



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche

DOTTORATO DI RICERCA IN : FISIOPATOLOGIA CLINICA
CICLO XIX

**RUOLO DEL TUBULO RENALE NELLA PATOGENESI DELLA
NEFROPATIA DIABETICA: ANALISI MORFOMETRICA
MEDIANTE MICROSCOPIA OTTICA ED ELETTRONICA IN
PAZIENTI CON DIABETE DI TIPO 2**

Coordinatore: Ch.mo Prof. Elena Ossi

Supervisore: Ch.mo Prof. Paola Fioretto

Dottorando: Alessandra Masiero

DATA CONSEGNA TESI

31 Gennaio 2008

INDICE

| | |
|--|---------|
| RIASSUNTO | pag. 2 |
| INTRODUZIONE | pag. 3 |
| Anatomia del Nefrone | pag. 3 |
| - Corpuscolo renale | pag. 3 |
| - Apparato juxtaglomerulare | pag. 6 |
| - Tubulo prossimale | pag. 6 |
| - Tratti sottili dell'ansa di Henle | pag. 10 |
| - Tubulo distale | pag. 10 |
| - Segmento connettore | pag. 12 |
| - Dotto collettore | pag. 12 |
| - Interstizio | pag. 14 |
| La nefropatia diabetica | pag. 16 |
| - Anatomia patologica del rene diabetico | pag. 16 |
| - Storia naturale della nefropatia diabetica | pag. 24 |
| - La microalbuminuria | pag. 26 |
| SCOPO DELLA TESI | pag. 30 |
| MATERIALI E METODI | pag. 31 |
| RISULTATI | pag. 40 |
| DISCUSSIONE | pag. 43 |
| BIBLIOGRAFIA | pag. 49 |
| LEGENDA | pag. 63 |
| TABELLE E FIGURE | |

RIASSUNTO

La nefropatia nei diabetici di tipo 1 (D1) si caratterizza per alterazioni strutturali sia a livello glomerulare che tubulo interstiziale. Nel diabete di tipo 2 (D2) il quadro istologico renale è più eterogeneo, ed una cospicua percentuale di pazienti si caratterizza per la presenza di importanti lesioni tubulo interstiziali non sempre accompagnate da un danno glomerulare, suggerendo che lesioni del tubulo renale possono avere un ruolo chiave nel determinare le alterazioni funzionali che caratterizzano la nefropatia nel D2. **Scopi:** quantificare, in pazienti con D2 e livelli differenti di velocità di escrezione urinaria dell'albumina (AER), lo spessore della membrana basale del tubulo prossimale (TBM width), la percentuale di citoplasma delle cellule del tubulo prossimale occupato da spazi vuoti [Vv(ES/cit)], il grado di espansione interstiziale [Vv(Int/cortex)] e la percentuale di tubuli atrofici [Vv(Ta/Tt)] e valutare i rapporti tra essi ed i parametri morfometrici glomerulari [spessore della membrana basale glomerulare (GBM) e funzionali renali tipici delle nefropatia diabetica. **Materiali e metodi:** In 42 D2 (16 normoalbuminurici-NA, 16 microalbuminurici-MA e 10 proteinurici-P) sono stati valutati: HbA_{1c}, AER (metodo immunoturbidimetrico), velocità di filtrazione glomerulare (GFR) (clearance plasmatica del ⁵¹Cr-EDTA) e pressione arteriosa sistemica. E' stata eseguita una biopsia renale e, mediante analisi morfometrica applicata alla microscopia elettronica, sono stati quantificati lo spessore della TBM, della GBM, Vv(ES/cit) e Vv (mes/glom), mediante microscopia ottica Vv(Int/cortex) e Vv(Ta/Tt). **Risultati:** la durata del diabete, il BMI, HbA_{1c}, la pressione arteriosa ed il GFR non differivano nei 3 gruppi. Lo spessore della TBM aumentava progressivamente nei 3 gruppi

(707±177 nm in NA, 875±225 in MA, 1055±169 in P, Anova < 0.001); lo spessore della GBM e il Vv(mes/glom) erano più elevati in P rispetto a NA e MA (p<0.005 NA vs P e p<0.05 MA vs P). I P presentavano inoltre valori di Vv(Ta/Tt) significativamente più elevati rispetto ad NA e MA (0.05±0.05 in NA, 0.06±0.04 in MA e 0.14±0.09 in P; p < 0.005 NA vs P e p < 0.05 MA vs P) e valori di Vv(int/cortex) aumentati rispetto ad MA (0.18±0.04 in NA, 0.17±0.02 in MA e 0.22±0.07 in P, p < 0.05 MA vs P). Nessuna differenza tra i gruppi è stata riscontrata per quanto riguarda Vv(ES/cit). L'analisi di regressione ha evidenziato l'esistenza di una correlazione diretta tra TBM width, GBM width (r=0.53, p<0.001) e Vv(mes/glom) (r=0.475, p<0.01). Anche Vv(Ta/Tt) correlava con GBM width (r=0.48, p<0.01) e Vv(mes/glom) (r=0.64, p<0.0001). Mentre Vv(int/cortex) correlava direttamente solo con Vv (mes/glom) (r=0.43, p<0.05). L'analisi di regressione multipla tra tutti i parametri morfometrici studiati ed AER ha svelato una significativa correlazione solo tra AER e TBM width (Beta = 0.40, p<0.05). Esisteva inoltre una correlazione diretta tra TBM width e HbA_{1c} (r=0.41, p<0.01). **Conclusioni:** l'ispessimento della TBM è, assieme ad ispessimento della GBM ed espansione mesangiale, presente nei D2 ed ha probabilmente un ruolo chiave nella patogenesi dell'albuminuria; la correlazione tra ispessimento della TBM e HbA_{1c} suggerisce un ruolo chiave dell'iperglicemia nella patogenesi di tale lesione strutturale renale nei pazienti con diabete di tipo 2.

INTRODUZIONE

ANATOMIA DEL NEFRONE

L'unità funzionale del rene è il nefrone, ogni rene umano ne contiene da 0,4 a 1,2 x 10⁶. Le strutture principali del nefrone sono il corpuscolo renale o del Malpighi costituito da glomerulo e capsula di Bowman, il tubulo prossimale, le anse sottili, il tubulo distale e il dotto collettore. Nel rene si riconoscono due tipi principali di nefroni quelli ad ansa di Henle lunga e quelli ad ansa corta. L'ansa di Henle è composta da: tratto retto del tubulo prossimale (pars recta), segmenti sottili e tratto retto del tubulo distale (tratto spesso ascendente o pars recta). La lunghezza dell'ansa di Henle è strettamente dipendente dalla posizione in sede corticale del glomerulo di appartenenza.

La midollare si divide in una zona esterna e in una zona interna, che a sua volta è ulteriormente suddivisa in uno strato interno e in uno strato esterno (1). La midollare interna accoglie sia i tratti sottili ascendente e discendente sia i grossi dotti collettori. Nello strato interno della midollare esterna, oltre ai dotti collettori, si trovano i tratti discendenti sottili e i tratti ascendenti spessi. Lo strato esterno della midollare esterna comprende i tratti terminali della parte retta del tubulo prossimale, i tratti ascendenti spessi (parts rectae del tubulo distale) e i dotti collettori.

Corpuscolo renale (glomerulo)

Il corpuscolo renale è formato da una matassa delimitata da un sottile strato di cellule endoteliali, da una regione centrale di cellule mesangiali circondate dalla matrice mesangiale, dalle cellule dell'epitelio viscerale con la membrana basale associata e, infine, dal foglietto parietale della capsula di Bowman con la propria membrana basale. Fra i due foglietti epiteliali si trova uno spazio, chiamato spazio di Bowman o

spazio urinario. L'epitelio viscerale si continua con l'epitelio parietale a livello del polo vascolare, laddove le arteriole afferente ed efferente entrano e rispettivamente escono dal glomerulo. L'epitelio parietale della capsula di Bowman si continua con l'epitelio del tubulo prossimale a livello del cosiddetto polo urinario. Nell'uomo il diametro medio glomerulare è di 200 μm .

Il glomerulo è responsabile della produzione di un ultrafiltrato di plasma. La barriera filtrante fra sangue e spazio urinario è composta da un endotelio fenestrato, dalla membrana basale glomerulare e dai pori a fessura tra i processi pedicellari delle cellule dell'epitelio viscerale. Nel rene umano l'area media della superficie filtrante di un glomerulo è stata misurata in 0,136 mm^2 .

Cellule endoteliali. I capillari glomerulari sono ricoperti da un sottile epitelio fenestrato (2); il nucleo delle cellule endoteliali si trova in genere in vicinanza del mesangio e lontano dallo spazio urinario, mentre il resto della cellula circonda irregolarmente il lume capillare. L'endotelio è interrotto da pori o *fenestrae* con un diametro medio fra 70 e 100 nm (3). Nelle cellule endoteliali è presente un'intricata massa di filamenti e di microtubuli intersecati fra loro, che circondano le fenestrature endoteliali. Costituiscono il primo sbarramento al passaggio di costituenti ematici dal lume capillare allo spazio di Bowman.

Cellule dell'epitelio viscerale. Le cellule dell'epitelio viscerale, dette anche podociti, sono le cellule più grandi presenti nel glomerulo, presentano delle lunghe prominente citoplasmatiche, o trabecole, che si estendono dalla parte principale della cellula e si dividono in processi pedicellari isolati (pedicelli), che prendono intimo contatto con la lamina rara esterna della membrana basale glomerulare. I podociti presentano un sistema di Golgi ben sviluppato e spesso al loro interno si possono rilevare dei lisosomi. Nel citoplasma vi è un gran numero di microtubuli, microfilamenti e

filamenti intermedi (4). Nel glomerulo normale la distanza tra un processo pedicellare e l'altro oscilla fra 25 e 60 nm.

Vi sono prove che le cellule dell'epitelio viscerale siano, almeno in parte, responsabili della sintesi e del mantenimento della membrana basale glomerulare.

Cellule mesangiali. Le cellule mesangiali e la matrice circostante costituiscono il mesangio, che è separato dal lume capillare dall'endotelio. La cellula mesangiale ha un profilo irregolare con nucleo addensato e digitazioni del citoplasma che si allungano fino a circondare il lume capillare e si insinuano fra la membrana basale e l'endotelio sovrastante. Oltre ai normali organuli citoplasmatici, la cellula mesangiale contiene numerosi microfilamenti (5) composti almeno in parte da actina, α -actina e miosina. La cellula mesangiale è circondata da una matrice che è simile, ma non identica, alla membrana basale glomerulare periferica, perché, rispetto a quest'ultima, possiede fibrille più grossolane e risulta lievemente meno elettrondensa. Oltre a fornire un supporto strutturale alle anse capillari glomerulari, questa cellula presenta capacità contrattili e fagocitarie e produce prostaglandine in risposta all'azione di sostanze vasoattive (6).

Membrana basale glomerulare La membrana basale glomerulare si compone di uno strato centrale spesso, la lamina densa, e di due strati più sottili ed elettrolucenti: la lamina rara esterna e la lamina rara interna.

Lo spessore della membrana basale glomerulare nell'uomo si aggira intorno a 310 nm.

La membrana basale glomerulare presenta siti fissi con cariche elettriche negative che influenzano la filtrazione delle macromolecole (7).

La parete del capillare glomerulare funziona come un filtro che permette il passaggio di piccole molecole, ma impedisce quasi totalmente la migrazione di molecole di

dimensioni pari o superiori a quelle dell'albumina. Studi di fisiologia hanno confermato che la parete capillare glomerulare possiede proprietà selettive legate sia al peso che alla carica elettrica. Per attraversare la parete capillare, una molecola deve quindi passare attraverso l'endotelio fenestrato, la membrana basale glomerulare e il diaframma delle fessure epiteliali.

Apparato juxtaglomerulare

L'apparato juxtaglomerulare si trova al polo vascolare del glomerulo, dove un tratto del nefrone distale viene in contatto con il glomerulo da cui origina, e si compone di una parte vascolare e di una tubulare. La parte vascolare è formata dalla porzione terminale dell'arteriola afferente, dal tratto iniziale dell'arteriola efferente e dalla regione mesangiale extraglomerulare. La parte tubulare è composta dalla macula densa, che è la porzione della parte spessa ascendente in contatto con la parte vascolare (8,9). Nella parte vascolare dell'apparato juxtaglomerulare si possono distinguere due tipi di cellule: le cellule granulari juxtaglomerulari o cellule mioepitelioidi e le cellule mesangiali agranulari extraglomerulari o cellule a graticcio. Le prime sono presenti in maggior quantità nelle pareti delle arteriole afferenti ed efferenti, ma si trovano anche nella regione mesangiale extraglomerulare; le seconde presentano ultrastruttura simile a quella delle cellule mesangiali e costituiscono il mesangio extraglomerulare situato tra l'arteriola afferente e quella efferente a stretto contatto con la macula densa e in continuità con il mesangio intraglomerulare.

Tubulo prossimale

Il tubulo prossimale inizia bruscamente al polo urinario del glomerulo. E' formato da una parte iniziale contorta (pars convoluta), che è una diretta continuazione dell'epitelio parietale della capsula di Bowman, e da una porzione rettilinea (pars recta), che si trova nel raggio midollare.

La lunghezza del tubulo prossimale è di circa 14 mm. Il diametro esterno del tubulo prossimale è di circa 40 μm .

Pars convoluta Le singole cellule della pars convoluta hanno una struttura complessa (10,11); dalla zona principale delle cellule, alcune grandi sporgenze primarie si allungano lateralmente dall'apice alla base. Sulla superficie luminale delle cellule, alcune espansioni laterali si propagano dalle sporgenze primarie per interdigitarsi con quelle delle cellule vicine. Nella zona media e basale delle cellule si notano inoltre dei processi laterali di dimensioni sufficienti a contenere mitocondri. Questo apparato si interdigita con apparati simili delle cellule vicine. Lungo la membrana citoplasmatica basale si trovano piccoli villi (12). I mitocondri, allungati e tortuosi, sono localizzati nei processi laterali in prossimità della membrana citoplasmatica. Da queste estese interdigitazioni dei rilievi basali e laterali si viene a costruire un intricato compartimento extracellulare che viene chiamato spazio intercellulare basolaterale. Questa zona è separata dal lume tubulare tramite una modificazione della membrana citoplasmatica denominata zonula occludens o giunzione serrata (13); quest'ultima forma una striscia continua attorno alla superficie luminale di ogni cellula. Immediatamente al di sotto della giunzione serrata esiste una seconda regione specializzata della membrana citoplasmatica, chiamata giunzione intermedia o zonula adherens (13). Questa struttura è costituita da due membrane citoplasmatiche adiacenti separate da uno stretto spazio intercellulare.

Nel tubulo prossimale, distribuiti casualmente a diverse distanze dalla giunzione intermedia, si trovano i desmosomi. Sono strutture a 7 strati di aspetto discoide, formate dalle due membrane citoplasmatiche adiacenti e dallo spazio intercellulare frapposto, sono responsabili dell'adesione tra cellule. Lungo il tubulo prossimale lo spessore della membrana basale si riduce progressivamente.

Le espansioni laterali della cellula tubulare e le invaginazioni della membrana citoplasmatica servono ad incrementare lo spazio intercellulare e la superficie della membrana citoplasmatica basolaterale dove ha sede la Na/K –ATPasi o pompa del sodio. La superficie apicale o luminale del tubulo contorto prossimale è formata da un bordo con un orletto a spazzola ben sviluppato, costituito da innumerevoli espansioni digitiformi della membrana citoplasmatica apicale denominati microvilli.

In tutte le cellule del tubulo prossimale sono rilevabili elevate quantità di reticolo endoplasmatico liscio e rugoso ed anche ribosomi liberi. Nella regione intermedia della cellula, al di sopra e lateralmente al nucleo, si osserva un apparato di Golgi ben sviluppato. In tutto il citoplasma delle cellule del tubulo prossimale si sviluppa un esteso sistema di microtubuli.

La parte contorta del tubulo prossimale presenta un apparato endocitico-lisosomiale ben sviluppato che è coinvolto nel riassorbimento e nella degradazione delle macromolecole presenti nell'ultrafiltrato (12, 14). Il complesso endocitico è costituito da un diffuso sistema di avvallamenti rivestiti da piccole vescicole. Gli avvallamenti rivestiti non sono altro che invaginazioni della membrana citoplasmatica apicale alla base dell'orletto a spazzola.

Il tubulo contorto prossimale contiene numerosi lisosomi; questi organuli, molto variabili in termini di dimensioni, forma e configurazione ultrastrutturale, sono legati alla membrana cellulare, contengono diverse idrossilasi acide, tra le quali la fosfatasi acida, e numerose proteasi, lipasi, e glicosidasi (15). I lisosomi basali delle cellule hanno spesso una matrice più densa di quelli in sede apicale. Questi organuli partecipano alla degradazione del materiale assorbito per endocitosi e spesso contengono depositi elettrondensi multipli che si ritiene siano sostanze riassorbite come le proteine. I lisosomi hanno anche un ruolo nel normale ricambio dei

costituenti intracellulari mediante autofagocitosi e nei vacuoli autofagici si trovano frammenti di granuli cellulari che poi si ritrovano anche nel tubulo prossimale (16, 17).

Il sistema vacuolo-lisosomiale ha un ruolo basilare nel riassorbimento e nella degradazione dell'albumina e delle proteine plasmatiche a basso peso molecolare presenti nel filtrato glomerulare (18-22). Le proteine sono assorbite per endo o pinocitosi dal lume tubulare, vengono stipate in piccole vescicole rivestite che si fondono con gli endosomi. La proteina così assorbita viene trasferita ai lisosomi attraverso il sistema endosomiale e successivamente catabolizzata dagli enzimi proteolitici.

Il tubulo contorto prossimale ha inoltre un ruolo importante nel riassorbimento di Na^+ , HCO_3^- , Cl^- , PO_4^{3-} , H_2O e soluti organici come glucosio e aminoacidi. Circa la metà dell'ultrafiltrato viene riassorbita nel tubulo prossimale. Il riassorbimento dell'acqua è associato al riassorbimento attivo del sodio.

Pars recta L'epitelio della porzione rettilinea del tubulo prossimale è più semplice rispetto alla porzione contorta (16). Le invaginazioni laterobasali sono praticamente assenti, i mitocondri risultano piccoli e distribuiti casualmente nel citoplasma, gli spazi intercellulari sono ridotti e meno complessi. In virtù di queste caratteristiche morfologiche si ritiene che questa porzione del tubulo prossimale abbia un ruolo meno importante nel riassorbimento di soluti e di acqua.

Si osserva nella pars recta la presenza di perossisomi e di numerosi piccoli lisosomi, il cui ruolo specifico in questo segmento non è noto. I perossisomi a differenza dei lisosomi, sono rivestiti da una membrana e non contengono idrossilasi acide (15). Non è ancora certo il loro significato funzionale, si ritiene che entrino in gioco nel

metabolismo lipidico e partecipino alla beta-ossidazione degli acidi grassi. La pars recta del tubulo prossimale prende parte alla secrezione di acidi organici e di basi.

Tratti sottili dell'ansa di Henle

Il passaggio dal tubulo prossimale al tratto sottile discendente dell'ansa di Henle è brusco e segna il confine fra segmento esterno e segmento interno della midollare esterna. Studi ultrastrutturali hanno svelato che le cellule della porzione iniziale del tratto sottile discendente dell'ansa di Henle sono notevolmente complesse a causa delle numerose interdigitazioni tra cellula e cellula, mentre le cellule del tratto sottile ascendente vicino al confine con il tratto ascendente spesso e nella porzione più profonda della midollare interna hanno una struttura più semplice (23, 24).

E' generalmente accettato che le proprietà permeabili dell'epitelio del tratto sottile siano estremamente importanti per il mantenimento dell'ipertonicità midollare e per il meccanismo di concentrazione delle urine.

Tubulo distale

Il tubulo distale è formato da tre segmenti morfologicamente distinti: il tratto spesso ascendente dell'ansa di Henle (pars recta), la macula densa e il tubulo contorto distale (pars convoluta).

Segmento ascendente spesso. Il segmento ascendente spesso, o pars recta, è la porzione iniziale del tubulo distale e si può dividere in un tratto midollare e in un tratto corticale. Dal confine con il tratto sottile, il segmento spesso ascendente sale attraverso la midollare esterna e la corticale fino al glomerulo di origine dove ha sede la macula densa. Nel punto di contatto con il mesangio extraglomerulare solo la porzione di parete tubulare ad esso più vicina forma la macula densa, il passaggio nel tubulo contorto distale avviene poco oltre la macula densa. Le cellule che formano il tratto midollare più interno della midollare esterna hanno un'altezza compresa fra 7 e

8 μ (25, 26); mano a mano che il tubulo sale verso la corticale, l'altezza delle cellule si riduce progressivamente.

Le cellule di questo tratto sono caratterizzate da estese invaginazioni della membrana citoplasmatica in sede basolaterale e da interdigitazioni fra cellule contigue. Nelle estensioni laterali della cellula vi sono numerosi mitocondri di forma allungata con orientamento perpendicolare rispetto alla membrana basale. I mitocondri assomigliano a quelli del tubulo prossimale, ma contengono granuli molto evidenti. Tra gli organuli citoplasmatici si osservano un sistema di Golgi ben sviluppato, grosse quantità di reticolo endoplasmatico liscio e rugoso, alcuni corpi multivescicolari e lisosomi. Le cellule sono unite tra loro da giunzioni serrate e da giunzioni intermedie, ma non compaiono desmosomi.

Il segmento ascendente spesso è coinvolto nel processo di trasporto attivo di NaCl dal lume all'interstizio circostante, nel riassorbimento di HCO_3^- e nel trasporto di ioni bivalenti come il calcio e il magnesio.

Tubulo contorto distale. Il tubulo contorto distale, o pars convoluta, ha una lunghezza approssimativa di 1 mm (25, 27), inizia a distanza variabile dalla macula densa e si estende fino al punto di passaggio con il dotto collettore. Il passaggio dal tubulo ascendente spesso avviene bruscamente. Le cellule del tubulo contorto distale assomigliano a quelle del segmento midollare del tratto ascendente spesso, ma sono più alte. Al microscopio ottico appaiono alte e cuboidi con all'interno numerosi mitocondri; il nucleo della cellula occupa la zona centrale in posizione apicale; non esiste un orletto a spazzola ben sviluppato e nemmeno un apparato endocitico esteso come quello del tubulo contorto prossimale.

Il tubulo contorto distale è ricoperto da numerose piccole microproiezioni citoplasmatiche e i margini cellulari laterali sono serrati senza le interdigitazioni

apicali tipiche del segmento ascendente spesso, ogni cellula possiede uno o due ciglia centrali. L'epitelio di questo tratto del tubulo è caratterizzato da estese invaginazioni della membrana citoplasmatica basolaterale e da estese interdigitazioni tra le cellule adiacenti come già osservato nel segmento ascendente spesso. Al microscopio elettronico a trasmissione, nei processi laterali si osservano molti mitocondri allungati in stretta vicinanza della membrana citoplasmatica, orientati perpendicolarmente alla membrana basale e spesso estesi dalla base all'apice della cellula. Il complesso giunzionale di questo tratto di nefrone è composto da giunzioni serrate e da giunzioni intermedie. In questo tratto sono di comune osservazione lisosomi e corpi multivescicolari; l'apparato di Golgi è ben sviluppato, in posizione solitamente laterale rispetto al nucleo. La membrana basale è complessa, spesso pluristratificata e con aspetto irregolare.

Il riassorbimento del sodio e del cloro rappresenta una delle funzioni principali del tubulo contorto distale.

Segmento connettore

Rappresenta una zona di passaggio tra il nefrone distale e il dotto collettore. Nell'uomo tale passaggio è spesso istologicamente mal definito. Il segmento connettore riveste un ruolo importante nella secrezione di potassio, ed è un sito importante di riassorbimento del calcio da parte del rene.

Dotto collettore

Il dotto collettore si estende dal tubulo collettore nella corticale attraverso la midollare esterna ed interna fino all'apice della papilla. Può essere diviso in almeno tre settori in rapporto alla loro localizzazione nel rene: il dotto collettore corticale, il dotto collettore della midollare esterna e il dotto collettore della midollare interna. I

segmenti midollari interni terminano come dotti collettori papillari (dotti di Bellini) e si aprono sulla superficie della papilla a formare l'area cribrosa.

Dotto collettore corticale. Può essere suddiviso in due parti: il tubulo collettore iniziale e la porzione midollare radiale. Le cellule del tubulo collettore iniziale sono più alte di quelle del segmento midollare radiale senza ulteriori differenze morfologiche tra i due segmenti. E' composto da cellule principali e da cellule intercalate.

Le cellule principali hanno il citoplasma di colore chiaro e un numero ridotto di organuli citoplasmatici; sono caratterizzate da numerose invaginazioni della membrana citoplasmatica confinate nella regione basale delle cellule al di sotto del nucleo. Le invaginazioni non racchiudono mitocondri o altri organuli cellulari e questo fa apparire al microscopio ottico la regione basale come un bordo ciliato. Estroflessioni cellulari ed interdigitazioni a livello laterale sono praticamente assenti (28). I mitocondri sono piccoli e sparsi disordinatamente nel citoplasma. Sono presenti anche piccoli lisosomi, vacuoli autofagici, corpi multivescicolari, un reticolo endoplasmatico liscio e rugoso e ribosomi liberi. Il microscopio elettronico a scansione mostra sulla superficie luminale delle cellule principali una membrana relativamente liscia, coperta da microvilli corti e tozzi ed un unico ciglio.

Le cellule intercalate nel dotto collettore sono caratterizzate dalla presenza di svariate strutture membranose tubulo-vescicolari e di microproiezioni sporgenti sulla superficie luminale. Inoltre, sparsi nel citoplasma sono presenti numerosi mitocondri, poliribosomi e un apparato del Golgi ben sviluppato.

Studi istochimici ed immunoistochimici hanno dimostrato alti livelli di attività dell'anidrasi carbonica nelle cellule intercalate, il che suggerisce che queste cellule

siano coinvolte nell'acidificazione delle urine e che siano inoltre in grado di riassorbire e secernere bicarbonato e potassio.

Dotto collettore della midollare esterna E' costituito da cellule principali e da cellule intercalate. Le cellule principali del dotto collettore della midollare esterna sono strutturalmente simili a quelle presenti nel dotto collettore della corticale. Le cellule diventano leggermente più alte e il numero di organuli e le invaginazioni basali diminuiscono con la discesa del dotto collettore nella midollare esterna. Il dotto collettore della midollare esterna svolge un ruolo importante nell'acidificazione delle urine.

Dotto collettore della midollare interna. Si estende dal confine tra la midollare esterna e quella interna fino all'apice della papilla. Man mano che i dotti collettori penetrano nella midollare interna subiscono delle fusioni successive dalle quali si formano un numero ridotto di tubuli di diametro maggiore. I dotti finali di Bellini si aprono sulla punta della papilla a formare l'area cribrosa. L'epitelio dei dotti di Bellini è alto, colonnare e simile a quello che riveste l'apice della papilla. Questo tratto del dotto collettore, oltre ad essere anch'esso coinvolto nel processo di acidificazione delle urine, prende parte al riassorbimento di sodio (29-31), cloro (32), potassio (31), urea ed acqua (33).

Interstizio

L'interstizio è composto dalle cellule interstiziali e da una matrice extracellulare ampia e fioccosa costituita da glicosaminoglicani solfati e non solfati (34, 35). Nella corticale il tessuto interstiziale è ridotto e i tubuli e i capillari hanno spesso direzioni opposte. Nell'uomo è stato dimostrato che il volume relativo di tessuto interstiziale della corticale è dell'11,7% ±5,5% nei reni di soggetti al di sotto di 36 anni e del 15,7% ±3,0% nei soggetti più anziani (36).

Interstizio della corticale. L'interstizio della corticale può essere suddiviso in un ampio spazio interstiziale, localizzato tra due o più tubuli adiacenti, e in uno spazio interstiziale più stretto, tipo fessura, localizzato tra la base della membrana di un unico tubulo ed il capillare peritubulare contiguo (37, 38).

Vi sono due tipi di cellule interstiziali nella corticale: la prima assomiglia ad un fibroblasto (cellula di tipo 1 dell'interstizio della corticale) e la seconda, più rara, è simile ai monociti o ai linfociti (cellula di tipo 2 dell'interstizio della corticale) (34, 37). Le cellule di tipo 1 si trovano tra la membrana basale dei tubuli adiacenti e i capillari peritubulari; hanno un aspetto stellato e contengono un nucleo a contorno irregolare e un reticolo endoplasmatico liscio e rugoso ben sviluppato. Le cellule di tipo 2 sono generalmente rotondeggianti con citoplasma uniforme e pochi organuli intracellulari. Lo spazio interstiziale contiene un materiale lasso e fioccoso di densità ridotta con piccoli fasci di fibrille collagene.

Intertizio della midollare Le cellule interstiziali della midollare interna sono in gran parte cellule di tipo 1 contenenti lipidi (39), e assomigliano alle cellule di tipo 1 contenute nella corticale. Contengono una gran quantità di reticolo endoplasmatico rugoso che è spesso in continuità con elementi della membrana citoplasmatica liscia. I mitocondri sono rari e non orientati nel citoplasma. Sono presenti pochi lisosomi con rari vacuoli endocitici, sebbene le cellule interstiziali siano in realtà capaci di endocitosi di materiale corpuscolato.

La funzione delle cellule interstiziali di tipo 1 è sconosciuta .

LA NEFROPATIA DIABETICA

Anatomia patologica del rene diabetico

Le alterazioni morfologiche della nefropatia diabetica nei pazienti con diabete di tipo 1 sono caratteristiche di questa malattia, e ben distinguibili dalle altre patologie renali

(40).

L'anomalia che si sviluppa piu' precocemente, sin da pochi anni dopo l'insorgenza della malattia e durante la fase di assenza di alterazioni funzionali renali, è l'ispessimento della membrana basale glomerulare, della membrana basale tubulare e della capsula di Bowman. In seguito insorge una ialinosi della arteriola glomerulare soprattutto afferente, ma anche efferente, caratterizzata dall'accumulo di proteine plasmatiche (immunoglobuline, complemento, fibrinogeno, albumina). Simili alterazioni almeno in parte, potrebbero essere secondarie a processi essudativi (41, 42).

Il coinvolgimento tanto dell'arteriola afferente che dell'efferente è considerato patognomonico della nefropatia diabetica. Il terzo tipo di lesione e la piu' importante da un punto di vista funzionale è l'espansione del mesangio (43), che si riscontra generalmente dopo una durata di malattia di almeno cinque anni. L'espansione mesangiale puo' assumere differenti quadri morfologici: di tipo diffuso o di tipo nodulare, spesso coesistenti. L'espansione mesangiale é causata prevalentemente da un accumulo di matrice extracellulare (collagene di tipo IV e VI, laminina, fibronectina ed altro) (44). Tale espansione comporta una progressiva riduzione della superficie di filtrazione del rene (43). L'espansione mesangiale, evolvendo, comporta una progressiva occlusione dei capillari glomerulari che determina, come evento finale, la sclerosi completa della matassa glomerulare (43). Un quarto tipo di lesione spesso rilevabile nei pazienti con diabete di tipo 1 é l'espansione e la fibrosi interstiziale (45). Differentemente dall'espansione mesangiale, dove l'accumulo di matrice svolge un ruolo cruciale, l'espansione interstiziale pare collegata negli stadi precoci ad un aumento della componente cellulare dell'interstizio e solo negli stadi più tardivi ad un aumento della componente di matrice.

Inoltre anche i tubuli vanno incontro a importanti modificazioni strutturali, con ispessimento e reduplicazione della membrana basale tubulare, cui possono far seguito processi di atrofia (46). Tali lesioni istologiche se esaminate singolarmente non rappresentano una caratteristica peculiare della malattia diabetica: è il riscontro contemporaneo di tali anomalie che configura il quadro patognomonico della glomerulopatia diabetica. Per quanto riguarda il rapporto tra alterazioni istologiche e caratteristiche funzionali renali, studi morfometrici quantitativi hanno dimostrato che la lesione più strettamente correlata alla comparsa dell'albuminuria e al declino della funzione renale nel diabete di tipo 1, è l'espansione del mesangio; in particolare l'accumulo della matrice mesangiale (43). Quando osserviamo il tessuto renale proveniente dalla biopsia renale al microscopio elettronico possiamo definire, come indice di espansione mesangiale, il volume frazionale del mesangio. Quando il mesangio si espande, restringe il lume dei capillari glomerulari, diminuendo la superficie di filtrazione glomerulare, e ciò determina il decremento del GFR nei pazienti con diabete di tipo 1 (43). Il $V_v(\text{mes}/\text{glom})$ è anche correlato alla presenza di alterata AER e all'ipertensione arteriosa (43). Diversamente, sempre nel diabete di tipo 1, l'ispessimento della membrana basale glomerulare (GBM) non è così strettamente correlato all'andamento del GFR e alla presenza o assenza di ipertensione arteriosa, sebbene esista una correlazione tra ispessimento della membrana basale e AER (43).

Inoltre è stato recentemente riportato in uno studio longitudinale con biopsie renali sequenziali, eseguite in pazienti affetti da diabete di tipo 1 in un periodo di 5 anni, che il solo parametro morfometrico associato all'incremento dell'albuminuria era il volume frazionale del mesangio [$V_v(\text{mes}/\text{glom})$] (47). Non sono state descritte correlazioni significative tra gli indici di funzionalità renale e l'ispessimento della

capsula di Bowman o altre lesioni essudative. Recentemente si e' ipotizzato che anche alterazioni a livello dei podociti, abbiano un ruolo nel determinare un'aumentata permeabilita' alle proteine. Bjorn et coll. trovarono, che lo spessore dei pedicelli dei podociti (FPW) a livello della membrana basale periferica era aumentato nei pazienti con diabete di tipo 1 e microalbuminuria, rispetto ai normoalbuminurici, e che lo spessore delle fessure di filtrazione era aumentato nei pazienti normoalbuminurici e microalbuminurici rispetto ai controlli (48). Ellis e coll. trovarono invece, significative alterazioni della struttura dei podociti solo nei pazienti con diabete di tipo 1 e proteinuria, mentre non c'erano differenze per tali parametri tra microalbuminurici e normoalbuminurici, sebbene lo spessore dei pedicelli e la densita' delle fessure di filtrazione correlassero con l'alterata velocita' di escrezione dell'albumina quando tutti i pazienti venivano inclusi nell'analisi (49).

Meno numerosi e piu' recenti sono gli studi che valutano le caratteristiche istologiche della nefropatia nei pazienti con diabete di tipo 2. Parving e coll. (50), in seguito a studi effettuati su campioni bioptici di diabetici di tipo 2 proteinurici, hanno osservato una elevata prevalenza di nefropatie non diabetiche (glomerulonefrite a lesioni minime, glomerulonefrite mesangioproliferativa, ed altre) del 23%. Anche Gambarà e coll. (51) hanno riscontrato una eterogeneità delle alterazioni istologiche dei pazienti con diabete di tipo 2 proteinurici, rilevando un quadro tipico di nefropatia diabetica solo nel 37% dei pazienti studiati. Recentemente comunque, lo stesso gruppo di ricerca ha descritto la presenza di glomerulopatie non diabetiche solo nel 18% di una coorte di 65 pazienti proteinurici, affetti da diabete di tipo 2 (52). Olsen e Mogensen hanno osservato patologie renali non diabetiche solo nel 12% dei pazienti valutati (53). Ad aumentare la contraddittorietà dei dati in letteratura hanno contribuito anche studi autoptici, che non hanno confermato alcuna differenza nella prevalenza di

nefropatie non diabetiche fra soggetti con diabete di tipo 2 e soggetti non diabetici comparabili per età (54-57). Questi studi coinvolgevano tutti pazienti che presentavano un andamento clinico atipico della nefropatia. In tali pazienti molto spesso, le biopsie venivano effettuate a scopo diagnostico proprio nei casi in cui la patogenesi del danno renale non appariva chiara. I risultati di questi studi quindi, non riflettono ciò che avviene nella maggior parte dei pazienti diabetici di tipo 2 proteinurici. Il nostro gruppo di ricerca ha pubblicato i dati di uno studio effettuato su pazienti con diabete di tipo 2 microalbuminurici, dimostrando una eterogeneità del tipo delle lesioni strutturali renali (58). Soltanto il 30% dei pazienti esaminati presentava il quadro tipico della glomerulopatia diabetica (Categoria CII). Un altro 30% presentava una struttura normale o quasi normale (Categoria CI) nonostante la presenza di alterazioni costanti della velocità di escrezione dell'albumina. Il restante 40% presentava un quadro di lesioni renali "atipiche", con prevalenza di alterazioni arteriolari (ialinosi marcata delle arteriole glomerulari, talora associata ad aterosclerosi dei vasi di calibro maggiore), tubulari (atrofia tubulare, ispessimento e sdoppiamento della membrana basale tubulare) ed interstiziali (fibrosi interstiziale), in presenza di una struttura glomerulare normale o con modeste alterazioni rispetto alla glomerulopatia diabetica tipica (Categoria CIII). Tali lesioni erano presenti in varie combinazioni nei pazienti della categoria CIII; in tutti comunque si sono osservate le alterazioni tubulo-interstiziali, spesso associate ad alterazioni vascolari e talora, a glomerulosclerosi globale. Per quanto riguarda le caratteristiche cliniche dei pazienti suddetti, appare importante sottolineare che i pazienti con lesioni renali tipiche della nefropatia diabetica (CII), presentavano una più lunga durata di malattia ed un peggior controllo metabolico rispetto a quelli delle altre due categorie. Gli studi morfometrici nei pazienti con diabete di tipo 2 sono attualmente pochi; un gruppo di

ricercatori giapponesi ha descritto nel diabete di tipo 2 correlazioni morfo-funzionali simili a quelle dei pazienti con diabete di tipo 1, suggerendo che anche nel diabete di tipo 2, le lesioni glomerulari svolgono un ruolo determinante nel causare la perdita di funzione renale (57). Gli studi morfometrici condotti da Osterby e coll. in un piccolo gruppo di pazienti caucasici con diabete di tipo 2 e proteinuria suggeriscono che in questi pazienti i parametri glomerulari sono mediamente alterati, tuttavia le lesioni sono meno avanzate che nei pazienti con diabete di tipo 1 proteinurici, ed alcuni individui presentano struttura glomerulare ancora nei limiti di norma (59). In accordo con questi riscontri, uno studio negli Indiani Pima dimostra, seppur in un limitato campione di osservazione, che non vi sarebbero significative differenze nell'ultrastruttura glomerulare tra i pazienti con diabete di tipo 2 di lunga durata e normoalbuminuria, rispetto ai pazienti con microalbuminuria (60). I parametri strutturali glomerulari risultavano significativamente alterati solo nei pazienti con proteinuria clinica. Tali alterazioni riguardano non solo il volume frazionale del mesangio e lo spessore della membrana basale glomerulare, ma anche altri parametri quali lo spessore dei pedicelli e il numero di podociti per glomerulo. Alla luce di questi riscontri, gli Autori concludono ipotizzando che negli Indiani Pima, la diminuzione del numero di podociti e l'ispessimento dei pedicelli possono essere indicati come fattori prognostici per l'evoluzione verso la nefropatia conclamata (60). Concetto poi rinforzato da uno studio longitudinale della durata di 4 anni (61).

Anche il nostro gruppo di ricerca ha analizzato le correlazioni morfo-funzionali in una vasta corte di diabetici di tipo 2 confermando una relazione importante tra AER, spessore della GBM e $V_v(\text{mes}/\text{glom})$ ed una correlazione significativa tra GFR e $V_v(\text{mes}/\text{glom})$. Questi dati sottolineano quindi l'importanza dell'espansione mesangiale nelle genesi della perdita di funzione renale anche nel diabete di tipo 2.

Non solo, il nostro gruppo di ricerca ha recentemente evidenziato che la densità di podociti per glomerulo [Nv(epi/glom)] diminuisce nei pazienti con alterata AER rispetto ai normoalbuminurici e che nei pazienti microalbuminurici e proteinurici la densità delle fessure di filtrazione (FSLv/glom) è diminuita mentre lo spessore dei pedicelli è aumentato rispetto ai normoalbuminurici. Tali parametri inoltre correlavano significativamente con l'AER suggerendo che modificazioni della densità e della struttura dei podociti intervengono nella patogenesi del danno funzionale renale (62).

Rapporti tra alterazioni strutturali glomerulari e tubulo-interstiziali nella patogenesi della nefropatia diabetica

La scoperta che le cellule dei tubuli e dell'interstizio si modificano quando esposte al glucosio (63) suggerisce che queste cellule possano contribuire direttamente ai cambiamenti patologici della nefropatia diabetica piuttosto che essere solo una conseguenza del danno glomerulare.

L'identificazione di una comunicazione bidirezionale tra questi due tipi di cellule (64) e di rapporti con cellule immunitarie, insieme alla capacità di trasformazione fibroblastica delle cellule dell'epitelio tubulare sottolineano la complessità della via metabolica fibrogenica nel tubulo-interstizio (65-66).

Sebbene infatti le cellule dell'epitelio tubulare sintetizzano TBM e i fibroblasti interstiziali possano essere ampiamente responsabili della fibrosi interstiziale di per sé, si pensa che intervengano anche altri fattori che comportano l'interazione tra i vari componenti cellulari del tubulo-interstizio innescando un sistema a cascata che ha come risultato finale la tipica destrutturazione dell'architettura di questo compartimento osservabile nella nefropatia diabetica.

I cambiamenti fisiopatologici che si sviluppano nel diabete non sono limitati all'iperglicemia, ma includono alterazioni di ormoni vasoattivi, formazioni di prodotti terminali di glicazione (AGEs), cambiamenti emodinamici, attivazione di varie vie metaboliche secondarie, stress ossidativi, attivazione della proteina chinasi C (67, 68). Il meccanismo attraverso il quale la fibrosi tubulo-interstiziale si sviluppa in associazione con il danno glomerulare e' stata materia di speculazioni conseguenti all'apprendimento del ruolo del tubulo interstizio nella progressione della nefropatia diabetica. I meccanismi proposti comprendono la produzione di citochine prosclerotiche sia da parte dei glomeruli che del tubulo-interstizio, l'aumentata filtrazione di albumina a livello glomerulare l'eccessivo riassorbimento di proteine da parte del tubulo prossimale porta ad una infiammazione peritubulare e fibrosi, a vasocostrizione postglomerulare con rarefazione dei capillari peritubulari con ischemia tubulare e atrofia conseguente (69).

In un modello di ratto con glomerulosclerosi focale segmentale, il danno glomerulare era associato a fuoriuscita del filtrato nello spazio periglomerulare e peritubulare che portava allo sviluppo di fibrosi periglomerulare e peritubulare.

Nel diabete il danno funzionale renale potrebbe essere quindi conseguenza della contemporanea presenza di un danno glomerulare e tubulare, ma anche, quando la degenerazione tubulare progredisce piu' rapidamente della fibrosi glomerulare, la conseguenza della formazione di glomeruli atubulari con ansa capillare aperta, il GFR potrebbe, in altre parole, diminuire come risultato della sclerosi glomerulare o come conseguenza della perdita di connessione tra glomerulo e tubulo prossimale.

Nella nefropatia diabetica, la presenza di alcuni glomeruli atubulari era gia' stata documentata (70-72). Recentemente Najafian et al (73) hanno studiato la giunzione glomerulo-tubulare in pazienti proteinurici con diabete di tipo 1. Le giunzioni

glomerulo tubulari sono state classificate come i tubuli normali (NT), tubuli atrofici (AT) con epitelio sottile o glomeruli atubulari (AG) senza connessione tubulare. AT furono ulteriormente suddivisi in tubuli atrofici corti (SAT) con atrofia tubulare all'inizio del tubulo prossimale e tubuli atrofici lunghi (LAT) con atrofia tubulare più diffusa e tubuli atrofici senza una osservabile apertura glomerulare (ATNO).

Il 17% dei glomeruli era atubulare e il 5% era attaccato a tubuli atrofici.

Queste lesioni a livello glomerulo-tubulare erano inoltre correlate con il GFR suggerendone un ruolo nella genesi della perdita di funzione renale nel diabete di tipo 1.

L'osservazione che nel diabete si sviluppano sia lesioni tubulo-interstiziali che glomerulari non è nuova. Tuttavia, ci sono alcune importanti differenze nel modo in cui entrambe queste regioni sono esposte a vari fattori biochimici ed emodinamici. Queste differenze potrebbero spiegare i risultati di Bader et al, che in uno studio su 103 pazienti con vari gradi di glomerulosclerosi riporta che oltre alla significativa correlazione tra volume interstiziale corticale e creatinina sierica, c'era una dissociazione tra danno glomerulare e disfunzione renale in un sottogruppo di pazienti (74)

In questi casi, lesioni glomerulari gravi erano accompagnate da normale creatinina sierica se l'interstizio non mostrava cambiamenti fibrotici, e viceversa, modeste lesioni glomerulari accompagnate da fibrosi interstiziale si accompagnavano sempre ad elevate concentrazioni di creatinina sierica.

Più recentemente, in uno studio su pazienti con diabete di tipo 2 microalbuminurici, Fioretto et al, hanno riportato che il pattern con malattia tubulo-interstiziale predominante era il tipo istologico più comune, essendo presente nel 41,2% dei

pazienti studiati, mentre cambiamenti tubulo-interstiziali e glomerulari presenti contemporaneamente si riscontravano solo nel 29% dei pazienti (75)

Il complesso meccanismo responsabile delle lesioni renali nel diabete e in particolare dell'interstizio rimangono poco note e coinvolgono complessi meccanismi.

Storia naturale della nefropatia diabetica

La storia naturale della nefropatia diabetica e la descrizione dei quadri clinici ed istologici derivano, prevalentemente, dallo studio di pazienti affetti da diabete di tipo 1. Studi recenti suggeriscono che le caratteristiche cliniche ed istologiche della nefropatia diabetica sono differenti nel diabete di tipo 1 rispetto al diabete di tipo 2. E' probabile che altri fattori patogenetici legati a differenti entità nosologiche, quali ad esempio l'ipertensione arteriosa e l'aterosclerosi, contribuiscano a determinare l'insorgenza e l'evoluzione della nefropatia diabetica.

Sono stati descritti nel diabete di tipo 1 cinque stadi evolutivi (76):

Stadio I: aumento del flusso plasmatico renale (Renal Plasma Flow o RPF) e della velocità di filtrazione glomerulare (Glomerular Filtration Rate o GFR), accompagnati dalla comparsa di ipertrofia renale. In questo stadio non sono presenti lesioni istologiche renali (*fase di esordio della nefropatia*). Tali anomalie si riscontrano nella maggior parte dei pazienti con diabete di tipo 1, ed alcuni autori (77,78), ma non tutti (79), considerano l'iperfiltrazione glomerulare responsabile dello sviluppo del danno renale. Dati controversi sono stati riportati nel diabete di tipo 2, dal momento che l'iperfiltrazione glomerulare è stata dimostrata solo negli Indiani Pima (80) e in alcune popolazioni caucasiche (81, 82).

Stadio II: a distanza di alcuni anni dall'esordio del diabete di tipo 1 iniziano a comparire lesioni istologiche a livello glomerulare, anche in assenza di una evidente sintomatologia clinica e in particolare di alterazioni della velocità di escrezione

urinaria di albumina (AER). Spesso in questo stadio vi è una riduzione dell'iperfiltrazione. Questi pazienti iniziano a presentare anomalie della morfologia renale, come un ispessimento della membrana basale glomerulare, un'espansione del volume mesangiale o addirittura i tipici noduli di Kimmestiel-Wilson (83,84). È importante sottolineare che circa il 60-80% dei pazienti con diabete di tipo 1 e circa il 70-80% dei pazienti con diabete di tipo 2, non superano il secondo stadio (85).

Stadio III: comparsa di minime quantità di albumina escreta nelle urine (microalbuminuria: 20-200 µg/min), generalmente dopo circa 10 anni di durata del diabete (*fase della nefropatia incipiente*). È stato dimostrato che nel diabete di tipo 1, l'ipertensione arteriosa è strettamente correlata con la presenza della microalbuminuria (86-88). Studi longitudinali (89,90) sulla storia naturale della funzionalità renale, come pure il riscontro di una predisposizione familiare all'ipertensione arteriosa nel diabete di tipo 1 con nefropatia (91,92), suggeriscono che l'ipertensione di per sé potrebbe assumere un ruolo importante nella patogenesi e nella progressione della nefropatia. Nel diabete di tipo 2 meno chiara è la relazione tra la presenza dell'ipertensione arteriosa e quella della microalbuminuria, dal momento che spesso i pazienti sono ipertesi, ma non nefropatici (93,94). Negli Indiani Pima con diabete di tipo 2 o con ridotta tolleranza glucidica, l'ipertensione sembra precedere la comparsa della microalbuminuria (95,96). Valori elevati di pressione arteriosa, in particolar modo sistolica, possono essere un fattore fondamentale nel determinare un progressivo deterioramento della funzione renale (97, 98).

Stadio IV: progressione del danno renale con comparsa di proteinuria persistente (>200 µg/min) che prelude al calo del GFR (*nefropatia conclamata*). Studi di follow up nei pazienti con diabete di tipo 1 macroalbuminurici ipertesi hanno indicato che la velocità del decremento annuo del GFR si aggira intorno a 10-12

ml/min/1.73m²/anno. Uno stretto controllo metabolico e pressorio riduce la caduta del GFR a 3-5 ml/min/1.73m²/anno. Gall e coll. (99) in uno studio prospettico condotto in pazienti con diabete di tipo 2 proteinurici di razza caucasica, osservarono una diminuzione media del GFR per anno di 5.7 ml/min/1.73m². La pressione sistolica media durante lo studio era l'unico fattore che influenzava significativamente la velocità di riduzione della funzione renale.

Stadio V: insorgenza di uno stato di insufficienza renale terminale, con perdita totale o subtotale della capacità di filtrazione renale (*fase dell'insufficienza renale terminale o ESRD*). In questo stadio l'unica terapia possibile e' il trattamento dialitico o il trapianto renale. In tale fase il sommarsi delle complicanze croniche del diabete, accanto alle complicanze dell'uremia, compromettono seriamente la sopravvivenza del paziente.

La microalbuminuria

In passato si riteneva che un'alterata velocità di escrezione urinaria dell'albumina tra 20 e 200 µg/min (microalbuminuria) fosse in grado di predire l'insorgenza di nefropatia manifesta, con presenza nelle urine di quantità macroscopiche di proteine, in circa l'80% dei pazienti con diabete di tipo 1.

Nel diabete di tipo 2 invece, la microalbuminuria é stata considerata un fattore predittivo piu' attendibile di mortalità cardiovascolare piuttosto che di insufficienza renale terminale (100-104). Studi del passato indicavano che solo il 20% circa dei pazienti microalbuminurici con diabete di tipo 2, progrediva verso la nefropatia manifesta durante un follow up di 10 anni (104). Il basso valore predittivo della microalbuminuria nel diabete di tipo 2, nei confronti della nefropatia conclamata veniva giustificato dal fatto che i pazienti con diabete di tipo 2 presentavano alla

diagnosi di diabete, una età piu avanzata rispetto a quella dei pazienti di tipo 1. Si supponeva cosi', che alcuni pazienti andassero incontro ad exitus per l'insorgenza di malattie cardiovascolari prima che la nefropatia avesse potuto manifestarsi. Infatti non si deve dimenticare che alterazioni dei lipidi plasmatici, ipertensione arteriosa ed anormalità dell'emostasi, tutti fattori di rischio cardiovascolare, sono spesso associati alla presenza di microalbuminuria nel diabete di tipo 2. Studi piu' recenti hanno invece evidenziato che il rischio di progressione dalla microalbuminuria alla proteinuria e' simile nel diabete di tipo 1 e nel diabete di tipo 2, e si aggira intorno al 40% (105). Probabilmente un ruolo importante nel modificare tale velocita' e' stato giocato dall'aumento della sopravvivenza, imputabile alla ridotta mortalita' cardiovascolare a cui si sta assistendo in questi ultimi anni nel diabete di tipo 2. Inoltre, rispetto agli anni Ottanta, l'autocontrollo delle glicemie ed i piu' moderni mezzi di somministrazione dell'insulina hanno fatto si che il controllo metabolico sia migliorato; l'uso inoltre di farmaci antiipertensivi "nuovi" ha permesso un controllo piu' stretto dei valori pressori. Sono state avanzate piu' ipotesi in letteratura per spiegare la patogenesi della microalbuminuria nel paziente diabetico. L'ipotesi che l'incremento della escrezione urinaria di albumina sia di origine glomerulare è abbastanza plausibile dato che tutti i pazienti con diabete di tipo 1, e nel 30-50% dei pazienti con diabete di tipo 2 e micro o macroalbuminuria, si presentano lesioni a carico della struttura glomerulare. La diminuzione della selettività di carica elettrostatica della membrana basale glomerulare, definita dal rapporto tra le clearance di IgG totali e IgG4, riscontrata nei pazienti con diabete di tipo 1 con nefropatia (106-111) e' stata messa in relazione al decremento nel contenuto di proteoglicani eparan-solfati della membrana basale glomerulare. Quindi, essendo l'albumina una proteina anionica, l'incremento della albuminuria potrebbe essere messo in relazione con la

perdita di carica elettrica negativa della membrana basale glomerulare. Tuttavia, la diminuzione del contenuto in proteoglicani eparansolfati della membrana basale glomerulare, pur dimostrata dallo studio delle biopsie renali di pazienti con diabete in fase avanzata, non è stata riscontrata in pazienti microalbuminurici. Alterazioni della funzione tubulare potrebbero spiegare, almeno in parte, la patogenesi dell'alterata AER nei pazienti con diabete di tipo 2, che abbastanza frequentemente presentano lesioni tubulo-interstiziali. Il riscontro di elevati valori urinari di α 1-microglobulina, una proteina a basso peso molecolare che viene riassorbita quasi completamente a livello tubulare nei soggetti normali, può supportare l'ipotesi di un danno tubulare come fattore patogenetico della microalbuminuria (112). Altri autori suggeriscono che alterazioni della funzionalità endoteliale determinino la comparsa della microalbuminuria (113,114). Il riscontro in pazienti con diabete di tipo 1, della associazione tra un aumento della permeabilità capillare all'albumina e gli indici di un'alterata funzionalità endoteliale quali: aumentati livelli plasmatici del fattore di von Willebrand (115,116), aumentata attività plasmatica della prorenina e delle concentrazioni ematiche dell'attivatore tissutale del plasminogeno, hanno indotto Deckert e coll. nell'89 a formulare la cosiddetta "Steno Hypotesis", secondo la quale la microalbuminuria riflette un danno vascolare diffuso (microangiopatia e macroangiopatia grave) conseguente ad una disfunzione endoteliale generalizzata. Più di recente Parving e coll. hanno descritto, nei pazienti con diabete di tipo 2 nefropatici, sia un aumento progressivo dei livelli plasmatici del fattore di von Willebrand con l'aumentare dei valori della microalbuminuria sia una maggior incidenza di retinopatia diabetica e cardiopatia ischemica rispetto ai pazienti non neuropatici. Questo suggerirebbe l'ipotesi che una disfunzione endoteliale generalizzata, potrebbe costituire la base patogenetica comune sia della

microalbuminuria che della macroangiopatia nei pazienti con diabete di tipo 2 (117-125). Da un punto di vista ultrastrutturale nel diabete di tipo 1, la microalbuminuria si associa alla presenza di glomerulopatia diabetica con espansione mesangiale ed ispessimento della membrana basale glomerulare. Recenti studi sull'ultrastruttura glomerulare indicano che anche modificazioni del numero e della struttura delle cellule epiteliali glomerulari (podociti), in particolare un aumento di spessore dei pedicelli (foot processes), possono avere un ruolo nella patogenesi dell'albuminuria e nella progressione della nefropatia diabetica, sia nel diabete di tipo 1 che nel diabete di tipo 2. Tale ipotesi assume una particolare importanza soprattutto in quei pazienti con diabete di tipo 2 e microalbuminuria o proteinuria che non presentano un'evidente alterazione della struttura glomerulare, espansione mesangiale ed ispessimento della GBM, tale da giustificare l'aumentata velocità di escrezione dell'albumina.

SCOPO DELLA TESI

In una coorte di pazienti affetti da diabete di tipo 2 con differenti livelli di escrezione urinaria di albumina (AER) abbiamo:

a) quantificato mediante analisi morfometrica associata alla microscopia elettronica lo spessore della membrana basale tubulare (TBM width) e la percentuale di citoplasma delle cellule del tubulo prossimale occupato da spazi vuoti [$V_v(ES/cit)$].

b) quantificato mediante microscopia ottica il grado di espansione interstiziale [$V_v(Int/cortex)$] e la percentuale di tubuli atrofici [$V_v(Ta/Tt)$].

c) valutato le correlazioni tra i parametri strutturali studiati ed i principali parametri di funzionalità renale: velocità di filtrazione glomerulare (GFR) e velocità di escrezione urinaria dell'albumina (AER)

d) Negli stessi paziente erano stati precedentemente valutati lo spessore della membrana basale glomerulare (GBM width) e il volume frazionale del mesangio [$V_v(mes/glom)$]. Abbiamo quindi valutato le relazioni tra lesioni tubulari ed interstiziali e lesioni glomerulari.

MATERIALI E METODI

Questi studi sono stati approvati dal Comitato Etico dell'Università di Padova, i pazienti sottoscrivevano un consenso informato scritto prima dell'esecuzione degli studi.

Pazienti

Quaradue pazienti con diabete di tipo 2 sono stati reclutati. I pazienti sono stati valutati durante un periodo di ricovero presso la Clinica Medica I dell'Università di Padova.

La diagnosi di Diabete Mellito di tipo 2 è stata formulata in accordo con i criteri dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (1985).

I criteri di inclusione dei pazienti erano:

- 1) Riscontro di diabete mellito ad un età superiore ai 40 anni
- 2) Durata nota del diabete di almeno 2 anni
- 3) Assenza di terapia insulinica e di chetosi per i primi 2 anni di malattia
- 4) Esclusione di ipertensione arteriosa secondaria
- 5) Creatininemia inferiore a 2 mg/dl
- 6) Assenza di litiasi renale
- 7) Esclusione di monorene
- 8) Nessun trattamento con FANS o anticoagulanti nelle due settimane precedenti lo studio

METODI

I pazienti sono stati ricoverati presso la Clinica Medica I dell'Università di Padova. Durante il ricovero sono stati eseguiti: anamnesi, esame clinico, esami ematochimici, misurazione della pressione arteriosa, valutazione della velocità di escrezione urinaria

dell'albumina (AER) in tre diverse raccolte durante sospensione della terapia antiipertensiva, valutazione della velocità di filtrazione glomerulare (GFR) ed esecuzione della biopsia renale ecoguidata. In tutti i pazienti veniva inoltre eseguito il fundus oculi, per l'identificazione della eventuali anomalie della struttura retinica.

Valutazione della velocità di escrezione dell'albumina (AER)

In tutti i pazienti venivano valutati i valori della velocità di escrezione urinaria dell'albumina (AER) mediante metodo immunoturbimetrico su 3 raccolte urinarie delle 24 ore, dopo aver escluso la presenza di infezioni delle vie urinarie (126).

In base ai valori medi di escrezione urinaria dell'albumina basale i pazienti sono stati divisi in: 1) normoalbuminurici (NA) con AER <20 µg/min 2) microalbuminurici (MA) con AER tra 20 e 200 µg/min, 3) proteinurici (P) con AER > 200 µg/min.

Valutazione dell'emoglobina glicata (HbA_{1c})

L'emoglobina glicata (HbA_{1c}) veniva valutata utilizzando il metodo cromatografico HPLC (DIAMAT Analyzer, BIO-RAD, California) (127).

Valutazione della velocità di filtrazione glomerulare (GFR)

La velocità di filtrazione glomerulare (GFR) è stata misurata mediante il calcolo della clearance plasmatica del ⁵¹Cr-EDTA. A paziente a digiuno da almeno 12 ore veniva posizionata una cannula di Venflo in una vena dell'avambraccio e veniva iniettato il tracciante. Una seconda cannula veniva posizionata a livello dell'avambraccio controlaterale per poter eseguire i prelievi ematici. Quest'ultima veniva mantenuta pervia con iniezione periodica di 0.5-0.7 ml di soluzione isotonica; il primo ml di ogni campione veniva scartato per evitare la possibile conseguente emodiluizione. Dopo aver raccolto un campione per la determinazione della radioattività naturale veniva eseguito un bolo endovenoso di 1µCi/kg di ⁵¹Cr -EDTA tale dose era stata calcolata sulla base della clearance della creatinina secondo la formula di Cockcroft and Gault

(128) . Dopo l'iniezione del tracciante venivano raccolti 19 campioni di sangue venoso (5/6 ml) 1, 2, 3, 5, 7, 10, 12,5, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 80, 120, 180, 240, 300 minuti dopo il tempo 0, considerando come tempo 0, il 15 secondo del tempo di infusione del tracciante (129). Una funzione bi-esponenziale è stata utilizzata per descrivere la scomparsa dal plasma del $^{51}\text{Cr-EDTA}$:

$$c(t) = A_1 \exp(-a_1 t) + A_2 \exp(-a_2 t)$$

dove c = radioattività plasmatica misurata del $^{51}\text{Cr-EDTA}$, t = tempo, A_1 , A_2 , a_1 , a_2 , sono parametri. La somma $A_1 + A_2$ è l'intercetta al tempo 0, mentre a_1 e a_2 sono costanti di tempo. I quattro parametri sono stati stimati dall'andamento nel tempo di una singola radioattività plasmatica, per regressione ai minimi quadrati non lineari . Ottenuta una stima accurata di A_1 , A_2 , a_1 e a_2 i parametri sono stati utilizzati per l'area sottostante alla curva (AUC) di radioattività plasmatica del tracciante, estrapolata all'infinito tramite la relazione: $\text{AUC} = (A_1/a_1) + (A_2/a_2)$. La velocità di clearance plasmatica del $^{51}\text{Cr-EDTA}$, ossia il GFR, si otteneva dividendo la dose totale somministrata conosciuta per l'AUC (129).

Biopsia renale percutanea

La biopsia renale percutanea ecoguidata è stata eseguita in anestesia locale con ago modificato True-cut. Il tessuto ottenuto da ogni prelievo veniva immediatamente esaminato al microscopio a dissezione per valutare l'adeguatezza del campione, ossia la quantità di tessuto corticale presente. La maggior parte del tessuto veniva quindi fissata in soluzione di Zenker per un'ora, lavato con acqua, disidratato ed incluso in paraffina. Si provvedeva poi a preparare delle sezioni dello spessore di 2 mm, destinate alla colorazione con ematossilina-eosina ed Acido Periodico-Schiff (PAS), per la lettura al microscopio ottico. Parte del tessuto veniva immediatamente congelata in azoto liquido ed utilizzata per gli studi di immunofluorescenza in cui veniva

valutata la presenza di: immunoglobuline IgG, IgA, IgM; fibrinogeno, C3, C4, C1q.

Infine 3-4 frammenti delle dimensioni di circa 1 mm^3 venivano fissati in glutaraldeide al 2.5% in tampone Millonig, per gli studi di microscopia elettronica.

ANALISI MORFOMETRICA

Microscopia elettronica

Per l'analisi al microscopio elettronico il tessuto è stato fissato in glutaraldeide al 2,5% in tampone Millonig ed incluso in Polybed 812. Sono state preparate all'ultramicrotomo con lama di vetro sezioni dello spessore di 1μ che sono state poi colorate con blu di toluidina in modo da poter valutare al microscopio ottico la presenza di almeno un glomerulo intatto ed un numero di profili tubulari sufficienti per l'analisi morfometrica.

Solo sezioni che presentavano un numero di profili tubulari da 20 a 40 sono state prese in considerazione per la microscopia elettronica.

Si sono successivamente ottenute delle sezioni ultrasottili, dello spessore di 500A-600A, all'ultramicrotomo con lama di diamante che sono state raccolte su retini a buco singolo ricoperti da membrana di Formvar. Dopo colorazione con acetato di uranile e citrato di piombo, le sezioni sono state analizzate al microscopio elettronico a trasmissione.

Spessore della membrana basale del tubulo prossimale (TBM width)

Il segmento prossimale del tubulo prossimale (PSPT) è stato identificato dalle peculiari caratteristiche strutturali delle cellule epiteliali tubulari presenti in questa specifica regione di tubulo. Tali cellule sono colonnari, alte e presentano nel bordo apicale un orletto a spazzola ben sviluppato, il nucleo cellulare è posizionato al centro della cellula. Numerosi mitocondri tortuosi e bastoncelliformi si estendono dalla base

all'apice della cellula. Nella regione apicale delle cellule, appena sotto il bordo cigliato, è presente un sistema di piccole vescicole e vacuoli. Le cellule del tubulo prossimale si contraddistinguono inoltre per la presenza di invaginazioni del plasmalemma apicale che si introflettono tra i microvilli e da un elevato numero di lisosomi. I tubuli atrofici non sono stati studiati.

La sezione di tessuto è stata osservata al microscopio elettronico partendo dall'angolo in alto a sinistra e spostando il campo di osservazione, sistematicamente, tramite i traslatori del microscopio, della stessa distanza fino ad esaminare completamente l'intera sezione. La membrana basale tubulare (TBM) veniva fotografata a ingrandimento 2000 X. Le micrografie così ottenute sono state poi stampate ottenendo un ingrandimento finale di 12.000 X. E' stata inoltre fotografata e stampata una griglia di calibrazione per consentire di determinare con precisione assoluta l'ingrandimento finale. Lo spessore della TBM è stato valutato mediante il metodo delle intercette ortogonali di Jensen (130), sovrapponendo ad ogni micrografia una griglia trasparente costituita da linee disposte orizzontalmente e verticalmente, perpendicolari tra di loro.

Quando una linea della griglia intersecava l'interfacie tra membrana basale tubulare e cellula endoteliale, si applicava un righello armonico con classi equidistanti in scala logaritmica reciproca per quantificare lo spessore della TBM; il righello veniva posto ortogonalmente al margine della membrana basale tubulare nel punto d'intersezione. Al termine delle misurazioni mediante complesse formule matematiche (130), si è ottenuto lo spessore della TBM espresso in nanometri. Sono state valutate due o tre sezioni, che includessero da 60 a 100 profili tubulari per paziente.

Volume frazionale degli spazi vuoti citoplasmatici [Vv(ES/cit)]

E' la percentuale di citoplasma delle cellule del tubulo prossimale occupata da spazio vuoto, definito come ampie zone, di forma irregolare, in cui non si evidenzia alla microscopia elettronica presenza di materiale elettron-denso. Questo parametro è stato determinato con il metodo del conteggio dei punti (84), sovrapponendo ad ogni micrografia una griglia in lattice costituita da punti grossi, a distanza di 30 mm, e punti fini, a distanza di 10 mm, in modo che ogni punto grosso sottendesse 9 punti fini.

Il Vv(ES/cit) è stato valutato contando il numero di punti fini che cadevano dentro agli spazi vuoti (ES) in relazione al numero di punti grossi che cadevano nel citoplasma, ossia il volume di riferimento (cit).

Dato che ad ogni punto grosso corrispondevano 9 punti fini ne deriva che:

$$Vv(ES/cit) = \frac{ES}{Cit \times 9} \text{ m}^3/\text{m}$$

Cit X 9

Volume frazionale del mesangio [Vv(Mes/glom)]

E' la percentuale del glomerulo costituita dal mesangio, questa misura veniva ottenuta mediante metodica di conteggio dei punti su fotomontaggio di un intero profilo glomerulare (84).

La transizione tra mesangio ed area della membrana basale glomerulare periferica veniva determinata sulla base dell'aumento della distanza e della scomparsa di parallelismo fra cellule epiteliali ed endoteliali. Questa demarcazione veniva utilizzata per identificare l'inizio del mesangio e la fine della membrana basale glomerulare periferica.

Mentre il fotomontaggio e' bidimensionale, si assume che l'area frazionale sulle foto sia uguale al volume frazionale del glomerulo, che e' tridimensionale, applicando il principio di Delesse. Questo principio sostiene che l'area frazionale di profili su sezioni randomiche rappresenta una stima esente da bias del volume frazionale di quella struttura (84).

La determinazione del volume frazionale del mesangio veniva effettuata sovrapponendo al fotomontaggio una griglia in lattice trasparente comprendente punti grossi disposti regolarmente a distanza di 60 mm e punti fini disposti regolarmente ad una distanza di 30 mm, in modo che ad ogni punto grosso corrispondessero 4 punti fini.

Il volume frazionale del mesangio veniva valutato contando il numero di punti fini che cadevano sul mesangio (PM) in relazione al numero di punti grossi contati nel profilo glomerulare (cioe' il volume di riferimento) (PG). Dal momento che ad ogni punto grosso corrispondono 4 punti fini deriva che:

$$V_v(\text{Mes/glom}) = \frac{\text{PM}}{\text{PG} \times 4} \text{ m}^3/\text{m}^3$$

Per ogni paziente sono stati studiati almeno 3 glomeruli.

Il coefficiente di variazione fra tre o piu' glomeruli studiati era del 14%.

Spessore della membrana basale glomerulare (GBM width)

Lo spessore medio della membrana basale glomerulare veniva determinato usando, come per la TBM, il metodo delle intercette ortogonali (130). In particolare veniva inoltre utilizzata la stessa griglia e lo stesso regolo. Le misurazioni venivano eseguite sulla membrana basale glomerulare periferica, cioe' non in quelle aree in cui la presenza di mesangio rendeva di difficile determinazione i limiti della membrana basale glomerulare. Il numero di misurazioni eseguito in ogni biopsia era 140 ± 41 .

Il coefficiente di variazione fra i tre o più glomeruli per questo parametro era del 13%

Microscopia ottica

Parte del tessuto è stato immerso in fissativo Zenker e processato in paraffina per la microscopia ottica. Sono state fatte sezioni di 2-3 micron con il microtomo che sono state colorate con acido periodico di Schiff (PAS).

Volume frazionale dell'interstizio [Vv(Int/cortex)]

Il volume frazionale dell'interstizio è la percentuale di corteccia renale occupata da interstizio, anche questa misura è stata ottenuta mediante metodica del conteggio dei punti (84).

L'interstizio è definito come la porzione di corticale non composta da glomeruli, tubuli, arterie o vene aventi diametro maggiore delle dimensioni di un tubulo. Capillari e piccole vene sono state considerate parte dell'interstizio. I campi di tessuto midollare non sono stati inclusi nell'analisi. Una sezione di tessuto per ogni paziente è stata osservata al microscopio ottico e tutto il tessuto corticale utilizzabile è stato fotografato ad un ingrandimento finale di 400 X.

Ad ogni fotografia è stata sovrainposta una griglia trasparente costituita da punti grossi disposti regolarmente a distanza di 25 mm e punti fini disposti a distanza di 13 mm, in modo che ad ogni punto grosso corrispondessero quattro punti fini.

Il $Vv(\text{Int/cortex})$ è stato valutato contando il numero di punti fini che cadevano sull'interstizio (PI) in relazione al numero di punti grossi contati nel tessuto corticale (cioè il volume di riferimento) (PC).

Dal momento che ad ogni punto grosso corrispondono quattro punti fini deriva che:

$$Vv(\text{Int/Cortex}) = \frac{PI}{PC} \text{ m}^3/\text{m}^3$$

$$PC \times 4$$

Volume frazionale dei tubuli atrofici [Vv(Ta/Tt)]

Il volume frazionale dei tubuli atrofici è definito come la percentuale di tubuli atrofici rispetto ai tubuli totali, anche questa misura è stata ottenuta mediante metodica del conteggio dei punti (84).

I tubuli atrofici sono stati identificati dalla presenza di ispessimento o reduplicazione della TBM attorno a tubuli con diametro ridotto, che presentavano cellule epiteliali appiattite; in assenza di ispessimento della TBM venivano definiti atrofici i tubuli che presentavano diametro ridotto più del 50% rispetto ai tubuli normali. Sono state utilizzate le medesime fotografie utilizzate per quantificare Vv(Int/Cortex) (400X).

Anche questo parametro è stato valutato con la metodica dei conteggio dei punti utilizzando la stessa griglia utilizzata per il conteggio di Vv(ES/cit).

Il Vv(Ta/Tt) è stato valutato contando il numero di punti fini e grossi che cadevano sui tubuli atrofici (Ta) in relazione al numero di punti grossi che cadono su tutti i tubuli presenti nella corticale (cioè il volume di riferimento) (Tt).

Dal momento che ad ogni punto grosso corrispondono nove punti fini deriva che:

$$Vv(\text{Ta/Tt}) = \frac{Ta}{Tt} \text{ m}^3/\text{m}^3$$

$$Tt \times 9$$

RISULTATI

Sono stati studiati 42 pazienti (29 maschi, 13 femmine) di età media 56 ± 7 anni con durata del diabete di 12.7 ± 6.3 anni. I pazienti sono stati suddivisi in 3 gruppi in base ai valori di AER: 16 erano NA, 16 MA, e 10 P (Tab.1).

Per quanto riguarda le caratteristiche cliniche i pazienti NA presentavano un'età significativamente ($p < 0.05$) maggiore rispetto ad MA ed i valori di HbA_{1c} dei pazienti P tendevano ad essere significativamente più elevati rispetto ai valori riscontrati nei pazienti NA ($p = 0.057$) (Tab. 1).

Non sono state riscontrate differenze significative per quanto riguarda la durata del diabete, il BMI, il GFR e la pressione arteriosa media (Tab. 1).

Parametri morfometrici

I valori di spessore della membrana basale tubulare (TBM width) aumentavano progressivamente passando dai pazienti NA ai pazienti MA e da questi a P (TBM width 707 ± 177 nm in NA, 875 ± 225 in MA e 1055 ± 169 in P, ANOVA $p < 0.001$) (Tab.2, Fig. 8).

I P presentavano inoltre un numero di tubuli atrofici [$V_v(Ta/Tt)$] significativamente più elevato rispetto ad NA e MA (0.05 ± 0.05 in NA, 0.06 ± 0.04 in MA e 0.14 ± 0.09 in P; $p < 0.005$ NA vs P e $p < 0.05$ MA vs P) e valori di $V_v(\text{int/cortex})$ aumentati rispetto ad MA (0.18 ± 0.04 in NA, 0.17 ± 0.02 in MA e 0.22 ± 0.07 in P, $p < 0.05$ MA vs P) (Tab. 2).

I pazienti P avevano inoltre valori più elevati di $V_v(\text{mes/glom})$ e di GBM width ($p < 0.005$ vs NA e $p < 0.05$ vs MA) (Tab.2).

In 26 pazienti 15 NA e 11 con AER elevata ($> 180 \mu\text{g}/\text{min}$) abbiamo valutato $V_v(\text{ES}/\text{cit})$; nessuna differenza tra i gruppi è stata riscontrata per quanto riguarda $V_v(\text{ES}/\text{cit})$ (Tab. 2).

Al fine di valutare eventuali relazioni tra le alterazioni rilevate a livello del compartimento tubulo-interstiziale e le classiche alterazioni glomerulari della nefropatia diabetica abbiamo correlato i parametri morfometrici tubulo-interstiziali studiati con i valori di GBM width e $V_v(\text{mes}/\text{glom})$ ottenuti negli stessi pazienti.

L'analisi di regressione ha evidenziato l'esistenza di una correlazione diretta tra TBM width, GBM width ($r = 0.53$, $p < 0.001$), $V_v(\text{mes}/\text{glom})$ ($r = 0.47$, $p < 0.01$) e $V_v(\text{MM}/\text{glom})$ ($r = 0.52$, $p < 0.0001$) (Tab. 3).

Anche $V_v(\text{Ta}/\text{Tt})$ correlava con GBM width ($r = 0.48$, $p < 0.01$), $V_v(\text{mes}/\text{glom})$ ($r = 0.64$, $p < 0.0001$) e $V_v(\text{MM}/\text{glom})$ ($r = 0.74$, $p < 0.0001$) (Tab. 3).

$V_v(\text{int}/\text{cortex})$ correlava direttamente con $V_v(\text{mes}/\text{glom})$ ($r = 0.43$, $p < 0.05$), ed in particolare con $V_v(\text{MM}/\text{glom})$ ($r = 0.56$, $p < 0.005$) (Tab. 3).

Una correlazione diretta esisteva inoltre anche tra $V_v(\text{Ta}/\text{Tt})$, TBM width ($r = 0.40$, $p < 0.05$) e $V_v(\text{int}/\text{cortex})$ ($r = 0.82$, $p < 0.0001$) (Tab. 3).

Correlazioni morfo-funzionali

L'analisi di regressione lineare ha evidenziato che la velocità di escrezione urinaria dell'albumina (AER) correlava direttamente con TBM width ($r = 0.54$, $p < 0.0001$) (Fig. 10), $V_v(\text{Ta}/\text{Tt})$ ($r = 0.51$, $p < 0.01$), $V_v(\text{mes}/\text{glom})$ ($r = 0.52$, $p < 0.0001$) e GBM width ($r = 0.55$, $p < 0.0001$); non esisteva invece nessuna correlazione tra $V_v(\text{int}/\text{cortex})$ e AER.

Mediante analisi di regressione multipla effettuata tra TBM width, $V_v(Ta/Tt)$, V_v (mes/glom) GBM width e AER si è confermata una relazione significativa solo tra AER e TBM width (Beta = 0.40, $p < 0.05$).

I valori di GFR correlavano significativamente con V_v (mes/glom) ($r = - 0.527$, $p < 0.0001$) e, tendevano a correlare con V_v (Ta/Tt) ($r = - 0.37$, $p = 0.05$).

I valori di pressione arteriosa non erano correlati con nessun parametro strutturale.

Esisteva inoltre una correlazione diretta tra TBM width e HbA1c ($r = 0.41$, $p < 0.008$) (Fig. 11).

DISCUSSIONE

Le modificazioni della struttura della TBM e del compartimento tubulo-interstiziale, i loro rapporti con la struttura glomerulare e con la funzione renale non sono stati valutati in precedenza nei pazienti con diabete di tipo 2. I pochi dati sull'argomento derivano da studi condotti in pazienti con diabete di tipo 1.

Questo studio evidenzia che un aumento dello spessore della TBM è presente nei pazienti diabetici nefropatici e che esso è in relazione con la gravità della malattia renale; non solo, ma che le alterazioni dello spessore della membrana tubulare sono probabilmente diretta conseguenza della malattia diabetica. Ipotesi questa che è sostenuta dalla correlazione diretta tra compenso metabolico e spessore della TBM, il che sta ad indicare che l'iperglicemia cronica potrebbe di per sé svolgere un danno a livello del tubulo-interstizio. Da punto di vista metodologico, per meglio valutare il possibile ruolo del tubulo-interstizio nella patogenesi della disfunzione renale tipica della nefropatia diabetica, abbiamo cercato di escludere che fattori confondenti ponessero il dubbio che le alterazioni della TBM non fossero altro che espressione di un danno avanzato di nefroni ormai totalmente distrutti. Abbiamo pertanto escluso dalle analisi di regressione i tubuli atrofici, ossia quei tubuli che si presentavano irrimediabilmente compromessi dal punto di vista funzionale. Il riscontro di valori di spessore della TBM che progressivamente aumentano passando dai pazienti normoalbuminurici ai micro e ai macroalbuminurici suggerisce due conclusioni, ossia che l'ispessimento della TBM è parte integrante delle alterazioni strutturali renali che contraddistinguono la nefropatia diabetica e che possiede un impatto non trascurabile nella patogenesi dell'alterata AER. Questi dati sono in accordo con i dati di Brito et al. (46) che evidenziano un incremento dello spessore della TBM in pazienti con

diabete di tipo 1. La maggior parte inoltre dei pazienti analizzati nello studio di Brito et al, pur avendo un aumentato spessore della TBM, erano normoalbuminurici, normotesi e con normale GFR. Questo conforta le nostre supposizioni che anche nel diabete di tipo 2 questa alterazione strutturale sia conseguente alla malattia diabetica e non secondaria alla compromissione glomerulare o ad altri meccanismi patogenetici come l'ipertensione. Il paziente con diabete di tipo 2, soprattutto se nefropatico presenta valori pressori spesso elevati, ma una correlazione tra valori pressori e spessore della TBM non è stata evidenziata nel nostro studio. L'assenza di dati relativi a controlli sovrapponibili ai pazienti per età e sesso non permette di trarre conclusioni per quanto riguarda i nostri pazienti normoalbuminurici anche se, pur con qualche forzatura, se paragoniamo i dati ottenuti nei nostri normoalbuminurici con i dati dei controlli utilizzati da Brito et al. (46) si possono evidenziare alcune differenze: TBM with 707 ± 177 nm nei diabetici di tipo 2 NA vs 558 ± 116 nei controlli; questo dato suggerisce che probabilmente nei pazienti normoalbuminurici esiste già un'incremento dello spessore della TBM. In effetti il danno tubulare non rappresenta l'evento finale; come per altre nefropatie proteinuriche modificazioni strutturali del tubulo sono presenti nel diabete prima dell'avvento della proteinuria (131).

L'ispessimento della TBM comunque non è una lesione isolata ed indipendente, ma, come nel diabete di tipo 1 (41-49) è parte integrante di un insieme di alterazioni, dato suggerito dall'evidenza di una relazione con lo spessore della GBM e con l'espansione mesangiale. Tuttavia se i pazienti con diabete di tipo 1 si presentano omogenei dal punto di vista della struttura renale, presentando tutti, quando insorge la nefropatia, un quadro caratteristico, i pazienti con diabete di tipo 2 si presentano eterogenei per quanto concerne la struttura renale. Il nostro gruppo di ricerca ha pubblicato i dati di uno studio effettuato su pazienti con diabete di tipo 2 microalbuminurici, dimostrando

una eterogeneità del tipo delle lesioni strutturali renali (58). Soltanto il 30% dei pazienti esaminati presentava il quadro tipico della glomerulopatia diabetica (Categoria CII). Un altro 30% presentava una struttura normale o quasi normale (Categoria CI) nonostante la presenza di alterazioni costanti della velocità di escrezione dell'albumina. Il restante 40% presentava un quadro di lesioni renali "atipiche", con prevalenza di alterazioni arteriolari (ialinosi marcata delle arteriole glomerulari, talora associata ad aterosclerosi dei vasi di calibro maggiore), tubulari (atrofia tubulare, ispessimento e sdoppiamento della membrana basale tubulare) ed interstiziali (fibrosi interstiziale), in presenza di una struttura glomerulare normale o con modeste alterazioni rispetto alla glomerulopatia diabetica tipica (Categoria CIII). Tali lesioni erano presenti in varie combinazioni nei pazienti della categoria CIII; in tutti comunque si sono osservate le alterazioni tubulo-interstiziali, spesso associate ad alterazioni vascolari e talora, a glomerulosclerosi globale. Questa eterogeneità strutturale accompagnata ad un eterogeneo andamento della nefropatia nei pazienti con diabete di tipo 2 fa supporre che lesioni differenti abbiano un impatto diverso sulla funzione renale.

Dalla letteratura si evince che GBM width e $V_v(\text{mes}/\text{glom})$ sono i parametri che meglio correlano con la funzione renale (43), tuttavia le alterazioni funzionali sono spiegate solo parzialmente dall'alterazione di tali parametri. In effetti i nostri risultati evidenziano un chiaro impatto dello spessore della TBM sulla velocità di escrezione dell'albumina. Non solo, quando tutti i parametri strutturali vengono considerati assieme, emerge che lo spessore della TBM è il parametro che più impatta sull'AER. La mancanza di una correlazione tra spessore della TBM e GFR suggerisce che tale parametro non ha un ruolo determinante nella genesi dell'insufficienza renale. E' quindi possibile ipotizzare che esistano due tipi di pazienti con diabete di tipo 2 e

nefropatia, quelli in cui predomina un'alterazione del glomerulo e che probabilmente progrediscono come suggerito dalla letteratura più precocemente verso l'insufficienza renale e quelli in cui predomina il danno tubulare e che presentano un importante incremento dell'AER pur mantenendo una discreta velocità di filtrazione glomerulare.

I risultati del nostro studio indicano inoltre come espansione interstiziale ed incremento del numero di tubuli atrofici siano caratteristici soprattutto degli stadi più avanzati della nefropatia essendo significativamente più alterati solo nei pazienti proteinurici. TBM width, $Vv(int/cortex)$ e $Vv(Ta/Tt)$ sono sicuramente intercorrelati, ma, oltre allo spessore della TBM solo la percentuale di tubuli atrofici mantiene una correlazione con la membrana basale glomerulare, relazione che non è invece confermata per quanto riguarda l'espansione interstiziale. La struttura della matrice extracellulare (ECM) che compone l'interstizio è infatti differente da quella che compone TBM e GBM ed i meccanismi di accumulo di ECM interstiziale sono probabilmente conseguenti al danno glomerulare e tubulare e non legati direttamente al diabete. Una simile ipotesi è stata avanzata anche nel diabete di tipo 1 (132, 46).

Va comunque sottolineato che espansione interstiziale e mesangiale sono legati da una correlazione diretta. Si può così speculare che esistano in realtà due comparti a livello corticale renale: un sistema che potremmo definire "di membrana" e che comprende TBM, GBM ed epitelio tubulare in genere ed un sistema costituito da mesangio ed interstizio. Tali comparti rispondono probabilmente in modo diverso, almeno temporalmente, alla malattia diabetica. L'espansione interstiziale potrebbe quindi essere secondaria al danno strutturale glomerulare e tubulare. $Vv(int/cortex)$ non correla né con il GFR, né con l'AER supportando l'ipotesi già avanzata nel diabete di tipo 1 che tale parametro abbia un impatto modesto sulla funzione renale. Uno studio longitudinale con biopsie renali sequenziali, eseguite in pazienti affetti da

diabete di tipo 1 in un periodo di 5 anni, ha evidenziato che l'incremento dell'AER era correlato con l'incremento dell'espansione mesangiale e non con l'espansione interstiziale che rimaneva stabile nel tempo (47). Dai nostri dati emerge inoltre che numero di tubuli atrofici [$V_v(Ta/Tt)$] sono significativamente più numerosi nei pazienti proteinurici e che hanno un ruolo nella patogenesi dell'alterata AER; non solo, oltre $V_v(\text{mes}/\text{glom})$, $V_v(Ta/Tt)$ è l'unico parametro che tende a correlare con il GFR. Questo dato risulta interessante anche alla luce dello studio di Najafian et al (73) che ha recentemente analizzato la giunzione glomerulo-tubulare in pazienti proteinurici con diabete di tipo 1. Le giunzioni glomerulo tubulari sono state classificate come i tubuli normali (NT), tubuli atrofici (AT) con epitelio sottile o glomeruli atubulari (AG) senza connessione tubulare. AT furono ulteriormente suddivisi in tubuli atrofici corti (SAT) con atrofia tubulare all'inizio del tubulo prossimale e tubuli atrofici lunghi (LAT) con atrofia tubulare più diffusa e tubuli atrofici senza una osservabile apertura glomerulare (ATNO).

Il 17% dei glomeruli era atubulare e il 5% era attaccato a tubuli atrofici.

Queste lesioni a livello glomerulo-tubulare erano inoltre correlate con il GFR suggerendone un ruolo nella genesi della perdita di funzione renale nel diabete di tipo 1.

L'osservazione che taluni pazienti presentavano un epitelio tubulare conservato, ma presenza di numerosi spazi vuoti intracitoplasmatici ci ha portato ad analizzare tale aspetto. Tuttavia tale parametro era uniformemente distribuito senza differenze tra pazienti normoalbuminurici e pazienti con alterata AER, tale parametro inoltre non mostrava correlazioni con la funzione renale. Studi più approfonditi serviranno per meglio chiarire il significato di tale alterazione.

In conclusione questi studi dimostrano che un aumento dello spessore della TBM è una caratteristica dei pazienti con diabete di tipo 2 con nefropatia presente fin dagli stadi precoci della malattia. L'incremento dello spessore della TBM si accompagna alla presenza delle classiche alterazioni glomerulari della nefropatia diabetica: ispessimento della GBM ed espansione mesangiale. Probabilmente tali lesioni sono direttamente correlate con la malattia diabetica ed influenzate dal controllo metabolico. L'ispessimento della TBM, essendo l'unico parametro correlato sia ai parametri glomerulari che interstiziali, potrebbe rappresentare l'anello di congiunzione tra alterazioni del glomerulo e del compartimento interstiziale e svolgere un ruolo, in tal senso, nella progressione del danno renale dagli stadi iniziali agli stadi più avanzati della nefropatia.

Ulteriori studi sono comunque necessari per meglio comprendere il ruolo di tali alterazioni nella cascata di eventi che portano all'insufficienza renale terminale.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Nyengaard JR, Bendtsen TF: Glomerular number and size relation to age, kidney weight and body surface in normal man. *Anat Rec* 232:194,1992
- 2) Wirz H, Hargitay B, Kuhn W: Lokalisation des Konzentrierungsprozesses in der Niere durch direkte Kryoskopie. *Helv Physiol Pharmacol Acta* 9:196, 1951
- 3) Jorgensen F: The Ultrastructure of the Normal Human Glomerulus. Ejnar Munksgaard, Copenhagen, 1996
- 4) Vasmant D, Maurice M, Feldman G: Cytoskeleton ultrastructure of podocytes and glomerular endothelial cells in man and in the rat. *Anat Rec* 210:17, 1984
- 5) Mundel P, Elger M, Sakai T, Kriz W: Microfibrils are a major component of the mesangial matrix in the glomerulus of the rat kidney. *Cell Tissue Res* 254:183, 1998.
- 6) Scholondorff D: The glomerular mesangial cell: An expanding role for a specialized pericyte. *FASEB J* 1:272,1987.
- 7) Farquhar MG: The glomerular basement membrane: A selective macromolecular filter. In Hay ED (ed): *Cell Biology of Extracellular Matrix*. Plenum Publishing, New York, 1981, p 335
- 8) Barajas L: The ultrastructure of the juxtaglomerular apparatus as disclosed by three-dimensional reconstructions from serial sections: The anatomical relationship between tubular and vascular components. *J Ultrastruct Res* 33:116,1970
- 9) Barajas L, Salido EC, Smolens P, et al: Pathology of the juxtaglomerular apparatus including Bartter's syndrome. In Tisher CC, Brenner BM Lippincott, Philadelphia, 1989, p877
- 10) Bulger RE: The shape of rat kidney tubular cells. *Am J Anat* 116:237, 1965

- 11) Welling LW, Welling DJ: Shape of epithelial cells and intercellular channels in the rat proximal nephron. *Kidney Int* 9:385, 1976.
- 12) Welling LW, Welling DJ, Holsapple JW, Evan AP: Morphometric analysis of distinct microanatomy near the base of proximal tubule cells. *Am J Physiol* 253:F126, 1987.
- 13) Farquar MG, Palde GE: Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 17:375, 1963.
- 14) Bulger RE, Siegel FL, Pendergrass R: Scanning and transmission electron microscopy of the rat kidney. *Am J Anat* 139:483, 1974.
- 15) Maunsbach AB: Observations on the ultrastructure and acid phosphatase activity of the cytoplasmic bodies in the rat kidney proximal tubules, with a comment on their classification. *J Ultrastructure Res* 16: 197, 1966.
- 16) Maunsbach AB: Ultrastructure of the proximal tubule. *In* Orloff J, Berliner RW (eds): *Handbook of Physiology Society*, Washington, DC, 1973, p 31.
- 17) Ericsson LJE: Mechanism of cellular autophagy. *In* Dagle IT, Fell HB (eds): *Lysosomes in Biology and Pathology*, Vol 2, North Holland Publishing, Amsterdam, 1969, p 345.
- 18) Christensen EI, Nielsen S: Structural and functional features of protein handling by the kidney proximal tubule. *Semin Nephron* 11:414, 1991
- 19) Maunsbach AB: Absorption of 125-labeled homologous albumin by rat kidney proximal tubule: A study of microperfused single proximal tubules by electron microscopic autoradiography and histochemistry. *J Ultrastruct Res* 15: 197, 1966.
- 20) Maunsbach AB: Cellular mechanism of tubular protein transport. *Int Rev Physiol* 11:145, 1976

- 21) Maack T, Johnson V, Kau ST, et al.: Renal filtration, transport, and metabolism of proteins of low-molecular-weight proteins: A review. *Kidney Int* 16:251, 1979
- 22) Maack T, Park CH, Camargo MJF: Renal filtration, transport, and metabolism of proteins. *In* Seldin DW, Giebisch G (eds): *The kidney: Physiology and Pathophysiology*. Raven Press, New York, 1985, p 1773.
- 23) Osvaldo L, Latta H: The thin limbs of the loop of Henle. *J Ultrastruct Res* 15:144, 1967
- 24) Bulger RE, Trumpp BR: Fine structure of the rat renal papilla. *Am J Anat* 118:685, 1966
- 25) Kaissling B, Kriz W: Structural analysis of the rabbit kidney. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 56, 1979.
- 26) Kone BC, Madsen KM, Tisher CC: Ultrastructure of the thick ascending limb of Henle in the rat kidney. *Am J Anat* 171: 217, 1984.
- 27) Crayen ML, Thoenes W: Architecture and cell structures in the distal nephron of the rat kidney. *Cytobiologie* 17:197, 1978.
- 28) Welling LW, Evan AP, Welling DJ: Shape of cell and extracellular channels in rabbit cortical connecting ducts. *Kidney Int* 20:211, 1981
- 29) Sonnenberg H: Medullary collecting-duct function in antidiuretic and in salt-or water – diuretic rats. *Am J Physiol* 226:501, 1974.
- 30) Diezi J, Michoud P, Aceves J, Giebisch G: Micropuncture study of electrolyte transport across papillary collecting duct of the rat. *Am J Physiol* 224:623, 1973.
- 31) Stein JH, Osgood RW, Kunau RT: Direct measurement of papillary collecting duct sodium transport in the rat. *J Clin Invest* 58:767, 1976.
- 32) Rocha AS, Kudo LH: Water, urea, sodium, chloride, and potassium transport in the vitro isolated perfused papillary collecting duct. *Kidney Int* 22:485, 1982.

- 33) Morgan T, Berliner RW: Permeability of the loop of Henle, vasa recta, and collecting duct to water, urea and sodium. *Am J Physiol* 215:108,1968.
- 34) Bohman SO: The ultrastructure of the renal medulla and interstitial cells. *In* Mandal AK, Bohman SO (eds) : *The Renal papilla and Hypertension*. Plenum Publishing, New York, 1980, p.7.
- 35) Lemley KV, Kriz W: Anatomy of the renal interstitium. *Kidney Int* 39:370,1991.
- 36) Dunmill MS, Halley W: Some observations on the quantitative anatomy of the kidney. *J Pathol* 110: 113,1973.
- 37) Bulger RE, Nagle RB: Ultrastructure of the interstitium in the rabbit kidney. *Am J Anat* 136: 183,1973.
- 38) Bohman SO: The ultrastructure of the renal medulla as observed after improved fixation methods. *J Ultrastruct Res* 47: 329, 1974.
- 39) Bohman SO, Jensen PKA : The interstitial cells in the renal medulla of rat, rabbit, and gerbil in different states of diuresis. *Cell Tissue Res* 189:1, 1978.
- 40) Mauer SM, Steffes MW, Brown DM. The kidney in diabetes. *Am J Med*, 70: 603-612; 1981
- 41) Harris R.H., Steffes M.W., Sutherland D.E.R., Mauer S.M. Global glomerular sclerosis and arteriolar hyalinosis in insulin-dependent diabetes. *Kidney Internat.* 40, 107-114; 1991.
- 42) Kimmelstiel I, Wilson C. Intercapillary lesions in the glomeruli of the kidney. *Am. J. Pathol*, 12: 83-105; 1936
- 43) Mauer S.M., Steffes M.W., Ellis E.N., Sutherland d.E.R., Brown D.M., Goetz F.C. Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. *J. Clin. Invest.*, 74, 1143-1155; 1984.
- 44) Steffes M.W., Bilous R.W., Sutherland D.E.R., Mauer S.M. Cell and matrix

components in the glomerular mesangium in type I diabetes. *Diabetes* 41: 679-84; 1992.

45) Lane P.H., Steffes M.W., Fioretto P. Mauer S.M. Renal interstitial expansion in insulin-dependent diabetes mellitus. *Kidney Int*, 43:661-67; 1993

46) Brito PL, Fioretto P, Drummond K, Kim Y, Steffes MW, Basgen JM, Sisson-Ross S, Mauer M.: Proximal tubular basement membrane width in insulin-dependent diabetes mellitus. *Kidney Int*. 1998;53(3):754-61.

47) Fioretto P. Steffes MW, Sutherland DER, Mauer M. Sequential renal biopsies in IDDM patients: structural factors associated with clinical progression. *Kidney Int*, 48: 1929-1935; 1995

48) Bjorn S.F, Bangstad H-J, Hanssen K.F, Nyberg G, Walker J.D, Viberti G.C, Osterby R. Glomerular epithelial foot processes and filtration slits in IDDM patients. *Diabetologia* 1995; 38:1197-1204.

49) Ellis EN, Steffes MW, Goetz FC, et al: Glomerular filtration surface in type I diabetes mellitus. *Kidney Int* 1986; 29: 889-894.

50) Parving H-H, Gall M-A, Skott P. Jorgensen HE, Lokkegaard H. Jorgensen F. Nielsen B. Larsen S. Prevalence and causes of albuminuria in non-insulin-dependent diabetic patients. *Kidney Int* 41: 758-762; 1992.

51) Gambará V, Mecca G. Remuzzi G. Bertani T. Heterogeneous nature of renal lesions in type II diabetes. *JASN* 3, 1458-1466; 1993.

52) Ruggenenti P, Gambará V, Perna A, Bertani T, Remuzzi G. The nephropathy of non insulin dependent diabetes: predictors of outcome relative to diverse patterns of renal injury. *J Am Soc Nephrol*, 1998; 9(12), 2336-2343.

53) Olsen S. Mogensen CE. Non-diabetic renal disease in NIDDM proteinuric patients may be rare in biopsies from clinical practice. *Diabetologia*, 39: 1638-1645;

1996

54) Waldherr R, ILkenhans C, Ritz E. How frequent is glomerulonephritis in diabetes mellitus type II? *Clinical Nephrology*, 37: 271-273; 1992

55) Kleinknecht D, Bennis D, Altman A, et al. Increased prevalence of non-diabetic renal pathology in type II diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant*, 7: 1258-1259; 1992

56) Carpenter AM, Goetz FC, LeCompte PM, Williamson JR. Glomerulosclerosis in type 2 (non insulin-dependent) diabetes mellitus: relationship to glycemia at the University Group Diabetes Program (UGDP). *Diabetologia*, 36: 1057-1063; 1993

57) Hayashi H, Karasawa R, Inn H et al. An electron microscopic study of glomeruli in Japanese patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Kidney Int.* 41, 749-757; 1992.

58) Fioretto P., Mauer M., Brocco E., Velussi M., Frigato F., Muollo B., Sambataro M., Abaterusso C., Baggio B., Crepaldi G., Nosadini R. Patterns of renal injury in NIDDM patients with microalbuminuria. *Diabetologia*, 39, 1569-1576; 1996.

59) Osterby R, Gall MA, Schmitz A et al. Glomerular Structure and function in proteinuric type 2 (non insulin dependent) diabetic patients. *diabetologia* 36: 1064-1070; 1993.

60) Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S, Nelson RG, Myers BD, Rennke HG, Coplon NS, Meyer TW. Podocyte loss and progressive glomerular injury in type 2 diabetes. *J Clin Invest*, 1997, 99: 342-348.

61) Meyer T.W., Bennett P.H., Nelson R.G. Podocyte number predicts long-term urinary albumin excretion in Pima Indians with Type II diabetes and microalbuminuria. *Diabetologia*, 1999, 42:1341-1344.

- 62) Dalla Vestra M, Masiero A, Roiter AM, Saller A, Crepaldi G, Fioretto P: Is podocyte injury relevant in diabetic nephropathy? Studies in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003 Apr;52(4):1031-5.
- 63) Ziyadeh FN, Snipes ER, Watanabe M, Alvarez RJ, Goldfarb S, Haverty TP: High glucose induces cell hypertrophy and stimulates collagen gene transcription in proximal tubule. *Am J Physiol* 259:F704-F714, 1990
- 64) Johnson DW, Saunders HJ, Baxter RC, Field MJ, Pollock CA: Paracrine stimulation of human renal fibroblast by proximal tubule cells. *Kidney Int* 54:747-757, 1998
- 65) Okada H, Danof TM, Kalluri R, Neilson EG: Early role of FSP1 in epithelial-mesenchymal transformation. *Am J Physiol* 42:F563-F574, 1997
- 66) Hooke DH, Gee DC, Atkins RC: Leukocyte analysis using monoclonal antibodies in human glomerulonephritis. *Kidney Int* 31:964-972, 1987
- 67) Cooper ME: Pathogenesis, prevention and treatment of diabetic nephropathy. *Lancet* 352:213-219, 1998
- 68) Bleyer AJ, Fumo P, Snipes ER, Goldfarb S, Simmons DA, Ziyadeh FN: Polyol pathway mediates high glucose-induced collagen synthesis in proximal tubule. *Kidney Int* 45:659-666, 1994
- 69) Kriz W, Hoyer H, Hahnel B, Gretz N, Provoost AP: From segmental glomerulosclerosis to total nephron degeneration and interstitial fibrosis: A histopathological study in rat models and human glomerulopathies. *Nephron Dial Transplant* 13:2781-2798, 1998
- 70) Taft J, Nolan CJ, Yeung SP, Hewitson TD, Martin FIR: Clinical and histological correlations of decline in renal function in diabetic patients with proteinuria. *Diabetes* 43:1046-1051, 1994

- 71) Gandhi M, Olson JL, Meyer TW: Contribution of tubular injury to loss of remnant kidney function. *Kidney Int* 54:1157-1165. 1998
- 72) Marcussen N: Atubular glomeruli and the structural basis for chronic renal failure. *Lab Invest* 66:265-284, 1992
- 73) Behzad Najafian, Younki Kim, John T. Crosson, Michael Mauer: Atubular glomeruli and glomerulotubular junction abnormalities in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Apr;14(4):908-17.
- 74) Bader R, Bader E, Grung KE, Markensen-Haen S, Christ H, Bohole A: Structure and function of the kidney in diabetic glomerulosclerosis: Correlation between morphological and functional parameters. *Pathol Res Pract* 167:204-216, 1980
- 75) Fioretto P, Stehower CDA, Mauer M, Chiesuracorona M, Brocco E, Carraro A, Bortoloso E, Vanhinsbergh VWM, Crepaldi G, Nosadini R: Heterogeneous nature of microalbuminuria in NIDDM: Studies of endothelial function and renal structure. *Diabetologia* 41:233-236, 1998
- 76) Mogensen C.E., Christensen C.K., Vittinghus E. The stages in diabetic renal disease: with emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes*, 32: 64-78; 1983
- 77) Rudberg S.R., Persson B., Dahlquist G. Increased glomerular filtration rate as a predictor of diabetic nephropathy -An - 8 year prospective study. *Kidney Internat.*, 41: 822-828; 1992
- 78) Mogensen C.E., Andersen M.J.F. Increased kidney size and glomerular filtration rate in early juvenile diabetes. *Diabetes* 22: 706 712; 1973
- 79) Jones S.L., Wiseman M.J., Viberti G.C. Glomerular hyperfiltration prospective study. *Diabetologia*, 34, 59-69; 1991
- 80) Myers B.D., Nelson R.G., Williams G.W., Bennet P.H., Hardy S.A., Berg R.L.,

Loon N., Knowler W.C., Mitch W.E. Glomerular function in Pima Indians in NIDDM of recent onset. *J. Clin. Invest.*, 8, 524-530; 1991

81) Vora J., Dolben J., Dean J., Thomas D., Williams J., Owens D., Peters J. Renal hemodynamics in newly presenting non insulin-dependent diabetes mellitus. *Kidney Internat.* 41: 829-835; 1992

82) Schmitz A., Christensen T., Moller A., Mogensen C.E. Kidney function and cardiovascular risk factors in NIDDM with microalbuminuria. *J. Int. Med.* 228: 347-352; 1990

83) Osterby R. Early phases in the development of diabetic glomerulopathy. *Acta Med. Scand*; 200 (Suppl. 574): 1-82; 1975

84) Fioretto P., Steffes M. W., Mauer M. Glomerular structure in non proteinuric IDDM patients with various levels of albuminuria *Diabetes*, 43: 1358-1364; 1994

85) Siegel J.E., Krolewski A.S., Warram J.H., Weinstein M.C. Cost effectiveness of screening and early treatment of nephropathy in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J.Am.Soc.Nephrol*, 3: 3111-3119; 1992

86) Parving H.H., Andersen A.R., Smidt U.M., Svendsen P.A. Early aggressive antihypertensive treatment reduces rate of decline in kidney function in diabetic nephropathy. *Lancet*, 1175-1199, 1983

87) Mogensen C.E., Schmitz A., Christensen C.K. Comparative renal pathology relevant to IDDM and NIDDM patients *Diabetes/Metabolism Review*, 4: 453-483; 1988

88) Viberti G.C., Wiseman M.J. The kidney in diabetes: significance of the early abnormalities. *Clinic in Endocrinology and Metabolism*, 15: 753-782; 1986

89) Microalbuminuria Collaborative Study, United Kingdom. Risk factors for development of microalbuminuria in IDDM: a cohort study *Br Med. J.*, 306: 1235-

1239; 1993

90) Mathiesen E.R., Rom B., Storm B., Foght H., Deckert T. Development of microalbuminuria. A 10 year prospective study. *Diabetologia*, 36: 215-227, 1993.

91) Mangili R., Bending J.J., Scott G., Li K., Gupta A., Viberti G.C.

Increased sodium-lithium countertransport activity in red blood cells of patients with insulin-dependent diabetes and nephropathy. *N. Engl. J. Med.*, 318: 146-150, 1988.

92) Krolewsky A.S., Canessa M., Warram J.H. Predisposition to hypertension and susceptibility to renal disease in insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, 318: 140-145, 1988.

93) Mogensen C.E., Damsgaard E.M., Froland A., Nielsen S., de Fine Olivarius N., Smith A. Microalbuminuria in NIDDM. *Clin. Nephrol.*, 51, 528-538, 1992.

94) Schmitz A. The kidney in NIDDM: studies on glomerular structure and function and the relationships between microalbuminuria and mortality. *Acta Diabetol.*, 29, 47-69, 1992.

95) Nelson R.G., Pettitt D.S., Baird H.R., Charles M.A., Liu Q.Z., Bennet P.H., Knowler W.C. Prediabetic blood pressure predicts urinary albumin excretion after the onset of type 2 (NIDDM) in Pima Indians. *Diabetologia*, 36, 998-1001, 1993.

96) Pettitt D.S., Saad M.F., Bennet P.H., Nelson R.G., Knowler W. C. Familial predisposition to renal disease in two generations of Pima Indians with type 2 (NIDDM) diabetes. *Diabetologia*, 33, 438-443, 1990.

97) Nielsen S., Schmitz A., Røhling M., Mogensen C.E. Systolic blood pressure relates to the rate of decline of glomerular filtration rate in Type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Care*; 16: 1427-1432;1993.

98) Ravid M., Savin H., Lang R., Jutrin I., Shoshana L., Lishner M. Proteinuria, renal impairment, metabolic control and blood pressure in Type 2 diabetes mellitus. *Arch.*

Inter. Med.; 152: 1225-1229; 1992.

99) Gall M.A., Nielsen F.S., Smidt U.M., Parving H.H. The course of kidney function in Type 2 (non insulin-dependent) diabetic patients with diabetic nephropathy. *Diabetologia*; 36:1071-1078; 1993.

100) Schmitz A., Vaeth M. Microalbuminuria: a major risk factor in type 2 diabetes. A 10 year follow-up study of 503 patients. *Diab Med*, 5: 126-134; 1985.

101) Mogensen C.E. Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity-onset diabetes. *N Engl J Med*, n 310; 1986

102) Jarrett R.J., Viberi G.C., Argyropoulos A., Hill R.D., Mahmud U. Murrells T.J. Microalbuminuria predicts mortality in non-insulin dependent diabetes. *Diab Med* 1: 17-19; 1984

103) Stehouwer C.D.A., Nauta J.J.P., Zeldenrust G.C., Hackeng W.H.L., Donker A.J.M., den Ottolander G.J.H. Urinary albumin excretion, cardiovascular disease, and endothelial dysfunction in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Lancet*, 340: 319-323;1992

104) Mogensen C.E. Microalbuminuria as a predictor of clinical diabetic nephropathy. *Kidney International*, 31: 673-689; 1987.

105) Camamori ML, Fioretto P, Mauer M. The need for early predictors of diabetic nephropathy risk: is albumin excretion rate sufficient? *Diabetes* 49: 1399-408; 2000

106) Fink P, Romer M. et al. Measurement of proteins with the Behring nephelometer. A multicenter evaluation. *J.Clin. Chem. Clin. Biochem*; 27: 261-276;1989

107) Di Mario U., Cancelli A., Pietravallo et al. Anionic vs cationic immunoglobulin clearance in normal subjects: a novel approach to the evaluation of charge permeselectivity. *Nephron*, 55: 400-407;1990

- 108) Viberti G.C. et al. Determinants of the penetration of proteins through the glomerular barrier in insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes*, 32 (Suppl. 2): 92-95;1983
- 109) Deckert T., Feldt-Rasmussen B., Djunp R., Deckert M. Glomerular size and charge selectivity in insulin dependent diabetes mellitus. *Kid. Int*, 33: 100-106;1988
- 110) Deckert T. et al. Size and charge selectivity of glomerular filtration in Type 1 diabetic patients with and without albuminuria. *Diabetologia*, 36: 244-251; 1993
- 111) Vernier R.L., Steffes M.W., Sisson-Ross S., Mauer S.M: Heparan sulfate proteoglycan in the glomerular basement membrane in Type 1 diabetes mellitus. *Kid. Int*, 41:1070-1080; 1992
- 112) Brocco E., Fioretto P., Mauer M. et al. Renal structure and function in non insulin dependent diabetic patients with microalbuminuria. *Kidney Int*; 52: S40-44;1997
- 113) Deckert T. Felt-Rasmussen B. Borch-Johnsen K, Jensen T. Kofoed Enevoldsen A. Albuminuria reflects widespread vascular damage. *Diabetologia*, 32: 219-226; 1989
- 114) Parving H.H., Rasmussen SM. Transcapillary escape rate of albumin and plasma volume in short- and long-term juvenile diabetics. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 32, 81-87, 1973.
- 115) Parving H.H., Rossing N. Simultaneous determination of the transcapillary escape rate of albumin and IgG in normal and long-term juvenile diabetic subjects. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 32, 239-244, 1973.
- 116) Feldt-Rasmussen B. Increased transcapillary escape rate of albumin in type I (insulin-dependent) diabetic patients with microalbuminuria *Diabetologia*, 29, 282-286, 1986.

- 117) Norgaard K., Jensen T., Feldt-Rasmussen B. Transcapillary escape rate of albumin in hypertensive patients with type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, 36, 57-61, 1993.
- 118) Porta M., Towsed C., Clover G.M. et al. Evidence for functional endothelial cell damage in early diabetic retinopathy. *Diabetologia*, 20, 597-601, 1981.
- 119) Jensen T. Increased plasma level of von Willebrand factor in insulin dependent diabetic patients with incipient nephropathy. *BMJ*, 298, 27 28; 1989.
- 120) Luetscher J.A., Kramer F.B., Wilson D.M., Schwartz H.C., Bryer-Ash M. Increased plasma inactive renin in diabetes mellitus. A marker of microvascular complications. *N. Engl. J. Med.*, 312, 1412-1417; 1985.
- 121) Feldt-Rasmussen B., Mathiesen E.R., Deckert T., et al. Central role for sodium in the pathogenesis of blood pressure changes independent of angiotensin, aldosterone and catecholamines in type 1 (insulin dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, 30, 610-617; 1987.
- 122) Wilson D.M., Luetscher J.A. Plasma prorenin activity and complications in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, 323, 1101-1106; 1990.
- 123) Franken A.A.M., Derkx F.H.M., Man in't Veld A.J. et al. High plasma prorenin in diabetes mellitus and its correlation with some complications. *J. Clin. Endocrinol.*, 71, 1008-1015; 1990.
- 124) Chen J.W., Gall M.-A., Deckert M., Jensen J.S., Parving H.H. Increased serum concentration of von Willebrand factor in non insulin dependent diabetic patients with and without diabetic nephropathy. *BMJ*, 311, 1405-1406; 1995.
- 125) Parving H.H., Nielsen F.S., Bang L.E., Smidt U.M., Svedensen T.L., Chen J.W., Gall M.A., Rossing P. Macro-microangiopathy and endothelial dysfunction in

NIDDM patients with and without diabetic nephropathy. *Diabetologia*, 39, 1590-1597; 1996.

126) Kearney EM, Mount JN, Watts GF, Slavin BM, Kind PRN, Simple immunoturbidimetric method for determining urinary albumin at low concentration using Cobas-Bio centrifugal analyzer. *J Clin. Pathol.* 40: 465-468; 1987

127) Dunn P.J., Cole R.A., Soeldner J.S. Further development and automation of a high pressure liquid chromatographic method for determination of HbA_{1c}. *Metabolism*, 28, 777-779; 1979.

128) Cockcroft D.W., Gault M.H. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron*, 16, 31-41; 1976.

129) Sambataro M, Thomaseth K, Pacini G. Robaudo C., Carraro A., Bruseghin M., Brocco E., Abaterusso C., DeFerrari G., Maioli M., Tonolo G.C., Crepaldi G., Nosadini R. Plasma clearance of ⁵¹Cr-EDTA provides a precise and convenient technique for measurement of glomerular filtration rate in diabetic humans. *JASN*, 7, 1-10; 1996.

130) Jensen E. B. , Gundersen H.J.G. , Osterby R. Determination of membrane thickness distribution from orthogonal intercepts. *J. Microsc (Oxford)*, 115: 19-33; 1979

131) Thomas MC, Burns WC, Cooper ME. Tubular changes in early diabetic nephropathy. *Adv Chronic Kidney Dis.* 12: 177-86; 2005

132) Ziyadeh FN. Renal tubular basement membrane and collagen type IV in diabetes mellitus. *Kidney Int.* 43: 114-120; 1993.

LEGENDA

Figura 1 A: Sezione di membrana basale del tubulo prossimale fotografata al microscopio elettronico (5000X) di un paziente con diabete di tipo 2 normoalbuminurico.

Figura 1 B: Sezione di membrana basale del tubulo prossimale fotografata al microscopio elettronico (5000X) di un paziente con diabete di tipo 2 proteinurico, si noti l'incremento dello spessore della TBM.

Figura 2: Membrana basale del tubulo prossimale fotografata al microscopio elettronico (5000X) con sovrapposta griglia utilizzata per la quantificazione dello spessore della TBM. In basso a sinistra è rappresentato il righello reciproco utilizzato.

Figura 3: Sezione di cellula del tubulo prossimale con evidenti gli spazi vuoti intracitoplasmatici.

Figura 4 A: Sezione di corticale renale di un soggetto sano fotografato al microscopio ottico (colorazione PAS, 40X). Il preparato evidenzia un glomerulo con struttura normale e sezioni di tubulo prossimale con epitelio ben conservato.

Figura 4 B: Particolare di tubuli prossimali del preparato precedente fotografati al microscopio ottico (100X).

Figura 5 A: Sezione di corticale renale di un paziente con diabete tipo 2 proteinurico fotografato al microscopio ottico (colorazione PAS, 40X). Si noti l'ispessimento e la reduplicazione della TBM e l'espansione interstiziale.

Figura 5 B: Particolare di tubuli prossimali del preparato precedente fotografati al microscopio ottico, si noti l'ispessimento della TBM evidenziato dalla colorazione PAS (100X).

Figura 6 A: Sezione di corticale renale di un paziente con diabete tipo 2 proteinurico fotografato al microscopio ottico (colorazione PAS, 40X) con evidente atrofia tubulare.

Figura 6 B: Particolare di tubuli prossimali atrofici del preparato precedente fotografati al microscopio ottico (100X).

Figura 7: Sezione di corticale renale di un paziente con diabete di tipo 2 normoalbuminurico fotografato al microscopio ottico (colorazione PAS) con sovrapposta la griglia utilizzata per la quantificazione dell'espansione interstiziale.

Figura 8: Valori di spessore della TBM nei controlli (dati di letteratura) e nei pazienti con diabete di tipo 2 divisi in gruppi in base ai valori di velocità di escrezione urinaria dell'albumina (AER). NA: normoalbuminurici, MA microalbuminurici, P: proteinurici

Figura 9: Correlazione tra spessore della TBM e spessore della GBM nei pazienti con diabete di tipo 2.

Figura 10: Correlazione tra TBM width e AER nei pazienti con diabete di tipo 2.

Figura 11: Correlazione tra TBM width e Hb_{A1c} nei pazienti con diabete di tipo 2.