира са прогресијом ДН односно нивоом албуминурије, док су други аутори. додуше на анималном моделу су показали да ниво TGF- $\beta_1$  у крви није повишен код животиња са микро и макроалбуминуријом. У сваком случају *Chang i sradanici* смтрају да је за успоравање прогресије ДН у сваком случају значајнија локална супресија активности TGF- $\beta_1$  односно на нивоу бубрега. Они тврде да супресија дејства TGF- $\beta_1$  на нивоу подоцита више утиче на успоравање губитка екскреционе функције бубрега (ГФР) него на снижавање албуминурије и интерстицијске фиброзе. Док супресија дејства TGF- $\beta_1$  на нивоу проксималног тубула више утиче на снижавање албуминурије и успоравање интерстицијске фиброзе него на екскреционе функције бубрега. Они износе да је код пацијената са ДМ и ДН системска супресија дејства TGF- $\beta_1$  чак штетна, јер то доводи до примарног алдостеронизма и поремећеног метаболизма воде и натријума, тако да предпостављају да један од механизма лечења и успоравања ДН нефропатије у будућности треба да буде управо циљана супресија TGF- $\beta_1$  само на нивоу бубрега (85). С обзиром да је код наших пацијената ниво TGF- $\beta_1$  након супституције витамина D снижен само у урину можемо рећи да витамин D само на нивоу бубрега врши супресију TGF- $\beta_1$ , управо као што се препоручује.

Хронична хипергликемија како смо већ навели стимулише синтезу VEGF A, и покреће низ међусобно повезаних метаболичких и хемодинамских процеса који су одговорни за развој ДН. У периоду почетног и умереног оштећења бубрежног ткива ниво VEGF A у бубрегу је повишен, међутим временом како оштећење подоцита и проксималног тубула напредује, како је фиброза све више изражен ниво VEGF A може да се снизи јер су ћелије које га секретује дефинитивно оштећење (56,91). Код наших пацијената пре започињања примене витамина D најниже апсолутне и кориговане концентрације VEGF A у

јутарњем урину имали су пацијената са нормоалбуминуријом, затим пацијенти са макроалбуминуријом, док су највише вредности имали пацијенти у групи са микроалбуминуријом. То управо потврђује тврдњу да у фази узрапредовале ДН где је степен оштећења подоцита и ћелија проксималног тубула већи, ниво VEGF A може да се снижава у односу на фазе ДН где имамо нижи степен оштећења бубрега. Након завршене супституције у све три групе забележили смо статистички значајно снижење апсолутних и коригованих концентрација VEGF A у урину. Управо у групи пацијената са микроалбуминуријом, где је била највиша апсолутна и коригована концентрација VEGF A, доказана је и умерена негативна корелација између витамина D и апсолутне концентрације VEGF A у урину након супституције. (*Spearman's rho* = -0,362,  $p < 0,082$ ) и јака негативна корелација између витамина D и кориговане концентрације VEGF A у урину након супституције. (*Spearman's rho* = -0,531,  $p < 0,008$ ). Кад је у питању ниво VEGF A у крви пре започете супституције најниже вредности су измерене код пацијената у групи са нормоалбуминуријом, затим у групи са микроалбуминуријом, док су највише вредности имали пацијенти у групи са макроалбуминуријом. Након спроведене терапије са витамином D нисмо забележили статистички значајан пад вредности ни у једној испитиваној групи. Код пацијената у групи са макроалбуминуријом након супституције имамо нумерички значајан пад вредности и потврђену умерену негативну корелацију између витамина D и нивоа VEGF A у крви након супституције (*Spearman's rho* = - 0,336;  $p < 0.070$ ).

Генерално можемо закључити да смо код наших пацијената корекцијом недостатка витамина D и његовом шестомесечном применом постигли редукцију нивоа албуминурије, протеинурије, *HbA1c*, *CRP-a*, укупног холестерола, триглицерида, VEGF A у урину, TGF- $\beta_1$  у урину и нефрина у урину код пацијената са микроалбуминуријом. Статистички значајна негативна корелација између нивоа витамина D и нивоа *UACR*, 24-часовне протеинурије, укупног холестерола, *CRP-a* и VEGF A у крви доказана је у групи пацијената са макропротеинуријом. Ова група пацијената имала је најнижи стартни клиренс креатинина, а на крају испитивања постигнут је статистички значајан пораст истога. Такође код ове групе пацијената постигнут је статистички значајан пад апсолутних и коригованих концентрација VEGF A и TGF- $\beta_1$  у урину па на основу тога можемо рећи да је током нашег испитивања, витамин D имао посебно изражено ренопротективно дејство код пацијената са макропротеинуријом и почетном ХБИ. С обзиром да смо постигли статистички значајно снижење нивоа *UACR*, 24-часовне протеинурије, триглицерида, укупног холестерола, *HbA1c-a*, *CRP-a*, VEGF A и у друге две групе, и нефрина код пацијената са микроалбуминуријом, можемо закључити да примена витамин D код свих пацијената са ДМ тип 2 има ренопротективну улогу.

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

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

На почетку испитивања пацијенти који су имали дефицијенцију витамина D имали су нижи ниво *CRP-a* у односу на пацијенте са инсуфицијенцијом витамина D, међутим након шестомесечне надокнаде витамина D у обадве групе пацијената постигнуто је статистички значајно снижење нивоа *CRP-a*. Није било статистички значајне разлике између група ни на почетку студије ни након завршене супституције. Ниво јутарње гликемије је на почетку студије у групи пацијената са дефицијенцијом витамина D био виши, у односу на пацијенте са инсуфицијенцијом витамина D, након шестомесечне надокнаде постигнут је статистички значајан пад нивоа јутарње гликемије у истој групи ( $p < 0,001$ ), док у групи пацијената са инсуфицијенцијом витамина D није било редукције нивоа гликемије након терапије. Између група разлика у вредностима није имала статистичку значајност. Ниво *HbA1c* на почетку студије је у групи пацијената са дефицијенцијом витамина D био виши у односу на групу пацијената са инсуфицијенцијом. Након шестомесечне терапије постигнут је статистички значајан пад нивоа *HbA1c* у обадве групе. Између група разлика у вредностима није имала статистичку значајност. На основу изнетих резултата видимо да пацијенти са нижим нивоом витамина D на почетку испитивања имају виши ниво јутарње гликемије и *HbA1c*, што указује на лошију гликорегулацију (113). Нижи ниво витамина D није код тих пацијената условио и виши ниво *CRP-a*.

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



клиренса креатинина ( $p < 0,001$ ) након супституције имамо само у групи пацијената са почетном дефицијенцијом витамина D. Значи виши степен недостатка витамина D на почетку испитивања код наших пацијената није условио и више нивое азотних материја уз последично нижи клиренс креатинина, али су неведени параметри у овој групи пацијената статистички значајно побољшани у односу на пацијенте са блажим недостатком витамина D.

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

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

Када су у питању биомаркери које смо пратили, имамо следеће резултате. Сви биомаркери и нефрин и VEGF A и TGF- $\beta_1$  како у урину тако и у крви имају вишу концентрацију код пацијената са дефицијенцијом витамина D. Након шестомесечне примене витамина D само пацијенти са дефицијенцијом витамина D имају статистички значајно снижење концентрације нефрина у урину. Нефрин у крви након шестомесечне надокнаде парадоксално расте у обадве групе пацијената. Када је у питању TGF- $\beta_1$  статистички значајно снижење концентрације TGF- $\beta_1$  у урину након примене витамина D имају само пацијенти са почетном дефицијенцијом витамина D. У крви промена ниво TGF- $\beta_1$  код пацијента са дефицијенцијом витамина D након терапије се није статистички значајно мењала, а код пацијената са инсуфицијенцијом витамина D је статистички значајно порасла. Ниво VEGF A у урину је статистички значајно снижен у обадве групе, док је у

крви ниво снижен само у групи са инсуфицијенцијом витамина D али без статистичке значајности.

На основу изнесених података можемо рећи да пацијенти са дефицијенцијом витамина D имају више вредности *HbA1c*, и више концентрације свих биомаркера како у урину тако и у крви. Такође, само пацијенти са дефицијенцијом витамина D након шестомесечне примене витамина D имају статистички значајно ниже нивое нефрина, TGF- $\beta_1$  и VEGF A у урину, што значи да примена витамина D има јаче ренопротективно дејство код пацијената са вишим степеном недостатка витамина D (113).

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

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

Пацијенти који су на крају студије имали ниво витамина D у референтним границама статистички значајно су снизили ниво *CRP-a* на крају студије у односу на ниво на почетку студије ( $p < 0,001$ ). Ти пацијенти су имали ниже вредности *CRP-a* на почетку и на крају студије у односу на пацијенте код којих је ниво витамина D остао снижен на крају студије, али без статистичке значајности у разлици вредности између група. Што значи, да ако се ниво витамина D након шестомесечне надокнаде доведе до референтних вредности већа је шанса да ће се ниво *CRP-a* статистички значајно снизити у односу на почетне вредности (141). За статистички значајно снижавање нивоа јутарње гликемије након терапије није неопходно да ниво витамина D након надокнаде буде у референтним вредностима, јер статистички значајан пад нивоа јутарње гликемије након супституције имамо у обадве групе (142). Пацијенти код којих је на крају студије ниво витамина D био у референтним границама, имали су статистички значајно ниже вредности *HbA1c* на почетку испитивања у

односу на пацијенте код којих је ниво витамина D на крају студије остао снижен ( $p = 0,041$ ). У обадве групе пацијената ниво *HbA1c* на крају испитивања је статистички значајно нижи у односу на вредности на почетку студије. На основу изнетих резултата видимо да за побољшање параметара гликорегулације није неопходно да се ниво витамина D након супституције доведе до референтних граница. Више аутора је спроводило надокнаду витамина D у краћи временском период од нас и такође су имали повољан терапијски ефекат (142). Што показује да витамин D дефинитивно има повољан ефекат на гликорегулацију код пацијената са ДМ тип 2.

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

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

наших пацијената поправља липидни статус, а ниво укупног холестерола је статистички значајно нижи ако је ниво витамина D након супституције у референтним границама.

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

Када су у питању биомаркери и нормализација нивоа витамина D након терапије имамо следеће стање. И нефрин и TGF- $\beta_1$  на почетку испитивања имају више концентрације (и апсолутне и кориговане) у урину и крви код пацијената у групи са нормализованим нивоом витамина D на крају студије. Код TGF- $\beta_1$  разлика је статистички значајна. Након шестомесечне примене витамина D ниво нефрина остаје виши у групи пацијената са витамином D у референтним вредностима, али разлика у нивоима нема статистичку значајност, нити су се нивои између група статистички значајно разликовали. Апсолутне и кориговане концентрације TGF- $\beta_1$  у урину су статистички значајно ниже након надокнаде витамина D у обадве групе, а ниво TGF- $\beta_1$  је статистички значајно виши и на почетку и на крају студије у групи пацијената који имају ниво витамина D на крају студије у референтним границама. Ниво TGF- $\beta_1$  у крви је након завршене супституције снижен у групи пацијената са нивоом витамина D у референтним границама али разлика нема статистичку значајност. Концентрације VEGF A су и на почетку студије и на крају студије како у урину, тако и у крви нижи код пацијената са витамином D у референтним границама након терапије, али разлика нема статистичку значајност. Након супституције апсолутне и кориговане концентрације VEGF A у урину су статистички значајно снижене у обадве групе, док је концентрација у крви снижена код пацијената са нормализованим нивоом витамина D на крају студије, али пад није статистички значајан.

Кад сумирамо наведене податке можемо закључити да нормализација нивоа витамина D након шестомесечне надокнаде не доводи код пацијената до статистички значајнијег снижења нивоа нефрина, TGF- $\beta_1$  и VEGF A како у урину тако и у крви, у односу на пацијенте код којих је ниво витамина D након терапије остао снижен.

## **5.5. Анализа резултата у односу на пушачки статус пацијената**

С обзиром да неки аутори реф. наводе да корекција недостатка витамина TGF- $\beta_1$  има снажнији ефекат на снижавање протеинурије и TGF- $\beta_1$  код пацијената који не пуше цигарете у односу на оне који пуше цигарте, анализирали смо наше добијене резултате у односу на пушачки статус пацијента. Такође сматра се да је ниво витамина D код оболелих од ДМ тип 2 и који пуше цигарете значајно нижи у односу на непушаче (145). Све пацијенти су на основу пушаког статуса, невезано за вредност протеинурије на почетку студије, подељени у две групе. Прву групу чине пацијенти који не пуше цигарете и у њој је било 54 (60.00%) пацијента, а другу групу чине пацијенти који пуше цигарете, и у њој је било 36 (40.00%) пацијената. Анализирани су сви резултати на почетку студије и након шестомесечне примене витамина D.

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

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

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

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

На ниво *CRP-a* као параметра инфламације, корекција недостатка витамина D је деловала подједнако и код пушача и код непушача, тако да не бисмо могли рећи да је антиинфламаторно дејство јаче изражено у једној од група (145).

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

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

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

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

Ниво апсолутних и коригованих концентрација нефрина у урину је на почетку испитивања био незнатно нижи у групи пацијената који пуше цигарете, након завршене супституције пацијенти који пуше цигарете имају значајан нумерички пад апсолутних и коригованих концентрација нефрина у урину али разлика између група како на почетку тако и на крају испитивања је без статистичке значајности. Концентрација нефрина у крви и на почетку и на крају испитивања је нижа у групи пацијената који не пуше цигарете али разлика између група је без статистичке значајности, а ниво нефрина након шестомесечне примене витамина D расте у обадве групе, али такође без статистичке значајности (144,145).

Ниво апсолутних и коригованих концентрација TGF- $\beta$ 1 у урину на почетку испитивања је био статистички значајно нижи у групи пацијената који не пуше цигарете, док је на крају испитивања ниво апсолутних и коригованих концентрација TGF- $\beta$ 1 у урину снижен у обадве групе али статистички значајан пад имамо само у групи пацијената који пуше цигарете ( $p = 0.001$ ). Што је у супротности са другим ауторима (83). *Kim* и сарадници су доказали статистички значајно снижење нивоа TGF- $\beta$ 1 у урину након примене витамина D само код непушача. Ниво TGF- $\beta$ 1 у крви на почетку и на крају испитивања је нижи у групи пацијената који не пуше цигарете али разлика је без статистичке значајности, и разлика између група није статистички значајна.

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

На основу добијених резултата можемо предпоставити да витамин D, поред ренопротективног ефекта код пацијената са ДМ тип 2, утиче и на превенцију кардиоваскуларних догађаја, с обзиром да је статистички значајно снижена албуминурија, коригован липидни статус и побољшани параметри гликорегулације. Међутим кардиоваскуларни догађаји нису били предмет садашњег испитивања, али нам може сугерисати на шта би смо могли ставити акценат у наредним студијама.

С обзиром да је у овој студији број пацијената у групама био релативно мали, могуће је да би се са већим бројем пацијената и дужим периодом праћења добили још одређенији подаци. Могао би се детаљније испитати ефекат витамина D на проинфламаторне цитокинеи кардиоваскуларне догађаје које овом приликом нисмо пратили. Испитивање би се могло проширити и на нове уринарне или серумске биомаркере које други аутори наводе као потенцијалне ране показатеље развоја и прогресије ДН.



## 6. Закључци

На основу изнетих резултата могу се извести следећи закључци:

1. Примена холекалциферола током два месеца у дози од 20 000 IU два пута недељно, а затим 5000 IU два пута недељно још четири месеца, доводи до статистички значајног пораста нивоа витамина D у крви код пацијената са ДМ тип 2 и инсуфицијенцијом/дефицијенцијом витамина D, без пропратних нежељених ефеката.
2. Шестомесечна применена витамина D доводи до статистички значајног пораста клиренса креатинина код пацијената са ДМ тип 2 и микроалбуминуријом и макроалбуминуријом.
3. Шестомесечна примена витамина D статистички значајног побољшава гликорегулацију (снижава ниво јутарње гликемије и *HbA1c*) код пацијената са ДМ тип 2, како без албуминурије, тако и код оних са микроалбуминуријом и макроалбуминуријом.
4. Шестомесечна примена витамина D доводи до статистички значајног снижења нивоа *CRP-a* код пацијената са ДМ тип 2 и присутном микроалбуминуријом и макроалбуминуријом, што потврђује антиинфламаторно дејство витамина D.
5. Шестомесечна примена витамина D доводи до побољшања липидног статуса (статистички значајно снижава нивоа укупног холестерола и триглицерида) код пацијената са ДМ тип 2, како без албуминурије, тако и код оних са микроалбуминуријом и макроалбуминуријом.
6. Шестомесечна примена витамина D доводи до статистички значајног снижења UACR и 24-часовне протеинурије код пацијената са ДМ тип 2, како без албуминурије, тако и код оних са микроалбуминуријом и макроалбуминуријом.
7. Шестомесечна примена витамина D доводи до статистички значајног снижења апсолутних и коригованих концентрација нефрина у урину код пацијената са ДМ тип 2 и микроалбуминуријом.
8. Шестомесечна примена витамина D доводи до статистички значајног снижења апсолутних и коригованих концентрација TGF- $\beta$ 1 у урину код пацијената са ДМ тип 2 и макроалбуминуријом, и нумерички значајног снижења у групи са микроалбуминуријом.
9. Шестомесечне примене витамина D не доводи до статистички значајног снижења концентрација TGF- $\beta$ 1 у крви.

10. Шестомесечна примена витамина D доводи до статистички значајног снижења нивоа апсолутних и коригованих концентрација VEGF A у урину, код пацијената са ДМ тип 2, како без албуминурије, тако и код оних са микроалбуминуријом и макроалбуминуријом.
11. Шестомесечна примена витамина D не доводи до статистички значајног снижења концентрација VEGF A у крви, код пацијената са ДМ тип 2, како без албуминурије, тако и код оних са микроалбуминуријом и макроалбуминуријом, али уз доказану снажну негативну корелацију између нивоа витамина D и концентрације VEGF A код пацијената у групи са макроалбуминуријом.
12. Шестомесечна примена витамина D има јаче ренопротективно дејство код пацијената са дефицијенцијом витамина D на почетку испитивања, такође пацијенти са дефицијенцијом витамина D имају на почетку испитивања виши ниво HbA1c, и више концентрације свих праћених биомаркера како у урину тако и у крви у односу на пацијенте са инсуфицијенцијом витамина D.
13. Нормализација нивоа витамина D на крају студије статистички значајно појачава ефекат витамина D на снижавање нивоа албуминурије, 24-часовне протеинурије и укупног холестерола.
14. Корекција недостатака витамина D код пацијената који пуше цигарете статистички значајније побољшава липидни статус и повећава клиренс креатинина у односу на пацијенте који не пуше цигарете.
15. Корекција недостатака витамина D код пацијената који не пуше цигарете статистички значајније побољшава гликорегулацију и снижава албуминурију у односу на пацијенте који пуше цигарете.
16. Ниво свих биомаркера је на почетку испитивања нижи код пацијената који не пуше цигарете, а након надокнаде витамина D статистички значајно снижење TGF- $\beta$ 1 имамо код пацијената који пуше цигарете.

## 7. Литература

1. *Ahmed AM*. History of diabetes mellitus. *Saudi Med J* 2002;23(4):373-8.
2. *Iskeandar AZ*. Arabic-Islamic medicine and its influence on the Latin West. *Medical Journal of Islamic World* 1986;1:64-67.
3. *McGrew RE*. Encyclopedia of Medical history. 1st ed. London, (United Kingdom): McMillan Press; p. 74-297.
4. *Langerhans P*. Contributions to the microscopic anatomy of the pancreas. Berlin (DE): Lang G; 1869. Reprint of the German origin with an English Translation. Morrison H. Baltimore, (USA): The John Hopkin's Press;1937. p. 85- 105.
5. *Pratt JH*. A reappraisal of researchers leading to the discovery of insulin. *Journal of History of Medicine* 1954; 9: 281-289.
6. *Wrenshall GA, Hatenyi G, Feasby WR*. The story of insulin. London, (United Kingdom): The Bodley Heod Ltd;1962. p. 39-52.
7. *Banting F, Best C, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA*. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus: a preliminary report. *Canadian Medical Association Journal* 1922;12:141-146.
8. *Gerich JE*. Oral hypoglycemic agents. *New Eng J Med* 1989;321:1231-1245.
9. *Mac Pherson JN, Feely J*. Insulin. *BMJ* 1990;300:731-736.
10. *Amitani M, Asakawa A, Amitani H, Inui A*. The role of leptin in the control of insulin-glucose axis. *Front Neurosci* 2013;7:51.
11. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*. 7th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2015.
12. *Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, Linnenkamp U, Guariguata L, Cho NH et.al*. *IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040*. *Diabetes Res Clin Pract* 2017 Jun;128:40-50.
13. *Kautzky-Willer A, Harreiter J, Pacini G*. Sex and Gender Differences in Risk, Pathophysiology and Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *Endocr Rev* 2016 Jun;37(3):278-316.
14. *Holman N, Young B, Gadsby R*. Current prevalence of Type 1 and Type 2 diabetes in adults and children in the UK. *Diabet Med J Br Diabet Assoc* 2015;32:1119–20.
15. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 populationbased studies with 4.4 million participants. *Lancet Lond Engl* 2016;387:1513–30.
16. *van Dooren FEP, Neffs G, Schram MT, Verhey FRJ, Denollet J, Pouwer F*. Depression and risk of mortality in people with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 2013;8:e57058.

17. *Degli Esposti L, Saragoni S, Buda S, Sturani A, Degli Esposti E.* Glycemic control and diabetes-related health care costs in type 2 diabetes; retrospective analysis based on clinical and administrative databases. *Clin Outcomes Res CEOR* 2013;5:193–201.
18. Diabetes UK. The cost of diabetes. Diabetes UK, London, United Kingdom; 2014.
19. United States Renal Data System. 2016 USRDS Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. Bethesda, MD: National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2016.
20. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. World population prospects: the 2015 revision. New York, USA: World Population Prospects; 2015.
21. Serbian Diabetes Register; report No7. Edt. Rakočević I., Miljuš D. Institute of Public Health of Serbia "Dr Milan Jovanović Batut" 2013. Incidence and mortality of diabetes in Serbia.
22. *Lalić NM, Zamaklar M, Pudar G, Kocić R, Antić S, Pešić M et al.* Nac vodič dobre Klin prakse DIABETES Mellit. 2012.
23. World Health Organization. Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycemia: Report of a WHO/IDF Consultation. Geneva, World Health Org., 2006.
24. *Tuttle KR, Bakris GL, Bilous RW, Chiang JL, de Boer IH, Goldstein-Fuchs J, et al.* Diabetic Kidney Disease: A Report From an ADA Consensus Conference. *Diabetes Care.* 2014 Oct 10;37(10):2864–83.
25. *Atkinson MA, Maclaren NK.* The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1994;331:1428.
26. *Tisch R, McDevitt H.* Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 1996; 85:291.
27. *Atabani SF, Thio CL, Divanovic S, Trompette A, Belkaid Y, Thomas DL KC.* Association of CTLA4 polymorphism with regulatory T cell frequency. *Eur J Immunol* 2005;35(7):2157–62.
28. *Imagawa A, Hanafusa T, Miyagawa J, Matsuzawa Y.* A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies. Osaka IDDM Study Group. *N Engl J Med* 2000; 342:301.
29. *Atkinson MA, Eisenbarth GS.* Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet.* 2001 Jul 21;358(9277):221-9. Review. Erratum in: *Lancet.* 2001 Sep 1;358(9283):766.
30. *Hyöty H, Taylor KW.* The role of viruses in human diabetes. *Diabetologia* 2002; 45:1353.
31. *Lin YC, Chang YH, Yang SY, Wu KD, Chu TS.* Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease. *J Formos Med Assoc* 2018; 24. pii: S0929-6646(17)30803-3. doi: 10.1016/j.jfma.2018.02.007.
32. *Baynest HW.* Classification, Pathophysiology, Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *Diabetes Metab.* 2015;6(5):1–9.

33. *Sladek R, Rocheleau G, Rung J, et al.* A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 2007; 445:881.
34. *Stephenson E.J, Smiles W, Hawley J.A.* The Relationship between Exercise, Nutrition and Type 2 Diabetes. In: *Diabetes and Physical Activity*. 2014. p. 1–10.
35. *Duran-Salgado MB, Rubio-Guerra AF.* Diabetic nephropathy and inflammation. *World J Diabetes*. 2014; 5(3): 393-8.
36. *American Diabetes Association.* 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018, *Diabetes Care* 2018;41(1):S13-S27.
37. *Association AD.* Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*. 2016;39(1):13–22.
38. *Pinhas-Hamiel O, Zeitler P.* Acute and chronic complications of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *Lancet*. 2007;369(9575):1823–31.
39. *Aastha Chawla, Rajeev Chawla, and Shalini Jaggi.* Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? *Indian J Endocrinol Metab* 2016; 0(4):546–551.
40. *Duff M, Demidova O, Blackburn S, Shubrook J.* Cutaneous Manifestations of Diabetes Mellitus. *Clin Diabetes*. 2015 Jan;33(1):40–8.
41. *Krentz AJ, Clough G, Byrne CD.* Interactions between microvascular and macrovascular disease in diabetes: Pathophysiology and therapeutic implications. *Diabetes Obes Metab*. 2007;9:781–91.
42. *Al-Wakeel JS, Hammad D, Al Suwaida A, Mitwalli AH, Memon NA, Sulimani F.* Microvascular and macrovascular complications in diabetic nephropathy patients referred to nephrology clinic. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2009;20:77–85.
43. *Matheus AS, Gomes MB.* Early aggressive macrovascular disease and type 1 diabetes mellitus without chronic complications: A case report. *BMC Res Notes*. 2013;6:222.
44. *Orasanu G, Plutzky J.* The pathologic continuum of diabetic vascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53(5 Suppl):S35–42.
45. *Ruan Y, Guo Y, Zheng Y, Huang Z, Sun S, Kowal P, Shi Y, Wu F.* Cardiovascular disease (CVD) and associated risk factors among older adults in six low-and middle-income countries: results from SAGE Wave 1. *BMC Public Health*. 2018 Jun 20;18(1):778.doi:10.1186/s12889-018-5653-9.
46. *Parchwani D, Upadhyah A.* Diabetic Nephropathy: Progression and Pathophysiology. *International Journal of Medical Science and Public Health* 2012;1:Issue 2
47. *Fioretto P, Caramori ML, Mauer M.* The kidney in diabetes: dynamic pathways of injury and repair. The Camillo Golgi Lecture 2007. *Diabetologia* 2008;51(8):1347–55.
48. *Dragović T.* Uticaj metaboličke kontrole na nastanak i razvoj bubrežne lezije u šećernoj bolesti. *Vojnosanit Pregl* 2002; 59(3):293–297.

49. Novak JE, Yee J. Diabetes and the Kidney: Sweet Dreams. *Adv Chronic Kidney Dis* 2018; 25(2): 115-8. doi: 10.1053/j.ackd.2018.01.001.
50. Carranza K, Veron D, Cercado A, Bautista N, Pozo W, Tufro A, Veron D. Cellular and molecular aspects of diabetic nephropathy; the role of VEGF-A. *Nefrologia*. 2015;35(2):131-8.
51. Teng B, Duong M, Tossidou I, Yu X, Schiffer M. Role of protein kinase C in podocytes and development of glomerular damage in diabetic nephropathy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:179.
52. Quack I, Woznowski M, Potthoff SA, Palmer R, Konigshausen E, Sivritas S, et al. PKC alpha mediates beta-arrestin2-dependent nephrin endocytosis in hyperglycemia. *J Biol Chem* 2011; 286:12959–70.
53. Menne J, Meier M, Park JK, Boehne M, Kirsch T, Lindschau C, et al. Nephrin loss in experimental diabetic nephropathy is prevented by deletion of protein kinase C alpha signaling in vivo. *Kidney Int* 2006;70:1456–62.
54. Anil Kumar P, Welsh GI, Saleem MA, Menon RK. Molecular and cellular events mediating glomerular podocyte dysfunction and depletion in diabetes mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014;5:151.
55. Yehia M, Shaker, Hanan A, Soliman, Elham Ezzat, Nervana S, Hussein, Esmat Ashour, Ashraf Donia, Soad M. Eweida. Serum and urinary transforming growth factor beta 1 as biochemical markers in diabetic nephropathy patients. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. 2014; 3(1):16-23.
56. Brosius FC, Coward RJ. Podocytes, signaling pathways, and vascular factors in diabetic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2014;21(3):304-10.
57. Gnudi L, Viberti G, Raij L, Rodriguez V, Burt D, Cortes P, Hartley B, Thomas S, Maestrini S, Gruden G. GLUT-1 over expression: Link between hemodynamic and metabolic factors in glomerular injury? *Hypertension* 2003; 42:19-24.
58. Takebayashi K, Matsumoto S, Aso Y, Inukai T. Association between circulating monocyte chemoattractant protein-1 and urinary albumin excretion in nonobese Type 2 diabetic patients. *J Diabetes Complications* 2006;20:98-104.
59. García-García PM, Getino-Melián MA, Domínguez-Pimentel V, Navarro-González JF. Inflammation in diabetic kidney disease. *World J Diabetes*. 2014;5(4):431-43.
60. Lopez-Parra V, Mallavia B, Egido J, Gomez-Guerrero C. Immunoinflammation in Diabetic Nephropathy: Molecular Mechanisms and Therapeutic Options. In: Chan JSD. *Diabetic Nephropathy*. InTech, Chapters, 2012:127-146.
61. Marrero MB, Banes-Berceli AK, Stern DM, Eaton DC. Role of the JAK/STAT signaling pathway in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290:F762-F768.

62. *Moriya T, Tanaka K, Hosaka T, Hirasawa T, Fujita Y.* Renal structure as an indicator for development of albuminuria in normo- and microalbuminuric type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2008;82(3):298-304.
63. *Kefalides NA.* Basement membrane research in diabetes mellitus. *Coll Relat Res* 1981;1:295–910.
64. *Groggel G, Stevenson J, Hovingh P, Linker A, Border W.* Changes in heparan sulfate correlate with increased glomerular permeability. *Kidney Int* 1988;33:517-523.
65. *Zimmerman KW.* Über den Bau des glomerulus der menschlichen niere. *Z Mikr Anat Forsch* 1929;18:520–2.
66. *Petrica L, Vlad A, Gluhovschi G, Gadalean F, Dumitrascu V, Gluhovschi C, Velciov S, Bob F, Vlad D, Popescu R, Milas O, Ursoniu S.* Proximal tubule dysfunction is associated with podocyte damage biomarkers nephrin and vascular endothelial growth factor in type 2 diabetes mellitus patients: a cross-sectional study. *PLoS One.* 2014; 9(11):e112538.
67. *Satoh D, Hirose T, Harita Y, Daimon C, Harada T, Kurihara H, et al.* aPKC $\lambda$  maintains the integrity of the glomerular slit diaphragm through trafficking of nephrin to the cell surface. *J Biochem* (2014);156:115–28.
68. *Dipaolo S, Ranieri E, Schena F.* High glucose concentration induces the overexpression of TGF- $\beta$  through the activation of a platelet derived growth factor loop in human mesangial cells. *Am J Pathol* 1996;149:2095-2106.
69. *Vasylyeva TL, Ferry RJ.* Novel roles of the IGF – IGFBP axis in etiopathophysiology of diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;76(2):177-86.
70. *Gilbert RE, Cooper ME.* The tubulo-interstitium in progressive diabetic kidney disease: more than an aftermath of glomerular injury. *Kidney Int* 1999;56:1627–37.
71. *Tervaret T.C., Mooyaart A., Amann K., Cohen A., Cook H. et.al.* Pathologic classification of diabetes nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:556-63.
72. *Fioretto P, Mauer S, Bilous R.W, Gotez F.C, Sutherlan D.E, Steffs M.W.* Effects of pancreas transplantation on glomerular structure in insulin depedent diabetic patients with their own kidneys. *Lancet* 1993; 342:1193-6.
73. *National kidney Foundation. KDOQI Clinical Practics Guideline for Diabetes and CKD 2012 update. Am J Kidney Dis* 2012;60(5):850-86.
74. *Jafar TH, Chaturvedi N, Hatcher J, Levey AS.* Use of albumin creatinine ratio and urine albumin concentration as a screening test for albuminuria in an Indo-Asian population. *Nephrol Dial Transplant.* 2007;22(8):2194–200.
75. *Dragovic T.* Microalbuminuria in diabetes: definition, identification techniques, and the significance of early recognition. *Vojnosanit Pregl* 2006; 63(12): 1027–1032.

76. Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, Bilous RW, Cull CA, Holman RR, et al. Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: The United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney Int.* 2017;63(1):225–32.
77. O'Connor AS, Schelling JR. Diabetes and the Kidney. *Am J Kidney Dis.* 2017;46(4):766–73.
78. Boronat M, García-Cantón C, Quevedo V, Lorenzo DL, López-Ríos L, Batista F, et al. Non-albuminuric renal disease among subjects with advanced stages of chronic kidney failure related to type 2 diabetes mellitus. *Ren Fail.* 2014;36(2):166–70.
79. Krolewski A.S., Niewczas M.A., Skupien J., Gohda T., Smiles A., Eckfeldt J.H. et.al. Early progressive renal decline precedes the onset of microalbuminuria and its progression to macroalbuminuria. *Diabetes Care* 2014;37:226-34.
80. Reutens A. Epidemiology of diabetic kidney disease. *Med Clin N Am* 2013;97:1-18.
81. Lee SY, Choi ME. Urinary biomarkers for early diabetic nephropathy: beyond albuminuria. *Pediatr Nephrol.* 2015;30(7):1063-75.
82. Lan HY. Diverse roles of TGF- $\beta$ /Smads in renal fibrosis and inflammation. *Int J Biol Sci* 2011;7:1056-1067.
83. Kim MJ, Frankel AH, Donaldson M, Darch SJ, Pusey CD, Hill PD, Mayr M, Tam FW. Oral cholecalciferol decreases albuminuria and urinary TGF- $\beta$ 1 in patients with type 2 diabetic nephropathy on established renin-angiotensin-aldosterone system inhibition. *Kidney Int.* 2011; 80(8): 851-60.
84. Tian Y, Lv G, Yang Y, Zhang Y, Yu R, Zhu J, Xiao L, Zhu J. Effects of vitamin D on renal fibrosis in diabetic nephropathy model rats. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014 May 15;7(6):3028-37.
85. Zhang Z, Sun L, Wang Y, Ning G, Minto AW, Kong J, et al. Renoprotective role of the vitamin D receptor in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2008; 73(2): 163-71.
86. Chang AS., Hathaway CK., Smithies O., Kakoki M. Transforming growth factor- $\beta$ 1 and diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2016; 310(8):F689–F696.
87. Quack I, Woznowski M, Potthoff SA, Palmer R, Konigshausen E, Sivritas S, et al. PKC alpha mediates beta-arrestin2-dependent nephrin endocytosis in hyperglycemia. *J Biol Chem* 2011; 286:12959–70.
88. Menne J, Meier M, Park JK, Boehne M, Kirsch T, Lindschau C, et al. Nephrin loss in experimental diabetic nephropathy is prevented by deletion of protein kinase C alpha signaling in vivo. *Kidney Int* 2006;70:1456–62.
89. Wagner N, Wagner KD, Xing Y, Scholz H, Schedl A.. The major podocyte protein nephrin is transcriptionally activated by the Wilms' tumor suppressor WT1. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:3044–51.



90. *Uchida K, Suzuki K, Iwamoto M, Kawachi H, Ohno M, Horita S, Nitta K.* Decreased tyrosine phosphorylation of nephrin in rat and human nephrosis. *Kidney Int.* 2008;73(8):926-32.
91. *Tufro A, Veron D.* VEGF and podocytes in diabetic nephropathy. *Semin Nephrol.* 2012; 32(4): 385-93.
92. *Veron D, Reidy KJ, Bertuccio C, Teichman J, Villegas G, Jimenez J, et al.* Overexpression of VEGF-A in podocytes of adult mice causes glomerular disease. *Kidney Int* 2010;77:989–99.
93. *Sun L, Yuan Q, Cao N., Guo W., Yao L., Freng J., M. et al.* VEGF polymorphism may contribute to the risk of diabetic nephropathy in patients with diabetes mellitus: a meta analysis. *The Scientific World Journal* 2014; ID 624573.
94. *Tarr JM, Kaul K, Wolanska K, Kohner EM CR.* Retinopathy in diabetes. *Adv Exp Med Biol.* 2012;771:88–106.
95. *Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA.* 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2008;359:1577–89.
96. *Fuller JH, Stevens LK, Wang SL.* Risk factors for cardiovascular mortality and morbidity: The WHO multinational study of vascular disease in diabetes. *Diabetologia.* 2001;44(Suppl 2):S54–64.
97. *Tracy JA, Dyck PJB.* The Spectrum of Diabetic Neuropathies. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 2008;19(1):1–26.
98. *Reed C, Hong J, Novick D, Lenox-Smith A, Happich M.* Incidence of diabetic peripheral neuropathic pain in primary care – a retrospective cohort study using the United Kingdom General Practice Research Database. *Pragmatic Obs Res.* 2013;4:27–37.
99. *Edwards JL, Vincent A, Cheng T, Feldman EL.* Diabetic Neuropathy: Mechanisms to Management. *Pharmacol Ther.* 2008;120(1):1–34.
100. *Autier P, Boniol M, Pizot C, Mullie P.* Vitamin D status and ill health: a systematic review. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014; 2(1): 76-89.
101. *De Luca H.* History of the discovery of vitamin D and its active metabolites. *Bonekey* 2014. Rep 3:479.
102. *Janković S.M.* Farmakologija i toksikologija. 3 izdanje. Medicinski fakultet u Kragujvcu 2011. Rep 3:479
103. *Kimball S, Fuleihan Gel-H, Vieth R.* Vitamin D: a growing perspective. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2008; 45(4):339-414.
104. German Nutrition Society. New reference values for vitamin D. *Ann Nutr Metab* 2012;60(4): 241-6.
105. *Holick MF.* Bioavailability of vitamin D and its metabolites in black and white adults. *N Engl J Med* 2013;369(21): 2047-8.

106. *Cipriani C, Pepe J, Piemonte S, Colangelo L, Cilli M, Minisola S.* Vitamin d and its relationship with obesity and muscle. *Int J Endocrinol* 2014: 8412-48.
107. *Tsiars WG, Weinstock MA.* Factors influencing vitamin D status. *Acta Derm Venereol* 2011; 91(2): 115-24.
108. *Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E.* Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289(1):F8-28.
109. *DeLuca HF.* The vitamin D system in the regulation of calcium and phosphorus metabolism. *Nutr Rev* 1979;37:161–193.
110. *Jones G, Prosser DE, Kaufmann M.* Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D. *J Lipid* 2014;55(1): 13-31.
111. *Bikle DD.* VITAMIN D: Newly Discovered Actions Require Reconsideration of Physiologic Requirements. *Trends Endocrinol Metab* 2010;21(6):375–84.
112. *Zervekh JE.* Blood biomarkers of vitamin D status. *Am J Clin Nutr* 2008;87(4):1087S-91S.
113. *Pludowski P, Holick MF, Grant WB, Konstantynowicz J, Mascarenhas MR, Haq A, et.al.* Vitamin D supplementation guidelines. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018 Jan;175:125-135.
114. *Holick MF.* Vitamin D Deficiency. *N Engl J Med* 2007;357(3): 266-81.
115. *Holick MF.* Vitamin D: a D-Lightful health perspective. *Nutr Rev* 2008; 66(10 Suppl 2):S182-94.
116. *Mohr SB.* A brief history of vitamin d and cancer prevention. *Ann Epidemiol* 2009;19(2): 79-83
117. *Gonzalez-Parra E, Rojas-Rivera J, Tuñón J, Praga M, Ortiz A, Egido J.* Vitamin D receptor activation and cardiovascular disease. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27 Suppl 4: iv17-21
118. *Humalda JK, Goldsmith DJ, Thadhani R, de Borst MH.* Vitamin D analogues to target residual proteinuria: potential impact on cardiorenal outcomes. *Nephrol Dial Transplant* 2015; 30(12): 1988-94.
119. *Schmitz KJ, Skinner HG, Bautista LE, et al.* Association of 25-hydroxyvitamin D with blood pressure in predominantly 25-hydroxyvitamin D deficient Hispanic and African Americans. *Am J Hypertens* 2009;22(8): 867-70.
120. *Ramiro-Lozano JM, Calvo-Romero JM.* Effects on lipid profile of supplementation with vitamin D in type 2 diabetic patients with vitamin D deficiency. *Ther Adv Endocrinol Metab* 2015; 6(6): 245-8. CLINICAL NUTRITION
121. *Qin F.X. et.al.* Effects of vitamin D on plasma lipid profiles in statin-treated patients with hypercholesterolemia: A randomized placebo-controlled trial. *Clinical Nutrition* 2015;34(2):201–206.
122. *Aguirrea P.M. et al.* The effect of vitamin D supplementation on serum lipids in postmenopausal women with diabetes: A randomized controlled trial. *Clinical Nutrition* 2015;34(5):799-804.

123. *Mitri J, Pittas AG.* Vitamin D and diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2014; 43(1): 205-32.
124. *Afzal S, Bojesen SE, Nordestgaard BG.* Low 25-hydroxyvitamin D and risk of type 2 diabetes: a prospective cohort study and metaanalysis. *Clin Chem* 2013;59(2):381-91.
125. *Tabesh M, Azadbakht L, Faghihimani E, Tabesh M, Esmailzadeh A.* Effects of calcium-vitamin D co-supplementation on metabolic profiles in vitamin D insufficient people with type 2 diabetes: a randomised controlled clinical trial. *Diabetologia* 2014; PMID: 25005333
126. *Asemi Z, Samimi M, Tabassi Z, Shakeri H, Esmailzadeh A.* Vitamin D supplementation affects serum high-sensitivity C-reactive protein, insulin resistance, and biomarkers of oxidative stress in pregnant women. *J Nutr* 2013; 143(9): 1432-8.
127. *Garbossa SG, Folli F.* Vitamin D, sub-inflammation and insulin resistance. A window on a potential role for the interaction between bone and glucose metabolism. *Rev Endocr Metab Disord* 2017; 18(2): 243-58.
128. *Momeni A, Mirhosseini M, Kabiri M, Kheiri S.* Effect of vitamin D on proteinuria in type 2 diabetic patients. *J Nephropathol* 2017; 6(1): 10-4.
129. *Huang Y, Yu H, Lu J, Guo K, Zhang L, Bao Y, et al.* Oral supplementation with cholecalciferol 800 IU ameliorates albuminuria in Chinese type 2 diabetic patients with nephropathy. *PLoS One* 2012; 7(11): e50510.
130. *Humalda JK, Goldsmith DJ, Thadhani R, de Borst MH.* Vitamin D analogues to target residual proteinuria: potential impact on cardiorenal outcomes. *Nephrol Dial Transplant* 2015; 30(12): 1988-94.
131. *de Zeeuw D, Agarwal R, Amdahl M, Audhya P, Coyne D, Garimella T, et al.* Selective vitamin D receptor activation with paricalcitol for reduction of albuminuria in patients with type 2 diabetes (VITAL study): a randomised controlled trial. *Lancet* 2010; 376 (9752): 1543-51.
132. *Kampmann U, Mosekilde L, Juhl C, et al.* Effects of 12 weeks high dose vitamin D<sub>3</sub> treatment on insulin sensitivity, beta cell function, and metabolic markers in patients with type 2 diabetes and vitamin D insufficiency - a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Metabolism* 2014;63(9): 1115-24.
133. *Seida JC, Mitri J, Colmers IN, et al.* Effect of Vitamin D(3) Supplementation on Improving Glucose Homeostasis and Preventing Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2014. jc20142136.
134. *Zhang R, Naughton DP.* Vitamin D in health and disease: current perspectives. *Nutr J* 2010;9: 65.

135. Antico A, Tampoia M, Tozzoli R, Bizzaro N. Can supplementation with vitamin D reduce the risk or modify the course of autoimmune diseases? A systematic review of the literature. *Autoimmun Rev* 2012;12(2): 127-36.
136. Wilson VK, Houston DK, Kilpatrick L, et al. Relationship between 25-hydroxyvitamin D and cognitive function in older adults: the Health, Aging and Body Composition Study. *J Am Geriatr* 2014;Soc 62(4):636-41.
137. Spedding S. Vitamin D and depression: a systematic review and meta-analysis comparing studies with and without biological flaws. *Nutrients* 2014.6(4):1501-18.
138. Fried LF, Emanuele N, Zhang JH, Brophy M, Conner TA, Duckworth W, et al. Combined angiotensin inhibition for the treatment of diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 2013; 369(20): 1892-903.
139. Parving HH, Brenner BM, McMurray JJ, de Zeeuw D, Haffner SM, Solomon SD, et al. Cardiorenal end points in a trial of aliskiren for type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2012; 367(23): 2204-13.
140. Xiao X, Wang Y, Hou Y, Han F, Ren J, Hu Z. Vitamin D deficiency and related risk factors in patients with diabetic nephropathy. *J Int Med Res* 2016; 44(3): 673-84.
141. Garbossa SG, Folli F. Vitamin D, sub-inflammation and insulin resistance. A window on a potential role for the interaction between bone and glucose metabolism. *Rev Endocr Metab Disord* 2017; 18(2): 243-58.
142. Li X, Liu Y, Zheng Y, Wang P, Zhang Y. The Effect of Vitamin D Supplementation on Glycemic Control in Type 2 Diabetes Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* 2018 19; 10(3). pii: E375. doi: 10.3390/nu10030375.
143. Rafiq S, Jeppesen PB. Is Hypovitaminosis D Related to Incidence of Type 2 Diabetes and High Fasting Glucose Level in Healthy Subjects: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Nutrients* 2018 10; 10(1). pii: E59. doi: 10.3390/nu10010059.
144. Pereira-Santos M, Costa PR, Assis AM, Santos CA, Santos DB. Obesity and vitamin D deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 2015; 16(4): 341-9.
145. Maxwell CS, Wood RJ. Update on vitamin D and type 2 diabetes. *Nutr Rev.* 2011;May;69(5):291-5.