



La diagnostica della nefropatia diabetica

A.M. Signorini, C. Fondelli, G. Gragnoli

Cattedra di Medicina Interna, O.P.D. - U.O. Diabetologia, Università degli Studi - Siena

Nei paesi occidentali il 25-30% dei nuovi ingressi in programmi di sostituzione della funzione renale, ogni anno, è rappresentato da soggetti affetti da nefropatia diabetica, che è divenuta la più importante singola causa di uremia (1). Nonostante che l'insufficienza renale terminale (ESRD) si sviluppi nel 20-30% dei casi di diabete tipo 1 (IDDM) (2, 3) e che nel diabete tipo 2 (NIDDM) colpisca invece solo il 10% (4), la maggioranza dei diabetici attualmente in dialisi è di tipo 2, in quanto il NIDDM interessa un percentuale

molto più elevata della popolazione. Il costo della terapia sostitutiva della funzione renale è molto alto nei diabetici, che frequentemente presentano patologie cardiovascolari, neurologiche, complicanze retiniche e infettive (1). La nefropatia diabetica è una malattia multifattoriale che può impiegare anche molti anni per diventare clinicamente manifesta. Lo studio di marker, che durante la sua storia naturale segnano i vari momenti dello sviluppo, è utile per poter intervenire precocemente e ritardare la sua progressione verso l'uremia.

Storia naturale della nefropatia diabetica

All'esordio del diabete tipo 1 si ritrovano frequentemente (30% dei casi) alterazioni della morfologia e della funzione renale come l'ipertrofia, l'aumento del flusso plasmatico renale e l'iperfiltrazione glomerulare (5), contrariamente a quanto avviene nel diabete tipo 2 (6). In una fase precoce queste modificazioni, sostenute da una serie di fenomeni endocrino-metabolici riconducibili all'iper-

TAB. I - STADI DELLA NEFROPATIA NEL DIABETE TIPO 1

	Stadio I dell'iperfiltrazione	Stadio II silente	Stadio III della nefropatia incipiente	Stadio IV della nefropatia clinica	Stadio V dell'uremia
Epoca di insorgenza	Alla diagnosi	2-3 anni	5-15 anni	10-30 anni	20-40 anni
Alterazioni funzionali	↑ GFR ↑ PA intra-glomerulare	= o ↑ GFR = o ↑ PA intragl. ↑ Albuminuria per stress o per cattivo controllo	= o ↓ GFR ↑ Albuminuria (20-200 µg/min)	↓ GFR ↑ Albuminuria > 200 µg/min	↓ GFR (10 ml/min)
Alterazioni strutturali	↑ Vol. renale ↑ Vol. glomer. ↑ Superficie filtr. glomerulare	↑ Spessore MB ↑ Vol. mesangiale	Inizio della glomerulosclerosi	Glomerulosclerosi diffusa	Glomerulosclerosi globale

glicemia, possono essere reversibili, in rapporto al ripristino del buon compenso del diabete, ma in alcuni pazienti possono persistere per anni acquistando un significato prognostico sfavorevole per lo sviluppo della nefropatia clinica (5) (Stadio I) (Tab. I).

Nell'IDDM a questa fase segue un periodo di anni in cui di solito, pur in presenza di un iniziale ispessimento della membrana basale glomerulare e di espansione mesangiale, si osserva un'escrezione urinaria d'albumina nei limiti della norma, tranne in occasione di stress fisico o di cattivo controllo glicemico, durante i quali può comparire un transitorio aumento dell'albuminuria (7) (Stadio II) (Tab. I).

Dopo 5 o più anni di malattia, il segno della nefropatia è rappresentato da una persistente escrezione urinaria d'albumina compresa fra 20 e 200 µg/min (Stadio III) (Tab. I). Questo fenomeno è detto microalbuminuria ed è un marker della nefropatia incipiente. La genesi della microalbuminuria va ricercata nella fisiopatologia del passaggio transglomerulare di proteine. La parete dei capillari glomerulari è un filtro perforato da pori ricoperti di cariche negative, che permette il libero passaggio dell'acqua e delle piccole molecole, mentre riduce o impedisce il passaggio delle macromolecole. Queste vengono filtrate o meno in rapporto alle loro dimensioni, alla loro carica elettrica e alla pressione transglomerulare. Le cariche elettriche negative dei proteoglicani di membrana, esposte sulla superficie di filtrazione, respingono le proteine cariche negativamente, come l'albumina (Fig. 1). L'indice di selettività di membrana, che è dato dal rapporto tra clearance delle IgG (molecole piuttosto voluminose, ma neutre dal punto di vista elettrico) e dell'albumina (molecola relativamente piccola, ma carica negativamente), subisce delle alterazioni caratteristiche nel corso delle varie fasi della nefropatia. In questo stadio inizialmente si mantiene normale, avendosi un'aumentata escrezione sia di IgG che di albumina, in rapporto alle alterazioni emodinamiche renali dovute all'iperglicemia, che culminano in un incremento della pressione idrostatica glomerulare. Successivamente, quando i valori dell'escrezione urinaria d'albumina superano i 30 µg/min, l'indice di selettività comincia a ridursi per un aumento

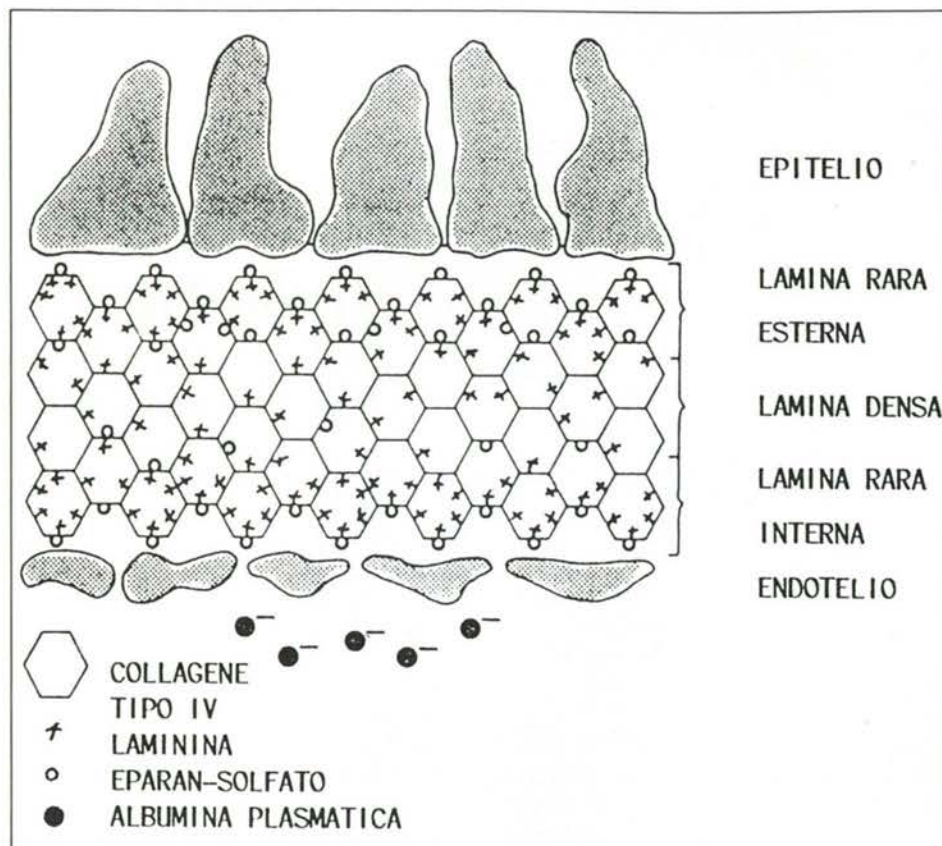


Fig. 1 - Struttura della membrana basale glomerulare. Da: Deckert T et al. *Diabetes Care* 15, 1181-1191, 1992.

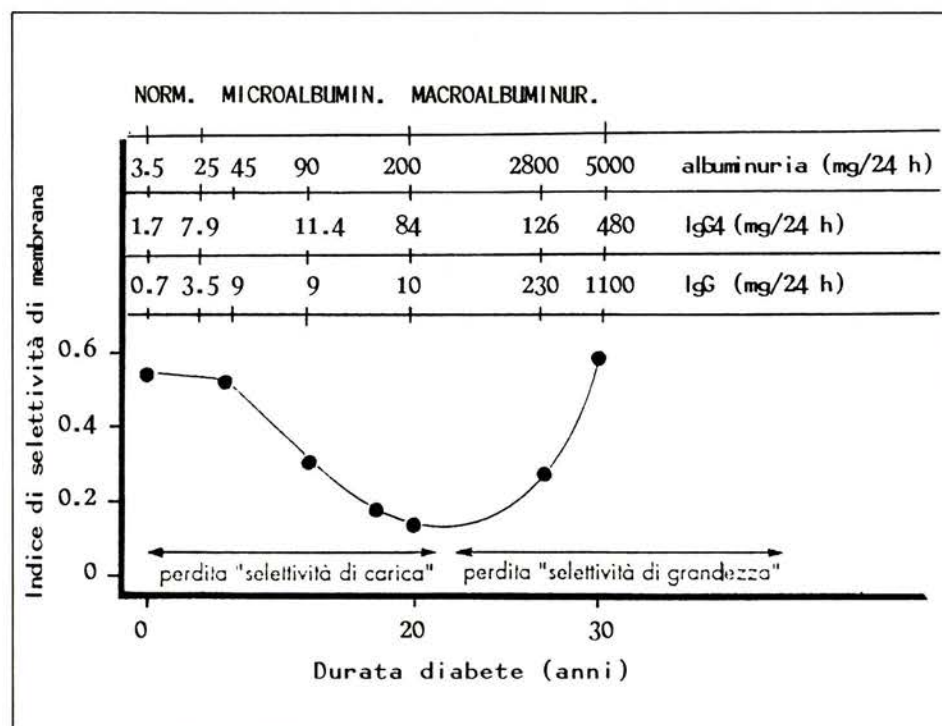


Fig. 2 - Andamento dell'indice di selettività di membrana durante le fasi della nefropatia diabetica. Da: Viberti GC et al. *Diabetes* 33, 686-690, 1984, modificata.

della permeabilità di membrana all'albumina (perdita di selettività di carica) (Fig. 2). Infatti l'iperglicemia è causa di un ridotto turnover del collagene tipo IV e di una minore produzione locale di proteoglicani, e quindi di una riduzione delle cariche anioniche della membrana basale glomerulare, che lascia passare le molecole elettronegative in misura superiore alla norma (8). A questo proposito, è stata studiata anche la clearance dell'unica subfrazione anionica delle IgG, la IgG4 ed è stato dimostrato (9) che, in questa fase della nefropatia diabetica, il rapporto IgG4/IgG urinarie è aumentato, a testimonianza della perdita di selettività di carica della membrana basale glomerulare, indipendentemente dal volume delle molecole. La funzione tubulare sembra conservata, come dimostra dalla normale concentrazione urinaria di molecole (α 1-microglobulina, β 2-microglobulina, "retinol-binding-protein" ed enzimi) che vengono utilizzate come test. Il riassorbimento tubulare dell'albumina, nei microalbuminurici, è facilmente saturato e l'escrezione delle proteine è proporzionale al carico filtrato (8). In una fase più avanzata l'iperpermeabilità all'albumina sarebbe legata anche ad aumento delle dimensioni e della percentuale di pori a largo raggio della membrana basale, nonché al sovrappiungere di un danno tubulare prossimale che determina l'instaurarsi di una marcata microalbuminuria. Il filtrato glomerulare (GFR) è inizialmente aumentato, quindi normale o solo lievemente diminuito. La pressione arteriosa è spesso superiore a quella dei coetanei non diabetici, ma in genere non raggiunge i criteri diagnostici per l'ipertensione (microipertensione) (10). Anche i genitori dei diabetici microalbuminurici hanno mostrato valori pressori da catalogare come "microipertensione". Inoltre, nei genitori, così come negli ipertesi e nei loro familiari, è stato rilevato un aumento dell'attività del sistema di controtrasporto Na-Li eritrocitario, che è indice, *in vitro*, dello scambio cellulare Na-H (11). Alterazioni del quadro lipidico, quali aumento del colesterolo-LDL, dei trigliceridi, dell'apolipoproteina B, dell'Lp(a), riduzione del colesterolo-HDL, accompagnano la microalbuminuria. In questo periodo, che può essere considerato il più critico nella storia della nefropatia del diabete tipo I,

l'ottimizzazione del controllo glicometabolico, la correzione della microipertensione con ACE-inibitori e dell'iperfiltrazione glomerulare, se esistente, con la riduzione del carico proteico alimentare e l'uso degli ACE-inibitori, rappresentano momenti terapeutici cruciali che consentono spesso di far regredire le alterazioni descritte o quanto meno di rallentare la progressione verso le fasi più avanzate della nefropatia (12, 13). Recenti studi di Bangstad (14) hanno dimostrato come, a questo stadio, siano già presenti alterazioni istologiche renali, quali ispessimento della membrana basale ed espansione della matrice mesangiale. Molto interessante è l'elevata correlazione che l'Autore ha trovato fra queste modificazioni anatomiche e il grado di controllo glicemico del diabete, valutato mediante l'HbA1c. Nel diabete tipo 2 lo stadio della nefropatia incipiente non è stato ben definito. Nei pazienti affetti da questa forma di diabete la microalbuminuria non precede necessariamente la nefropatia clinica e la sua evoluzione verso la macroalbuminuria è più lenta di quella del diabete tipo 1 a causa di differenti lesioni glomerulari (6).

La comparsa della proteinuria clinica persistente (escrezione urinaria d'albumina > 200 μ g/min), dopo 15-17 anni dall'esordio del diabete tipo 1, segna l'inizio della nefropatia clinica (Stadio IV) (Tab. I), il punto di non ritorno e il destino del paziente verso l'insufficienza renale terminale (Stadio V) (Tab. I). Le lesioni strutturali glomerulari, simili in entrambe le forme di diabete, sono contraddistinte dall'obliterazione di un numero progressivamente maggiore di glomeruli conseguente all'ispessimento della membrana basale e all'espansione del mesangio. Come si passi, dalla precedente, a questa fase della malattia, non è ancora noto. Di certo il "traffico" transglomerulare di proteine, continuo e prolungato nel tempo e l'aumento di dimensione e di numero dei grossi pori della membrana basale glomerulare, non sono estranei al meccanismo patogenetico. Comunque sia, l'indice di selettività di membrana tende ad aumentare, riportandosi verso la norma a causa del passaggio di considerevoli quantità di IgG oltre che di albumina (perdita di selettività di grandezza) (9) (Fig. 2). A questo stadio è presente l'ipertensione arteriosa e si manifestano con più fre-

quenza le più gravi complicanze cardiovascolari. È costante inoltre la retinopatia diabetica; anzi la sua assenza deve far sospettare una causa diversa di proteinuria, considerando che il 10% dei pazienti con IDDM e il 30% con NIDDM sviluppa proteinuria per altre patologie renali. Il filtrato glomerulare inizia il suo declino (0.8 - 2.4 ml/min/mese) e, se non si interviene, dopo un numero variabile di anni, in media 7, si giunge all'uremia (15). Le possibilità di un intervento terapeutico, in questa fase della nefropatia diabetica, sono state a lungo discusse. Nei primi anni '80 numerosi studi avevano dimostrato l'impossibilità di ridurre il grado di proteinuria clinica e la velocità di declino del filtrato glomerulare, con il miglioramento del compenso glicemico (16, 17). Successivamente invece altri Autori (18) hanno suggerito che l'uso di diete ipoproteiche a basso contenuto di fosforo, la normalizzazione della pressione arteriosa e degli indici del grado di controllo glicometabolico, possano rallentare il decadimento della funzione renale e quindi rimandare, anche di 30 anni, l'ingresso in dialisi o in programmi di trapianto, dei pazienti diabetici. Tuttavia, nello sforzo di ottenere un compenso glicemico migliore, non si può dimenticare che in questa fase della malattia renale diabetica la retinopatia, la neuropatia e la malattia coronarica, comunemente presenti, rendono particolarmente pericolosi gli eventi ipoglicemici. Una volta instauratasi l'insufficienza renale terminale (Stadio V), il diabetico necessita del trattamento sostitutivo più precocemente rispetto all'uremico non diabetico, per la peggiore tolleranza dell'intossicazione uremica.

Diagnostica

Escrezione urinaria d'albumina

La misurazione dell'escrezione urinaria d'albumina, in assenza di proteinuria rilevabile con i comuni test di laboratorio (Albustix), fu introdotta negli anni '60-'70 grazie a tecniche di radioimmunologia e di immunochimica (19). In un'indagine epidemiologica per il diabete, condotta nel 1962 nella città di Bedford, fu osservato che i diabetici, già

al momento della diagnosi, avevano un'aumentata escrezione urinaria d'albumina rispetto ai soggetti normoglicemici (20). Tale aumento era nettamente al di sotto della soglia di sensibilità dei comuni test clinici per la proteinuria e poteva essere messo in evidenza con metodi d'immunodiffusione radiale. Questo aumento subclinico è stato denominato microalbuminuria (20).

Il significato clinico della microalbuminuria persistente, come indicatore di nefropatia incipiente e predittivo della nefropatia clinica, è stato accertato solo all'inizio degli anni '80. Questo concetto è oggi ampiamente riconosciuto sia dal punto di vista pratico che teorico, anche se alcuni gruppi di nefrologi nord-americani hanno a lungo tardato a considerare valido il significato attribuito alla microalbuminuria ed hanno sostenuto la necessità di riferirsi a metodiche tradizionali come la biopsia renale congiunta alla clearance della creatinina, nella diagnostica delle complicanze renali del diabete.

Una microalbuminuria transitoria e reversibile può essere presente al momento della diagnosi del diabete tipo 1 o durante i primi anni di malattia. Invece la microalbuminuria persistente si sviluppa dopo almeno 5 anni dalla diagnosi e, oltre certi limiti, è considerata un marker di progressione verso la nefropatia clinica e quindi verso l'ESRD, nell'80% dei casi (21). A questo riguardo, negli ultimi 10-15 anni sono stati condotti numerosi studi per stabilire i valori dell'escrezione urinaria d'albumina che fossero da ritenere predittivi. Le ricerche longitudinali del Guy's Hospital (Londra) (22) hanno fissato in 30 µg/min questo valore; invece lo Steno Memorial Hospital ha indicato 70 µg/min (23) e il gruppo della Aarhus University 15 µg/min (21). Per definire i limiti della microalbuminuria si possono attuare due tipi di approccio: **1)** considerare i livelli massimi dei soggetti normali, **2)** considerare i livelli predittivi della nefropatia avanzata. Nella maggior parte degli ultimi studi questi valori quasi coincidono. Infatti in un soggetto normale non si evidenzia mai un'escrezione urinaria d'albumina superiore ai 15 µg/min e i livelli soglia vanno da 15 a 30. Sulla base di queste considerazioni il Consensus Statement del 1989 (24) ha fissato i limiti della microalbuminuria fra 20 e 200 µg/min

TAB. II - ESCREZIONE URINARIA DI ALBUMINA

	Albumina (µg/min)	Albumina/Creatinina (mg/mg)
Normale	≤ 20	≤ 0.02
Microalbuminuria	> 20 ≤ 200	> 0.02 ≤ 0.2
Macroalbuminuria	> 200	> 0.2

TAB. III - SINDROME PLURIMETABOLICA O SINDROME X

I N S U L I N O R E S I S T E N Z A	<p>IPERINSULINISMO</p> <p>RIDOTTA TOLLERANZA AI CARBOIDRATI</p> <p>IPERTRIGLICERIDEMIA</p> <p>RIDUZIONE COLESTEROLO - HDL</p> <p>IPERURICEMIA</p> <p>OBESITÀ</p> <p>IPERTENSIONE ARTERIOSA</p> <p>MICROALBUMINURIA</p>	➔	M A L T T I A C O R O N A R I C A A T S
--	--	---	--

(Tab. II). Ha inoltre stabilito che un'escrezione urinaria d'albumina superiore alla norma può assumere il significato clinico di "nefropatia incipiente" (ossia nefropatia al III stadio) se sono soddisfatti i seguenti criteri: **1)** rilevamento di albuminuria patologica in almeno tre occasioni in un periodo di sei mesi; **2)** urine sterili; **3)** assenza di chetosi; **4)** diabete tipo 1 datante da almeno 3 anni; **5)** esclusione di altre patologie renali o del tratto urinario.

Nel diabete tipo 2, invece, la microalbuminuria persistente è frequentemente presente anche al momento della diagnosi, probabilmente perché può essere preceduta da un lungo retroterra iperglicemico, durante il quale si sviluppano le alterazioni della fisiologia renale. D'al-

tra parte la microalbuminuria, in questi pazienti, è predittiva della nefropatia clinica, solo nel 20% dei casi, mentre è strettamente correlata alla mortalità per malattie cardiovascolari (6). Oggi è noto infatti che la microalbuminuria e il diabete tipo 2 spesso fanno parte del complesso quadro della sindrome plurimetabolica, insieme all'iperinsulinismo, obesità viscerale, ipertensione arteriosa, ipertrigliceridemia, iperuricemia (Tab. III). Queste caratteristiche, che sembrano avere come base comune l'insulino-resistenza, precedono il manifestarsi delle patologie cardiovascolari, concorrendo, con modalità non completamente conosciute, alla loro realizzazione. Inoltre, mentre nel diabete tipo 1 è stata osservata un'importante correlazione

fra la gravità delle lesioni istologiche e il grado di albuminuria, nel NIDDM le alterazioni anatomiche non accompagnano, se non nel 3% dei casi (6), in cui si sviluppa l'ESRD, il progredire della proteinuria. In conclusione si può affermare che il decorso della nefropatia nel diabete tipo 2 sembra più lento e meno devastante che nell'IDDM.

La prevalenza della microalbuminuria nella popolazione diabetica di tipo 1 è ancora abbastanza varia da casistica a casistica. Il Nord Europa, nel decennio scorso, ha espresso le percentuali più elevate: 22% (25). In Italia sono state riportate prevalenze del 23% nella Toscana Nord-Occidentale (26), 13% nell'indagine multicentrica dell'Italian Microalbuminuria Study Group (27) e 12.58% nella nostra recente indagine epidemiologica svolta su 3160 diabetici della provincia di Siena (dati in corso di pubblicazione).

Valutando l'epidemiologia della nefropatia diabetica sulla base del riscontro della macroalbuminuria persistente (escrezione urinaria d'albumina > 200 µg/min), risulta che l'incidenza, nel diabete tipo 1, è bassa dopo pochi anni di malattia, successivamente cresce per raggiungere un massimo dopo 16-20 anni (20-40%, a seconda delle casistiche), ma poi si riduce progressivamente fino a livelli di poco superiori a quelli iniziali (28) (Fig. 3). Tale pattern epidemiologico e in particolare l'assenza di una relazione lineare fra durata del diabete e incidenza della nefropatia, dimostra che anche fattori genetici concorrono a determinare l'insorgenza della compromissione renale. Per questo è stata proposta la partecipazione di una "predisposizione genetica" ed è stato affermato che, se un diabetico dopo 25-30 anni di malattia non ha ancora la nefropatia allo stadio IV, è un soggetto "geneticamente protetto" con buona probabilità di rimanere esente dalle complicanze renali diabetiche. Fattori determinanti la suscettibilità allo sviluppo delle fasi avanzate della nefropatia diabetica, sono stati a lungo sospettati. È stato, per esempio, suggerito che l'aumento subclinico dei valori pressori e l'incremento dell'attività del sistema di controtrasporto Na-H, ritrovati sia nei diabetici microproteinurici che nei loro genitori, possa rappresentare un marker di propensione all'ipertensione e di suscetti-

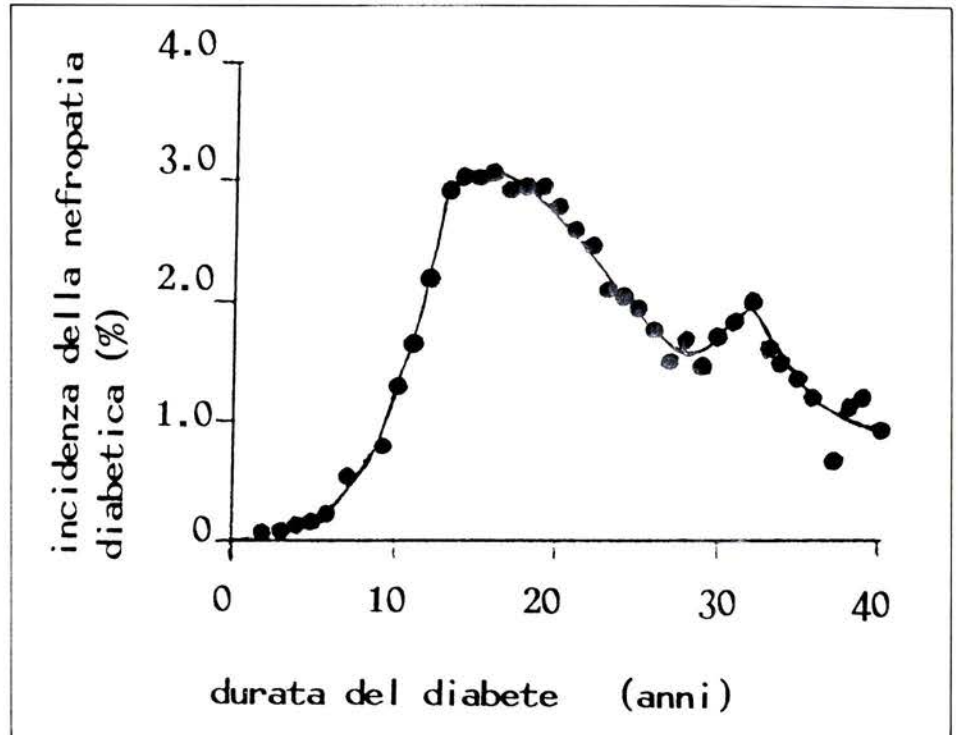


Fig. 3 - Incidenza della nefropatia diabetica nel diabete tipo 1. Da: Andersen AR et al. *Diabetologia* 25, 496-501, 1983, modificata.

lità alle complicanze renali del diabete. D'altra parte questo fattore genetico non è risultato presente in tutti i familiari dei diabetici nefropatici, per cui non può essere considerato un fattore decisivo (11). Un'altra teoria si basa sull'osservazione che esiste un polimorfismo genetico, per la vulnerabilità all'iperglicemia, di sistemi enzimatici implicati nel metabolismo di componenti anioniche della matrice extracellulare. Queste sostanze, come l'eparan solfato dei proteoglicani, svolgono la già spiegata importante funzione nel ridurre il passaggio delle proteine attraverso le membrane basali (29).

Nel diabete tipo 2 valutare la prevalenza

della macroalbuminuria in rapporto alla durata della malattia, è difficile, perché la dianogisi, come abbiamo accennato, molto spesso non coincide con il reale esordio dell'iperglicemia. Infatti, dato l'andamento subdolo dal punto di vista sintomatologico del NIDDM, questo può essere riconosciuto quando son già presenti le complicanze. Così da alcuni studi risulta che l'incidenza cumulativa della macroalbuminuria persistente, dopo 20 anni dalla diagnosi, è più elevata che nel diabete tipo 1. In maniera analoga, la mortalità è maggiore nei pazienti con macroalbuminuria rispetto ai non albuminurici, ma in questo caso la causa non è tanto l'ESRD (3% dei casi),

TAB. IV - METODI DI DOSAGGIO DELL'ALBUMINA URINARIA

* Metodi non competitivi

- Immunodiffusione radiale
- Test al lattice
- Immunoturbidimetria
- Immunonefeliometria
- Test enzimatico su striscia

* Metodi per competizione proteica

- Dosaggio radioimmunologico

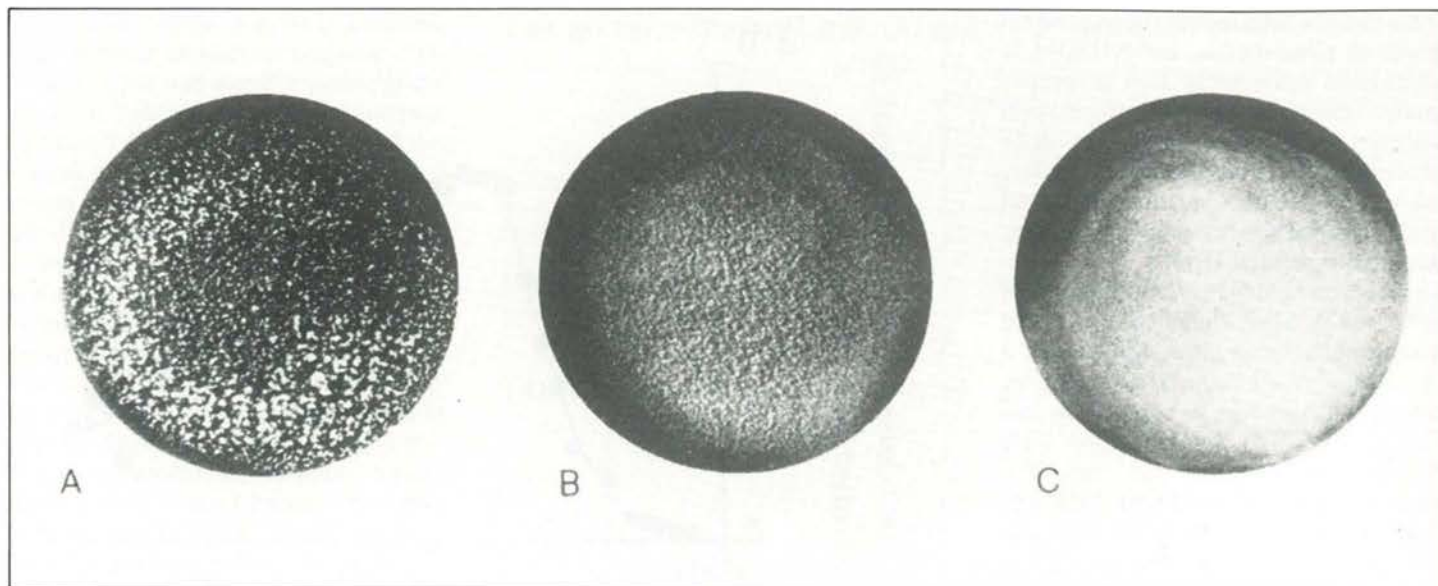


Fig. 4 - Test al lattice per il dosaggio semiquantitativo dell'albumina urinaria. A = completa agglutinazione; B = agglutinazione intermedia; C = mancata agglutinazione.

quanto piuttosto le patologie cardiovascolari (45%) (6).

Metodi di determinazione dell'albumina nelle urine (Tab. IV)

In rapporto all'ampio interesse suscitato dal significato clinico dell'albuminuria, il suo dosaggio ha conosciuto, negli ultimi anni, la rapida messa a punto di varie metodiche, tutte basate sulla reazione immunologica fra l'albumina presente nel campione e un anticorpo anti-albumina umana.

1) *Immunodiffusione radiale*. Questa è, in ordine cronologico, la prima tecnica utilizzata per la misurazione della concentrazione urinaria d'albumina (19). In una piastra contenente un gel impregnato di antisiero anti-albumina, venivano seminate aliquote dei campioni urinari in pozzetti periferici. Dopo 48 ore era possibile la lettura che consisteva nel misurare il raggio dell'alone di reazione a g/ab che si era formato intorno al pozzetto e confrontare questo valore con la scala delle concentrazioni.

2) *Dosaggio radioimmunologico*. È noto che la metodica più sensibile e precisa in senso assoluto, per determinare piccole quantità di proteine nei liquidi biologici, è il saggio radioimmunologico. D'altra

parte la tecnica offre svantaggi, quali l'impossibilità di ottenere i risultati in tempi reali e la necessità di dosare non meno di 40 campioni contemporaneamente, tali da non permetterne un'utilizzazione routinaria. I due kit disponibili in Italia sono: H-Albumin kit (Sclavo Diagnostics and Instruments Division, Cinisello Balsamo, Milano, Italia) e Albumin RIA 100 (Pharmacia AB, Uppsala, Svezia). Con questo metodo è possibile dosare l'albumina urinaria facendo reagire il campione con l'antisiero e l'albumina marcata. Trascorse una o due ore di reazione, viene aggiunto un agente precipitante che, dopo centrifugazione, permette il fissaggio degli immunocomplessi alla provetta e la lettura della radioattività emessa, che sarà tanto più elevata quanto minore è il contenuto di albumina nel campione. Ricercando, nella curva di taratura, la corrispondenza fra radioattività e concentrazione, è possibile ottenere il risultato (30).

3) *Test rapido al lattice*. Nel 1987 per primi abbiamo messo a punto un test semiquantitativo, che permette di separare i soggetti con albuminuria normale o patologica (31). A questo scopo una goccia di sospensione di particelle di lattice-poliestere legate ad albumina umana viene aggiunta ad una piccola quantità di soluzione di immunoglobuline anti-albumina, precedentemente incubate

con il campione, in un vetrino nero da reazione. Dopo aver ruotato gentilmente per 1 minuto il vetrino, si evidenzia l'agglutinazione se la concentrazione di albumina nel campione è insufficiente a saturare gli anticorpi presenti (<25 mg/L), non si osserva agglutinazione se la concentrazione d'albumina è sufficiente a neutralizzare la carica anticorpale (>40 mg/L). Per livelli intermedi si possono osservare gradi intermedi di agglutinazione (Fig. 4). La scelta di un cutoff di 40 mg/L, corrisponde approssimativamente ad un'escrezione urinaria d'albumina di 30 mg/die. La sensibilità del test, cioè la percentuale di campioni con concentrazione uguale o superiore a 40 mg/L correttamente identificati, è risultata 97.2%; la specificità, ossia la percentuale di campioni con concentrazione inferiore a 40 mg/L correttamente identificati, 99.6%. Altri test al lattice, basati sullo stesso principio chimico, sono stati successivamente commercializzati: Latest Microalbuminuria (Menarini Diagnostici, Firenze, Italia), Albufast 20.

4) *Test semiquantitativi con striscia reattiva*. Recentemente sono stati realizzati metodi immunoenzimatici su striscia per la determinazione dell'albumina (Fig. 5), con lettura colorimetrica da effettuare su una scala di valori 0, 10, 20, 50, 100 mg/L: Micral-Test (Boehringer

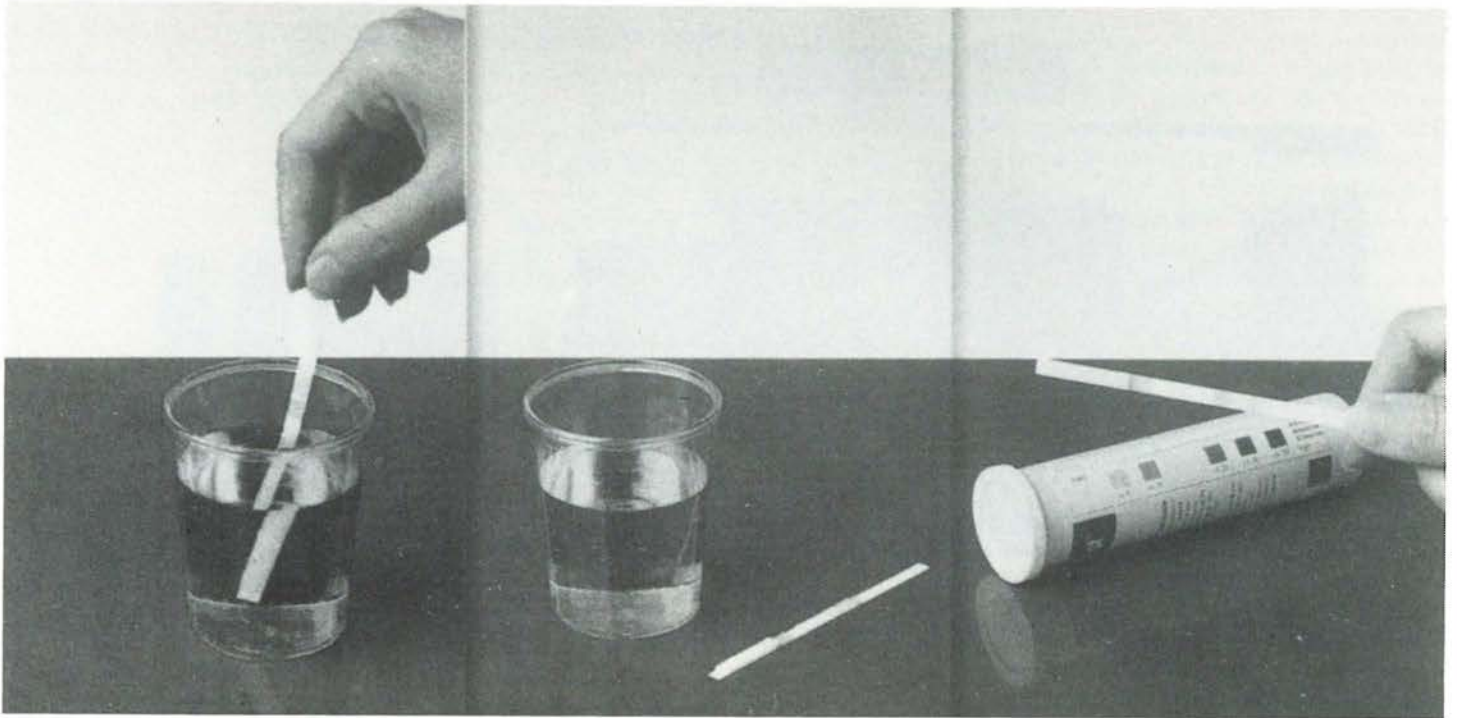


Fig. 5- Strisce reattive per il dosaggio semiquantitativo dell'albumina urinaria.

Mannheim, Mannheim, Germania), Micro-Bumintest (Miles Inc. Diagnostics Division, Elkhart, USA). Alcune ricerche (32) condotte per la validazione del test hanno dimostrato che il metodo possiede, nei confronti del RIA, una buona sensibilità e specificità, associate ad una semplicità e rapidità d'esecuzione. Il test è quindi proponibile per valutazioni di primo livello.

5) **Immunoturbidimetria.** La turbidimetria è una tecnica immunochimica per il dosaggio delle proteine plasmatiche e urinarie (Fig. 6). Misura fotometricamente la torbidità prodotta dalla formazione di complessi ag/ab fra l'albumina contenuta nel campione in esame e l'antisiero-reagente in eccesso. La reazione avviene in una cuvetta fornita di barretta mescolatrice che ruota durante tutta la fase di lettura del campione. La torbidità prodotta dalla reazione immunologica riduce l'intensità di un raggio di luce che attraversa la cuvetta. L'intero sistema è costituito da una sorgente luminosa, un filtro alla lunghezza d'onda di 340 nm, una fibra ottica a due canali di cui uno che indirizza la luce verso un sistema rivelatore di riferimento e l'altro che indirizza la luce alla cuvetta e da qui

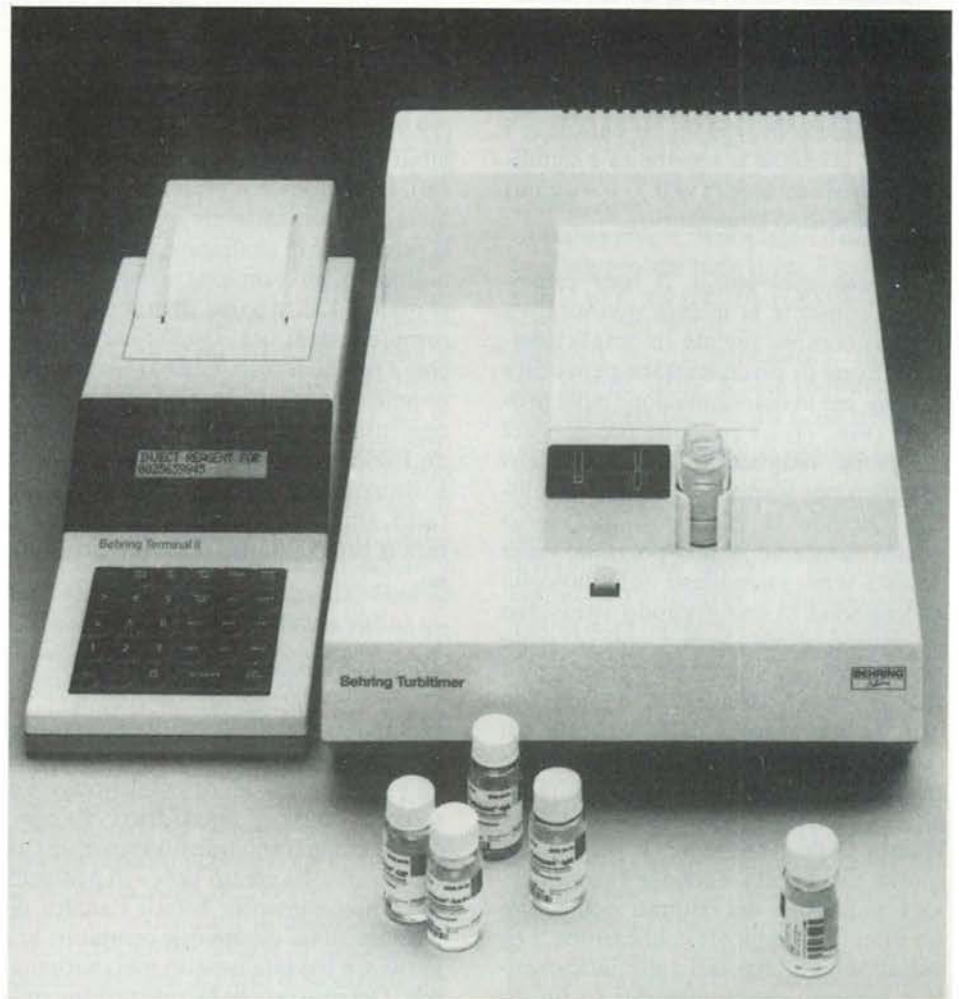


Fig. 6 - Immunoturbidimetro.

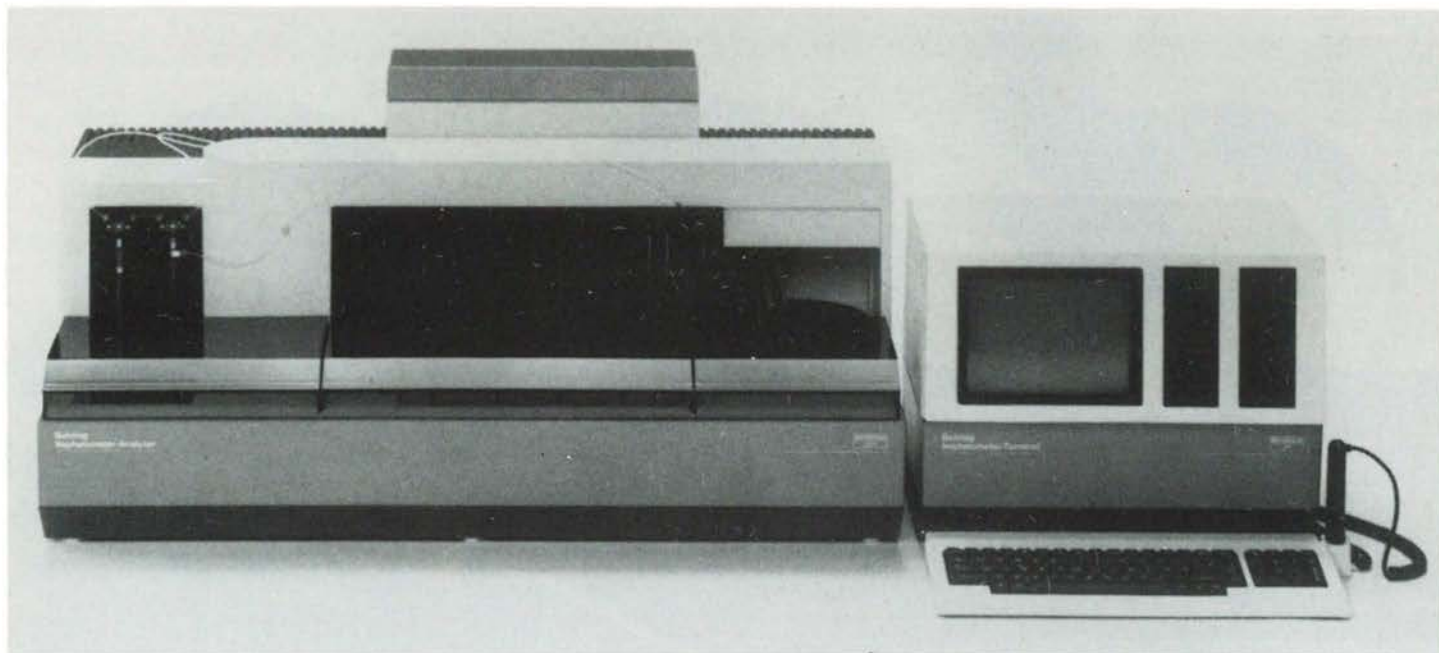


Fig. 7 - Immunonefelometro.

ad un sistema di rivelazione della misurazione. In 43 controlli e in 121 diabetici la correlazione con il RIA è risultata soddisfacente ($r = 0.95$, in entrambi i gruppi), anche se la sensibilità è significativamente minore (5 vs 0.3 - 0.4 $\mu\text{g/ml}$) (dati del nostro laboratorio).

6) *Immunonefelometria*. Il laser nefelometro consente la misura quantitativa rapida e completamente automatica della reazione di precipitazione provocata *in vitro*, per la determinazione delle proteine (Fig. 7). Le proteine presenti nel campione reagiscono con l'antisiero specifico per formare complessi insolubili. Quando la luce passa attraverso questa sospensione, una porzione viene deviata verso i complessi immunologici e focalizzata in un fotodiodo attraverso un sistema ottico a lenti. Come sorgente luminosa è usato un diodo infrarosso ad alta emittenza (lunghezza d'onda 840 nm). La luce deviata dalle particelle del campione è trasformata in un segnale elettrico e convertita quindi in unità digitali. La curva di taratura viene memorizzata dallo strumento e può essere quindi riutilizzata, anche se l'accuratezza e precisione dei risultati richiedono un'attenta e frequente calibrazione. I risultati sono interpolati automaticamente e possono essere mostrati su un display o essere stampati dal nefelometro.

La determinazione dell'albuminuria con questa metodica ha mostrato elevati livelli di precisione (99.2%), sensibilità (99.9%) e specificità (99.4%) sovrapponibili al RIA (dati del nostro laboratorio). La metodica si presenta particolarmente raccomandabile in quanto offre la possibilità di analizzare, in qualunque momento, un campione urinario in tempi reali e, d'altra parte, di processare 200 campioni ogni ora. Queste caratteristiche, a parità di costi, hanno reso l'immunonefelometria la tecnica utilizzata in ogni laboratorio per l'indagine di secondo livello sulla nefropatia diabetica, in sostituzione al RIA, che richiede, oltre tutto, ambienti particolari per ottemperare a provvedimenti di radioprotezione.

Metodi di campionamento urinario

L'ampia variabilità circadiana e giornaliera dell'escrezione urinaria d'albumina (33), dovuta all'ortostatismo, all'esercizio fisico e al carico idrico, che come è noto aumentano transitoriamente l'albuminuria, ha creato notevoli problemi di campionamento. Infatti l'analisi effettuata su un qualunque campione urinario si è rivelata quanto mai inattendibile. Del resto anche la misurazione sulla raccolta delle 24 ore, che non tutti i

pazienti, per motivi diversi, sono in grado di effettuare correttamente, ha presentato un'insufficiente riproducibilità. Il campionamento migliore, anche se non ottimale, sembra oggi la raccolta temporizzata "overnight", in cui il riposo notturno e il clinostatismo rappresentano una sorta di standardizzazione. In alternativa la misurazione nello spot del primo mattino (urine prodotte dal rene durante la notte), la cui concentrazione albuminica viene corretta per la creatinina, ha dimostrato di essere un valido metodo per monitorizzare l'escrezione urinaria d'albumina nei diabetici, in quanto riduce notevolmente la variabilità intraindividuale ed è citato anche nelle linee guida del Consensus Statement (24). Tuttavia una misurazione sufficientemente precisa dell'albuminuria richiede che vengano eseguite almeno tre determinazioni su campioni d'urine raccolte in condizioni standardizzate.

Diagnosi differenziale della microalbuminuria

L'attribuzione di una microalbuminuria alle complicanze renali del diabete richiede l'esclusione delle altre possibili cause di aumentata escrezione urinaria d'albumina.

Le cause di proteinuria sono molte e

TAB. V - CAUSE DI AUMENTATA ESCREZIONE URINARIA D'ALBUMINA

Origine glomerulare

- malattie glomerulari primitive
- malattie glomerulari secondarie
 - farmaci
 - allergeni
 - infezioni
 - neoplasie
 - malattie sistemiche
 - tossiemia gravidica
 - febbre
 - ortostatismo

Origine tubulare

- tossici
 - esogeni
 - endogeni
- tubulo-intestiziopatie
 - LES
 - pielonefriti
 - uropatie ostruttive
 - infezioni del tratto urinario

varie (Tab. V). Prima di tutto devono essere considerate quelle causate da glomerulopatie primitive o secondarie a farmaci, allergeni, malattie sistemiche, tossiemia gravidica, febbre e ortostatismo. Fra le forme di origine tubulare, particolare rilievo ha quella da tossici endogeni ed esogeni, da tubulointerstitiopatie, in corso di LES, pielonefriti, uropatie ostruttive e infezioni del tratto urinario. La diagnosi, volta ad escludere o confermare queste affezioni, è affidata ad indagini anamnestiche, bioumorali e strumentali secondo l'iter nefrologico abituale, che non è oggetto di questo articolo. Tuttavia dobbiamo ricordare che esistono molecole-marker la cui determinazione nelle urine è indicativa o meno di compromissione tubulare e viene utilizzata in un primo approccio alla diagnostica della nefropatia diabetica.

1) α 1- e β 2- *Microglobulina, retinol binding protein*

L' α 1-microglobulina è una piccola glicoproteina di peso molecolare compreso fra 26.000 e 33.000 dalton, con 167 aminoacidi, prodotta prevalentemente dal fegato. La β 2-microglobulina è una proteina a basso peso molecolare (11.800 dalton) composta da 100 ami-

noacidi con un ponte disolfuro. È stata identificata come la catena leggera degli antigeni della classe I del sistema maggiore di istocompatibilità, è unita con legami non covalenti alla catena pesante ed è essenziale per la specificità sierologica dei suddetti antigeni. Il metabolismo degli antigeni HLA determina il distacco della β 2-microglobulina e la comparsa della sua forma libera nei liquidi biologici. La retinol binding protein ha un peso molecolare di 26.000 dalton ed è la principale molecola di trasporto del precursore della vitamina A nel sangue. Queste sostanze, isolate e studiate nel 1968 da Berggard (34) nelle urine di pazienti affetti da disordini tubulari renali, hanno la proprietà di essere facilmente filtrate dal glomerulo e riassorbite dalle cellule tubulari prossimali dove vengono catabolizzate, per cui il malfunzionamento di queste strutture è accompagnato a diminuito riassorbimento e ad aumentata escrezione. La loro determinazione nelle urine è stata suggerita nella diagnostica differenziale delle proteinurie di origine glomerulare da quelle dovute o associate a danno tubulare. È stato dimostrato che elevati livelli di α 1-microglobulina, nel siero e nelle urine, in pazienti con funzio-

ne renale conservata, sono un ottimo indice di danno tubulare e quindi di proteinuria di origine tubulare. Invece, quando esista una considerevole riduzione del filtrato glomerulare (clearance della creatinina < 70 ml/min) si ritrovano comunque alte concentrazioni di α 1-microglobulina nel siero e nelle urine, probabilmente dovute in parte ad un sovraccarico del tubulo e in parte a lesioni sia glomerulari che tubulari. La β 2-microglobulina serica è un buon marker nefrologico, infatti i suoi livelli mostrano una significativa correlazione negativa con il filtrato glomerulare e gli aumenti sono considerati un indice d'insufficienza renale più precoce della creatinemia. Il dosaggio urinario della β 2-microglobulina invece presenta difficoltà in rapporto alla sua bassa concentrazione nelle urine, ai limiti della sensibilità dei metodi di misura. Inoltre la β 2-microglobulina è instabile in ambiente acido, per cui se ne perde una significativa quantità in urine a pH < 6 . Pertanto, mentre la determinazione urinaria dell' α 1-microglobulina ha la sua indicazione nella diagnostica delle proteinurie di origine tubulare, i livelli sierici della β 2-microglobulina trovano la loro migliore applicazione nella valutazione della funzionalità renale. Il dosaggio della retinol binding protein nelle urine è particolarmente utile per mettere in evidenza i più precoci segni di disfunzione tubulare nei diabetici microalbuminurici. Infatti è più stabile della β 2-microglobulina e non presenta incrementi acuti della sua escrezione urinaria in periodi di cattivo controllo glicemico.

Metodiche RIA ed ELISA venivano utilizzate fino a pochi anni orsono per la determinazione dell' α 1 e β 2-microglobuline. Attualmente l'immunonefelometria laser ha soppiantato ampiamente queste tecniche. Nel nostro laboratorio viene effettuato il dosaggio dell' α 1-microglobulina urinaria, affiancato a quello dell'albumina, per una prima diagnosi differenziale fra albuminurie glomerulari e tubulari. I valori "normali" sono stati ottenuti utilizzando la M + 1DS dei livelli da noi rilevati in 72 casi suddivisi per fasce d'età, risultati esenti da nefropatie all'esame clinico e alle indagini strumentali renali (ecografia e scintigrafia). Da questo studio è risultato che, per soggetti di età inferiore a 50 anni, il valore normale dell' α 1-microglobulina

è < 10 mg/L; per età compresa fra 50 e 59 anni, < 12 mg/L; per età compresa fra 60 e 69, < 14 mg/L; per età uguale o superiore a 70 anni, < 17 mg/L.

2) Enzimi tubulari

Alcuni enzimi lisosomiali, essenzialmente idrolasi, presentano elevate concentrazioni, sia plasmatiche che urinarie, nelle nefropatie tubulari; pertanto il loro dosaggio può essere utilizzato come indice di funzionalità tubulare (35). Fra i più studiati è stato sicuramente l'N-acetil-β-D-glucosaminidasi (NAG), un enzima di peso molecolare 130.000-140.000 dalton, localizzato sia nella frazione lisosomiale che microsomiale delle cellule del tubulo renale. Poiché non viene filtrato dal glomerulo, la sua quota urinaria deriva interamente dalle cellule tubulari. Il NAG partecipa alla degradazione enzimatica dei mucopolisaccaridi e delle glicoproteine e negli anni '80 è stato proposto anche come marker di microangiopatia e di controllo a breve e lungo termine del diabete. Altri enzimi, che derivano dall'orletto a spazzola del tubulo prossimale renale, sono utili nello studio della funzione tubulare: il principale è l'analino-amino-peptidasi (AAP), ma anche la β-galattosidasi (GAL), la gamma-glutamyl-transpeptidasi (gamma-GT), l'angiotensin-converting enzyme (ACE), la fosfatasi alcalina, la lattico-deidrogenasi (LDH), la maltasi. Oggi è possibile utilizzare l'immunofluorescenza per il dosaggio della maggior parte di questi enzimi.

Nella diagnostica differenziale della microalbuminuria persistente osservata in un diabetico, deve essere considerato anche il reperto urinario riscontrato nell'ipertensione arteriosa essenziale. L'evidenza di una stretta correlazione fra l'ipertensione e la microalbuminuria, sia nei diabetici che nella popolazione generale, ha stimolato un crescente interesse sul possibile meccanismo fisiopatologico connesso con questa evenienza. In assenza di diabete o nefropatie è stato dimostrato infatti che fino al 40% degli ipertesi essenziali presenta una microalbuminuria persistente. Questo sembra dovuto ad alterazioni emodinamiche glomerulari che possono influenzare il passaggio dell'albumina attraverso il filtro glomerulare. Nell'ipertensione arteriosa le resistenze vascolari renali aumentano e il flusso plasmatico renale

diminuisce, mentre si conserva la velocità di filtrazione con conseguente aumento della frazione di filtrazione, dovuto probabilmente alla costrizione dell'arteriola efferente. Questo fenomeno provocherebbe un aumento della pressione di filtrazione glomerulare e delle proteine plasmatiche lungo i capillari glomerulari con conseguente passaggio facilitato di macromolecole nell'ultrafiltrato. L'angiotensina II sembra rivestire un ruolo importante in questo fenomeno, in quanto realizza una vasocostrizione preferenziale dell'arteriola efferente, probabilmente per una maggiore ricchezza di recettori a questo livello. Ciò è confermato dagli studi fisiopatologici eseguiti con l'uso degli ACE-inibitori, che riducono il grado di microalbuminuria negli ipertesi affetti o meno da diabete. Essi inducono vasodilatazione renale senza modificare la frazione di filtrazione, dimostrando così che la loro azione vasodilatatrice si espleta soprattutto a carico dell'arteriola efferente. L'effetto benefico di questi farmaci sull'escrezione urinaria d'albumina comunque non è ancora spiegato in maniera soddisfacente e infatti sono state formulate altre ipotesi che prevedono, per esempio, un'azione sulla permeabilità glomerulare per l'albumina e sulla selettività della membrana basale glomerulare.

Filtrato glomerulare

La complicità renale del diabete tipo 1 si caratterizza per la presenza d'iperfiltrazione glomerulare nel 25% dei pazienti di recente diagnosi. Questo fenomeno non solo la distingue da altre patologie renali che in genere si accompagnano a riduzione del filtrato glomerulare, ma assume particolare significato dal punto di vista prognostico e fisiopatologico. È stato infatti dimostrato che pazienti con iperfiltrazione glomerulare (probabilmente associata a scarso controllo glico-metabolico) e durata del diabete uguale o maggiore di 5 anni, hanno un elevato rischio di sviluppare la nefropatia clinica (5). In pazienti con microalbuminuria precoce, l'iperfiltrazione rappresenta un'alterazione che concorre nel predire gli stadi più avanzati della nefropatia e in misura maggiore se ad essa si associa l'ipertensione arte-

riosa (5). Questo dato, unitamente alla dimostrazione mediante un'analisi di regressione multipla che l'iperfiltrazione è apparsa come fattore di rischio indipendente, ha suggerito il ruolo centrale del fenomeno nella patogenesi della nefropatia diabetica. D'altra parte che l'iperfiltrazione glomerulare rappresenti una causa importante di progressione delle malattie renali in genere, è noto da tempo, soprattutto nell'animale da esperimento. Un legame fra l'iperfiltrazione renale e i cambiamenti strutturali glomerulari che portano all'aggravamento della nefropatia, sono stati suggeriti dagli studi di Brenner (36), riguardanti la restrizione proteica in ratti mononefrectomizzati. Questi animali sono il modello sperimentale che ha condotto alla formulazione della teoria del "rene superstite". Dopo la nefrectomia monolaterale, si assiste ad un'iperperfusion e un'ipertrofia compensatoria del rene superstite, che ha in attività tutti i glomeruli, mentre, in condizioni normali, quelli sottocorticali, che rappresentano la "riserva nefronica", riposano. La conseguenza è un'iperfiltrazione e un aumento costante dei gradienti di pressione idraulica transcappillare, ossia un'ipertensione glomerulare. Questa ha effetti deleteri su tutte le componenti cellulari del glomerulo: **1)** aumento del rilascio di sostanze vasoattive dalle cellule endoteliali, deposizione di lipidi, trombosi intracapillare; **2)** accumulo di macromolecole nel mesangio, con aumento della produzione di matrice e proliferazione cellulare; **3)** aumento della permeabilità della membrana basale glomerulare e quindi proteinuria: tutto questo conduce alla glomerulosclerosi. A sua volta la glomerulosclerosi è causa d'ipertensione sistemica, che aggrava l'ipertensione glomerulare e autoalimenta il processo distruttivo renale. Questi importanti studi di Brenner hanno inoltre dimostrato che gli effetti lesivi dell'iperfiltrazione glomerulare nel rene supersite del ratto vengono prevenuti dalla somministrazione di ACE-inibitori o dalla restrizione dell'apporto proteico con la dieta. Questa scoperta ha sollevato il problema dell'iperfiltrazione proteica nell'uomo e ha dato l'avvio all'applicazione, con successo, delle diete ipoproteiche nelle malattie renali. Queste osservazioni hanno fatto presumere che la progressione di molte nefropatie umane po-

tesse dipendere dal precoce instaurarsi, a seguito di una riduzione critica della massa renale, di uno stato di iperperfusion e iperfiltrazione glomerulare. Tuttavia è ormai dimostrato che la teoria di Brenner sul rene superstite non può spiegare da sola la progressione della nefropatia diabetica. La precoce e persistente iperfiltrazione presente in un quarto dei diabetici tipo 1 è sostenuta da alterazioni che si riscontrano in tutti i casi. Se ne deduce che essa non possa essere l'unico fattore patogenetico della nefropatia stessa. Invece è probabile che l'iperfiltrazione glomerulare, con il concomitante intervento di altri fattori fisiopatologici, possa provocare l'insorgenza della complicanza renale nei pazienti geneticamente predisposti.

Nel diabete tipo 2 numerosi studi hanno mostrato risultati abbastanza controversi. Tuttavia nelle più recenti e ampie casistiche è dimostrato che l'iperfiltrazione anche nel NIDDM non è un'evenienza eccezionale nei primi anni dalla diagnosi (37, 38), potendo ritrovarla in almeno il 7% della popolazione e con un valore predittivo di progressione verso l'ESRD del 22% (39).

Metodi di determinazione del GFR (Tab. VI)

Il GFR può essere misurato con tecniche non invasive ed invasive, in particolare può essere valutato indirettamente tramite la determinazione della clearance della creatinina o direttamente con tecniche che utilizzano i radioisotopi.

1) Clearance della creatinina. È questa la metodica più ampiamente in uso, specie in indagini di primo livello, facilmente effettuabile su qualunque tipo di paziente, anche ambulatoriale. La creatinina è una sostanza endogena, che deriva dal metabolismo non enzimatico della creatina. La creatina per il 98% è prodotta nei muscoli. Il 2% del pool è convertito giornalmente in creatinina. La dieta può far variare del 10-20% l'escrezione di creatinina urinaria, che è anche in rapporto all'esercizio muscolare. La clearance della creatinina viene misurata valutando la creatininemia e la creatininuria con il metodo del picrato alcalino (reazione di Jaffé) e applicando la formula generale: $U \times V/P$, dove U è la

TAB. VI - METODI DI MISURAZIONE DEL GFR

Non radioisotopici

- clearance della creatinina
- clearance stimata della creatinina
- iotalamato freddo

Radioisotopici

- ⁵¹Cr EDTA
- ¹²⁵I iotalamato
- ^{99m}Tc DTPA

TAB. VII - FORMULA DI COCKROFT

Maschio

$$\text{Ccr} = \frac{(140 - \text{età}) \times \text{peso corporeo (kg)}}{72 \times \text{Pcr (mg/dl)}}$$

Femmina

$$\text{Ccr} = \frac{(140 - \text{età}) \times \text{peso corporeo (kg)} \times 0.85}{72 \times \text{Pcr (mg/dl)}}$$

concentrazione urinaria, P quella plasmatica e V il volume urinario espresso in ml/min. Tuttavia la clearance della creatinina presenta, nel diabetico, oltre ai ben noti svantaggi (variabilità giornaliera intorno al 10-20%, imprecisione della raccolta urinaria), possibili alterazioni in rapporto ai disturbi metabolici e del bilancio idro-elettrolitico, per cui la determinazione del GFR con questo metodo è veramente poco attendibile.

2) La clearance della creatinina, stimata secondo una formula che prende in considerazione età, sesso e superficie corporea (di Cockcroft e Gault) (40) (Tab. VII) offre una più accurata valutazione del GFR, soprattutto per valori non superiori a 100 ml/min/1.73 m².

In conclusione, queste tecniche possono essere usate con un grado accettabile di confidenza per seguire nel tempo l'andamento della funzionalità renale e quando non è praticabile la misurazione ripetuta del GFR con radioisotopi.

3) L'iotalamato freddo può essere usato per valutare il GFR, secondo una tecnica molto indaginosa che utilizza la cro-

matografia liquida ad alta pressione per misurare la sua concentrazione nel sangue e nelle urine durante 4 periodi di clearance. All'inizio della prova vengono infusi e.v. 300 mg di iotalamato al 30%, 16 mg/kg di paramminoipurato al 20%, 150 mg/kg di destrano al 10%, con una pompa peristaltica alla velocità sufficiente per ottenere un tasso plasmatico di iotalamato di 1.5 mg/dl. Dopo 60 min di equilibrio si iniziano le clearance di 20 min ciascuna. Il GFR si calcola come la media delle clearance dello iotalamato (44). Con questa metodica si ottiene anche il valore del flusso plasmatico renale.

4) Misurazione diretta del GFR con radioisotopi. Questa è di gran lunga la metodica più precisa per la determinazione del GFR.

a) In Europa il composto usato più comunemente è il ⁵¹Cr-EDTA. Con questa tecnica il GFR viene misurato dopo iniezione singola di ⁵¹Cr-EDTA (50 o 100 μCi). La clearance plasmatica del radioisotopo è calcolata come rapporto fra la dose iniettata e l'area sotto la cur-

va determinata su 4 campioni collezionati durante 180-240 min dopo l'iniezione del tracciante. La clearance renale del $^{51}\text{Cr-EDTA}$ è misurata su campioni urinari di 160 min (4 periodi di 40 min, dopo un periodo d'equilibrio di 40 min). Il valore del GFR è calcolato moltiplicando la concentrazione urinaria \times la diuresi / la concentrazione plasmatica. La media dei 4 valori dà il risultato finale (41).

b) Una semplificazione metodologica è data dall'uso di $^{125}\text{-Iotalamato}$. Il composto è infatti somministrato sottocute alla dose di $35\text{-}50\ \mu\text{Ci}$, dopo aver indotto una diuresi adeguata con carico idrico e aver bloccato con Lugol la captazione tiroidea dello iodio. Trascorsi 60 min di equilibrio, si eseguono 2-3 periodi di clearance. Il GFR è calcolato secondo la formula $U(\text{cpm}) \times V / (P1(\text{cpm}) + P2(\text{cpm})) / 2$, dove $U(\text{cpm})$ indica la radioattività urinaria e $(P1 + P2) / 2$ la media delle radioattività urinaria e $(P1 + P2) / 2$ la media delle radioattività plasmatiche ottenute all'inizio e alla fine di ogni clearance (42). Possibili svantaggi del metodo sono l'eventuale allergia allo iodio e la necessità di raccogliere le urine.

c) Un altro metodo molto frequentemente utilizzato è la scintigrafia renale per sottrazione d'immagine, secondo Gates (43). Con questa tecnica vengono iniettati e.v. $0.5\text{-}1\ \mu\text{Ci}$ di $^{99\text{m}}\text{Tc}$, che ha il vantaggio di possedere una breve emivita, ma lo svantaggio di dover essere preparato estemporaneamente per l'instabilità della chelazione fra il $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e il DTPA. La misurazione della clearance renale risulta un esame molto semplice e breve per il paziente e prevede un complesso calcolo matematico computerizzato.

Nuovi markers

Recentemente è stata attribuita, ad una serie di sostanze, la caratteristica di poter rappresentare dei marker di presenza o di predizione della nefropatia diabetica. (Tab. VIII)

1) La fibronectina è una sostanza che ha ricevuto notevole interesse negli ultimi anni. Sembra in rapporto con le compli-

TAB. VIII - NUOVI MARKERS

Fibronectina

Laminina

Fattore VIII - Von Willebrand

Spermina - Spermidina

GAGS - SA - NAG

canze del diabete e con la nefropatia in particolare. È una glicoproteina ad alto peso molecolare che consta di una frazione "di struttura" situata nelle membrane basali e nelle strutture sottoendoteliali e una frazione plasmatica, che sembra prevalentemente prodotta dagli endoteli vascolari. Questa sua caratteristica e il fatto che è coinvolta in processi di adesione cellulare e di neovascolarizzazione consente di proporla legittimamente come marker di patologia dei piccoli vasi. Alcuni Autori (45) hanno infatti riscontrato, in diabetici con sola microangiopatia, elevati livelli plasmatici di fibronectina, correlati con il grado di microalbuminuria. Sulla base di questi risultati è stata formulata l'ipotesi che l'aumento dei suoi livelli plasmatici sia secondario ad aumentata sintesi da parte degli endoteli dei micro-vasi, in risposta allo stimolo verso la neovascolarizzazione, che costituisce una parte dell'evoluitività della microangiopatia diabetica. A conferma di ciò starebbe la presenza della sostanza, dimostrata con tecniche d'immunofluorescenza, in zone glomerulari con lesioni in fase evolutiva e la sua assenza in zone dove è già stabilizzata la sclerosi glomerulare. Con metodiche ELISA e immunonefelometriche è oggi possibile il rapido e semplice dosaggio della fibronectina in campioni plasmatici.

2) La laminina è un'altra glicoproteina delle membrane basali che ha un ruolo favorente l'adesione, nelle interazioni cellule-matrice proteica. Con tecniche cromatografiche è stato possibile isolare e studiare il frammento P1 della laminina e dimostrare che esso, presente in circolo, non può passare la barriera glomerulare, per cui la quota che si ritrova nelle urine è presumibilmente di origine renale. È stato dimostrato che la laminina-P1 è aumentata nelle urine, nelle

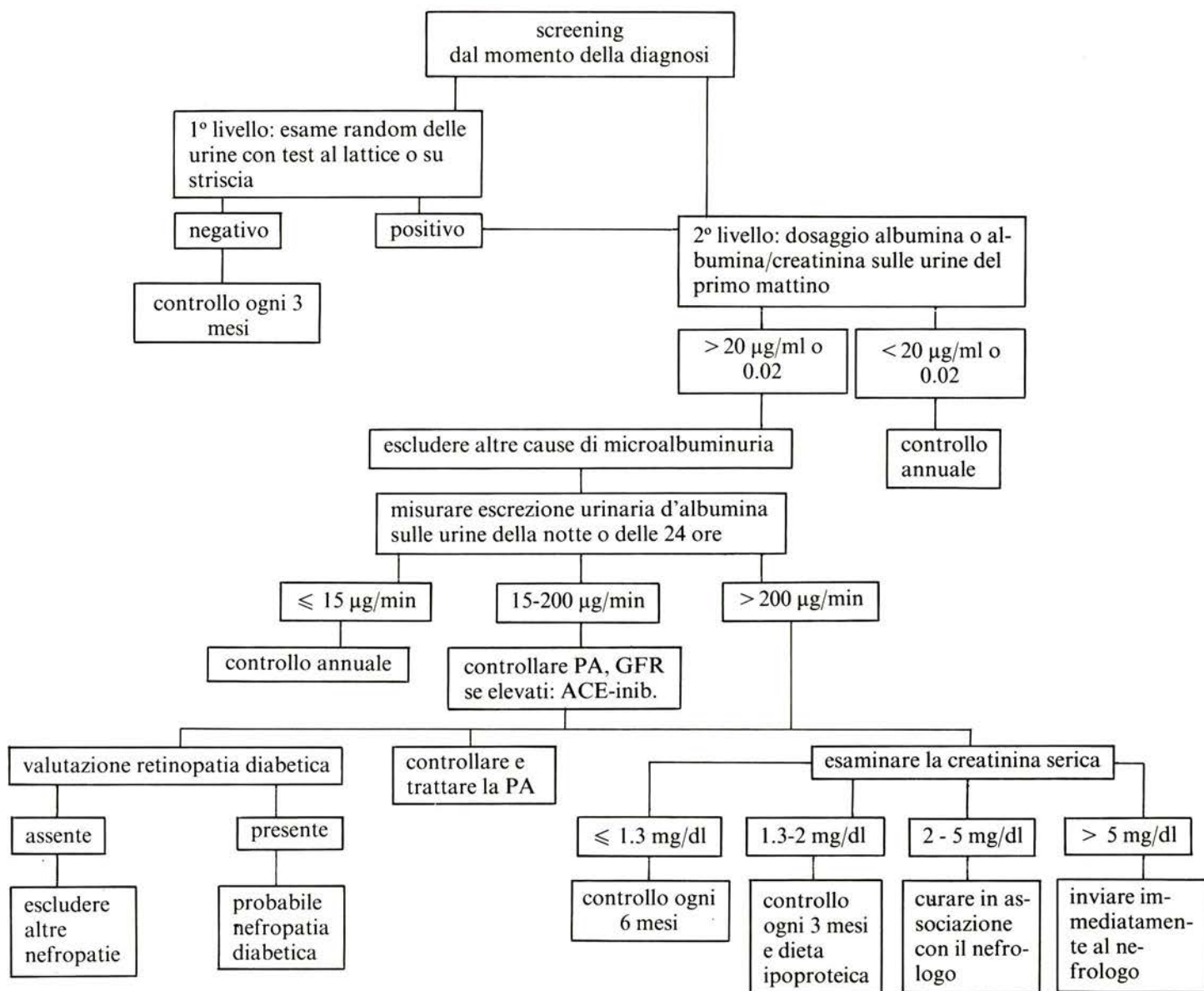
strutture mesangiali e nella membrana basale glomerulare di diabetici nefropatici, nella fase precoce di espansione del mesangio e di ispessimento delle membrane basali stesse (46). La concentrazione urinaria misurabile con metodo RIA, rifletterebbe l'alterazione del metabolismo renale della laminina.

3) Un altro indice di lesione endoteliale, il fattore VIII-Von Willebrand, presenta un aumento della sua concentrazione plasmatica in pazienti diabetici con nefropatia incipiente (44). Anch'esso viene dosato con tecnica RIA.

4) Spermina e spermidina sono poliammine indispensabili nei processi di crescita e differenziazione cellulare. La misurazione del loro rapporto negli eritrociti ha mostrato valori aumentati in diabetici con microangiopatia. Il livello intracellulare di queste sostanze è legato alla velocità di proliferazione cellulare, tanto che sono usate anche come marker neoplastico. Tuttavia possono essere ragionevolmente considerate come un altro indice di patologia degli endoteli e come un nuovo marker di nefropatia diabetica, anche perché l'enzima chiave nella loro sintesi (spermidino-ossidasi) è stato trovato aumentato nella nefropatia diabetica e correlato con la microalbuminuria (47).

5) È stato descritto, nei diabetici tipo 1, un aumento dell'escrezione urinaria di glicosaminoglicani (GAGS) e di acido sialico (SA), normali costituenti della matrice extracellulare e delle membrane basali, che assicurano la selettività di carica del filtro glomerulare. L'aumento degli enzimi che partecipano al metabolismo delle glicoproteine (NAG), insieme all'incremento dei GAGS e SA, indicherebbe un alterato turnover dei mucopolisaccaridi e delle glicoproteine della membrana basale glomerulare. Baggio e coll (48), avendo documentato in un gruppo di diabetici insulino-dipendenti non albuminurici un aumento di queste sostanze, hanno ipotizzato che quest'alterazione possa essere rilevabile addirittura nella fase prealbuminurica della nefropatia diabetica. Successivamente altri Autori (49) hanno evidenziato un'enzimuria tubulare elevata in diabetici normoalbuminurici, tanto da ipotizzare l'esistenza di una tubulopatia prossima-

TAB. IX - DIAGNOSTICA E TRATTAMENTO DELLA NEFROPATIA DIABETICA



le. Shimojo (50) ha osservato un incremento dell'enzimuria, dell'albumina e del lisozima in diabetici normoalbuminurici affetti da retinopatia e per questo ha suggerito che la determinazione di queste sostanze possa essere utile nel rilevamento precoce del danno microangiopatico diffuso nel diabete mellito. Poiché è stata evidenziata una correlazione fra l'enzimuria e i parametri a lungo termine del compenso glico-metabolico, è stato proposto, soprattutto per il NAG, il ruolo di marker di controllo della malattia (48).

Concludiamo la rassegna con la considerazione che la microalbuminuria è il più semplice e sensibile parametro per la precoce identificazione dei pazienti a rischio di sviluppare la nefropatia diabetica conclamata. La presenza di microalbuminuria persistente probabilmente riflette le prime lesioni anatomiche caratteristiche della nefropatia. Ovviamente sono importantissimi la valutazione del filtrato glomerulare e prima ancora il monitoraggio dei valori pressori, sia come indice di un viraggio verso gli stadi più avanzati, che come spia per attuare

una terapia mirata, ma la possibilità di sostituire la microalbuminuria con altri marker precoci e attendibili nella stadiazione attuale e nella predizione della progressione della nefropatia diabetica, è a tutt'oggi negata dalla maggior parte degli Autori.

Infine sintetizziamo nella Tabella IX l'iter diagnostico completo di primo e secondo livello che può rappresentare la linea guida nel management di un diabetico che come tale è sottoposto a sviluppare complicanze a lungo termine.

**BIBLIOGRAFIA**

- 1 Narins BE, Narins RG. Clinical features and health-care costs of diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 1988; 11: 833-9.
- 2 Andersen AR, Christiansen JS, Andersen JK, Kreiner S, Deckert T. Diabetic nephropathy in type 1 (insulin-dependent) diabetes: an epidemiological study. *Diabetologia* 1983; 25: 496-501.
- 3 Krolewski A, Warram JH, Rand LI, Kahn CR. Epidemiological approach to the etiology of type 1 diabetes mellitus and its complications. *N Engl J Med* 1987; 317: 1390-8.
- 4 Tung P, Levin SR. Nephropathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Med* 1988; 85 (Suppl 5A): 131-6.
- 5 Mogensen CE. Early diabetic renal involvement and nephropathy. In: Alberti KGMM and Krall LP eds. *The diabetes annual/3*, Elsevier science publisher, Amsterdam 1987; 306-24.
- 6 Schmitz A. The kidney in non-insulin-dependent diabetes. *Acta diabetologica* 1992; 29: 47-69.
- 7 Mogensen CE, Christensen CK, Vittinghus E. The stages in diabetic renal disease with emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes* 1983; 32 (Suppl 2): 64-78.
- 8 Viberti GC, Mackintosh D, Keen H. Determinants of the penetration of proteins through the glomerular barrier in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 1983; 32 (Suppl 2): 92-5.
- 9 Di Mario U, Morano S, Cancelli A, et al. New parameters to monitor the progression of diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 1989; 13: 45-8.
- 10 Viberti GC. Diabetic renal disease in type 1 diabetes: aetiology and prevention. *Diabetic Med* 1981; 8: 38-42.
- 11 Nosadini R, Fioretto P, Trevisan R, Crepaldi G. Insulin-dependent diabetes mellitus and hypertension. *Diabetes Care* 1991; 14: 210-9.
- 12 Viberti GC. Interventions based on microalbuminuria screening and low-protein diet in the treatment of kidney disease of diabetes mellitus. *Am J Kidney Dis* 1989; 13: 41-4.
- 13 Parving HH, Hommel E, Smidt UM. Protection of kidney function and decrease in albuminuria by captopril in insulin dependent diabetics with nephropathy. *Br Med J* 1988; 297: 1086-91.
- 14 Bangstad HJ, Osterby R, Dahl-Jorgensen K, et al. Early glomerulopathy is present in young, type 1 (insulin-dependent) diabetic patients with microalbuminuria. *Diabetologia* 1993; 36: 523-9.
- 15 Viberti GC. La malattia renale diabetica: patogenesi ed evoluzione. *Giornale Italiano di Diabetologia* 1982; 2: 99-104.
- 16 Viberti GC, Bilous RW, Mackintosh D, Bending JJ, Keen H. Long term correction of hyperglycaemia and progression of renal failure in insulin dependent diabetes. *Br Med J* 1983; 286: 598-602.
- 17 Hanssen KF, Dahl-Jorgensen K, Lauritzen T, Feldt-Rasmussen B, Brinchmann-Hansen O, Deckert T. Diabetic control and microvascular complications: the near-normoglycaemic experience. *Diabetologia* 1986; 29: 677-84.
- 18 Nyberg G, Norden G, Bjork S, Larsson O. Progression of diabetic nephropathy. A multifactorial process. *Scand J Urol Nephrol* 1988; 108: 35-40.
- 19 Keen H, Chlouverakis C. An immunoassay method for urinary albumin at low concentrations. *Lancet* 1963; 2: 913-6.
- 20 Sharp CL, Butterfield WJH, Keen H. Diabetes survey in Bedford, 1962. *Proc Roy Soc Med* 1964; 57: 193-202.
- 21 Mogensen CE, Christensen CK. Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. *N Engl J Med* 1984; 311: 89-93.
- 22 Viberti GC, Wiseman MJ. The kidney in diabetes: significance of the early abnormalities. *Clin Endocrinol Metab* 1986; 15: 753-82.
- 23 Mathiesen ER, Oxenboll B, Johansen K, et al. Incipient nephropathy in type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1984; 26: 406-10.
- 24 Consensus statement. *Am J Kidney Dis* 1989; 13: 2-6.
- 25 Parving HH, Hommel E, Mathiesen ER, Sko HP. Prevalence of microalbuminuria, arterial hypertension, retinopathy and neuropathy in patients with insulin-dependent diabetes. *Br Med J* 1988; 296: 156-60.
- 26 Giampietro O, Penno G, Bertoli S, et al. Screening della nefropatia diabetica: studio multicentrico nella Toscana Occidentale. *J Endocrinol Invest* 1989; 12 (Suppl 1): 141.
- 27 Crepaldi G, Nosadini R, Rigamonti G. Prevalence of hypertension and microalbuminuria in Italy in IDDM patients without overt nephropathy. *Diabetes* 1991; 40 (Suppl 1): 125A.
- 28 Mogensen CE. Diabetic renal involvement and disease in patients with insulin-dependent diabetes. In: Alberti KGMM and Krall LP eds. *The Diabetes Annual/4*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam 1988; 411-48.
- 29 Deckert T, Feldt-Rasmussen B, Borch-Johnsen K, Jensen T, Kofoed-Enevoldsen A. Albuminuria reflects widespread vascular damage. *Diabetologia* 1989; 32: 219-26.
- 30 Miles DW, Mogensen CE, Gundersen HJG. Radioimmunoassay for urinary albumin using a single antibody. *Scan J Clin Lab Invest* 1970; 26: 5-11.
- 31 Paoli C, Bardelli F, Tarli P, Gragnoli G, Tanganelli I, Signorini AM. A simple latex agglutination test for urinary albumin screening. *Clin Chim Acta* 1987; 166: 67-71.
- 32 De Tommaso G, Boemi M, Ricciotti R, Romagnoli F, Fumelli P. Validità dell'impiego di strisce reattive per la valutazione della microalbuminuria nei pazienti diabetici. *Giornale Italiano di Diabetologia* 1992; 12: 253-6.

- 33 Feldt-Rasmussen B, Mathiesen ER. Variability of urinary albumin excretion in incipient diabetic nephropathy. *Diabetic Nephropathy* 1984; 3: 101-3.
- 34 Berggard J, Bearn AG. Isolation and properties of a low molecular weight β_2 -globulin occurring in human biological fluids. *J Biol Chem* 1968; 243: 4095-103.
- 35 Dati F, Lammers M. Immunochemical methods for determination of urinary proteins (albumin and α_1 -microglobulin) in kidney disease. *JIFCC* 1989; 231: 68-77.
- 36 Brenner BM, Meyer TW, Hostetter TH. Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease. *N Engl J Med* 1982; 307: 652-9.
- 37 Meyers BD, Nelson RG, Williams GW, et al. Glomerular function in Pima Indians with non-insulin-dependent diabetes mellitus of recent onset. *J Clin Invest* 1991; 88: 524-30.
- 38 Gragnoli G, Signorini AM, Tanganelli I, et al. Prevalence of glomerular hyperfiltration and nephromegaly in normo- and microalbuminuric type 2 diabetic patients. (In stampa).
- 39 Mogensen CE. Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity onset diabetes. *N Engl J Med* 1984; 310: 356-60.
- 40 Cockcroft DW, Gault HM. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976; 16: 31-41.
- 41 Granerus G, Aurell M. Reference values for ^{51}Cr -EDTA clearance as a measure of glomerular filtration rate. *Scand J Clin Lab Invest* 1981; 41: 611-6.
- 42 Rolin H, Hall PM. Evaluation of glomerular filtration rate and renal plasma flow. In: Jacobson HR, Striker GE, Klahr S eds., *The principles and practice of nephrology*. BG Decker Inc, Philadelphia 1991; 158-62.
- 43 Gates GF. Glomerular filtration rate: estimation from fractional renal accumulation of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA. *A J R* 1982; 138: 565-70.
- 44 Meyers BD, Nelson RG, Williams GW, et al. Glomerular function in Pima Indians with noninsulin-dependent diabetes mellitus of recent onset. *J Clin Invest* 1991; 88: 524-30.
- 45 Solerte SB, Piovella F, Viloa C, et al. Plasma fibronectin, von Willebrand factor antigen and blood rheology. Association with diabetic microvascular disease. *Acta Diabetol Lat* 1985; 22: 239-46.
- 46 Nakajuma C, Shimojo N, Naka K, Okuda K, Yamamoto M, Fujii S. Clinical significance of urinary laminin P1 in diabetic patients. *Diabetic Complications* 1991; 5: 197-8.
- 47 Seghieri G, Gironi A, Mammini P, et al. Erythrocyte spermidine levels in IDDM patients. *Diabetes Care* 1992; 15: 543-5.
- 48 Baggio B, Briani G, Cicerello E, et al. Urinary glycosaminoglycans, sialic acid and lysosomal enzymes increase in non-albuminuric diabetic patients. *Nephron* 1986; 43: 187-91.
- 49 Giampietro O, Miccoli R, Clerico A, et al. Diagnosi precoce della nefropatia diabetica: significato ed utilità clinica dell'albuminuria e dell'enzimuria. *Min Endocrinol* 1988; 13: 187-201.
- 50 Shimojo N, Kitahashi S, Naka K, et al. Comparison of N-acetyl- β -D-glucosaminidase and alanine aminopeptidase activities for evaluation of microangiopathy in diabetes mellitus. *Metabolism* 1987; 36: 277-80.