

2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy

DISERTAČNÍ PRÁCE

Vztah autoimunity a cytokinů ke klinickým aspektům diabetu mellitu 1. typu



Praha 2007

Vypracovala: As. MUDr. Denisa Janíčková Žďárská

Školitel: Prof. MUDr. Milan Kvapil, CSc., MBA.

Školitel - konzultant: MUDr. Eva Zavadová, PhD.

Obsah

PROHLÁŠENÍ	3
PODĚKOVÁNÍ	4
SEZNAM ZKRATEK	5
1. DIABETES MELLITUS – ZÁKLADNÍ FAKTA	7
1.1. KLASIFIKACE	7
1.2. DIAGNOSTIKA	7
2. DIABETES MELLITUS A POZDNÍ ORGÁNOVÉ KOMPLIKACE	9
2.1. ÚLOHA HYPERGLYKÉMIE V PATOGENEZI ORGÁNOVÝCH KOMPLIKACÍ DM	9
2.2. ÚLOHA CYTOKINŮ V PATOGENEZI ORGÁNOVÝCH KOMPLIKACÍ DM	10
3. TGF-β_1 A CHRONICKÉ KOMPLIKACE DM	13
4. DIABETICKÁ NEFROPATIE	14
4.4. CYSTATIN C	18
4.5. LÉČBA DIABETICKÉ NEFROPATIE	19
5. CÍLE PRÁCE	20
5.1. CÍL A	20
5.2. CÍL B	20
6. ČÁST A. - EFEKT TERAPIE RAMIPRIEM NA CYTOKINY A PARAMETRY INCIPIENTNÍ DIABETICKÉ NEFROPATIE U NEMOCNÝCH S DIABETES MELLITUS 1. TYPU	21
6.1. SOUBOR A METODY	21
6.2. VÝSLEDKY	26
6.2.2. <i>Efekt půlroční terapie ramipriem</i>	27
6.3. DISKUZE	34
7. ČÁST B. - TGF-β_1 A BIOCHEMICKÉ PARAMETRY U DIABETES MELLITUS 1. TYPU	36
7.1. SOUBOR A METODY	36
7.1.1. <i>Pacienti</i>	36
7.1.2. <i>Analýza TGF-β_1 a biochemických parametrů</i>	36
7.1.3. <i>Statistická analýza</i>	37
7.2. VÝSLEDKY	39
7.3. DISKUZE	44
8. ZÁVĚRY	46
8.1. ZÁVĚR A A DOPADY DO KLINICKÉ PRAXE	46
8.2. ZÁVĚR B A DOPADY DO KLINICKÉ PRAXE	46
LITERATURA	47
SEZNAM PREZENTACÍ MUDR. DENISA JANÍČKOVÁ ŽĎÁRSKÁ	53

Prohlášení

Prohlašuji,

že jsem diplomovou práci na téma: " Vztah autoimunity a cytokinů ke klinickým aspektům diabetu mellitu 1. typu" vypracovala samostatně. Při práci jsem použila jen prameny, které cituji a uvádím v seznamu literatury.

V Praze 29. června 2007

.....
Denisa Janíčková Žďárská

Poděkování

Ráda bych vyslovila poděkování všem, kteří svými vědomostmi, ochotou a časem přispěli ke vzniku této práce. Především děkuji vedoucímu mé diplomové práce panu Prof. MUDr. Milanovi Kvapilovi, CSc. za odbornou pomoc a cenné připomínky. Dále MUDr. Evě Zavadové, PhD. za pomoc s vyhodnocením výsledků. V neposlední řadě patří vřelé díky mé rodině za podporu při studii.

Autorka

Seznam zkratk

TGF- β_1	transformující růstový faktor
VEGF	vaskulární růstový faktor
IGF-1	růstový faktor podobný inzulínu
EDF	epidermální růstový faktor
PDGF	trombocytární růstový faktor
CTGF	růstový faktor pojivové tkáně
TNF- α	faktor nekrotizující tumory
DN	diabetická nefropatie
DM	diabetes mellitus
ACE	angiotenzin konvertující enzym
ACEI	inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu
MA	mikroalbuminurie
duMA	mikroalbuminurie/24 hodin
AGE	pozdní produkty glykace (advanced glycation endproducts)
RAGE	receptor pro pozdní produkty glykace
CRPC-	reaktivní protein
HbA _{1c}	glykovaný hemoglobin
BMI	body mass index
sBP	systolický krevní tlak
dBp	diastolický krevní tlak
WHO	Světová zdravotnická organizace
ADA	Americká diabetologická společnost
OGTT	orální glukózový toleranční test

DCCT Diabetes Control and Complications Trial

UKPDS UK Prospective Diabetes Study

1. Diabetes mellitus – základní fakta

Diabetes mellitus (DM) představuje skupinu chronických a metabolických chorob, jejichž základním rysem je hyperglykémie (Pelikánová 2003). Podle definice ADA (American Diabetes Association) a doporučení z roku 1997 (Expert Committee 1997) je tato skupina metabolických poruch výsledkem defektu inzulínové sekrece, inzulínové aktivity či kombinací obou abnormalit, které jsou provázeny komplexní poruchou metabolismu cukrů, tuků a bílkovin. V průběhu choroby se postupně rozvíjejí dlouhodobé cévní komplikace postihující řadu orgánů, zejména oko, ledviny, nervy, srdce a cévní řečiště. Klasifikace, diagnostika diabetického syndromu vychází z průkazu hyperglykémie a klinických známek onemocnění.

1.1. Klasifikace

Řada poznatků v etiopatogenezi diabetu vyústila k přijetí nové klasifikace, která je platná v současné době a zohledňuje návrhy Světové zdravotnické organizace z roku 1999 a Americké diabetologické společnosti z roku 1997 (Expert Committee 1997, World Health Organization 1999). Klasifikace je prezentována v tabulce 1.1.

1.2. Diagnostika

Diagnózu DM stanovujeme na základě glykémie ve venózní plazmě, kterou měříme klasickou biochemickou metodou (enzymová nebo o-toluidinové metoda). Kritéria pro diagnózu diabetes mellitus shrnuje tabulka 1.2.

Tab 1.1. Klasifikace diabetes mellitus a glukoregulačních poruch – upraveno podle WHO (1999) a ADA (1997)

<p>Diabetes mellitus</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Diabetes mellitus 1. typu <ol style="list-style-type: none"> a) imunitně podmíněný b) idiopatický 2) Diabetes mellitus 2. typu 3) Ostatní specifické typy diabetu <ol style="list-style-type: none"> a) genetický defekt funkce B buněk b) genetické defekty účinku inzulínu c) onemocnění exokrinního pankreatu d) endokrinopatie e) chemicky a léky indukovaný diabetes f) infekce g) neobvyklé formy imunologicky podmíněného diabetu h) genetické syndromy asociované s diabetem 4) Gestační diabetes mellitus
<p>Hraniční poruchy glukoregulace (poruchy glukózové homeostázy)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Zvýšená glykémie na lačno 2) Porucha glukózové tolerance

Tab 1.2. Kritéria pro diagnózu diabetes mellitus (upraveno dle doporučení ADA 1997)

<p>Diabetes mellitus může být diagnostikován třemi způsoby</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) přítomnost klasických příznaků DM + náhodná glykémie $\geq 11,1$ mmol/l Klasické příznaky zahrnují polyurii, polydypsii a váhový úbytek nejasné příčiny. Náhodná glykémie je hodnota naměřená kdykoli během dne bez ohledu na příjem potravy. <i>nebo</i> 2) glykémie na lačno $\geq 7,0$ mmol/l <i>nebo</i> 3) glykémie ve 120. minutě OGTT (orální glukózový toleranční test) $\geq 11,1$ mmol/l OGTT by měl být prováděn při zátěži 75 g glukózy standardním způsobem. 				
<p>Hraniční porucha glukózové homeostázy</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%;">1) zvýšená glykémie na lačno</td> <td style="width: 50%;">glykémie na lačno je 6,1 – 6,9 mmol/l</td> </tr> <tr> <td>2) porucha glukózové tolerance</td> <td>glykémie ve 120. min OGTT je 7,8-11,0 mmol/l</td> </tr> </table>	1) zvýšená glykémie na lačno	glykémie na lačno je 6,1 – 6,9 mmol/l	2) porucha glukózové tolerance	glykémie ve 120. min OGTT je 7,8-11,0 mmol/l
1) zvýšená glykémie na lačno	glykémie na lačno je 6,1 – 6,9 mmol/l			
2) porucha glukózové tolerance	glykémie ve 120. min OGTT je 7,8-11,0 mmol/l			
<p>Normální hodnoty</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%;">1) normální glykémie na lačno</td> <td style="width: 50%;">glykémie na lačno je $< 6,1$ mol/l</td> </tr> <tr> <td>2) normální glukózová tolerance</td> <td>glykémie ve 120. min OGTT je $< 7,8$ mmol/l</td> </tr> </table>	1) normální glykémie na lačno	glykémie na lačno je $< 6,1$ mol/l	2) normální glukózová tolerance	glykémie ve 120. min OGTT je $< 7,8$ mmol/l
1) normální glykémie na lačno	glykémie na lačno je $< 6,1$ mol/l			
2) normální glukózová tolerance	glykémie ve 120. min OGTT je $< 7,8$ mmol/l			
<p>Kritéria pro diagnózu diabetu musí být potvrzena nejméně 2krát v různých dnech.</p>				

2. Diabetes mellitus a pozdní orgánové komplikace

DM je chronické onemocnění vedoucí po letech trvání k ireverzibilním změnám v pojivové tkáni. Na tomto podkladě se postupně rozvíjejí dlouhodobé cévní komplikace, které jsou hlavní příčinou mortality a morbidit diabetických pacientů ve srovnání se zdravou populací (Krolewski a kol. 1977). Orgánové komplikace jsou pro diabetes nespecifické (diabetická makroangiopatie: urychlená ateroskleróza) či specifické (diabetická mikroangiopatie reprezentovaná retinopatií, nefropatií či neuropatií, kde se kombinuje složka cévní a nervová). Patologický proces v cévní stěně je důsledkem dlouhodobého působení změněného metabolismu při DM, z čehož lze konstatovat, že uvedené komplikace jsou spíše pozdními projevy nemoci než komplikacemi v pravém slova smyslu (Bartoš a kol. 2000).

2.1. Úloha hyperglykémie v patogenezi orgánových komplikací DM

Diabetes má široký dopad na celkový metabolismus organismu, a proto se nabízí mnoho potencionálních mediátorů tkáňového poškození. Jednoznačně nejčastější příčinou diabetických komplikací je dlouhodobá expozice hyperglykémii. Tento fakt je dnes podporován rozsáhlými prospektivními studiemi, a to zejména DCCT - Diabetes Control and Complications Trial (DCCT research group 1993) a UKPDS – UK Prospective Diabetes Study (UKPDS group 1998). Mikrovasculární komplikace jsou nejčastěji přítomny u nemocných s dlouhodobě neuspokojivou metabolickou kompenzací (Molich 1997). Ovšem jsou i výjimky tohoto obecného pravidla. Neboť existují jedinci s dobrou metabolickou kompenzací trpící závažnými orgánovými komplikacemi a na druhé straně jsou pacienti se špatnou kompenzací glykémie, kteří se komplikacím vyhnou. Hyperglykémie, její tíže a trvání, je stěžejním faktorem pro rozvoj diabetických komplikací, ale neméně důležitou roli v jejich manifestaci hraje genetická predispozice, glomerulární tlak a enviromentální faktory (Parving a kol. 1996).

2.2. Úloha cytokinů v patogenezi orgánových komplikací DM

Precizní molekulární a buněčná kaskáda, která vyvolává tkáňové poškození po expozici hyperglykémie, není ještě jednoznačně objasněna. Vzdávající důkazy poukazují, že deregulace cytokinů a růstových faktorů může být zodpovědná nejen za patogenezi autoimunitních, degenerativních či fibrotizujících chorob, ale i patogenezi a progresi mikrovaskulárních komplikací diabetu, zejména DN a retinopatie (Bordur a kol. 1993).

Hyperglykémie způsobí zvýšenou tvorbu pozdních produktů glykace (AGE, z angl. advanced glycation endproducts), které vazbou na monocyty, makrofágy, glomerulární mezangiální buňky či endoteliální buňky spustí sled aktivačních reakcí (Skena a kol. 2005, Cohen a kol. 2003) vedoucích až k funkčním i morfologickým změnám tkání či orgánů. Schematicky je aktivace cytokinů vlivem AGE znázorněna na obrázku 2.2.

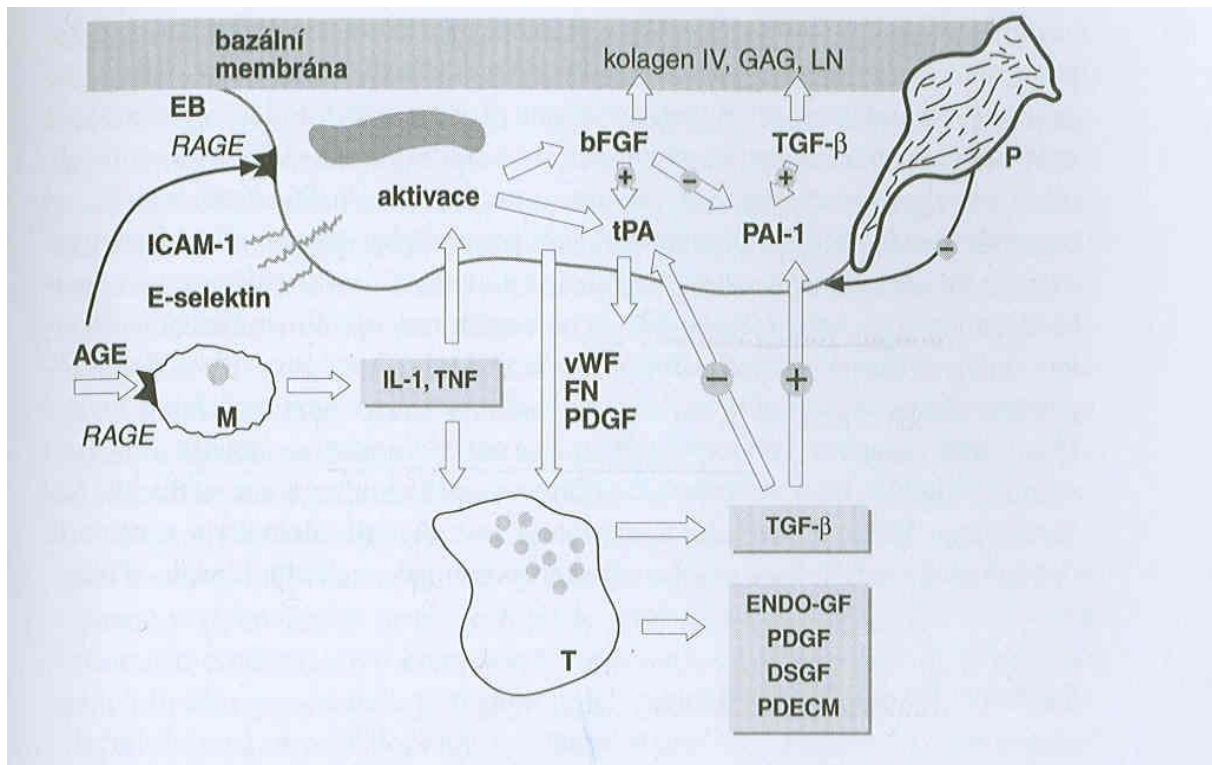
Po navázání AGE na specifický receptor (RAGE – receptor pro pokročilé produkty glykace) dojde k uvolnění cytokinů interleukinu-1 a tumor nekrotizujícího faktoru- α (Galina a kol. 2006), které dále působí na trombocyty a na endotelové buňky. Při aktivaci endotelové buňky se stimuluje tvorba růstových faktorů, VEGF či TGF- β_1 , které modulují např. aktivitu fibrinolytického systému, a tím mohou narušit rovnováhu celého hemostatického systému. Cytokiny jsou tudíž zodpovědné za další poškození tkáně, které může pokračovat i navzdory normalizace glykémie. Tento fenomén nazýváme hyperglykemická paměť (Taguchi a kol. 2003, Williams a kol. 2003).

V současné době jsou dostupná pouze limitující klinická data o vlivu akutní a chronické hyperglykémie na hladiny TGF- β_1 . Experimentálními studiemi bylo potvrzeno, že obě, akutní i chronická hyperglykémie, mohou zvýšit produkci TGF- β_1 . Klinické studie k tomuto tématu zůstávají inkonzistentní (Sharma a kol. 1995, Matsumo a kol. 2002). Je tomu pravděpodobně proto, že v klinické praxi je těžké zohlednit řadu dalších faktorů, které zvyšují hladiny TGF-

β_1 , a to zejména přítomnost orgánových komplikací, vliv chronické hyperglykémie či souběžné medikace apod.

Jedinou prací publikovanou k tomuto tématu byla studie Florese a kolektivu, zkoumající TGF- β_1 při záchytu DM 1. typu a po 1., 4. a 16. týdnu léčby inzulinem (Flores a kol. 2004). Ta v zásadě říká, že produkce TGF- β_1 nebyla modifikována redukcí glykémie. Domníváme se, že tento závěr může být vysvětlen faktem, že Flores zahrnul pouze soubor nově diagnostikovaných nemocných v časných fázích choroby, kde jsou vysoké hladiny TGF- β_1 asociovány s aktivitou autoimunitního procesu, který je podstatou patogeneze DM 1. typu, a nejsou odezvou na hyperglykémii. Imunosupresivní účinky TGF- β_1 se projevují inhibicí sekrece zánětlivých cytokinů z makrofágů, lymfocytů, zejména Th1 lymfocytů. TGF- β_1 pak může hrát roli v patogenezi DM 1. typu antagonismem cytotoxického efektu prozánětlivých cytokinů, které zahajují a udržují autoimunitní proces. Ten následně může zakrýt změny TGF- β_1 způsobené snížením glykémie v časných fázích choroby. Několik studií poukazuje, že prozánětlivá dysbalance je patrná dlouhý čas po záchytu DM 1. typu a ustupuje až lýzou β -buněk a ukončením zánětlivého procesu v pankreatu (Netea a kol. 1997). Nalézt odpověď, zda metabolická kompenzace ovlivňuje TGF- β_1 , a zohlednit výše jmenované faktory, bylo jedním z cílů našeho sledování.

Obr. 2. 2. Aktivace cytokinů vlivem pokročilých produktů glykace.



Vysvětlivky:

BM-bazální membrána

GAG- glykosaminoglykany

LN- laminin

EB- endotelová buňka

P-pericyt, bFGF- bazický fibroblastový růstový faktor

TGFβ- transformující růstový faktor beta

tPA- tkáňový aktivátor plasminogenu

PAI-1- inhibitor tPA

vWF- von Willebrandův faktor

FN- fibronectin,

M- mikrofág

AGE- pokročilé produkty glykace

RAGE- receptor pro pokročilé produkty glykace

IL-1- interleukin 1

TNF-tumor nekrotizující faktor

PDGF, ENDO-GF, DSGF, PDECM- destičkové růstové faktory

(převzato z Praktická diabetologie 2000, Bartoš a kolektiv)

3. TGF- β_1 a chronické komplikace DM

Cytokiny jsou nejdůležitější modulátory mezibuněčné komunikace. Jednou ze skupin cytokinů jsou transformující růstové faktory, kam řadíme TGF- β a TGF- α (strukturně zcela odlišné). TGF- β_1 je pleiotropní cytokin (růstový faktor) s širokým rozsahem fyziologických funkcí zasahující do buněčného dělení, diferenciace, apoptózy, buněčné migrace či tvorby mezibuněčné hmoty. Mezi buňky produkující TGF- β_1 patří T-lymfocyty, makrofágy a zejména degranulující se trombocyty. TGF- β_1 je produkován ve formě neaktivního prekurzoru, což znamená, že molekula je chráněna ochranným proteinovým filmem, který je tráven proteázami (zejména plazminem, trombospondinem, ...). Biologicky aktivní TGF- β_1 sestává ze dvou 12,5 kD homodimérů spojených disulfidickými můstky (Clark a kol. 1998). Pouze aktivní forma TGF- β se může navázat na specifický receptor. TGF- β se vyskytuje ve třech izoformách (TGF- β_1 , 2, 3).

Zdá se, že největší význam v buněčné odpovědi hraje TGF- β_1 . Fyziologické hladiny TGF- β_1 jsou velmi nízké (do 10ng/ml), relativně stálé, pouze někteří jedinci jsou geneticky predisponováni mít vyšší hladiny TGF- β_1 (Grainger a kol. 1999). Právě cytokinu TGF- β_1 se připisuje prominentní úloha v patofyziologii diabetické nefropatie a v dalších vaskulárních komplikacích diabetu. V naší práci jsme se věnovali zejména diabetické nefropatii.

4. Diabetická nefropatie

DN (diabetická interkapilární glomeruloskleróza) – diabetická mikroangiopatie postihující ledviny, která je charakterizována proteinurií, hypertenzí a postupným snižováním glomerulární filtrace, je pozdní komplikací diabetu, která může vést k terminálnímu selhání ledvin (Shena a kol. 2005). DN se stává v průmyslově vyspělých zemích nejčastější příčinou konečného stadia selhání ledvin.

4.1. Výskyt

DN se zřídka objevuje před 10. rokem trvání diabetu; její incidence se zvyšuje mezi 13. až 20. rokem s maximem 3% ročně a po 20. roce klesá. Riziko vývoje DN u normoalbuminurických diabetiků 1. typu s trváním diabetu delším než 30 let je nízké. Prevalence všech stadií DN může po 20 letech trvání diabetu 1. typu dosáhnout 30-40% (Pont'uch 2003).

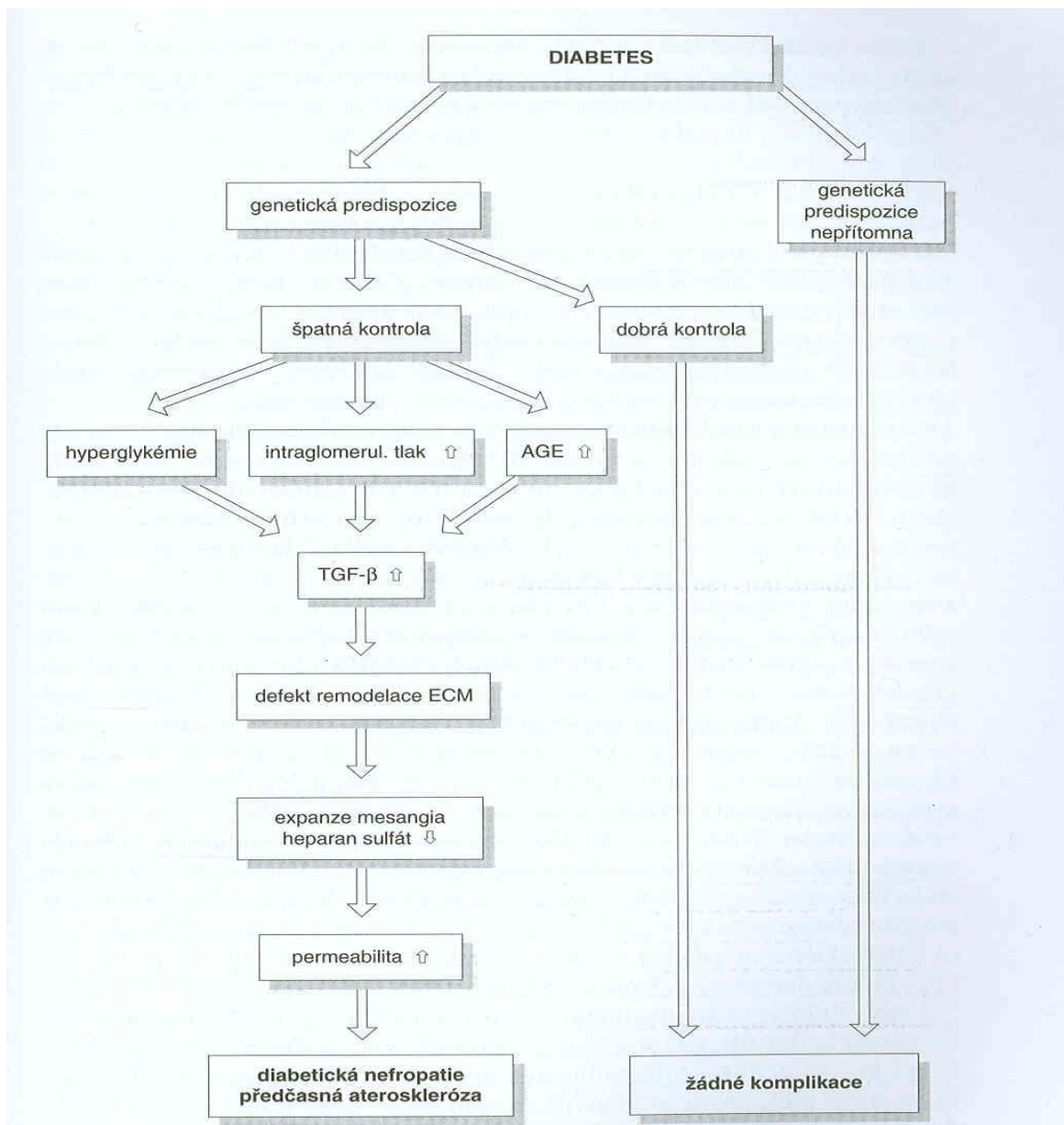
4.2. Patogeneze DN

V současné době je jednoznačně prokázáno, že hyperglykémie působí na vznik mikroangiopatických komplikací. Hyperglykémie je jistě důležitá, ale insuficientní k tomu, aby způsobila diabetické postižení ledvin, neboť řada diabetiků se navzdory špatné metabolické kompenzace nefropatii vyhne. Obecné principy patogeneze specifických komplikací se zaměřením na roli cytokinů jsou uvedeny výše. Glomerulární buňky produkují mnohé látky, které regulují růst buněk a ukládání extracelulární matrix a podílejí se na patogenezi hypertrofických změn a vývoji diabetické glomerulosklerózy. Konkrétně mezi ně patří: TGF- β 1, VEGF, IGF-1, EDF, PDGF, CTGF a TNF- α . TGF- β 1 vzbuzuje největší pozornost.

TGF- β 1 hraje centrální úlohu v nárůstu extracelulární matrix, jako je kolagen IV. typu, fibronektin a laminin, a proto je prominátním kandidátem pro fibrotické změny (Sahan a kol. 2005). TGF- β 1 zvyšuje akumulaci matrix mechanismy inhibice syntézy kolagenáz, stimulací tkáňové tvorby inhibitorů metaloproteináz, umožňuje transformaci fibroblastů na myofibroblasty. Kromě toho stimuluje syntézu integrinů, což jsou receptory pro molekuly matrix na buněčném povrchu, tudíž podporuje interakci buňka-matrix. TGF- β 1 tak přispívá k buněčné hypertrofii a syntéze kolagenu, která je patrná u DN (Chamber a kol. 2003). Schopnost TGF- β 1 způsobit četné fibrotické změny je možné vysvětlit vlastností autoprodukce reziduálními buňkami v místě postižení (Zavadová a kol. 1999). Tento autoindukční mechanismus vedoucí k nadprodukci TGF- β 1 se stává chronickým uzavřeným kruhem, jež přispívá k progresi mikrovaskulárních komplikací (Border a kol. 1993). Postavení TGF- β 1 v patogenezi DN je schematicky vyjádřeno na obrázku 4.2.1.

U DN jsou často na vaskulárním pólu glomerulu pozorovány vedle aferentní a eferentní arterioly další drobné cévy (Kanesaki a kol. 2005). Proces tvorby a růstu těchto nových cév nazýváme neovaskularizací, jež je způsobena aktivací růstových faktorů jako VEGF. VEGF je cytokin, který stimuluje angiogenezi, mikrovaskulární hyperpermeabilitu asociovanou s vysokými hladinami VEGF a spolupodílí se v rozvoji diabetické mikroangiopatie (Vriese a kol. 2001).

Obr. 4.2.1. Etiopatogeneze diabetické nefropatie.



Vysvětlivky:

ECM - extracelulární masa

AGE - advanced glycation endproducts

TGF-β- transformující růstový faktor beta

(převzato z Praktická diabetologie 2000)

4.3. Incipientní DN a diagnostika

Při rozvoji DN dochází v časných fázích k vzestupu glomerulární filtrace a objevení se MA. Ta je prvním funkčním projevem strukturálních změn v ledvinách, kde dominuje zesílená glomerulární bazální membrána a rozšířené mesangium. Současný názor na význam stanovení MA zdůrazňuje, že nejde pouze o časnou známku DN, ale současně o časnou známku poškození kardiovaskulárního systému. MA odráží glomerulární manifestaci generalizované hyperpermeability cévní stěny, jinými slovy generalizované poškození endotelu (Perušičová 2003). MA znamená takové množství vyloučeného albuminu, které přesahuje horní limit zdravých jedinců (nediabetiků) a které není detekovatelné běžně dostupnými testovacími močovými proužky pro bílkovinu. Abychom získali validní výsledky při stanovení MA, to znamená, aby naměřené hodnoty MA odpovídaly specifickým změnám zvýšené glomerulární propustnosti u diabetu, musíme zohlednit přítomnost mimorenálních (fyzická zátěž, infekce močových cest, chyby ve sběru moče, menstruace či špatná metabolická kompenzace) a renálních nediabetických (pyelonefritis, glomerulonefritis).

První stadium DN, kdy lze onemocnění neinvazivním způsobem prokázat, nazýváme incipientní DN. Zlatým standardem pro její diagnózu jsou sběry moče/24hod, kde musí být alespoň ve dvou ze tří sběrů uskutečněných v období 3-6 měsíců hodnoty MA 30-300mg/24hod (Pont'uch 2003). V tomto případě je nemocný zatížen nutností 24 hodinového sběru. Jinak je tomu v případě užití poměru koncentrace albuminu a kreatininu v ranním vzorku moče. Otázkou je zavedení nových postupů, které by nezatěžovaly nemocného sběry, byly by dostatečně senzitivní a specifické pro diabetickou renální mikroangiopatii. Na tomto místě se nabízí stanovení hladin sérového cystatinu C jednak s účelem diagnostiky incipientní DN, jednak s cílem zhodnotit terapii ACEI (diskutováno níže), čímž jsme se zabývali v naší práci.

4.4. Cystatin C

Cystatin C je neglykovaný nízkomolekulární protein (molekulová hmotnost 13 kDa) ze skupiny inhibitorů proteáz cysteinu a tvoří se ve všech jádrových buňkách. Referenční rozmezí pro muže je 0,57-0,96mg/l, pro ženy 0,50-0,96 mg/l. Koncentrace cystatinu C je považována za vynikající korelát úrovně glomerulární filtrace, který není významně ovlivněn jinými vlivy (dietou, infekcemi, jaterními funkcemi, malignitami, myopatiemi, množstvím tělesného tuku). Je typický svou konstantní produkcí a eliminací glomerulární filtrací, kdy je volně filtrován v glomerulech a kompletně resorbován v buňkách proximálního tubulu ledvin. Dosavadní obecně používaný ukazatel glomerulární filtrace, kreatinin, představuje dostačující odhad v pokročilých fázích choroby. Není však dostatečně senzitivní zachytit minimální pokles glomerulární filtrace v incipientních fázích renální léze. Jeho hodnota je ovlivňována množstvím svalové hmoty a tím závislostí na věku a pohlavím tubulární sekrecí (proměnlivou intra- a interindividuálně), úrovni sběru moči apod. V běžné rutinní praxi kompenzujeme limitace stanovení glomerulární filtrace s užitím sérového kreatininu, clearance kreatininu a sběrů moče aplikací matematického modelu (Cockcroft-Gaults formule). Cystatin C je spolehlivějším markerem pro screening incipientní nefropatie a reprezentuje užitečnou alternativu Cockcroftovy formule (Perlemoine a kol. 2003, Buysschaert a kol. 2003). Pokud je možné užít cystatin C pro diagnostiku incipientní DN, bude jej možné využít jako marker léčby ACEI?

4.5. Léčba diabetické nefropatie

ACEI jsou všeobecně akceptovaným lékem první volby incipientní DN. Léčba by měla být zahájena již v počátcích MA nezávisle na hodnotách krevního tlaku. ACEI snižují exkreci proteinů a zpomalují progresi renální komplikace. Tato doporučení jsou postavena na závěrech multicentrických studií ukazujících jejich benefit v léčbě DN (Viberti a kol. 1994). ACE katalyzuje konverzi angiotenzin I na angiotenzi II, který následně stimuluje TGF- β 1 a indukuje angiogenezi aktivací VEGF (Sharma a kol. 1999, Tamara a kol. 2002). Na základě této vazby jsme vyslovili na začátku naší studie hypotézu, zda nedojde po podání ACEI ke snížení hladin cytokinů, jako jeden z projevů mechanismu účinku léčby. Hladinami cytokinů bychom posléze mohli monitorovat účinnost léčby a poukázat na nutnost titrace jejich dávky.

Vliv ACEI na TGF- β 1 byl již zkoumán v předešlých studiích - Collaborative Study Group Captopril Trial, kde došlo k poklesu TGF- β 1 po podání captoprilu v pokročilejších stádiích DN (Sharma a kol. 1999), pak i v experimentálních modelech (Gilbert a kol. 1998). Vliv ACEI na hladiny cytokinů v iniciálních fázích DN, tj. u nemocných bez hypertenze, prozatím zkoumán nebyl.

5. Cíle práce

5.1. Cíl A

V první části práce bylo cílem:

- a) porovnat hladiny cytokinů pacientů s DM 1. typu s recentní incipientní DN s nemocnými bez přítomné DN, následně srovnat obě skupiny diabetiků se zdravými kontrolami
- b) stanovit vliv ramiprilu (zástupce ACEI) na hladinu VEGF a TGF- β_1 po 3, 6 měsících léčby indikované pro incipientní DN u pacientů s DM 1. typu
- c) sledovat biochemické parametry zejména markery zánětu, endoteliální dysfunkce (CRP, homocystein, fibrinogen), mikroalbuminurie, cystatinu C během terapie ACEI a srovnat získané hodnoty se skupinou bez nefropatie a se zdravými kontrolami

5.2. Cíl B

V druhé části práce bylo cílem stanovit, zda u pacientů s DM 1. typu:

- a) jsou hladiny TGF- β_1 ovlivněny aktuální glykemií a/nebo dlouhodobou metabolickou kompenzací (chronickou hyperglykemií)
- b) hladiny TGF- β_1 korelují s parametry endoteliální dysfunkce (CRP, homocystein, fibrinogen), s mírou diabetické komplikace a délkou trvání DM

6. Část A. - Efekt terapie ramiprilem na cytokiny a parametry incipientní diabetické nefropatie u nemocných s diabetes mellitus 1. typu

6.1. Soubor a metody

6.1.1. Pacienti

Do studie jsme zařadili 3 skupiny nemocných: skupina I zahrnovala 13 zdravých kontrol, skupina II zahrnovala 13 nemocných s DM 1. typu bez přítomných orgánových komplikací diabetu, skupina III se skládala z 20 nemocných s DM 1. typu s nově diagnostikovanou incipientní DN (opakovaný záchyt mikroalbuminurie > 30mg). Bližší charakteristika souboru je uvedena v tabulce 6.1.1. Všichni pacienti a zdravé kontroly pocházeli z Interní kliniky Fakultní nemocnice v Motole a z Univerzity Karlovy.

6.1.2. Stanovení TGF- β_1 , VEGF a biochemických parametrů

TGF- β_1 a VEGF byly stanoveny metodou ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) s užitím monoklonálních anti-TGF- β_1 a anti-VEGF protilátek dle manuálu (R&D Systems, Minneapolis, USA). Normální hodnoty pro TGF- β_1 byly < 10 ng/ml a pro VEGF < 50 pg/ml. Intra a interassay koeficient variace byly 2.9%. CRP, homocystein, fibrinogen, duMA, cystatin C, urea, kreatinin, cholesterol, triacylglyceroly, HbA_{1c} byly stanoveny standardními metodami užívanými v laboratoři Fakultní Nemocnice Motol (Průša 2000). HbA_{1c} byl stanoven podle IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) metod (HPLC, Tosoh) s referenčním rozmezím 2,8 – 4,5%.

6.1.3. Léčba a monitorování

Ve studii byl podáván perorálně ramipril, coby zástupce ACEI, v průměrné dávce $2,5 \pm 1,3$ mg. Při zahájení léčby byla dávka ramiprilu podaná nemocnému závislá na vstupní hodnotě systolického krevního tlaku: ≤ 120 mmHg (1,25 mg ramiprilu, 5 pacientů), 120-135 mmHg (2,5mg ramiprilu, 12 pacientů), ≥ 135 mmHg (5mg ramiprilu, 3 pacienti). Monitorované parametry včetně TGF- β_1 a VEGF, markery zánětu a endoteliální dysfunkce (CRP, homocystein, fibrinogen), duMA a cystatin C byly analyzovány před podáním ACEI, dále pak po 3. a 6. měsíci léčby. 3 pacienti netolerovali léčbu ACEI z důvodu hypotenze a byli ze studie vyřazeni.

6.1.4. Statistická analýza

K vyjádření rozdílů mezi jednotlivými skupinami byla užita robustní Kruskal-Wallisův test následovaný Kruskal-Wallisovým vícenásobným porovnáváním. Pro časové závislosti byla použita ANOVA s opakováním s nezávislými faktory čas a subjekt následovaná vícenásobným porovnáváním metodou nejmenšího významného rozdílu (LSD testy). Uvedená metodika oddělovala variabilitu inter-individuální od variability spojené s vývojem v čase. Pro posouzení vlivu kouření, pohlaví či HbA_{1c} byl ANOVA model rozšířen na model ANCOVA obsahující navíc příslušný hodnocený kovariát. Normalita rozdělení dat a reziduí u lineárních modelů (ANOVA, ANCOVA) byla prověřována několika metodikami. Kromě Kolmogorova-Smirnovova testu shody rozdělení dat s rozdělením normálním, Shapiro-Wilksova testu a testů významnosti odchylek od normality zvlášť pro šikmost a špičatost, byly použity také grafické metodiky jako jsou rozmítnutý rozptylový graf, vrubový krabicový graf, histogram, kvantil-kvantilový graf pro normální rozdělení a graf symetrie. V případě nesymetrie v datech a heteroscedasticity byla použita mocninná nebo logaritmická transformace. Optimální transformační parametr byl nalezen pro minimum střední kvadratické chyby predikce pro lineární regresi kvantilů závisle proměnné po transformaci

proti kvantilům normálního rozdělení – maximální shoda transformovaných dat s normálním rozdělením. Uvedené metodiky jsou součástí statistických softwarů Statgraphics Plus verze 5.1 (Manugistics, Rockville, MD, USA) či NCSS 2002 (Number Cruncher Statistical Systems, Rockville, UT, USA) které byly použity při zpracování dat.

Tab 6.1.1. Vstupní klinická charakteristika souboru všech 30 nemocných s DM 1. typu a 13 zdravých kontrol. Výsledky jsou prezentovány jako průměr ± SD.

	Skupina I (zdravé kontroly)	Skupina II (DM 1. typu bez komplikací)	Skupina III (DM 1. typu s incipientní DN)	Diference mezi skupinami ^a Fisherův exaktní test/ χ^2 -test ^b Kruskal-Wallisovo vícenásobné porovnávání/Kruskal-Wallisův test ^c Mann-Whitneyův test
Počet subjektů	13	13	17	
Pohlaví (muži/ženy)	6/7	8/5	13/4	NS ^a
Věk (roky)	30,8 ± 5,24	25,7 ± 6,61	30,9 ± 5,80	I-II (p<0,05), II-III (p<0,05) ^b NS (p<0,07)
BMI (kg/m²)	23,0 ± 2,15	23,2 ± 2,08	28,4 ± 6,98	I-III (p<0,05), II-III (p<0,05) ^b p<0,02
Trvání DM (roky)	0	5,61 ± 4,15	11,0 ± 6,26	II-III (p<0,05) ^c ---
sBP (mmHg)	119 ± 9,96	129 ± 11,7	129 ± 13,6	I-III (p<0,05) ^b NS (p<0,08)
dBP (mmHg)	74,6 ± 5,57	76,3 ± 6,38	77 ± 6,72	NS ^b
duMA (mg)	10,7 ± 5,93	14,8 ± 7,92	81,5 ± 55,0	I-III (p<10 ⁻⁴), II-III (p<10 ⁻⁶) ^b

Vysvětlivky:

BMI - body mass index

sBP - systolický tlak

dBP - diastolický tlak,

duMA - mikroalbuminurie/24hod

Tab 6.2.1. Vstupní hodnoty biochemických parametrů u 30 nemocných s DM 1. typu a 13 zdravých kontrol. Výsledky jsou prezentovány jako průměr ± SD.

	Skupina I (zdravé kontroly)	Skupina II (DM 1. typu bez komplikací)	Skupina III (DM 1. typu s incipientní DN)	Kruskal-Wallisovo vícenásobné porovnání/ Kruskal-Wallisův test
TGF-β₁ (ng/ml)	2,33 ± 0,86	40,7 ± 14,5	31,4 ± 12,3	I-II (p<10 ⁻⁶), I-III (p<0,001) p<10 ⁻⁶
VEGF (pg/ml)	32,5 ± 7,03	38,5 ± 39,1	264 ± 415	I-III (p<0,01), II-III (p<0,001) p < 0,001
HbA_{1c} (%)	3,61 ± 0,45	6,84 ± 1,89	7,76 ± 2,39	I-II (p<0,001), I-III (p<10 ⁻⁵), p<10 ⁻⁵
duMA (mg)	10,7 ± 5,93	14,8 ± 7,92	81,5 ± 55,0	I-III (p<10 ⁻⁶), II-III (p<10 ⁻⁴), p<10 ⁻⁶
Cystatin C (mg/l)	0,73 ± 0,10	0,74 ± 0,08	1,45 ± 1,51	I-III (p<0,001), II-III (p<0,01) p<0,001
Homocystein (μmol/l)	7,60 ± 1,26	8,28 ± 4,08	10,3 ± 3,08	I-III (p<0,01), II-III (p<0,01) p<0,01
Fibrinogen (g/l)	2,74 ± 0,73	2,22 ± 0,45	2,58 ± 0,63	I-II (p<0,05) NS (p<0,14)
CRP (mg/l)	0,73 ± 0,27	1,02 ± 0,84	2,88 ± 3,94	NS
TAG (mmol/l)	1,03 ± 0,34	1,06 ± 0,75	1,86 ± 2,60	NS
HDL-C (mmol/l)	1,77 ± 0,47	1,41 ± 0,41	1,49 ± 0,41	I-II (p<0,05) NS (p<0,11)
LDL-C (mmol/l)	2,33 ± 0,31	2,60 ± 0,61	2,79 ± 0,84	NS

Vysvětlivky:

TGF-β₁- transformační růstový faktor beta 1

VEGF - vaskulární endoteliální růstový faktor

HbA_{1c} – glykovaný hemoglobin

duMA – mikroalbuminurie/24hod

CRP - C-reaktivní protein

TAG – triacylglyceroly

HDL-C – high density lipoprotein cholesterol

LDL-C – low density lipoprotein cholesterol

6.2. Výsledky

6.2.1. Nálezy při vstupu do studie

Vstupní charakteristika souboru již byla prezentována v tabulce 6.1.1. Jak jsme očekávali, nemocní s incipientní DN měli signifikantně vyšší hladinu duMA ve srovnání s nemocnými bez DN ($p < 10^{-6}$) a zdravými kontrolami ($p < 10^{-4}$).

Tabulka 6.2.1. prezentuje biochemických parametry, které byly analyzovány při vstupu do studie. Cytokiny byly signifikantně zvýšeny při vstupu do studie u pacientů s incipientní DN ve srovnání se zdravými kontrolami ($p < 0,001$ pro TGF- β_1 a $p < 0,01$ pro VEGF), ačkoli u pacientů bez dlouhodobých komplikací jsme oproti kontrolám pozorovali pouze signifikantní zvýšení TGF- β_1 ($p < 10^{-6}$) a nikoliv VEGF, ve srovnání se zdravými kontrolami. Zatímco u TGF- β_1 se skupina s DM bez komplikací nelišila od skupiny s komplikacemi, u VEGF byl mezi těmito skupinami významný rozdíl ($p < 0,001$). Skupiny diabetických nemocných měly signifikantně vyšší HbA_{1c} než zdravé kontroly ($p < 0,001$ pro skupinu bez komplikací a $p < 10^{-5}$ pro skupinu s komplikacemi). Nemocní s incipientní DN měli signifikantně vyšší cystatin C při vstupu do studie ve srovnání s diabetickými nemocnými bez komplikací ($p < 0,001$), i se zdravými kontrolami ($p < 0,01$). Nemocní s DM 1. typu s orgánovými komplikacemi měli signifikantně nižší homocystein při vstupu než nemocní s incipientní DN ($p < 0,01$) a kontroly ($p < 0,01$).

V rámci zjišťování rozdílů mezi skupinami nedosáhl Kruskal-Wallisův test statistické významnosti pro fibrinogen, CRP, triacylglyceroly či cholesterol.

6.2.2. Efekt půlroční terapie ramipilem

Hodnoty některých parametrů během půlroční terapie jsou uvedeny v tabulce 6.2.2. Po šesti měsících léčby ramipilem došlo u nemocných s DM 1. typu s incipientní DN k signifikantnímu poklesu v průměru (\pm SD) hladin duMA z $81,5 \pm 55,0$ mg na $42,1 \pm 24,7$ mg ($p < 0,01$). Hodnocení průběhu léčby diabetických pacientů i incipientní neuropatií vzhledem ke kontrolám a pacientům bez komplikací pro duMA je pak demonstrováno na souhrnném schématu č. 1

Nalezli jsme signifikantní pokles v průměru (\pm SD) hladin cystatinu C, a to po 6 měsících léčby ($0,74 \pm 0,24$ mg/l) ve srovnání se vstupní hodnotou $1,45 \pm 1,51$ mg/l u nemocných s DM 1. typu s incipientní DN ($p < 0,01$). Hodnocení průběhu léčby diabetických pacientů i incipientní neuropatií vzhledem ke kontrolám a pacientům bez komplikací pro duMA je pak demonstrováno na souhrnném schématu č. 2

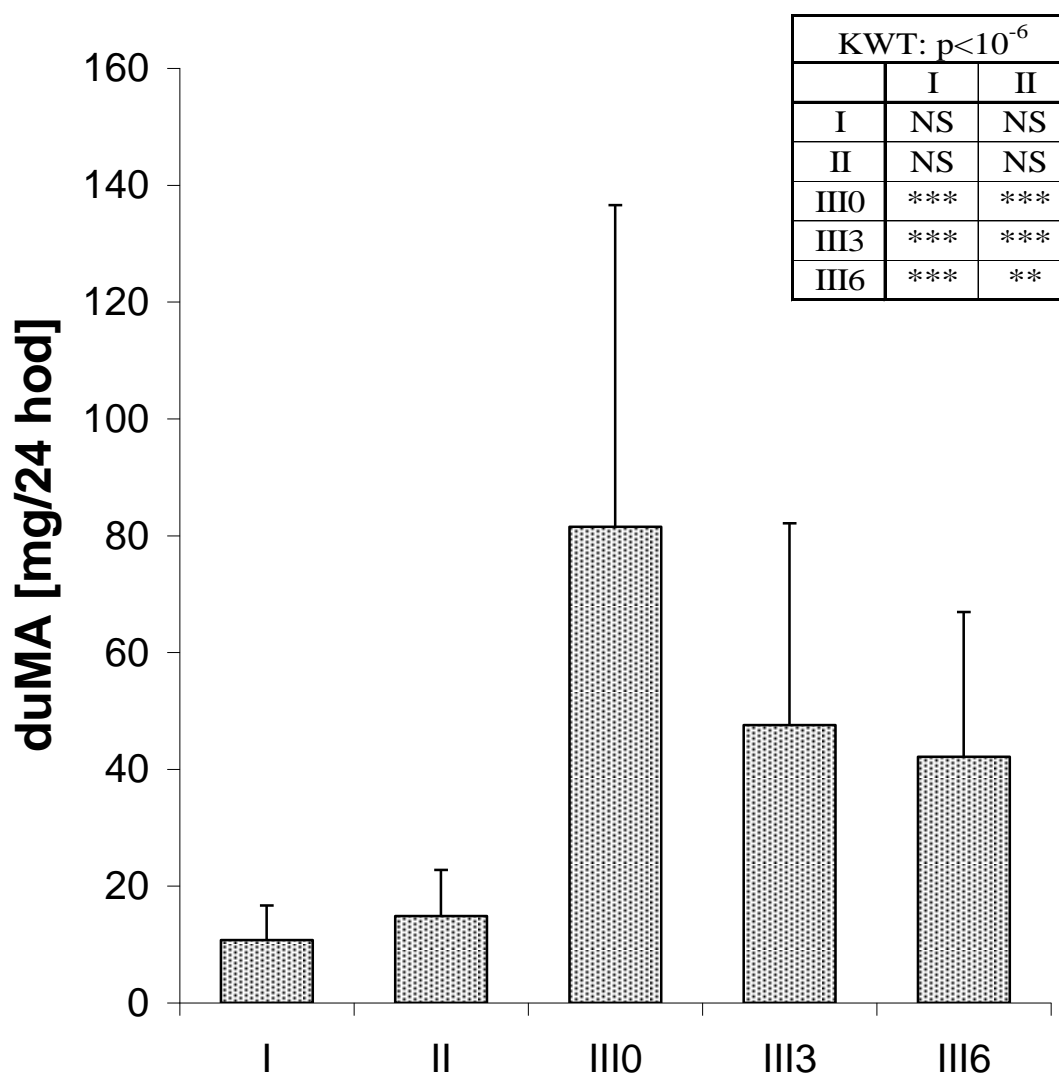
Pokles v hladin HbA_{1c} z $7,76 \pm 2,39$ % na začátku terapie ramipilem na $6,92 \pm 1,63$ % po šesti měsíčním sledování se blížil statistické významnosti při užití Kruskal-Wallisova testu ($p < 0,07$) zatímco Kruskal-Wallisovo vícenásobné porovnávání fází 0 a 6 již naznačovalo hraniční rozdíl ($p < 0,05$).

Hladiny VEGF a TGF- β_1 nevykazovaly statisticky významnou změnu během léčby (Tab 6.2.2). Podobně hodnoty CRP, homocysteinu, fibrinogenu, urey, kreatininu, triacylglycerolů, cholesterolu či clearance kreatininu během půlroční terapie ramipilem nevykazovaly významné změny během léčby. Hodnocení průběhu léčby diabetických pacientů i incipientní neuropatií vzhledem ke kontrolám a pacientům bez komplikací pro VEGF pak demonstrováno na souhrnném schématu č. 3 a pro TGF- β_1 na souhrnném schématu č. 4.

Pro všechny fáze experimentu byla nalezena významná korelace mezi VEGF a TGF- β_1 ($r = 0,460$, $p < 0,05$, $n = 31$, Spearmanova korelace).

Faktory jako kouření a pohlaví neovlivnily významně sledované parametry (data neprezentována). Muži vykazovali statisticky významně nižší hladiny VEGF ($p < 0,008$) než ženy, avšak tento efekt nekoreloval s léčebnými periodami.

Schéma 1. Mikroalbuminurie/24 hodin



Skupina	Průměr	SD	Medián	Dolní kvartil	Horní kvartil
I	10,7	5,9	10,8	6,5	13,2
II	14,8	7,9	16,0	9,6	22,8
III0	81,5	55,0	63,6	34,7	106,0
III3	47,5	34,6	39,0	30,1	58,0
III6	42,1	24,8	37,8	26,5	48,9

I...zdravé kontroly

II...DM 1. typu bez komplikací

III0...DM 1. typu s incipientní DN, 0. měsíc

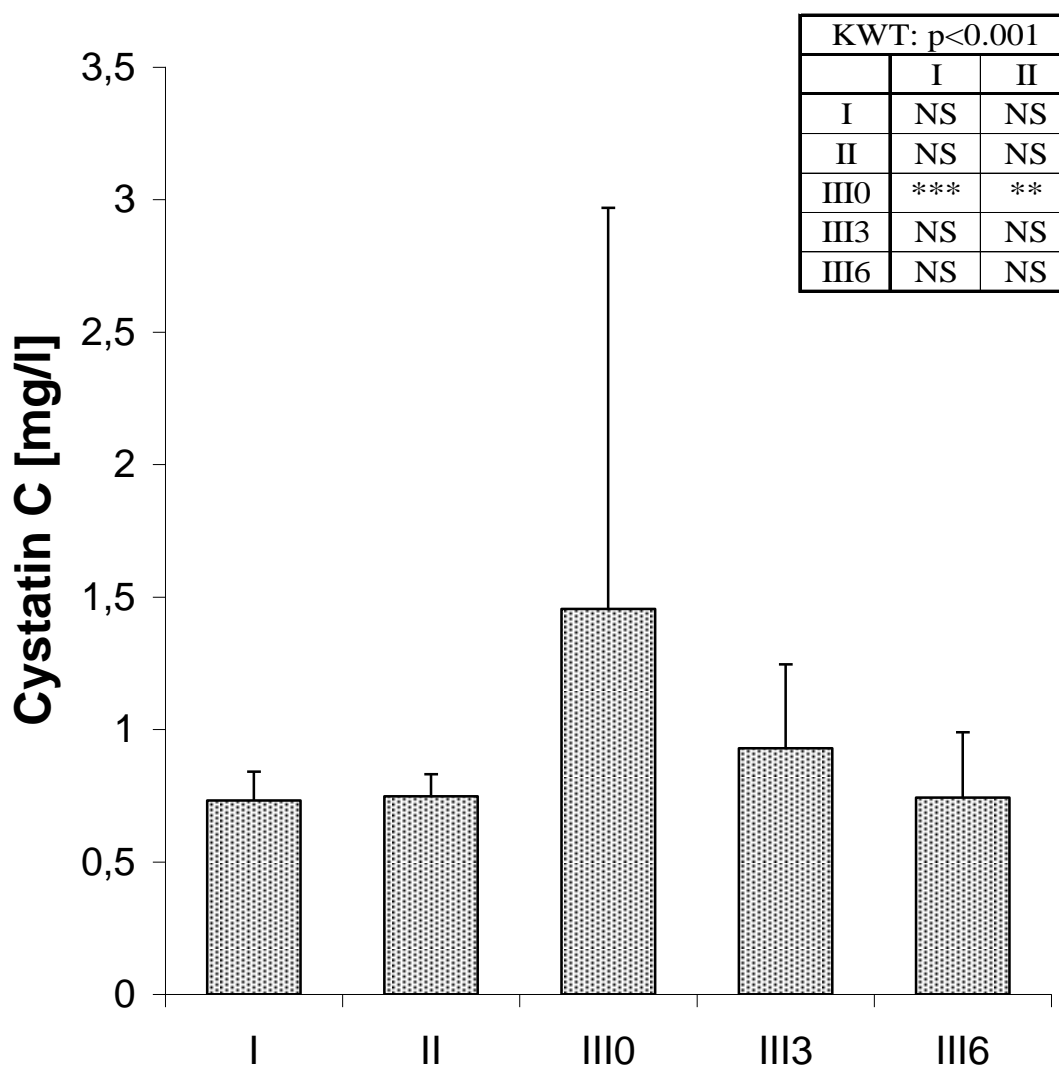
III3...DM 1. typu s incipientní DN, 3. měsíc

III6...DM 1. typu s incipientní DN, 6. měsíc

KWT...Kruskal-Wallisův test

Kruskal-Wallisovo vícenásobné porovnání: *... $p < 0.05$, **... $p < 0.01$, ***... $p < 0.001$

Schéma 2. Cystatin C



KWT: p<0.001		
	I	II
I	NS	NS
II	NS	NS
III0	***	**
III3	NS	NS
III6	NS	NS

Skupina	Průměr	SD	Medián	Dolní kvartil	Horní kvartil
I	0,732	0,109	0,720	0,640	0,820
II	0,748	0,083	0,750	0,680	0,800
III0	1,454	1,515	0,975	0,915	1,308
III3	0,929	0,317	0,875	0,728	1,165
III6	0,743	0,246	0,710	0,610	0,730

I...zdravé kontroly

II...DM 1. typu bez komplikací

III0...DM 1. typu s incipientní DN, 0. měsíc

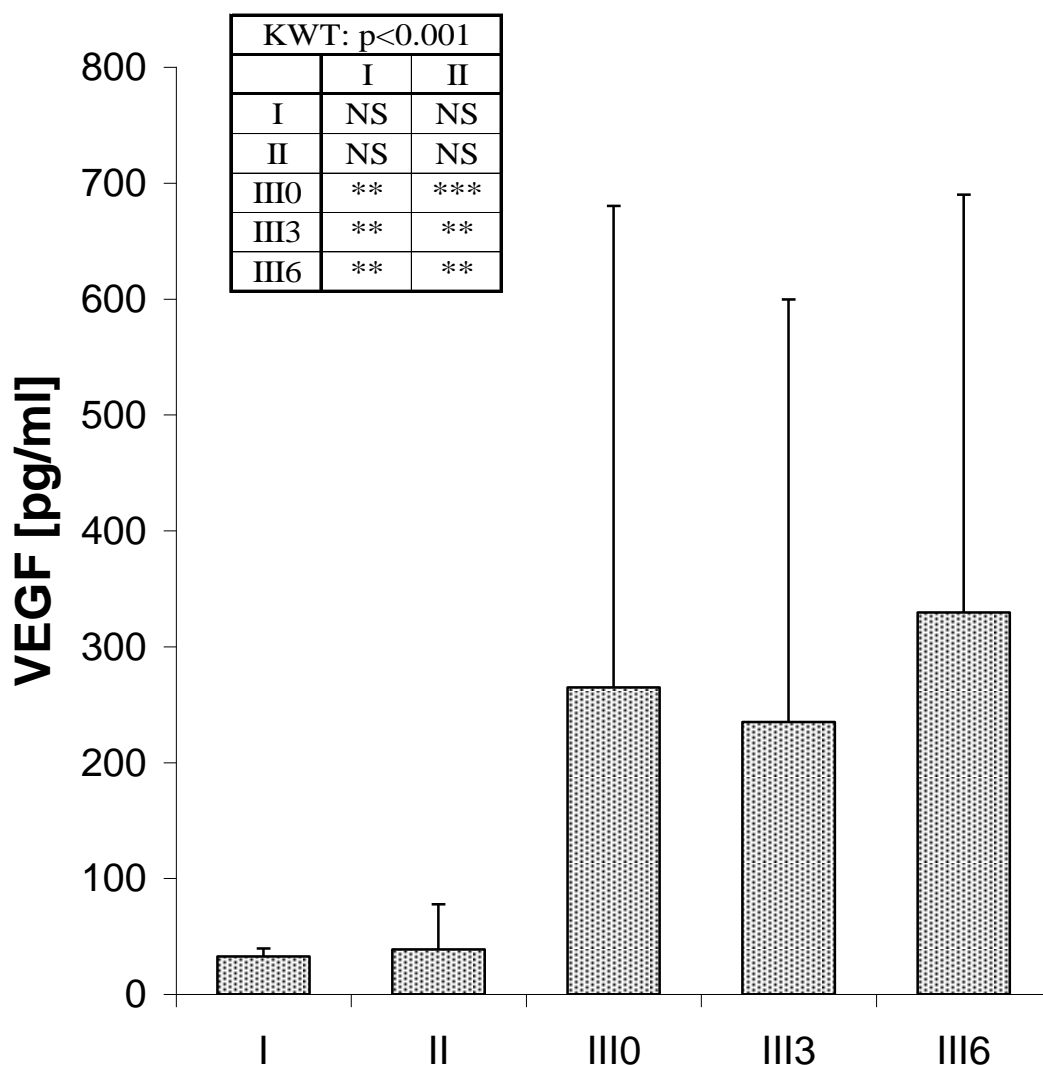
III3...DM 1. typu s incipientní DN, 3. měsíc

III6...DM 1. typu s incipientní DN, 6. měsíc

KWT...Kruskal-Wallisův test

Kruskal-Wallisovo vícenásobné porovnání: *...p<0.05, **...p<0.01, ***...p<0.001

Schéma 3. Vascular endothelial growth factor



Skupina	Průměr	SD	Medián	Dolní kvartil	Horní kvartil
I	32,5	7,0	32,0	28,0	38,0
II	38,6	39,2	23,6	14,5	48,0
III0	264,7	415,5	70,0	42,0	182,0
III3	235,1	364,6	44,0	39,0	148,0
III6	329,6	360,4	131,0	39,0	711,8

I...zdravé kontroly

II...DM 1. typu bez komplikací

III0...DM 1. typu s incipientní DN, 0. měsíc

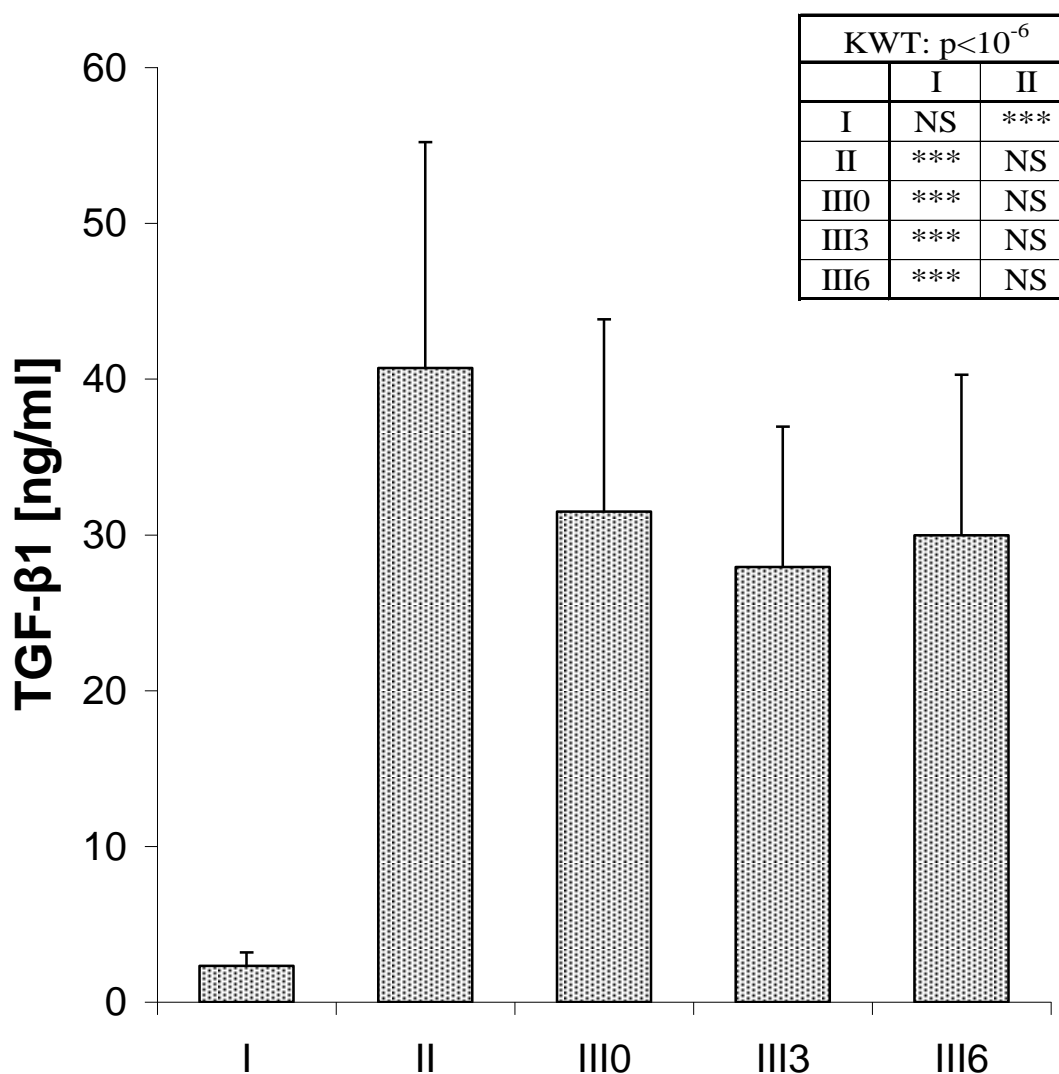
III3...DM 1. typu s incipientní DN, 3. měsíc

III6...DM 1. typu s incipientní DN, 6. měsíc

KWT...Kruskal-Wallisův test

Kruskal-Wallisovo vícenásobné porovnání: *...p<0.05, **...p<0.01, ***...p<0.001

Schéma 4. Transforming growth factor beta – 1



Skupina	Průměr	SD	Medián	Dolní kvartil	Horní kvartil
I	2,33	0,86	2,14	1,84	3,05
II	40,71	14,50	46,18	25,29	54,02
III0	31,50	12,34	31,97	25,15	40,25
III3	27,92	9,02	25,76	21,42	34,40
III6	29,96	10,31	28,68	23,71	34,26

I...zdravé kontroly

II...DM 1. typu bez komplikací

III0...DM 1. typu s incipientní DN, 0. měsíc

III3...DM 1. typu s incipientní DN, 3. měsíc

III6...DM 1. typu s incipientní DN, 6. měsíc

KWT...Kruskal-Wallisův test

Kruskal-Wallisovo vícenásobné porovnání: *... $p < 0,05$, **... $p < 0,01$, ***... $p < 0,001$

Tab 6.2.2. Hodnoty parametrů během půlroční terapie u 17 pacientů s DM 1. typu s incipientní DN. Výsledky jsou prezentovány jako průměr ± SD.

	0. měsíc	3. měsíc	6. měsíc	Fisherův LSD test/ ANOVA s opakováním (faktory, fáze a subjekt)
Cystatin C (mg/l)	1,45 ± 1,51	0,92 ± 0,31	0,74 ± 0,24	0-6 (p<0,01) Fáze: p<0,01, Subjekt: NS
duMA (mg)	81,5 ± 55,0	47,5 ± 34,5	42,1 ± 24,7	0-3 (p<0,01), 0-6 (p<0,01) Fáze: p<0,01, Subjekt: (p<0,001)
TGF-β₁ (ng/ml)	31,4 ± 12,3	27,9 ± 9,01	29,9 ± 10,3	Fáze: NS
VEGF (pg/ml)	264 ± 415	235 ± 364	329 ± 360	Fáze: NS
HbA_{1c} (%)	7,76 ± 2,39	7,12 ± 1,96	6,92 ± 1,63	0-6 (p<0,05) Fáze: NS (p<0,07), Subjekt: (p<0,001)

Vysvětlivky:

duMA – mikroalbuminurie/24hod

TGF-β₁- transformační růstový faktor beta 1

VEGF - vaskulární endoteliální růstový faktor

HbA_{1c} - glykovaný haemoglobin,

6.3. Diskuze

Naše studie ukázala, že TGF- β_1 , na rozdíl od VEGF, je zvýšen u nemocných s DM 1. typu, a to již ve stádiu bez přítomných orgánových komplikací. Oba prosklerotické cytokiny, TGF- β_1 , i VEGF, jsou zvýšeny v počáteční fázi renálního postižení u pacientů s DM 1. typu. Zvýšené hladiny VEGF u pacientů s incipientní DN (ve srovnání s DM 1. typu bez nefropatie) poukazují na důležitou roli tohoto cytokinu v patogenezi DN. Autokrinní schopnost cytokinů může vysvětlit jejich úlohu v progresi onemocnění. Zvýšené hladiny TGF- β_1 , a to již při záchytu diabetes mellitu, byly dokumentovány v dříve publikovaných studiích (Zdarska a kol. 2003, Zdarska a kol. 2005, Flores a kol. 2004).

Podání monoklonálních anti-VEGF protilátek vede k poklesu hyperfiltrace, albuminurie a glomerulární hypertrofie u diabetických krys (Vriese a kol. 2001). Anti-VEGF terapie je v současnosti používána pro nemocné s karcinomem a v budoucnosti by mohla představovat alternativní terapeutickou strategii iniciálních fází DN. Naše práce prokázala, že ramipril samotný nevede k signifikantnímu snížení hladin VEGF.

Vliv ACEI na TGF- β_1 byl již zkoumán v předešlých studiích - Collaborative Study Group Captopril Trial, kde došlo k poklesu TGF- β_1 po podání captoprilu v pokročilejších stádiích DN (Sharma a kol. 1999), pak i v experimentálních modelech (Gilbert a kol. 1998).

V naší práci jsme pozorovali mírný pokles hladin TGF- β_1 a VEGF nemocných s DM 1. typu s incipientní DN, který ovšem nedosáhl statistické významnosti. Vliv ACEI na TGF- β_1 byl již zkoumán v předešlých studiích (Gilbert a kol. 1998). Renoprotektivní efekt captoprilu na progresi diabetické nefropatie byl demonstrován Collaborative Study Group Captopril Trial, kde nálezy podporovaly, že podání captoprilu vede k poklesu TGF- β_1 u nemocných s DN (Sharma a kol. 1999).

Míra poklesu cytokinů může být dána použitou dávkou ACEI. V naší práci dávka ramiprilu byla limitována hypotenzními symptomy, protože naši pacienti měli incipientní DN

bez arteriální hypertenze. ACEI byli v našem případě indikováni z důvodu prokázané incipientní DN, nikoli arteriální hypertenze. Dávka ramiprilu, stejně tak krevní tlaku zůstaly beze změn v průběhu půlročního sledování. Zde se nabízí možnost pro další sledování se sartany (Pohl a kol. 2005). Vystává také otázka, zda by u nemocných s DN užívajících ACEI nedošlo k další elevaci hladin cytokinů po vysazení zavedené léčby.

Nalezli jsme zvýšené hladiny cystatinu C u pacientů s incipientní DN a jejich pokles během půlroční terapie ramipriem. Jak jsme očekávali, sérový kreatinin a clearance kreatininu zůstala v průběhu studie nezměněna. V běžné rutinní praxi kompenzujeme limitace stanovení glomerulární filtrace s užitím sérového kreatininu, clearance kreatininu a sběrů moče aplikací matematického modelu - Cockcroft-Gaults formule (Samson a kol. 1992). Hladina sérového kreatininu je ovlivňována řadou ne-renálních vlivů (svalová hmota, přítomnost onemocnění, ...) a není dostatečně senzitivní zachytit minimální pokles glomerulární filtrace v incipientních fázích renální léze. Cystatin C je spolehlivějším markerem než kreatinin pro screening incipientní nefropatie a reprezentuje užitečnou alternativu Cockcroftovy formule (Perlemoine a kol. 2003, Buyschaert a kol. 2003). Výsledky naší studie jsou v souladu s těmito závěry. Co více, námi pozorovaný pokles cystatinu C během terapie ACEI, může stanovit použití cystatinu C jako marker efektu této terapie v daných případech.

V naší práci jsme během terapie ACEI pozorovali pokles HbA_{1c}. Je zřejmé, že žádný ze skupiny ACEI nevede přímo ke snížení HbA_{1c}. Domníváme se, že zlepšení metabolické kompenzace bylo dosaženo četnějšími kontrolami a edukací. Také informovanost nemocného o prokázání diabetické komplikace může vést k lepší compliance a motivaci pacienta ve snaze o úpravu glykemií.

7. Část B. - TGF- β_1 a biochemické parametry u diabetes mellitus

1. typu

7.1. Soubor a metody

7.1.1. Pacienti

Na studii participovalo 43 nemocných s DM 1. typu a 13 zdravých kontrol. Ke srovnání TGF- β_1 s parametry endoteliální dysfunkce, krátkodobou a dlouhodobou metabolickou kompenzací, s délkou trvání DM byly diabetičtí nemocní rozděleni do tří podskupin dle stupně mikrovaskulární diabetické komplikace: podskupina I nemocných bez mikrovaskulární léze, podskupina II nemocných s nově diagnostikovanou incipientní DN ale bez jiných orgánových komplikací a podskupina III pacientů s rozvinutými orgánovými komplikacemi. Charakteristika jednotlivých diabetických podskupin a zdravých kontrol (podskupina C) je prezentována v tabulce 7.1.1. (uvedeno jako průměr \pm SD).

7.1.2. Analýza TGF- β_1 a biochemických parametrů

TGF- β_1 bylo stanoveno metodou ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) s užitím monoklonálních anti-TGF- β_1 protilátek dle manuálu (R&D Systems, Minneapolis, USA). Normální hodnoty pro TGF- β_1 byly < 10 ng/ml. Intra a interassay koeficient variace byly 2.9%.

Dlouhodobá metabolická kompenzace glykémie byla vyjádřena užitím glykovaného hemoglobinu - HbA_{1c}, který byl stanoven podle IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) metod (HPLC, Tosoh) s referenčním rozmezím 2,8 – 4,5%. Aktuální glykémie byla měřena hexokinásovou reakcí (Bayer). CRP, homocystein, fibrinogen, duMA, cystatin C, urea, kreatinin, cholesterol, triacylglyceroly byly stanoveny standardními metodami užívanými v laboratoři Fakultní Nemocnice Motol (Průša 2000).

7.1.3. Statistická analýza dat

K vyjádření rozdílů mezi jednotlivými skupinami byla užita robustní Kruskal-Wallisův test následovaný Kruskal-Wallisovým vícenásobným porovnáváním. Pro posouzení vlivu kouření, pohlaví či HbA_{1c} byl ANOVA model rozšířen na model ANCOVA obsahující navíc příslušný hodnocený kovariát. Normalita rozdělení dat a reziduí u lineárních modelů (ANOVA, ANCOVA) byla prověřována několika metodikami. Kromě Kolmogorova-Smirnovova testu shody rozdělení dat s rozdělením normálním, Shapiro-Wilksova testu a testů významnosti odchylek od normality zvláště pro šikmost a špičatost, byly použity také grafické metodiky jako jsou rozmítnutý rozptylový graf, vrubový krabicový graf, histogram, kvantil-kvantilový graf pro normální rozdělení a graf symetrie. V případě nesymetrie v datech a heteroscedasticity byla použita mocninná nebo logaritmická transformace. Optimální transformační parametr byl nalezen pro minimum střední kvadratické chyby predikce pro lineární regresi kvantilů závisle proměnné po transformaci proti kvantilům normálního rozdělení – maximální shoda transformovaných dat s normálním rozdělením. Vztahy mezi parametry byly hodnoceny Spearmanovou korelací a dále faktorovou analýzou s užitím metody hlavních faktorů následovanou faktorovou rotací VARIMAX. Uvedené metodiky jsou součástí statistických softwarů Statgraphics Plus verze 5.1 (Manugistics, Rockville, MD, USA) či NCSS 2002 (Number Cruncher Statistical Systems, Rockville, UT, USA) které byly použity při zpracování dat.

Tab 7.1.1. Zkoumané parametry u 43 nemocných s DM 1. typu a 13 zdravých kontrol. Výsledky jsou prezentovány jako průměr ± SD.

	Skupina I (zdravé kontroly)	Skupina II (DM 1. typu bez komplikací)	Skupina III (DM 1. typu s incipientní DN)	Skupina IV (DM 1. typu s komplikacemi)	Diference mezi skupinami ^a Fisherův exaktní test/ χ^2 -test, ^b Kruskal-Wallisovo vícenásobné porovnávání/Kruskal-Wallisův test
Počet subjektů	13	13	17	13	
Pohlaví (muži/ženy)	6/7	8/5	13/4	5/8	NS ^a
Věk (roky)	30,8 ± 5,24	25,7 ± 6,61	30,9 ± 5,80	31,6 ± 5,03	I-II (p<0,05), II-III (p<0,05), II-IV (p<0,05) ^b NS (p<0,1)
Trvání DM (roky)	0	5,61 ± 4,15	11,0 ± 6,26	21,2 ± 4,28	II-III (p<0,05), II-IV (p<10 ⁻⁵), III-IV (p<0,001) ^b p<10 ⁻⁵
BMI (kg/m²)	23,0 ± 2,15	23,2 ± 2,08	28,4 ± 6,98	23,3 ± 2,84	I-III (p<0,05), II-III (p<0,05), III-IV (p<0,05) ^b p<0,05
sBP (mmHg)	119 ± 9,96	129 ± 11,7	129 ± 13,6	131 ± 10,6	I-II (p<0,05), I-III (p<0,05), I-IV (p<0,05) ^b NS (p<0,06)
dBP (mmHg)	74,6 ± 5,57	76,3 ± 6,38	77 ± 6,72	76,3 ± 6,29	NS ^b

Vysvětlivky:

* podskupina C versus podskupina III, p < 0,05

BMI - body mass index

sBP - systolický krevní tlak

dBP - diastolický krevní tlak

7.2. Výsledky

Tabulka 7.2.1 prezentuje hladiny zkoumaných parametrů v jednotlivých podskupinách a statistické rozdíly mezi nimi. TGF- β_1 bylo statisticky zvýšeno ve všech podskupinách s diabetem ve srovnání se zdravými kontrolami, ale nikoli mezi diabetickými podskupinami (I-II ($p < 10^{-6}$), I-III ($p < 10^{-4}$), I-IV, ($p < 10^{-4}$)). Obdobná situace byla zjištěna u HbA_{1c} (I-II ($p < 0,001$), I-III ($p < 10^{-4}$), I-IV, ($p < 10^{-6}$)) a také u glykemie (I-II ($p < 0,01$), I-III ($p < 10^{-4}$), I-IV, ($p < 10^{-4}$)). Hodnoty duMA byly významně vyšší u nemocných s orgánovými komplikacemi, a to ve fázi incipientní nefropatie či pokročilých orgánových komplikací (I-II ($p < 10^{-5}$), I-IV ($p < 10^{-4}$), II-III ($p < 0,001$), II-IV ($p < 0,001$)). Obdobné závěry byly nalezeny v případě cystatinu C (I-II ($p < 0,01$), I-IV ($p < 10^{-5}$), II-III ($p < 0,01$), II-IV ($p < 10^{-5}$)). Další výsledky jsou zobrazeny v tabulce jako mean \pm SD.

Tabulka 7.2.2. ukazuje Spearmanovy korelace mezi zkoumanými parametry počítané z kompletní zdrojové matice (bez měření s chybějícími údaji). TGF- β_1 pozitivně koreluje s HbA_{1c} ($r=0.7282$, $p < 0,0001$) i s aktuální glykemií ($r=0.494$, $p < 0,002$); méně pak s markery DN: duMA ($r=0.332$, $p < 0,05$) a cystatinem C ($r=0,363$, $p < 0,03$). Další významná korelace mezi stanovenými parametry a TGF- β_1 nebyla nalezena.

Tabulka 7.2.3. uvádí výsledky faktorové analýzy Spearmanovy korelační matice. Neparametrické korelace byly zvoleny s ohledem na výraznou nesymetrii v datech u některých proměnných a z ní vyplývající heteroscedasticitu. Optimální počet faktorů byl zvolen na základě Kaiserova kritéria a Cattelova grafu vlastních čísel. Obě metody vedly ke dvěma vzájemně nezávislým (ortogonálním) faktorům vyjadřujícím celkem 88.6% celkové variability sdílené mezi proměnnými. První z těchto faktorů vysvětloval 67.9% celkové variability sdílené mezi proměnnými a druhý 20.8%. Faktory byly snadno interpretovány. První z faktorů byl interpretován jako Faktor diabetické neuropatie. Uvedený faktor koreloval

nejsilněji s dobou trvání DM, dále s HbA_{1c}, TGF-β₁, glykemií, duMA a Cystatinem C. Druhý faktor, který byl interpretován jako Faktor endoteliální dysfunkce koreloval nejsilněji s Cystatinem C, Homocysteinem a Fibrinogenem a naopak nevykazoval výraznější korelaci s proměnnými charakterizujícími stupeň diabetu.

Tab 7.2.1. Zkoumané parametry u 43 nemocných s DM 1. typu a 13 zdravých kontrol. Výsledky jsou prezentovány jako průměr ± SD.

	Skupina I (zdravé kontroly)	Skupina II (DM 1. typu bez komplikací)	Skupina III (DM 1. typu s incipientní DN)	Skupina IV (DM 1. typu s komplikacemi)	Kruskal-Wallisovo vícenásobné porovnání/ Kruskal-Wallisův test
TGF-β₁ (ng/ml)	2,33 ± 0,86	40,7 ± 14,5	31,4 ± 12,3	35,7 ± 18,7	I-II (p<10 ⁻⁶), I-III (p<10 ⁻⁴), I-IV (p<10 ⁻⁴) p<10 ⁻⁶
HbA_{1c} (%)	3,61 ± 0,45	6,84 ± 1,89	7,76 ± 2,39	8,93 ± 1,72	I-II (p<0,001), I-III (p<10 ⁻⁴), I-IV (p<10 ⁻⁶) p<10 ⁻⁶
Glykémie (mmol/l)	4,67 ± 0,41	10,3 ± 4,72	12,5 ± 4,62	10,3 ± 3,58	I-II (p<0,01), I-III (p<10 ⁻⁴), I-IV (p<0,01), p<10 ⁻⁴
duMA (mg)	10,7 ± 5,93	14,8 ± 7,92	81,5 ± 55,0	468 ± 880	I-III (p<10 ⁻⁵), I-IV (p<10 ⁻⁴), II-III (p<0,001), II-IV (p<0,001) p<10 ⁻⁶
Cystatin C (mg/l)	0,73 ± 0,10	0,74 ± 0,08	1,45 ± 1,51	1,50 ± 0,35	I-III (p<0,01), I-IV (p<10 ⁻⁵), II-III (p<0,01), II-IV (p<10 ⁻⁵) p<10 ⁻⁶
Fibrinogen (g/l)	2,74 ± 0,73	2,22 ± 0,45	2,58 ± 0,63	2,81 ± 0,80	II-IV (p<0,05) NS (p<0,14)
Homocystein (μmol/l)	7,60 ± 1,26	8,28 ± 4,08	10,3 ± 3,08	11,8 ± 5,27	I-III (p<0,01), I-IV (p<0,01), II-III (p<0,01), II-IV (p<0,01) p<0,01
CRP (mg/l)	0,73 ± 0,27	1,02 ± 0,84	2,88 ± 3,94	5,66 ± 7,77	NS
TAG (mmol/l)	1,03 ± 0,34	1,06 ± 0,75	1,86 ± 2,60	1,87 ± 1,02	I-IV (p<0,05), II-IV (p<0,05), III-IV (p<0,05) p<0,05
HDL-C (mmol/l)	1,77 ± 0,47	1,41 ± 0,41	1,49 ± 0,41	1,61 ± 0,44	I-II (p<0,05) NS (p<0,17)
LDL-C (mmol/l)	2,33 ± 0,31	2,60 ± 0,61	2,79 ± 0,84	2,88 ± 0,88	I-IV (p<0,05) NS (p<0,16)

Vysvětlivky:

TGF-β₁- transformační růstový faktor beta 1

HbA_{1c} – glykovaný hemoglobin

duMA – mikroalbuminurie/24hod

CRP - C-reaktivní protein

HDL-C - high density lipoprotein cholesterol

LDL-C - low density lipoprotein cholesterol

Tab 7.2.2. Spearmanovy korelce zahrnující pacienty s diabetem (n=24) a kontroly (n=13). Pro výpočet byla použita kompletní zdrojová datové matice (n=37). Statisticky významné korelace jsou označeny žlutě. V horní části buněk jsou korelační koeficienty, za

	Trvání DM	HbA1c	Fibrinogen	Glykémie	Homocystein	Cystatin C	duMA	TGF-β1
Trvání DM		0,7047 0,0000	-0,0194 0,9092	0,6966 0,0000	0,3030 0,0683	0,5537 0,0004	0,5216 0,0009	0,6689 0,0000
HbA1c	0,7047 0,0000		0,0340 0,8417	0,4778 0,0028	0,1216 0,4735	0,5658 0,0003	0,2549 0,1279	0,7282 0,0000
Fibrinogen	-0,0194 0,9092	0,0340 0,8417		-0,1172 0,4897	0,3289 0,0469	0,4507 0,0051	-0,0111 0,9478	-0,0688 0,6859
Glykémie	0,6966 0,0000	0,4778 0,0028	-0,1172 0,4897		0,2089 0,2148	0,3300 0,0461	0,5291 0,0008	0,4940 0,0019
Homocystein	0,3030 0,0683	0,1216 0,4735	0,3289 0,0469	0,2089 0,2148		0,4802 0,0026	0,4441 0,0059	0,1021 0,5475
Cystatin C	0,5537 0,0004	0,5658 0,0003	0,4507 0,0051	0,3300 0,0461	0,4802 0,0026		0,3473 0,0352	0,3626 0,0274
duMA	0,5216 0,0009	0,2549 0,1279	-0,0111 0,9478	0,5291 0,0008	0,4441 0,0059	0,3473 0,0352		0,3318 0,0448
TGF-β1	0,6689 0,0000	0,7282 0,0000	-0,0688 0,6859	0,4940 0,0019	0,1021 0,5475	0,3626 0,0274	0,3318 0,0448	

Tab 7.2.3. Faktorová analýza parametrů diabetické nefropatie a endoteliální dysfunkce zahrnující pacienty s diabetem (n=24) a kontroly (n=13). Pro výpočet byla použita metoda hlavních faktorů následovaná rotací faktorů VARIMAX. Z důvodů negaussovské distribuce dat byla základem pro výpočet komunalit a faktorových vah Spearmanova korelační matice z kompletní zdrojové datové matice (n=37). Optimální počet faktorů byl určen na základě Kaiserova kritéria. Zvolené faktory jsou označeny žlutě. Faktorové váhy (korelace proměnných s faktory) s absolutní hodnotou větší než 0,4 jsou označeny žlutě.

Číslo faktoru	Vlastní číslo faktoru	Procento vysvětleného rozptylu	
		Individuální	Kumulativní
1	3,35	67,88	67,88
2	1,02	20,76	88,64
3	0,56	11,36	100,00
4	0,00	0,00	100,00
5	0,00	0,00	100,00
6	0,00	0,00	100,00
7	0,00	0,00	100,00
8	0,00	0,00	100,00

Proměnná	Komunalita	Faktor	
		(1) Faktor diabetické nefropatie	(2) Faktor endoteliální dysfunkce
Trvání DM	0,7984	0,8720	0,1950
HbA1c	0,6339	0,7866	0,1231
TGF-β1	0,6030	0,7764	-0,0137
Glykémie	0,5244	0,7221	0,0539
duMA	0,3386	0,5095	0,2811
Cystatin C	0,6781	0,4649	0,6797
Homocystein	0,4089	0,1938	0,6094
Fibrinogen	0,3857	-0,1280	0,6077

7.3. Diskuze

Výsledky naší práce ukazují, že hladiny TGF- β_1 u nemocných s DM 1. typu jsou ovlivněny jak aktuální, tak chronickou glykemií. Jak již bylo řečeno dříve, je tíže a délka hyperglykémie stěžejním faktorem pro rozvoj diabetických komplikací. Jakmile je organismus jednou vystaven hyperglykémii, spouští se kaskáda dějů na molekulární a buněčné úrovni, které pak vedou ke tkáňovému poškození. Vzdávající důkazy poukazují na roli cytokinů v patogenezi tkáňové léze způsobené hyperglykemií (Yang a kol. 2003).

Experimentálními studiemi bylo potvrzeno, že obě, akutní i chronická hyperglykémie, mohou zvýšit produkci TGF- β_1 avšak klinické práce k tomuto tématu zůstávají inkonzistentní (Sharma a kol. 1995, Matsumo a kol. 2002).

Práce Florese a kolektivu zkoumající TGF- β_1 při záchytu DM 1. typu a po 1., 4. a 16. týdnu léčby inzulinem v zásadě říká, že produkce TGF- β_1 nebyla modifikována redukcí glykémie (Flores a kol. 2004), což není jednoznačně v souladu s naší prací. Domníváme se, že rozdíl mezi nálezy Florese a námi, může být vysvětlen faktem, že Flores zahrnul pouze soubor nově diagnostikovaných nemocných v časných fázích choroby, kde jsou vysoké hladiny TGF- β_1 asociovány s aktivitou autoimunitního procesu, který je podstatou patogeneze DM 1. typu, a nejsou odezvou na hyperglykémii. Imunosupresivní účinky TGF- β_1 se projevují inhibicí sekrece zánětlivých cytokinů z makrofágů, lymfocytů, zejména Th1 lymfocytů. TGF- β_1 pak může hrát roli v patogenezi DM 1. typu antagonismem cytotoxického efektu prozánětlivých cytokinů, které zahajují a udržují autoimunitní proces. Ten následně může zakrýt změny TGF- β_1 způsobené snížením glykémie v časných fázích choroby. K získání více sofistikovaného závěru by bylo třeba větších prospektivních studií s pacienty v různých stádiích diabetu.

V naší průřezové studii jsme pozorovali korelaci mezi TGF- β_1 a dlouhodobou metabolickou kompenzací sacharidů (vyjádřeno HbA_{1c}), stejně tak aktuální glykemií. Tyto závěry podporují názor, že vzestup glykémie během dne vede k produkci TGF- β_1 a tímto mechanismem se spolupodílí na endoteliální dysfunkci. Ve světle těchto nálezů, by měla být kontrola akutní stejně tak chronické hyperglykémie, hlavním cílem léčby DM 1. typu ve všech stádiích choroby.

8. Závěry

8.1. Závěr A a dopady do klinické praxe

Naše práce ukázala, že TGF- β_1 , na rozdíl od VEGF, je již zvýšen u nemocných s DM 1. typu bez přítomných orgánových komplikací. Oba prosklerotické cytokiny, TGF- β_1 i VEGF, jsou elevovány ve fázi incipientní DN u DM 1. typu a neklesají signifikantně během ACEI terapie. Zvýšené hladiny VEGF u pacientů s incipientní DN poukazují na roli tohoto cytokinu v patogenezi DN. Stanovování hladin VEGF by mohlo sloužit jako diagnostický marker této komplikace. Podobně cystatin C hraje důležitou úlohu v incipientní DN. Může sloužit jako spolehlivý marker pro screening časně fáze renálního postižení u diabetu a může být také, mimo mikroalbuminurii, použit ke zhodnocení efektu léčby ACEI v případech s minimálním poklesem glomerulární filtrace, kde vyšetření sérového kreatininu a clearance kreatininu nejsou dostatečně citlivá.

8.2. Závěr B a dopady do klinické praxe

Naše nálezy ukazují, že produkce a hladiny TGF- β_1 korelují s aktuální i chronickou hyperglykemií. Dysregulace cytokinů (včetně TGF- β_1) je jedním z patogenetických mechanismů přispívajícím k rozvoji diabetických mikrovaskulárních komplikací.

Uspokojivá dlouhodobá metabolická kompenzace glykémie sama nezajistí dostatečnou prevenci specifických komplikací diabetu. Proto, a to zejména s ohledem na aktivitu cytokinů, je nutné v klinické praxi zajistit stabilitu glykémie během celého dne (24 hodin)

Literatura

- Bartoš V, Pelikánová T. Praktická diabetologie. Maxdorf, 2000.
- Border WA, Noble NA: Cytokines in kidney disease: the role of transforming growth factor-beta. *Am J Kidney Dis* 1993; 22(1): 105-13.
- Buyschaert M, Joudi I, Wallemecq P, Hermans MP. Performance of serum cystatin-C versus serum creatinine in subjects with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 1320.
- Chambers RC, Leoni P, Kaminski N, Laurent GJ, Heller RA. Global expression profiling of fibroblast responses to transforming growth factor-beta1 reveals the induction of inhibitor of differentiation-1 and provides evidence of smooth muscle cell phenotypic switching. *Am J Pathol* 2003; 162(2): 533-46.
- Clark DA, Coker R. Transforming growth factor-beta. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30(3): 293-298.
- Cohen MP, Shea E, Chen S *et al*: Glycated albumin increases oxidative stress, activates NF-kappa B and extracellular signal-regulated kinase (ERK), and stimulate ERK-dependent transforming growth factor-beta 1 production in macrophage RAW cells. *J Lab Clin Med* 2003; 141(4): 242-9.
- Danielson P, Truedsson L, Eriksson KF, Norgren L. Inflammatory markers and IL-6 polymorphism in peripheral disease with and without diabetes mellitus. *Vasc Med* 2005; 10(3): 191-8.
- Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-86.

- Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20: 1183-97.
- Flores L, Naf R, Hernaez R: Transforming growth factor beta 1 at clinical onset of Type 1 diabetes mellitus. A pilot study. *Diabet Med* 2004; 21: 818-822.
- Galkina E, Ley K. Leukocyte recruitment and vascular injury in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(2): 367-77.
- Gilbert RE, Cox A, Wu LL et al: Expression of TGF-beta 1 and type IV collagen in the renal tubulointerstitium in experimental diabetes: effects of ACE inhibition. *Diabetes* 1998; 47(3): 414-22.
- Grainger DJ, Heathcote M, Chiano M, Snieder H, Kemp JC, Metcalfe JC, Carter ND, Spector TD. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. *Hum Mol Genet* 1999; 8(1): 93-97.
- Kanesaki Y, Suzuki D, Uehara G, Toyoda M, Katoh T, Sakai H, Watanabe T. Vascular endothelial growth factor gene expression is correlated with glomerular neovascularization in human diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2005; 45: 288-94.
- Krolewski AS, Czyzyk A, Janeczko D, Kopczynski J. Mortality from cardiovascular diseases among diabetics. *Diabetologia* 1977; 13: 345-50.
- Matsumo Y, Takahashi M, Ogata M. Relationship between glycoxidation and cytokines in the vitreous of eyes with diabetic retinopathy. *Jpn J Ophthalmol* 2002; 46(4): 406-12.
- Meloun M, Militky J, Hill M, Brereton RG. Crucial problems in regression modelling and their solutions. *Analyst* 2002; 127: 433-50.
- Meloun M, Hill M, Militky et al. New methodology of influential point detection in regression model building for the prediction of metabolic clearance rate of glucose. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 311-22.

- Molich ME: The relationship between glucose control and the development of diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Seminars in Nephrology* 1997; 17: 101-103.
- Netea M, Hancu N, Blok W, Grigorescu-Sido P, Popa V. Interleuin 1- β , tumour necrosis factor- α and interleukin 1 receptor antagonist in newly diagnose insulin-dependent diabetes mellitus. Comparison to long-standing diabetes and healthy individuals. *Cytokines* 1997; 9: 284-287.
- Parving H, Tarnow L, Rossing P. Genetics of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 2509-17.
- Pelikánová T. Diabetologie a vybrané kapitoly z metabolismu. Triton 2003
- Perlemoiiine C, Beauviex MC, Rigalleau V, Baillet L, Barthes N, Derache P. Interest of cystatin C in screening diabetic patients for early impairment of renal function. *Metabolism* 2003; 52(10): 1258-64.
- Perušičová J. Trendy soudobé diabetologie 7. Galén 2003.
- Pohl MA, Blumenthal S, Cordonnier DJ et al: Independent and additive impact of blood pressure control and angiotensin II receptor blockade on renal outcomes in the irbesartan diabetic nephropathy trial: clinical implications and limitations. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16(10): 3027-37.
- Pontůuch P. Diabetická nefropatie. Grada Publishing, Praha 2003.
- Průša R a kol. Orientační rozmezí hodnot laboratorních vyšetření podle věkových skupin. FN Motol, Praha 2000.
- Sampson M J, Drury P L. Accurate estimation of glomerular filtration rate in diabetic nephropathy from age, body, weight, and serum creatinine. *Diabetes Care* 1992; 15(5): 609-12.
- Schena PF, Gesualdo L. Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 30-33.

- Sharma K, Eltayeb BO, McGowan TA, Dunn SR, Alzahabi B, Rohde R et al. Captopril-induced reduction of serum levels of TGF-beta 1 correlates with long-term renoprotection in insulin dependent diabetic patients. *Am J Kidney Dis* 1999; 34(5): 951-4.
- Sharma K, Ziyadeh FN: Hyperglycemia and diabetic kidney disease. The case for transforming growth factor-beta as a key mediator. *Diabetes* 1995; 44(10): 1139-46.
- Taguchi T, Brownlee M. Angiotensin II angiogenic effect in vivo involves vascular endothelial growth factor- and inflammation-related pathways. *Lab Invest* 2002; 82: 747–756.
- Pickup J, Tamara R, Silvestre JS, Durie JS, Levy BI. The biochemical mechanisms of diabetic tissue damage. In Pickup J, Williams G eds. *Textbook of diabetes*, 3rd edn. Oxford: Blackwell Science 2003: 47: 1-10.
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylurea or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998; 352: 837-53.
- Yang B, Cross DF, Ollrenshaw M et al. Polymorphisms of the VEGF and susceptibility to diabetic microvascular complications in patients with type 1 diabetes mellitus. *J Diabet Its Compl* 2003; 17: 1-6.
- Viberti G, Mogensen CE, Groop LC, Pauls JF. Effect of captopril on progression to clinical proteinuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and microalbuminuria. *JAMA* 1994; 271: 275.
- Vriese AS, Tilton RG, Elger M, Stephan CC, Kriz W, Lameire NH. Antibodies against vascular endothelial factor improve early renal dysfunction in experimental diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12(5): 993-1000.
- Wahab N A, Schaefer L, Weston B S et al: Glomerular expression of thrombospondin-1, transforming growth factor beta and connective tissue growth factor at different stages of

diabetic nephropathy and their interdependent roles in mesangial response to diabetic stimuli. *Diabetologia* 2005; 48: 2650-2660.

- Williams G eds. *Textbook of diabetes*, 3rd edn. Oxford: Blackwell Science 2003: 47: 1-10.
- Zavadova E, Loercher A, Verstovsek S, Verschraegen CF, Micksche M, Freedman RS. The role of macrophages in antitumor defense of patients with ovarian cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 1999; 13(1): 135-44.
- World Health Organization Consultation. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications, Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of WHO Consultation. Geneva: World Health Organization, 1999.

Seznam prezentací MUDr. Denisa Janíčková Žďárská

- **Žďárská D**, Kvapil M, Dřevínek P, Cinek O a spolupracovníci studie CIMGT: Autoimunitní diabetes mellitus v dospělosti – pilotní studie. *DMEV* 2001; 4 Supl. 1:58-59.
- **Žďárská D**, Sýkora M, Kvapil M: Latentním autoimunitním diabetem mellitus a inzulinová rezistence - *Postgraduální medicína* 2001; 3: 751-754.
- **Žďárská D**, Kvapil M: Genetika inzulinové rezistence - *Postgraduální medicína* 2001; 3: 749-750.
- **Žďárská D**, Zavadová E, Kvapil M: Transforming growth factor beta 1 in newly diagnosed diabetes mellitus - American Association for Cancer Research Special Conference: the TGF- β superfamily, roles in the pathogenesis of cancer and other diseases. *Proceedings B* 58, January 15-19, 2003 La Jolla, CA.
- Zamrazil V ml., Vaněček T, Chodová I, **Žďárská D**: Laktátová acidóza s letálním koncem u 67-leté nemocné léčené metforminem. *DMEV* 2003; 6, suppl. 1:66.
- **Žďárská D**, Zavadová E, Kvapil M: Transforming growth factor beta 1 u pacientů při záchytu diabetes mellitus 2. typu ve srovnání s nemocnými s latentním autoimunitním diabetem mellitus *DMEV* 2003; 6 suppl. 1: 66-67.
- **Žďárská D**, Zavadová E, Kvapil M: Transforming growth factor β_1 in patients with newly diagnosed diabetes mellitus type 2 in comparison to patients with latent autoimmune diabetes mellitus. *Diabetes Metab* 2003; 29: 4S7-4S428.
- Haková M, Piřhová P, Zamrazil V, **Žďárská D**: Efektivní náhrada CSII inzulinem glargine u pacientky s labilním diabetes mellitus 1. typu - *Kazuistiky v diabetologii* 2004; 3:17-19.

- **Janíčková Žďárská D:** Kazuistika 1 – indikace pro glargine: labilita diabetu - *Medicína po promoci* (speciální vydání), Další nové možnosti léčby diabetu k "cílovým hodnotám", inzulin glargine (Lantus) na prahu nového tisíciletí 2004; 12: 13.
- **Janíčková Žďárská D:** Kazuistika 2 – indikace pro glargine: dawn fenomén - *Medicína po promoci* (speciální vydání), Další nové možnosti léčby diabetu k "cílovým hodnotám", inzulin glargine (Lantus) na prahu nového tisíciletí 2004; 12: 14.
- **Žďárská D, Kvapil M:** Indikace pro glargine – dawn fenomén u DM 1. typu – *Kazuistiky v diabetologii*, inzulin glargine (Lantus) a jeho místo v terapii DM 2004; suppl. 2: 11.
- **Žďárská D, Kvapil M:** Indikace pro glargine – labilita DM 1. typu – *Kazuistiky v diabetologii*, inzulin glargine (Lantus) a jeho místo v terapii DM 2004; suppl. 2: 12-13.
- **Žďárská D, Kvapil M:** Místo inzulinu glargine v komplexní intervenci rozvinutých komplikací u DM 2. typu – *Kazuistiky v diabetologii*, inzulin glargine (Lantus) a jeho místo v terapii DM 2004; suppl. 2: 14-15.
- **Janíčková Žďárská D:** Inzulínová léčba u diabetes mellitus 1. typu – inzulin detemir versus inzulin glargine. *Kazuistiky v diabetologii* 2005; 1: 40.
- **Žďárská D, Zavadová E, Kvapil M:** Transforming growth factor beta 1, beta 2 u nemocných s diabetes mellitus. *DMEV* 2005; 8 Suppl. 1: 54-55.
- **Žďárská D, Vavřinec J, Zavadová E, Kvapil M:** Increased levels of TGF beta 1 in recently diagnosed diabetes mellitus in adults and in patients with diabetic complications. *Diabetes* 2005; volume 54, suppl. 1: A614.
- **Janíčková Žďárská D:** Diabetes mellitus ve vztahu ke kardiovaskulárním chorobám. *Interní medicína pro praxi* 2005; 7-8: 332-335.
- **Žďárská D, Zavadová E, Kvapil M:** Efekt léčby ACEI u incipientní diabetické nefropatie u nemocných s diabetes mellitus 1. typu. *DMEV* 2005; 8(4): 205.
- **Janíčková Žďárská D, Kvapil M:** Diabetická retinopatie. *Medinews* 2005; 4(4): 206-7.

- **Žďárská D:** Užití inzulínových analog u diabetické nefropatie vedoucí k chronické renální insuficienci, *Kazuistiky v diabetologii* 2006, 4 suppl.1: 19-20.
- **Žďárská D:** Kontinuální glukózový monitorovací systém potvrzuje stabilizaci glykémie u pacientů s diabetes mellitus 2. typu léčených inzulínem glargine na terapii IIR. *Kazuistiky v diabetologii* 2005; 3(4): 43-44.
- Charvat J, Michalova K, Chlumsky J, Horackova M, Valenta Z, **Zdarska D:** The significance of carotid artery plaques in the detection of coronary artery disease in asymptomatic type 2 diabetic patients. *J Int Med Res* 2006; 34:13-20.
- **Janičková Žďárská D,** Kvapil M: Rimonabant. *Farmakoterapie* 2006; 2(1): 9-12.
- Kvapil M, **Janičková Žďárská D:** Léčba inzulínem u diabetu 2. typu a postprandiální glykémie. *Farmakoterapie* 2006; 2(1): 87-101.
- **Žďárská D,** Zavadová E, Kvapil M: Effect of angiotenzin-converting enzyme inhibitors therapy in patients with diabetes mellitus type 1 with incipient diabetic nephropathy. *Eur J Clin Invest* 2006; 36, suppl. 1: 7-22.
- **Zdarska D,** Peliskova P, Charvat J, Slavicek J, Mlcek M, Medova E, Kittnar O. ECG Body surface mapping (BSM) in Type 1 diabetic patients. *Physiol Res.* 2006; 22.
- **Janičková Žďárská D,** Doležalová L, Žákovičová E, Kvapil M: Nové postupy při léčbě metabolického syndromu a diabetu 2. typu. *Lékařské listy* 2006; 18 (42): 20-24.
- Kvapil M, **Janičková Žďárská D,** Doležalová L. Terapie obézních pacientů s diabetes mellitus 2. typu. *Medinews* 2006; 4: 202-205.
- **Janickova Zdarska D,** Kvapil M, Zavadova E. The effect of ramipril therapy on cytokines and on parameters of incipient diabetic nephropathy of diabetes mellitus type 1. *Diabetes Metab* 2006; 23: 238.
- **Žďárská D,** Kvapil M. Studie Adopt. *Kazuistiky v diabetologii* 2007; 1: 36 -37.

- **Janíčková Žďárská D.** Úprava poměru bazálního a prandiálního inzulínového analoga vede ke zlepšení kompenzace u diabetes mellitus 1. typu. *Kazuistiky v diabetologii* 2007; 1: 57-58.
- **Janickova Zdarska D,** Zavadova E, Kvapil M. The effect of ramipril therapy on cytokines and parameters of incipient diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes mellitus. *J Int Med Res* 2007; 35: 374-783.
- **Janíčková Žďárská D,** Kvapil M. Zlepšení metabolické kompenzace nemocných s diabetes mellitus 1. typu – porovnání dvou léčebných algoritmů s inzulinem glargine. *Farmakoterapie* 2007; 7: 96-98.
- **Janickova Zdarska D,** Zavadova E, Kvapil. TGF- β and different biochemical markers in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes* 2007; 56, suppl. 1, A320.