

Wskaźniki nefropatii cukrzycowej – czym wspomóc albuminurię?

Niedostateczna znajomość wciąż odkrywanych mechanizmów nerkowego przesączania i wydalania albuminy oraz niedoskonała czułość i swoistość albuminurii jako markera nefropatii cukrzycowej, nakazują poszukiwanie nowych wskaźników występowania i ciężkości uszkodzenia nerek wskutek cukrzycy.

Postęp w zakresie znajomości patogenezы nefropatii cukrzycowej pozwolił na identyfikację jej nowych potencjalnych predyktorów i markerów zaawansowania wśród cytokin zapalnych (m.in. TNF α i jego receptory) oraz związków, których ekspresja zachodzi w uszkodzonych komórkach nerek (m. in. cząsteczka uszkodzenia nerek typu 1 /KIM-1/).

Szansę na istotny przełom w diagnostyce nefropatii cukrzycowej niosą badania proteomu i metabolomu moczu i krwi, a przede wszystkim odkrywanie znaczenia niektórych mikroRNA jako modyfikowalnych czynników ryzyka nefropatii cukrzycowej (np. miR-192), co dodatkowo budzi nadzieje na nowe rodzaje leczenia.

(NEFROL. DIAL. POL. 2014, 18, 226-229)

Markers of diabetic nephropathy – what can support albuminuria?

Our inadequate and constantly evolving understanding of the mechanisms of kidney albumin filtration and excretion, as well as imperfect sensitivity and specificity of albuminuria as a marker of diabetic nephropathy warrant searching for new parameters of kidney damage due to diabetes.

A significant progress in the knowledge of diabetic nephropathy pathogenesis enabled identification of its new potential predictors and markers of progression among inflammatory cytokines (like TNF α and its receptors), as well as compounds whose expression takes place in damaged renal cells (like kidney injury molecule-1).

A major breakthrough in the diagnosis of diabetic nephropathy can be expected with studies of the urine and blood proteomes and metabolomes, and most importantly, exploration of certain microRNA as modifiable risk factors of diabetic nephropathy (like miR-192), which also raises hopes for new treatment options.

(NEPROL. DIAL. POL. 2014, 18, 226-229)

Obraz patomorfologiczny nefropatii cukrzycowej obejmuje nasilające się zmiany w kłębuszkach nerkowych: zwyrodnienie szkliste tętniczek, pogrubienie błony podstawnej, dystrofię podocytów, przerost komórek oraz istotny przyrost macierzy mezangium, a także zaburzenia strukturalne kanalików nerkowych: atrofię komórek nabłonka i pogrubienie jego błony podstawnej. Napływ komórek zapalnych do kłębuszka i śródmiaższu łączy się z postępującym włóknieniem nerek.

Te zmiany histologiczne są następstwem licznych, wzajemnie powiązanych i nasilających się zaburzeń na poziomie molekularnym. Pod wpływem długotrwałego zwiększonego katabolizmu glukozy w komórkach nerek, a także oddziaływania zaawansowanych produktów glikacji białek na swoiste receptory w błonach komórkowych dochodzi do pobudzenia ekspresji substancji zwiększających ciśnienie śródkłębuszkowe (renina, angiotensyna, endotelina-1), dysfunkcji śródbłonka wskutek obniżonej syntezy tlenu azotu, zwiększonej generacji wolnych rodników tlenowych i nasilenia stresu oksydacyjnego, zwiększenia ekspresji cytokin prozapalnych, chemokin i adhezyj

oraz zwiększenia ekspresji tkankowych czynników wzrostowych. Ostatecznie, procesy te odpowiadają za zwiększenie syntezy białek macierzy zewnątrzkomórkowej – kolagenów, fibronektyny i lamininy.

Jak dotychczas jedynym klinicznym markerem obecności i progresji nefropatii cukrzycowej pozostaje wielkość albuminurii. Nie jest to marker swoisty – zwiększone wydalanie albuminy jest objawem większości glomerulopatii. W przypadku cukrzycowej choroby nerek jego wartość diagnostyczna opiera się na stwierdzeniu towarzyszącej retinopatii cukrzycowej. Jak pokazują jednak badania, założenie jednoczasowości postępu mikroangiopatii w naczyniach kłębuszka i siatkówki często nie odpowiada rzeczywistości [1, 2].

Badania ostatnich lat dowodzą również, że albuminuria nie jest też dostatecznie czułym markerem nefropatii cukrzycowej – w badaniu amerykańskim NHANES, u niemal 10% spośród ok. 3000 chorych na cukrzycę typu 2, przewlekła choroba nerek w stadium ≥ 3 występowała bez nieprawidłowości w zakresie albuminurii, podczas gdy tylko 7,6% chorych charakteryzowało się przewlekłą niewydolnością nerek z towarzyszącą mi-

Ewa ŻUKOWSKA-SZCZECZOWSKA¹
Ewa PIKULSKA-CHROBAK²
Grzegorz WYSTRYCHOWSKI¹

¹Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Diabetologii i Nefrologii, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
Kierownik
Prof. dr hab. n. med. *Władysław Grzeszczak*

²Oddział Chorób Wewnętrznych z Pododdziałem Diagnostyki Kardiologicznej, Szpital Zakonu Bonifratrów w Katowicach
Kierownik:
Dr hab. n. med. *Andrzej Madej*

Słowa kluczowe:

- nefropatia cukrzycowa
- markery
- albuminuria

Key words:

- diabetic nephropathy
- markers
- albuminuria

Adres do korespondencji:

Dr hab. Grzegorz Wystrychowski
Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Diabetologii i Nefrologii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach Szpital Kliniczny nr 1 w Zabrze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
ul. 3 Maja 13-15
41-800 Zabrze
Tel. 32 3704441
Fax. 32 3704489
e-mail: wystrych@gmail.com

kro- lub makroalbuminurią [3]. Podobnie, w innym i większym międzynarodowym badaniu na populacji 11,5 tys. chorych z cukrzycą typu 2 i eGFR<60ml/min, aż ~20% chorych nie objawiało nieprawidłowości w zakresie wydalania albuminy, zaś ~27% z nich cechowała jedynie mikroalbuminuria [4]. Również w cukrzycy typu 1, zespół Andrzeja Krolewskiego odnotował szybkie obniżanie się filtracji kłębuszkowej (>3,3%/rok) u ok. 10% spośród 286 chorych z wyjściową normoalbuminurią w obserwacji ~8-letniej, podczas której tylko u połowy pacjentów doszło do rozwoju mikroalbuminurii, natomiast pozostali nadal nie wykazywali odchyleń w zakresie albuminurii [5].

Należy mieć również na uwadze inne mankamenty albuminurii – fizjologiczne wzrosty powysiłkowe i poposiłkowe oraz towarzyszące ostrym schorzeniom zapalnym, a także istotną niedokładność metod pomiarowych [6]. Sprawę komplikują dodatkowo niedawne odkrycia z zakresu fizjologii albuminurii. W przeszłości, na podstawie oznaczeń mikropunkcyjnych, zakładano niktę przesączanie kłębuszkowe albuminy (0,00062 wskaźnika przesączania) [7]. Badania ostatnich 7 lat z użyciem mikroskopii dwufotonowej dowodzą jednak ok. 50-krotnie większego przesączania albuminy (0,03 wskaźnika przesączania, ok. 5,5g na dobę), co lepiej odpowiada stosunkowi rozmiarów cząsteczki albuminy względem szerokości porów błony ściennej [8]. W związku z tym, że prawie cała pula przesączanej albuminy jest resorbowana w cewce proksymalnej na drodze endocytozy lub degradowana w lizosomach, zwiększona albuminuria może nie być efektem nasilonego przesączania przez uszkodzoną błonę filtracyjną, a skutkiem zaburzonej resorpcji cewkowej [9].

Biorąc pod uwagę wszystkie niedoskonałości albuminurii celowe jest poszukiwanie innych predyktorów i markerów progresji lub regresji nefropatii cukrzycowej. Takie potencjalne markery stanowią m.in. zwiększone stężenia w moczu parametrów odzwierciedlających uszkodzenie kłębuszka: śródbłonka – glikozaminoglikanów; podocytów – nefryny, podokaliksyny, podocyny; błony podstawnej – kolagenu typu IV; zwiększonej przepuszczalności bariery filtracyjnej – transferyny [10,11]. Kolejna grupa badanych substancji wykazuje podwyższone stężenia w moczu w przypadku uszkodzenia kanałków nerkowych – wskutek zmniejszonej zdolności resorpcyjnej cewek: m.in. α_1 -mikroglobulina, β_2 -mikroglobulina, białko wiążące retinol, a także w następstwie martwicy komórek nabłonka cewek: N-acetylo- β -D-glukozaminidaza, fosfataza alkaliczna, γ -glutamyl-transferaza, lipokalina związana z żelatynazą neutrofilii [11]. W nefropatii cukrzycowej obserwuje się również zwiększone wydalanie z moczem markerów ciężkości ogólnoustrojowego stresu oksydacyjnego: 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny i – będącej produktem zaawansowanej glikacji białek – pentozydiny, a także cytokin zapalnych (m.in. białka chemotaktycznego dla monocytów typu 1 (MCP-1), czynnika martwicy guza α (TNF α)), jak też czynników wzrostowych (TGF β , CTGF) [10,11].

Jak dotąd badania nowych markerów nie przekładają się na nowe zastosowania

kliniczne. Związane to jest m.in. z tym, że w większości badań wykazano jedynie związek podwyższonych lub obniżonych poziomów markerów z obecnością nefropatii, natomiast niewiele badań oceniło w sposób prospektywny wartość predykcyjną markerów w przewidywaniu rozwoju lub progresji nefropatii. Co gorsza, wśród takich badań, w większości, nie stwierdzono niezależnej wartości predykcyjnej nowych markerów w zakresie „nerkowych” punktów końcowych po uwzględnieniu klasycznych predyktorów (HbA1c, albuminuria, ciśnienie tętnicze) [11].

Hellemons i wsp. podjęli w 2012 r. próbę oceny wartości potencjalnych markerów nefropatii cukrzycowej na podstawie jakości przeprowadzonych badań – liczebności grup badanych i uwzględnienia kopredyktorów. Najbardziej wiarygodnymi wg tych kryteriów parametrami były markery subklinicznego zapalenia (zwiększony poziom IL-18 w surowicy), dysfunkcji śródbłonka (zwiększone stężenia w surowicy asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA), czynnika von Willebranda, tkankowego aktywatora plazminogenu, adhezyn VCAM i ICAM) oraz wynikające z dysfunkcji kłębuszka lub cewek zwiększone stężenia w moczu IgG, ceruloplazminy i transferyny [12].

Spśród nowych markerów na uwagę zasługuje m.in. ADMA, która może być nie tylko markerem, ale i czynnikiem ryzyka nefropatii cukrzycowej. W cukrzycy upośledzona aktywność enzymu rozkładającego ADMA (dimetyloaminohydrolazy dimetyloargininowej) w komórkach śródbłonka wskutek działania produktów zaawansowanej glikacji białek prowadzi do wzrostu stężenia ADMA, która wywiera działanie hamujące syntazę tlenu azotu, prowadząc tym samym do dysfunkcji śródbłonka [13]. Dotychczasowe badania wskazują, że podwyższony poziom ADMA w osoczu wydaje się dobrym markerem szybkiej progresji nefropatii cukrzycowej. Poziom >mediany wiązał się niezależnie z szybszym postępem niewydolności nerek i większym ryzykiem schyłkowej ich niewydolności w grupie 397 chorych z jawną nefropatią w przebiegu cukrzycy typu 1 w okresie 11,3 lat obserwacji [14]. Zaś u chorych na cukrzycę typu 2 korygowane ryzyko progresji niewydolności nerek wśród 225 chorych z mikro- lub makroalbuminurią było 2,7-krotnie wyższe w przypadku wyjściowo wyższych poziomów ADMA w osoczu (>mediany) [15].

Warto zwrócić również uwagę na intrygujące obserwacje dotyczące innego potencjalnego markera progresji nefropatii cukrzycowej – adiponektyny, hormonu pochodzenia tłuszczowego o właściwościach przeciwzapalnych i poprawiających insulinowrażliwość, którego obniżone stężenia w surowicy stwierdza się w zespole metabolicznym i cukrzycy. Co zaskakujące, w przypadku nefropatii cukrzycowej wykazano, że wyższe poziomy adiponektynemii wiążą się z gorszym rokowaniem. W grupie 198 chorych z jawną nefropatią w przebiegu cukrzycy typu 1 skorygowane ryzyko schyłkowej niewydolności nerek było 2,72-krotnie wyższe w przypadku wyższego poziomu adiponektynemii (>mediany) w obserwacji ~8-letniej [16]. Z kolei wśród 1330 chorych na cukrzycę typu 1 podwyższone poziomy

adiponektynemii były niezależnym predyktorem schyłkowej niewydolności nerek u chorych z makroalbuminurią, natomiast nie miały wartości predykcyjnej jeśli chodzi o progresję nefropatii w przypadku chorych z normo- lub mikroalbuminurią [17]. Istnieje kilka hipotez tłumaczących wzrost stężeń adiponektyny w szybko postępującej nefropatii cukrzycowej – może to być nieskuteczna reakcja obronna organizmu, efekt oporności tkankowej na ten hormon lub skutek jego obniżonego klirensu nerkowego.

W ostatnich latach badaniom poddaje się również związki pochodzenia nerkowo-mórkowego, których zwiększona zawartość w surowicy lub moczu bezpośrednio odzwierciedla stopień uszkodzenia tkankowego nerek.

Takim związkiem jest KIM-1 (cząsteczka uszkodzenia nerek typu 1 *kidney injury molecule-1*), białko błony apikalnej nabłonka cewki proksymalnej, którego ekspresja i obecność w moczu i krwi ma miejsce tylko w przypadku uszkodzenia nerek i przekształcania się komórek nabłonka cewki proksymalnej w fagocyty [18]. W badaniach chorych z nefropatią w przebiegu obu typów cukrzycy, przeprowadzonych w ośrodku Steno, stężenie KIM-1 w moczu korelowało z progresją niewydolności nerek (szybszy spadek przesączania kłębuszkowego u 63 chorych z jawną nefropatią w przebiegu cukrzycy typu 1 oraz u 177 chorych z wczesną nefropatią w przebiegu cukrzycy typu 2 (w okresie 3-3,5 lat)), jednak zależności te zniknęły po uwzględnieniu innych znanych predyktorów niewydolności nerek [19,20]. W odróżnieniu od tych obserwacji, niedawno badacze z Bostonu wykazali niezależną wartość prognostyczną stężenia KIM-1 w surowicy. W grupie chorych z jawną nefropatią w przebiegu cukrzycy typu 1 stężenie KIM-1 w surowicy było predyktorem spadku eGFR i ryzyka schyłkowej niewydolności nerek niezależnie od wyjściowej albuminurii, eGFR i HbA1c [21].

Kolejnym związkiem badanym przez tę i inne grupy badaczy jest TNF α , cytokina zapalna o zwiększonej ekspresji w nefropatii cukrzycowej. TNF α wydzielany jest w nerkach przez infiltrujące makrofagi oraz przez komórki nerek pod wpływem hiperglikemii i końcowych produktów zaawansowanej glikacji białek. Cytokina ta oddziałuje na receptory TNFR1 obecne na wszystkich komórkach oraz TNFR2, którego ekspresja zachodzi w nerkach pod wpływem hiperglikemii i stymulacji receptorów dla produktów zaawansowanej glikacji; efektem aktywacji tych receptorów jest pobudzenie aktywności czynnika transkrypcyjnego NF κ B, i, co za tym idzie, zwiększona ekspresja adhezyn i chemokin oraz nasilona generacja wolnych rodników tlenowych. We względnie licznych badaniach ostatnich 2 lat wykazano że stężenie TNFR2 w surowicy (oraz w mniejszym stopniu TNFR1) jest silnym i niezależnym predyktorem rozwoju jawnej nefropatii cukrzycowej oraz spadku wydolności nerek i ryzyka schyłkowej niewydolności nerek u obu typach cukrzycy [22-27].

Substancją przeżywającą renesans w obszarze diagnostyki i leczenia chorób nerek, w tym nefropatii cukrzycowej, jest kwas moczowy. Badania doświadczone na myszach z nefropatią cukrzycową wykazały

że podawanie allopurynolu ogranicza białkomoc, czemu towarzyszy zmniejszona ekspresja cytokin zapalnych i TGF- β w śródmiąższu [28, 29]. U chorych na cukrzycę typu 2 stwierdzono, z kolei, zachodzenie korelacji między stopniem albuminurii a stężeniem kwasu moczowego [30, 31]. Wartość prognostyczną hiperurykემii wykazano u chorych na cukrzycę typu 1 – w grupie 263 chorych z świeżo rozpoznaną cukrzycą typu 1 stężenie kwasu moczowego niezależnie korelowało z ryzykiem rozwoju makroalbuminurii w okresie ~18 lat [32]. Z kolei, w badaniu 324 chorych z cukrzycą typu 1 i normoalbuminurią, w 6-letniej obserwacji, następnienie kwasu moczowego w surowicy było niezależnym predyktorem mikro- lub makroalbuminurii obok wyjściowych wartości HbA1c, albuminurii [33]. Wreszcie, w cytowanym już badaniu A. Krolewskiego i wsp. w grupach 286 chorych z cukrzycą typu 1 i prawidłowym wydalaniem albuminy z moczem oraz 248 chorych z tym typem cukrzycy i mikroalbuminurią, w ~8-letniej obserwacji, wyjściowe stężenie kwasu moczowego było w obu grupach niezależnym predyktorem szybkiego obniżania się eGFR, obok stężeń w surowicy TNFR1 i 2, poziomu HbA1c i skurczowego ciśnienia tętniczego [5]. Obecnie trwa amerykańsko-duńskie badanie kliniczne II fazy mające ocenić wpływ allopurynolu na rozwój nefropatii cukrzycowej u chorych na cukrzycę typu 1 [34].

Postęp technologiczny ostatnich lat – rozwój technik spektrometrii masowej – przyniósł możliwość jednoczesnego oznaczenia stężeń wszystkich peptydów i białek (proteomu) w badanym materiale biologicznym. W diagnostyce nefropatii cukrzycowej najbardziej obiecujące są badania profili proteomicznych moczu, który zawiera ~2000 peptydów i białek. W przeprowadzonych badaniach zidentyfikowano panele kilkudziesięciu-kilkuset białek różnicujących chorych z cukrzycową i niecukrzycową etiologią nefropatii [35] oraz chorych z szybko i wolną postępującą chorobą nerek [36]. W grupie 16 chorych na cukrzycę typu 1 i 19 chorych na cukrzycę typu 2 z wyjściowo prawidłową albuminurią, panel 273 peptydów (CKD273-classifier) identyfikował pacjentów, u których w obserwacji 5-letniej doszło do rozwoju jawnej nefropatii, w stopniu doskonalszym niż mikroalbuminuria (pole pod krzywą ROC: 0,93 wzgl. 0,67; $P < 0,001$) [37]. Największą wartość predykcyjną w tej grupie peptydów miały obniżone stężenia fragmentów kolagenu typu I i III, które, jak się przypuszcza mogą być skutkiem zmniejszonej degradacji kolagenu towarzyszącej nasilonej syntezy białek macierzy łącznotkankowej w przebiegu nefropatii [38].

Również w oparciu o techniki spektrometrii masowej lub chromatografii możliwe jest jednoczesne badanie w materiale biologicznym stężeń wszystkich cząsteczek wielkości 50-1500 Da, czyli metabolomu. Niewczas i wsp. w grupie 40 chorych na cukrzycę typu 2 powikłaną schyłkową niewydolnością nerek w okresie 6,5-12,4 lat oraz 40 chorych z cukrzycą typu 2 bez progresji do schyłkowej niewydolności nerek w tym czasie, zidentyfikowali w surowicy 445 metabolitów, z czego 262 u >80% chorych, spośród tych zaś, 119 o stabilnych poziomach w powtarzanych pomiarach.

Stężenia 28 metabolitów różniły się istotnie statystycznie między obu grupami chorych – w większości były to produkty katabolizmu aminokwasów, węglowodanów i nukleotydów. Stężenia pięciu związków wykazywały niezależnie istotną statystycznie wartość w przewidywaniu progresji do terminalnej niewydolności nerek. Co ciekawe dwie z tych substancji – siarczan p-krezolu i fenyloacetyloglutamina nie są produktem metabolizmu komórek ludzkich, lecz katabolizmem aminokwasów przez bakterie komensalne flory jelitowej, co otwiera nowe fascynujące pytania ws. etiologii i patogenezы nefropatii cukrzycowej [39].

Ostatnie lata przynoszą wiedzę w zakresie kontroli epigenetycznej ekspresji cytokin zapalnych i białek macierzy łącznotkankowej. Hiperglikemia i aktywowane przez nią szlaki sygnałowe modyfikują tę ekspresję nie tylko bezpośrednio poprzez aktywację czynników transkrypcyjnych, ale i pośrednio (epigenetycznie) przez zmiany w zakresie morfologii chromatyny i jej dostępności do transkrypcji, a także zmiany w ekspresji mikroRNA, będących krótkimi niekodującymi odcinkami RNA (20-22 pary nukleotydów), które łącząc się z mRNA uniemożliwiają jego translację. Dla potencjalnych zastosowań klinicznych duże znaczenie ma fakt stabilności mikroRNA w płynach ustrojowych i moczu.

U chorych z nefropatią cukrzycową obserwowano zwiększoną lub zmniejszoną ekspresję mikroRNA (miR) zaangażowanych w procesy proliferacji komórkowej (\uparrow miR-21 [40]), uszkodzenia podocytów i błony szczelinowej (\uparrow miR-155 [41]), generacji wolnych rodników tlenowych (\downarrow miR-25 [42]), zapalenia i włóknienia (\uparrow miR-155 i \uparrow miR-146a [43]). Badania nad miR-192 dowodzą, że mikroRNA mogą być modyfikowalnymi czynnikami ryzyka nefropatii cukrzycowej. Hiperglikemia, poprzez aktywację szlaku TGF β /Smad3, zwiększa w komórkach mezangium ekspresję miR-192. Ta cząsteczka mikroRNA hamuje, z kolei, ekspresję represora Zeb1/2 promotorów genów TGF β i białek macierzy łącznotkankowej, doprowadzając do ich zwiększonej syntezy [44]. Jak wykazali Putta i wsp. [45], podawanie oligonukleotydów o aktywności anty-miR-192 przez 2-17 tygodni myszom z indukowaną cukrzycą typu 1 zwiększało ekspresję represora Zeb1/2, zmniejszało ekspresję TGF β , CTGF, kolagenu IV i fibronektyny oraz ograniczało włóknienie nerek i białkomoc. Wyniki te otwierają szerokie perspektywy dla nowych metod rozpoznawania, monitorowania, a przede wszystkim leczenia nefropatii cukrzycowej.

Podsumowując, w świetle wciąż odkrywanych mechanizmów fizjologii i patofizjologii nerkowego przesączania i wydalania albuminy oraz niedostatecznej czułości i swoistości albuminurii jako markera występowania i ciężkości nefropatii cukrzycowej, konieczne jest poszerzenie zasobu dostępnych narzędzi diagnostyki i monitorowania tego groźnego powikłania cukrzycy.

Postęp w zakresie znajomości mechanizmów patogenezы nefropatii cukrzycowej pozwolił na identyfikację jej nowych potencjalnych predyktorów i markerów zaawansowania. Jak dotąd wyniki tych badań nie

przełożyły się na zastosowania kliniczne, co ma związek z niedostateczną jakością przeprowadzonych prac badawczych (m.in. niska liczba badań oceniających wartość predykcyjną nowych markerów względem albuminurii oraz konfrontujących >2 markery w tej samej grupie chorych), wysokim kosztem analiz oraz brakiem addytywnej wartości rokowniczej większości parametrów względem „klasycznych” markerów.

Szanse na istotny przełom w diagnostyce nefropatii cukrzycowej można wiązać z badaniami proteomu i metabolomu płynów ustrojowych i moczu, a przede wszystkim odkrywaniem znaczenia mikroRNA jako modyfikowalnych czynników ryzyka nefropatii cukrzycowej, co dodatkowo może zaowocować nowymi, celowanymi, a przez to skuteczniejszymi, metodami leczenia tego powikłania cukrzycy.

Piśmiennictwo

1. Lovestam-Adrian M, Agardh E, Agardh CD: The temporal development of retinopathy and nephropathy in type 1 diabetes mellitus during 15 years diabetes duration. *Diabetes Res Clin Pract.* 1999; 45: 15-23.
2. Lovestam-Adrian M, Agardh E, Agardh CD: The incidence of nephropathy in type 1 diabetic patients with proliferative retinopathy: a 10-year follow-up study. *Diabetes Res Clin Pract.* 1998; 39: 11-17.
3. Mottl AK, Kwon KS, Mauer M, Mayer-Davis EJ, Hogan SL, Kshirsagar AV: Normoalbuminuric diabetic kidney disease in the U.S. population. *J Diabetes Complications* 2013; 27: 123-127.
4. Dwyer JP, Parving HH, Hunsicker LG, Ravid M, Remuzzi G, Lewis JB: Renal Dysfunction in the Presence of Normoalbuminuria in Type 2 Diabetes: Results from the DEMAND Study. *Cardiorenal Med.* 2012; 2: 1-10.
5. Krolewski AS, Niewczas MA, Skupien J, Gohda T, Smiles A. et al: Early progressive renal decline precedes the onset of microalbuminuria and its progression to macroalbuminuria. *Diabetes Care* 2014; 37: 226-234.
6. Tuttle KR, Bakris GL, Bilous RW, Chiang JL, de Boer IH. et al: Diabetic Kidney Disease: A Report From an ADA Consensus Conference. *Diabetes Care* 2014; 37: 2864-2883.
7. Tojo A, Endou H: Intrarenal handling of proteins in rats using fractional micropuncture technique. *Am J Physiol.* 1992; 263: F601-606.
8. Russo LM, Sandoval RM, McKee M, Osicka TM, Collins AB. et al: The normal kidney filters nephrotic levels of albumin retrieved by proximal tubule cells: retrieval is disrupted in nephrotic states. *Kidney Int.* 2007; 71: 504-513.
9. Russo LM, Sandoval RM, Campos SB, Molitoris BA, Comper WD, Brown D: Impaired tubular uptake explains albuminuria in early diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2009; 20: 489-494.
10. Lee SY, Choi ME: Urinary biomarkers for early diabetic nephropathy: beyond albuminuria. *Pediatr Nephrol.* 2014.
11. Moresco RN, Sangoi MB, De Carvalho JA, Tatsch E, Bochi GV: Diabetic nephropathy: traditional to proteomic markers. *Clin Chim Acta* 2013; 421: 17-30.
12. Hellemons ME, Kerschbaum J, Bakker SJ, Neuwirt H, Mayer B. et al: Validity of biomarkers predicting onset or progression of nephropathy in patients with Type 2 diabetes: a systematic review. *Diabet Med.* 2012; 29: 567-577.
13. Ando R, Ueda S, Yamagishi S, Miyazaki H, Kaida Y. et al: Involvement of advanced glycation end product-induced asymmetric dimethylarginine generation in endothelial dysfunction. *Diab Vasc Dis Res.* 2013; 10: 436-441.
14. Lajer M, Tarnow L, Jorsal A, Teerlink T, Parving HH, Rossing P: Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine (ADMA) predicts cardiovascular morbidity and mortality in type 1 diabetic patients

- with diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 2008; 31: 747-752.
15. Hanai K, Babazono T, Nyumura I, Toya K, Tanaka N. et al: Asymmetric dimethylarginine is closely associated with the development and progression of nephropathy in patients with type 2 diabetes. *Nephrol Dial Transplant*. 2009; 24: 1884-1888.
 16. Jorsal A, Tarnow L, Frystyk J, Lajer M, Flyvbjerg A. et al: Serum adiponectin predicts all-cause mortality and end stage renal disease in patients with type 1 diabetes and diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2008; 74: 649-654.
 17. Saraheimo M, Forsblom C, Thorn L, Waden J, Rosengard-Barlund M. et al: Serum adiponectin and progression of diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2008; 31: 1165-1169.
 18. Waanders F, van Timmeren MM, Stegeman CA, Bakker SJ, van Goor H: Kidney injury molecule-1 in renal disease. *J Pathol*. 2010; 220: 7-16.
 19. Nielsen SE, Andersen S, Zdunek D, Hess G, Parving HH, Rossing P: Tubular markers do not predict the decline in glomerular filtration rate in type 1 diabetic patients with overt nephropathy. *Kidney Int*. 2011; 79: 1113-1118.
 20. Nielsen SE, Reinhard H, Zdunek D, Hess G, Gutierrez OM. et al: Tubular markers are associated with decline in kidney function in proteinuric type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract*. 2012; 97: 71-76.
 21. Sabbisetti VS, Waikar SS, Antoine DJ, Smiles A, Wang C. et al: Blood kidney injury molecule-1 is a biomarker of acute and chronic kidney injury and predicts progression to ESRD in type 1 diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 2014; 25: 2177-2186.
 22. Niewczas MA, Gohda T, Skupien J, Smiles AM, Walker WH. et al: Circulating TNF receptors 1 and 2 predict ESRD in type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 2012; 23: 507-515.
 23. Wu J, Ding Y, Zhu C, Shao X, Xie X. et al: Urinary TNF-alpha and NGAL are correlated with the progression of nephropathy in patients with type 2 diabetes. *Exp Ther Med*. 2013; 6: 1482-1488.
 24. Lopes-Virella MF, Baker NL, Hunt KJ, Cleary PA, Klein R, Virella G: Baseline markers of inflammation are associated with progression to macroalbuminuria in type 1 diabetic subjects. *Diabetes Care* 2013; 36: 2317-2323.
 25. Pavkov ME, Nelson RG, Knowler WC, Cheng Y, Krolewski AS, Niewczas MA: Elevation of circulating TNF receptors 1 and 2 increases the risk of end-stage renal disease in American Indians with type 2 diabetes. *Kidney Int*. 2014; October 1st.
 26. Forsblom C, Moran J, Harjutsalo V, Loughman T, Waden J. et al: Added value of soluble tumor necrosis factor-alpha receptor 1 as a biomarker of ESRD risk in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2014; 37: 2334-2342.
 27. Skupien J, Warram JH, Niewczas MA, Gohda T, Malecki M. et al: Synergism between circulating tumor necrosis factor receptor 2 and HbA(1c) in determining renal decline during 5-18 years of follow-up in patients with type 1 diabetes and proteinuria. *Diabetes Care* 2014; 37: 2601-2608.
 28. Kosugi T, Nakayama T, Heinig M, Zhang L, Yuzawa Y. et al: Effect of lowering uric acid on renal disease in the type 2 diabetic db/db mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009; 297: F481-488.
 29. Kim SM, Choi YW, Seok HY, Jeong KH, Lee SH. et al: Reducing serum uric acid attenuates TGF-beta1-induced profibrogenic progression in type 2 diabetic nephropathy. *Nephron Exp Nephrol*. 2012; 121: e109-121.
 30. Ling Y, Li XM, Gao X: Cross-sectional association of serum C-reactive protein and uric acid with albuminuria in Chinese type 2 diabetic patients. *Chin Med J. (Engl)*. 2013; 126: 4023-4029.
 31. Chuengsamarn S, Rattanamongkolgul S, Jirawatnotai S: Association between serum uric acid level and microalbuminuria to chronic vascular complications in Thai patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Complications* 2014; 28: 124-129.
 32. Hovind P, Rossing P, Tarnow L, Johnson RJ, Parving HH: Serum uric acid as a predictor for development of diabetic nephropathy in type 1 diabetes: an inception cohort study. *Diabetes* 2009; 58: 1668-1671.
 33. Jalal DI, Rivard CJ, Johnson RJ, Maahs DM, McFann K. et al: Serum uric acid levels predict the development of albuminuria over 6 years in patients with type 1 diabetes: findings from the Coronary Artery Calcification in Type 1 Diabetes study. *Nephrol Dial Transplant*. 2010; 25: 1865-1869.
 34. Maahs DM, Caramori L, Cherney DZ, Galecki AT, Gao C. et al: Uric acid lowering to prevent kidney function loss in diabetes: the preventing early renal function loss (PERL) allopurinol study. *Curr Diab Rep*. 2013; 13: 550-559.
 35. Papale M, Di Paolo S, Magistrini R, Lamacchia O, Di Palma AM. et al: Urine proteome analysis may allow noninvasive differential diagnosis of diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 2010; 33: 2409-2415.
 36. Rossing K, Mischak H, Dakna M, Zurbig P, Novak J. et al: Urinary proteomics in diabetes and CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2008; 19: 1283-1290.
 37. Zurbig P, Jerums G, Hovind P, Macisaac RJ, Mischak H. et al: Urinary proteomics for early diagnosis in diabetic nephropathy. *Diabetes* 2012; 61: 3304-3313.
 38. Roscioni SS, de Zeeuw D, Hellemons ME, Mischak H, Zurbig P. et al: A urinary peptide biomarker set predicts worsening of albuminuria in type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2013; 56: 259-267.
 39. Niewczas MA, Sirich TL, Mathew AV, Skupien J, Mohney RP. et al: Uremic solutes and risk of end-stage renal disease in type 2 diabetes: metabolomic study. *Kidney Int*. 2014; 85: 1214-1224.
 40. Dey N, Das F, Mariappan MM, Mandal CC, Ghosh-Choudhury N. et al: MicroRNA-21 orchestrates high glucose-induced signals to TOR complex 1, resulting in renal cell pathology in diabetes. *J Biol Chem*. 2011; 286: 25586-25603.
 41. Lin X, You Y, Wang J, Qin Y, Huang P, Yang F: MicroRNA-155 Deficiency Promotes Nephritis Acetylation and Attenuates Renal Damage in Hyperglycemia-Induced Nephropathy. *Inflammation* 2014; June 27th.
 42. Fu Y, Zhang Y, Wang Z, Wang L, Wei X. et al: Regulation of NADPH oxidase activity is associated with miRNA-25-mediated NOX4 expression in experimental diabetic nephropathy. *Am J Nephrol*. 2010; 32: 581-589.
 43. Huang Y, Liu Y, Li L, Su B, Yang L. et al: Involvement of inflammation-related miR-155 and miR-146a in diabetic nephropathy: implications for glomerular endothelial injury. *BMC Nephrol*. 2014; 15: 142.
 44. Kato M, Arce L, Wang M, Putta S, Lanting L, Natarajan R: A microRNA circuit mediates transforming growth factor-beta1 autoregulation in renal glomerular mesangial cells. *Kidney Int*. 2011; 80: 358-368.
 45. Putta S, Lanting L, Sun G, Lawson G, Kato M, Natarajan R: Inhibiting microRNA-192 ameliorates renal fibrosis in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2012; 23: 458-469.