МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО ПАТОФИЗИОЛОГИЯ

д-р Анелия Първанова Илиева, дм

ИНХИБИРАНЕ НА АНГИОТЕНЗИН И ЕНДОТЕЛИН КОНВЕРТИРАЩИТЕ ЕНЗИМИ И РОЛЯТА ИМ В ПРОФИЛАКТИКАТА И ЛЕЧЕНИЕТО НА МИКРОАЛБУМИНУРИЯТА ПРИ ЗАХАРЕН ДИАБЕТ ТИП 2

Област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт,
Професионално направление 7.1. Медицина,
Докторска програма по Патофизиология
Научна специалност ш. 03.01.05. – Патофизиология

Д И С Е Р Т А Ц И Я

За присъждане на научна степен

“Доктор на науките”

СОФИЯ

2016

На моя баща,

доц. Първан Иванов Николов, к.т.н.

(1937 - 1987)

Поклон!

СЪДЪРЖАНИЕ

СЪДЪРЖАНИЕ 3

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ 9

АКРОНИМИ НА КЛИНИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ 13

ВЪВЕДЕНИЕ 15

ПЪРВА ГЛАВА. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР 18

1.1. Система ренин-ангиотензин алдостерон 19

1.1.1. Исторически преглед 19

1.1.2. Ренин: синтез и фактори, стимулиращи секрецията му 21

1.1.3. Ангиотензиноген: синтез и фактори, стимулиращи секрецията му 22

1.1.4. Ангиотензин конвертиращ ензим: синтез, структура и биологична характеристика 23

1.1.5. Ангиотензин II: рецептори и ефекти 25

1.1.6. Нови концепции за RAS 29

1.1.6.1. Локална RAS 29

1.1.6.2. Алтернативни пътища за образуване на Ang II 30

1.1.7. Нови компоненти на RAS 32

1.1.7.1. Ренин / Проренинови рецептори 32

1.1.7.2. Ангиотензин конвертиращ ензим тип 2 33

1.1.7.3. Други ангиотензинови пептиди 35

1.1.8. Роля на локалната RAS в бъбречните функции 36

1.1.8.1. ACE / Ang II / AT1 37

1.1.8.2. ACE2 / Ang 1-7 / Mas R 38

1.1.8.3. Проренин / (P)PR / MAPK-ERK 1/2 40

1.1.8.4. Ang II / Ang III / AT2 41

1.1.8.5. Ang IV / AT4 / IRAP 41

1.1.8.6. Интрацелуларна RAS 42

1.1.9. Фармакологично инхибиране на RAS и диабетна нефропатия 44

1.1.9.1. Артериална хипертензия и албуминурия – основен таргет в ренопротекцията 44

1.1.9.2. Исторически данни за фармакологичното инхибиране на RAS 45
1.1.9.3. Потенциални механизми, участващи в ренопротекцията 45
1.1.9.3.1. Инхибиране на ACE 45
1.1.9.3.2. Блокиране на рецепторите на Ang II 48
1.1.9.3.3. Комбинирано инхибиране на ACE и AT1 49
1.1.9.3.4. Блокиране на бавните L-тип потенциал-зависими калциеви канали 49
1.1.9.3.5. Комбинирано блокиране на RAS и на бавните L-тип потенциал-зависими калциеви канали 50
1.1.9.4. Предотвратяване прогресията на макроалбуминурия към ТБН 51
1.1.9.4.1. Захарен Диабет тип 1 51
1.1.9.4.2. Захарен Диабет тип 2 52
1.1.9.5. Предотвратяване прогресията на микроалбуминурия към макроалбуминурия 54
1.1.9.5.1. Експериментални данни 54
1.1.9.5.2. Захарен Диабет тип 1 54
1.1.9.5.3. Захарен Диабет тип 2 55
1.1.9.6. Предотвратяване появата на микроалбуминурия 56
1.1.9.6.1. Захарен Диабет тип 1 56
1.1.9.6.2. Захарен Диабет тип 2 56
1.1.9.7. Ренопротекция с комбинирано инхибиране на ACE и блокиране на рецепторите на Ang II 56
1.1.9.8. Роля на блокирането на бавните L-тип потенциал-зависими калциеви канали в ренопротекцията при ЗД-2 59
1.1.9.9. Роля на комбинираното инхибиране на ACE и блокирането на бавните L-тип потенциал-зависими калциеви канали в ренопротекцията при ЗД-2 60
1.2. Ендотелин 62
1.2.1. Структура, синтез, катаболизъм, рецептори и основни ефекти 62
1.2.2. Основни концепции за биологията на ендотелина 65

1.2.3. Роля на ендотелина в бъбречните функции 66
1.2.3.1. Ендотелин и съдова система на бъбреците 66
1.2.3.1.1. Синтез, експресия и ефекти на ЕТ в бъбречната микроциркулация 66
1.2.3.1.2. Ефекти на ЕТ върху медуларния бъбречен кръвоток 68
1.2.3.1.3. Сигнални пътища на ЕТ в бъбречното кръвообращение 69
1.2.3.2. Синтез и ефекти на ЕТ в гломерулните и мезангиалните клетки 70
1.2.3.3. Синтез на ЕТ и експресия на рецепторите му в отделните тубулни сегменти 71
1.2.3.4. Роля на ЕТ в регулацията на водния транспорт 72
1.2.3.5. Роля на ЕТ в регулацията на транспорта на натрий 72
1.2.3.6. Роля на ЕТ в регулацията на алкално-киселинното равновесие 72
1.2.4. Ендотелин и системата ренин-ангиотензин 73
1.2.4.1. Ендотелин и ренин 73
1.2.4.2. Ендотелин и ангиотензин II 73
1.2.5. Бъбречен ЕТ и артериална хипертензия 74
1.2.6. Роля на ЕТ в диабетната нефропатия 75
1.2.6.1. Експериментални проучвания 75
1.2.6.2. Клинични проучвания 76
1.3. Натриуретични пептиди 79
1.3.1. Структура, синтез, катаболизъм, рецептори и механизъм на действие 79
1.3.2. Основни физиологични ефекти 81
1.3.2.1. Бъбреци 81
1.3.2.2. Сърце и кръвоносни съдове 82
1.3.2.3. Централна нервна система 82
1.3.2.4. Мастна тъкан 83
1.3.3. Други натриуретични пептиди 83
1.3.4. Възможности за клинично приложение 84
1.4. Изводи от обзора на литературата 87

1.5. Работни хипотези 90
ВТОРА ГЛАВА. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ 91
ТРЕТА ГЛАВА. КОНТИНГЕНТИ И МЕТОДИКИ 93
3.1. BErgamo NEphrologic DIabetes Complications Trial (BENEDICT) 93
3.1.1. Контингенти 93
3.1.2. Дизайн на проучването 94
3.1.3. The BENEDICT-A Extension Study (Удължено проучване на BENEDICT-A) 100
3.1.3.1. Контингенти 100
3.1.3.2. Дизайн на проучването 101
3.2. Изследване ефикасността и профила на безопасност на даглутрил при пациенти със ЗД-2, диабетна нефропатия и артериална хипертензия 102
3.2.1. Контингенти 102
3.2.2. Дизайн на проучването, изпитван лекарствен продукт 103
3.3. Източник на данните 105
3.4. Признаци на наблюдението 106
3.4.1. Факториални 106
3.4.2. Резултативни 107
3.5. Клинични и лабораторни методи 107
3.5.1. Измерване на гломерулна филтрационна скорост и други основни показатели на бъбречната функция 107
3.5.2. Измерване на скорост на екскреция на албумина 109
3.5.2.1. Процедура за събиране на нощна урина 109
3.5.2.2. Процедура за събиране на три последователни 24-часови колекции на урина 109
3.5.3. Измерване на артериално налягане 110
3.5.3.1. В лекарския кабинет 110
3.5.3.2. Амбулаторно 24-часово мониториране на артериално налягане 111
3.5.4. Други биохимични измервания 112
3.5.5. Определяне размера на извадките 112

3.5.5.1. BENEDICT-A 112
3.5.5.2. Удължено проучване на BENEDICT (BENEDICT Extension study) 113
3.5.5.3. BENEDICT-B 113
3.5.5.4. Изследване ефикасността и профила на безопасност на даглутрил при пациенти със ЗД-2, ДН и АХ 114
3.5.6. Методи за статистически анализ 114
ЧЕТВЪРТА ГЛАВА. РЕЗУЛТАТИ 118
4.1. Изследване ефекта на АСЕ-инхибира трандолаприл, приложен самостоятелно или в комбинация с ndCCB верапамил, върху честотата на поява на микроалбуминурия при хипертензивни пациенти със ЗД-2 и нормоалбуминрия 118
4.2. Изследване наличието на асоциация между нормоалбуминурия и дългосрочния сърдечно-съдов риск и ролята на рано започнатата терапия с АСЕ-инхибитор в дългосрочната кардиопротекция при пациенти със ЗД-2, нормоалбуминурия и АХ, рандомизирани в BENEDICT-A 135
4.3. Изследване дали добавянето на ndCCB верапамил към АСЕ-инхибитора трандолаприл може допълнително да забави прогресията на микроалбуминурията до макроалбуминурия (основна цел), да потенцира регресията на микроалбуминурията до нормоалбуминурия и да ограничи ССЗ (вторични цели) при хипертензивни пациенти със ЗД-2, микроалбуминурия и нормална бъбречна функция 143
4.4. Изследване ефектите на даглутрил, инхибитор на ECE и NEP, върху албуминурията, артериалното налягане, бъбречната функция и профила на безопасност на фона на лосартан, при пациенти със ЗД-2, АХ и диабетна нефропатия (микро- и макроалбуминурия) 153
ПЕТА ГЛАВА. ОБСЪЖДАНЕ НА ПОЛУЧЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ 163
5.1. Изследване ефекта на АСЕ-инхибира трандолаприл, приложен самостоятелно или в комбинация с ndCCB верапамил, върху честотата на поява на микроалбуминурия при хипертензивни пациенти със ЗД-2 и нормоалбуминрия 163

5.2. Изследване наличието на асоциация между нормоалбуминурия и дългосрочния сърдечно-съдов риск и ролята на рано започнатата терапия с АСЕ-инхибитор в дългосрочната кардиопротекция при пациенти със ЗД-2, нормоалбуминурия и АХ, рандомизирани в BENEDICT-A 174
5.3. Изследване дали добавянето на ndCCB верапамил към АСЕ-инхибитора трандолаприл може допълнително да забави прогресията на микроалбуминурията до макроалбуминурия (основна цел), да потенцира регресията на микроалбуминурията до нормоалбуминурия и да ограничи ССЗ (вторични цели) при хипертензивни пациенти със ЗД-2, микроалбуминурия и нормална бъбречна функция 179
5.4. Изследване ефектите на даглутрил, инхибитор на ECE и NEP, върху албуминурията, артериалното налягане, бъбречната функция и профила на безопасност на фона на лосартан, при пациенти със ЗД-2, АХ и диабетна нефропатия (микро- и макроалбуминурия) 186
ИЗВОДИ 193
НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧНИ ПРИНОСИ 195
НАУЧНО-ПРИЛОЖНИ ПРИНОСИ 197
ЛИТЕРАТУРА 199

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АН	–	артериално налягане
АХ	–	артериална хипертензия
ГБМ	–	гломерулна базална мембрана
ДКН	–	диастолно кръвно налягане
ДН	–	диабетна нефропатия
ЕТ-1	–	ендотелин-1
ET_AP	–	ендотелин А рецептор
ET_BP	–	ендотелин В рецептор
ЕКГ	–	електрокардиограма
ЗД	–	захарен диабет
ЗД-1	–	захарен диабет тип 1
ЗД-2	–	захарен диабет тип 2
иРНК	–	информационна рибонуклеинова киселина
ИТМ	–	индекс на телесна маса
ХЛК	–	хипертрофия на лявата камера
НЛР	–	нежелани лекарствени реакции
$[Ca^{2+}]_I$	–	цитозолна калциева концентрация
РФ	–	рисков(и) фактор(и)
САН	–	средно артериално налягане
СГМК	–	съдови гладко-мускулни клетки
СГФ	–	скорост на гломерулна филтрация
СК	–	събирателни каналчета
СКН	–	систолно кръвно налягане
ССЗ	–	сърдечно-съдови заболявания
ТБН	–	терминална бъбречна недостатъчност
ХБН	–	хронична бъбречна недостатъчност
ХСН	–	хронична сърдечна недостатъчност
ЦНС	–	централна нервна система

ЮГА – юкстагломерулен апарат

AACE – American Association of Clinical Endocrinologists (Американска Асоциация на Клиничните Ендокринолози)

ACE – angiotensin-converting enzyme (ангиотензин конвертиращ ензим)

ADH – antidiuretic hormone (антидиуретичен хормон, вазопресин)

AER – albumin excretion rate (скорост на екскреция на албумина)

AHA – American Heart Association (Американска Кардиологична Асоциация)

Ang II – angiotensin II (ангиотензин II)

ANP – atrial natriuretic peptide (предсърден натриуретичен пептид)

ARBs – angiotensin II receptor blockers (антагонисти на рецепторите на ангиотензин II)

AUC – area under the curve (площ под кривата)

AV – atrioventricular (атриовентрикуларен)

BNP – brain natriuretic peptide (B-тип натриуретичен пептид)

BSA – body surface area (телесна повърхност)

CCBs – calcium channel blockers (калциеви антагонисти)

cGMP – cyclic guanosine monophosphate (цикличен гуанозин монофосфат)

CI – confidence interval (доверителен интервал)

CNP – C-type natriuretic peptide (C-тип натриуретичен пептид)

dCCBs – dihydropyridine CCBs (дихидропиридинови калциеви антагонисти)

EASD – European Association for the Study of Diabetes (Европейска Асоциация за Изучаване на Диабета)

ECE – endothelin converting enzyme (ендотелин конвертиращ ензим)

ERK1/2 – extracellular signal-regulated kinases 1/2 (екстрацелуларни сигнал-регулирани кинази 1/2)

ESC – European Society of Cardiology (Европейско общество по кардиология)

ESH – European Society of Hypertension (Европейско Общество по Хипертензия)

FF – filtration fraction (филтрационна фракция)

HbA_{1c} – glycated hemoglobin (гликолизиран хемоглобин)

HDL – high-density lipoprotein (високо-плътностни липопротеини)

HPLC – high performance liquid chromatography (високо-афинитетна течна хроматография)

HR – hazard ratio (кумулативен коефициент на риска)

ICAM-1 – intercellular adhesion molecule-1 (междуклетъчна адхезионна молекула-1)

IL – interleukin (интерлевкин)

IQR – interquartile range (интерквартилен обхват)

kb – kilobase (килобаза)

LDL – low-density lipoprotein (ниско-плътностни липопротеини)

MAPK – mitogen-aktivated protein kinase (митоген-активирана протеинкиназа)

MCP-1 – monocyte chemotactic protein-1 (моноцит хемотаксичен протеин-1)

Na^+/K^+-ATP– sodium-potassium adenosine triphosphatase (натриево-калиева аденозин-трифосфатаза)

ndCCBs – nondihydropyridine CCBs (недихидропиридинови калциеви антагонисти)

NEP – neutral endopeptidase (неутрална ендопептидаза)

NF-kB – nuclear factor kappa-beta (нуклеарен фактор капа-бета)

NO – nitric oxide (азотен оксид)

NP	–	natriuretic peptides (натриуретични пептиди)
OR	–	Odds ratio (Отношение на шансовете)
PAI-1	–	plasminogen activator inhibitor-1 (инхибитор на плазминогеновия активатор-1)
PGI2	–	prostacyclin (простациклин)
PI3-K		phosphatidylinositol 3-kinase (фосфатидилинозитол-3-киназа)
(P)RR	–	(pro)renin receptor ((про)ренин рецептор)
RAS	–	renin angiotensin system (система ренин-ангиотензин)
RPF	–	renal plasma flow (ренален плазмен ток)
RVR	–	renal vascular resistance (бъбречно съдово съпротивление)
TGF-β1	–	transforming growth factor-beta1 (трансформиращ растежен фактор-бета1)
TNF-α	–	tumor necrosis factor-alpha (тумор некрозис фактор-алфа)

АКРОНИМИ НА КЛИНИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ

ASCEND – A Randomised, Double Blind, Placebo Controlled, Parallel Group Study to Assess the Effect of the Endothelin Receptor Antagonist Avosentan on Time to Doubling of Serum Creatinine, End Stage ReNal Disease or Death in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Diabetic Nephropathy

DCCT – the Diabetes Control and Complications Trial

DEMAND – The DElapril and MAnidipine for Nephroprotection in Diabetes

DIRECT – DIabetic REtinopathy Candesartan Trials

EDIC – the Epidemiology of DIabetes Interventions and Complications

EUCLID – EURODIAB Controlled trial of Lisinopril in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus study

HOPE – Heart Outcomes Prevention Evaluation

HOPE-TOO – HOPE-The Ongoing Outcomes study

IDNT – Irbesartan in Diabetic Nephropathy Trial

IRMA – IRbesartan in patients with type 2 diabetes and MicroAlbuminuria

J-MIND – Japan Multicenter Investigation of antihypertensive treatment for Nephropathy in Diabetics

LIFE – Losartan Intervention For Endpoint reduction in Hypertension

ONTARGET – ONgoing Telmisartan Alone and in combination with Ramipril Global End-point Trial

PREVEND – Prevention of REnal and Vascular ENd Stage Disease

RENAAL – Reduction of Endpoints in Non-insulin dependent diabetes mellitus with the Angiotensin II Antagonist Losartan

ROADMAP – Randomized Olmesartan And Diabetes MicroAlbuminuria Prevention

SONAR – Study Of Diabetic Nephropathy with AtRasentan

UKPDS – United Kingdom Prospective Diabetes Study

VALID – A prospective, randomized, open label blinded end point (probe) trial to evaluate whether, at comparable blood pressure control, combined therapy with the ACE inhibitor benazepril and the angiotensin II receptor blocker (ARB) VALsartan reduces progression to ESRD more effectively than benazepril or valsartan alone In high risk patients with type 2 Diabetes and overt nephropathy

VARIETY – A prospective, randomized, open label blinded end point (probe) trial to evaluate whether, combined therapy with the ACE-inhibitor benazepril and the angiotensin II receptor blocker VAlsartan, Reduces the Incidence of microalbuminuria more Effectively than benazepril or valsartan alone in hypertensive patients with TYpe 2 diabetes and high-normal albuminuria

ВЪВЕДЕНИЕ

Захарният диабет (ЗД) се явява най-масовата неинфекциозна епидемия в човешката история. Неговата разпространеност в световен мащаб е средно от 1 до 3%, а при прибавяне и на недиагностицираните случаи се достига до 6% [World Health Organisation, 2011]. През 2011 година са регистрирани 346 милиона болни от ЗД, като 90% от тях са със ЗД тип 2 (ЗД-2). Предполага се, че към 2030 г. болните ще бъдат над 429 милиона, което е свързано с повишаване честотата на затлъстяването, заседналия начин на живот и подобряване диагностицирането на заболяването [Wild S et al, 2004]. Тревожен е фактът, че ЗД-2 се увеличава не само в напредналите индустриализирани страни, но също и в развиващите се държави в Африка, Азия и Латинска Америка, и все по-често обхваща млади хора, дори под тридесетгодишна възраст, като в някои етнически групи зачестява сред деца и юноши [World Health Organisation, 2011].

Съвременната терапия на ЗД удължава средната продължителност на живота, като създава предпоставка за увеличаване на неговите хронични микро- и макроваскуларни усложнения. От микроваскуларните усложнения, диабетната нефропатия (ДН) засяга около една трета от пациентите и е основна причина за терминалната бъбречна недостатъчност (ТБН) в световен мащаб [Mogensen CE, 1995; Remuzzi G et al, 2002; Parving HH et al, 2004]. Първият клиничен признак на ДН е появата на микроалбуминурия, която се наблюдава в 2–5 % от пациентите годишно [Viberti GC et al, 1982; Mogensen CE, 1984; Gall MA et al, 1997; Adler AI et al; 2003]. При ЗД-2, за разлика от ЗД-1, микроалбуминурията по-рядко е обратима и прогресира до изявена протеинурия при 20-40 % от пациентите [Mogensen CE, 1984; Nelson RG et al, 1991; Perkins BA et al, 2003]. Десет до 50% от пациентите с протеинурия достигат до ТБН, която в крайна сметка изисква диализа или трансплантация [Nelson RG et al, 1988; Brenner BM et al, 2001; Lewis EJ et al, 2001]. Микроалбуминурията отразява не само бъбречно увреждане, но често рефлектира и генерализирана ендотелна дисфункция, асоциирана с повишен

кардиоваскуларен риск [Mattock MB et al, 1998; Ritz E, 2003]. Диабетно болните с микроалбуминурия имат три пъти по-висока честота на смъртност от сърдечно-съдови заболявания (ССЗ), в сравнение с тези без микроалбуминурия [Adler AI et al, 2003], като 40-50 % от пациентите със ЗД-2 и микроалбуминурия умират от ССЗ преди да достигнат до ТБН [Eurich DT et al, 2004; Parving HH et al, 2004]. Затова, превенцията на микроалбуминурията се явява основен таргет при пациентите със ЗД-2.

Освен ДН, друга водеща причина за ТБН е и артериалната хипертензия (АХ) [Mogensen CE, 1976; Remuzzi G et al, 2002]. Ангиотензин II (Ang II), основният ефекторен пептид на системата ренин-ангиотензин (RAS) има централна роля в патогенезата и прогресията на ДН, АХ и асоциираните сърдечно-съдови усложнения. Показано е, че лекарствата, които потискат активността на RAS, а именно инхибиторите на ангиотензин конвертиращия ензим (ACE) и антагонистите на рецепторите на Ang II (ARBs), при подобен контрол на артериалното налягане (АН), намаляват бъбречните и ССЗ при пациентите със ЗД по-ефективно, в сравнение с другите антихипертензивни лекарства [Brenner BM et al, 2001; Remuzzi G et al, 2002; Eurich DT et al, 2004; Ruggenenti et al, 2010]. Въпреки това, протективният ефект на инхибиторите на RAS е недостатъчен при пациентите с напреднал стадий на ДН, свързано с нейната комплицирана и многофакторна патогенеза [Brenner BM et al, 2001; Ruggenenti et al, 2010]. Това налага търсенето на нови методи за потенциране на нефропротективния им ефект или чрез тяхното комбиниране, с което се осъществява по-пълна блокада на RAS, или чрез комбинирането им с други антихипертензивни препарати, като например антагонистите на бавните L-тип потенциал-зависими калциеви канали (CCBs), за които също има данни, че намаляват албуминурията и забавят прогресията на ДН [Fioretto P et al, 1992; Bakris GL et al, 1996; Bakris GL et al, 1998]. През последното десетилетие активно се изследват и други лекарства, които потискат RAS, като инхибитори на ренина, антагонисти на рецепторите на алдостерона, агонисти на

рецепторите на витамин Д [Dhakarwal P et al, 2014; Parvanova AI et al, 2014 Sato A, 2015; Humalda JK et al, 2015]. Изследват се и нови лекарствени молекули, повлияващи не-RAS зависими патогенетични фактори в развитието на ДН [Vogt L et al, 2010; Waanders F et al, 2013].

След откриването на ендотелин-1 (ET-1), мощен вазоконстриктор стимулиращ процесите на пролиферация и възпаление, антагонизмът на рецепторите на този пептид или на неговото образуване от прекурсора му Big-ET чрез инхибиране на ендотелин-конвертиращия ензим (ECE) е предложен като нов подход в лечението на АХ и бъбречните заболявания [Yanagisawa M et al, 1988; Dhaun N et al, 2008].

Семейството на натриуретичните пептиди (NP), освен натриуретична, притежават също диуретична, вазодилатираща, антиинфламаторна, антифибротична, антимитогенна и антихипертрофична активност. Повишаването на NP чрез инхибиране на неутралната ендопептидаза (NEP), ензимът, който ги разгражда е таргет в клиничните изследвания през последните двадесет години поради благоприятните им ефекти върху сърдечната и отделителната системи.

Интересна е и стратегията, чрез която се търси максимална терапевтична полза от инхибирането на два или повече ензими с т.нар. вазопептидазни инхибитори. Пример за това е комбинираното инхибиране на ECE и NEP, при което се потиска синтеза на вазоконстриктора ET-1 и се потенцират ефектите на NP. Предполага се, че този подход може да има приложение при лечението на ДН тъй като ET-1 и NP участват активно в регулацията на основните бъбречни функции.

Подобряването на съществуващите терапевтични програми и откриването на лекарствени молекули с нов механизъм на действие ще доведе до по-успешна профилактика и лечение на ДН, което ще намали колосалните разходи, свързани с нейното лечение и ще подобри качеството на живот на пациентите със ЗД-2 и бъбречни усложнения.

ПЪРВА ГЛАВА

ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Диабетната нефропатия е водеща причина за ТБН в световен мащаб и е асоциирана с увеличена кардиоваскуларна заболеваемост и смъртност [Mogensen CE, 1995; Remuzzi G et al, 2002; Parving H-H et al, 2004]. Нейната честота, разпространение и разходи продължават да нарастват, което е свързано с драматичното увеличаване на болните от ЗД-2 [King H et al, 1998; Rossing P, 2006]. Лечението на ДН е важен здравен и социален проблем и е предизвикателство за научните среди и клиничната практика.

В многофакторната патогенеза на ДН участват редица хемодинамични, метаболитни и хуморални фактори: повишено гломерулно и системно артериално налягане (АН), патологично активираната RAS, вазоконстрикторите ЕТ-1 и уротензин II, хипергликемия, дислипидемия, затлъстяване, инсулинова резистентност, хиперхомоцистеинемия, тютюнопушене, анемия, възпалителни цитокини, растежни фактори, които са в сложни и финни взаимодействия помежду си, но за съжаление не са проучени напълно. Освен това, те се наблюдават върху различен генетичен терен, при представителите на двата пола и на различните раси, и се задълбочават с напредването на възрастта и давността на диабета [Pugh JA et al, 1988; Seaquist ER et al, 1989; Keller CK et al, 1996; Gall MA et al, 1997; De Mattia G et al, 1998; Ravid M et al, 1998; Parvanova A et al, 2006; Vogt L et al, 2010].

Основният патогенетичен механизъм в развитието на ДН е свързан с вазоконстрикторното действие на Ang II и ET-1 върху еферентната артериола на гломерула, което води до повишаване на гломерулното налягане и на гломерулната филтрация [Ritz E and Orth SR, 1999]. Това е съпроводено със структурни промени: задебеляване на гломерулната базална мембрана (ГБМ) и експанзия на мезангиалния матрикс [Dalla Vestra M et al, 2000]. Хиперфилтрацията и структурните изменения в гломерула са в основата на

променения трафик на плазмените албумини през ГБМ, което води до появата на микроалбуминурия, първият клиничен белег на ДН.

В настоящия литературен обзор са разгледани RAS, системите на ET и NP, техния синтез, структура, ефекти и значението им в регулацията на бъбречната функция и развитието на ДН. Дискутирани са възможни ренопротективни механизми при тяхното повлияване.

1.1. Система ренин-ангиотензин алдостерон

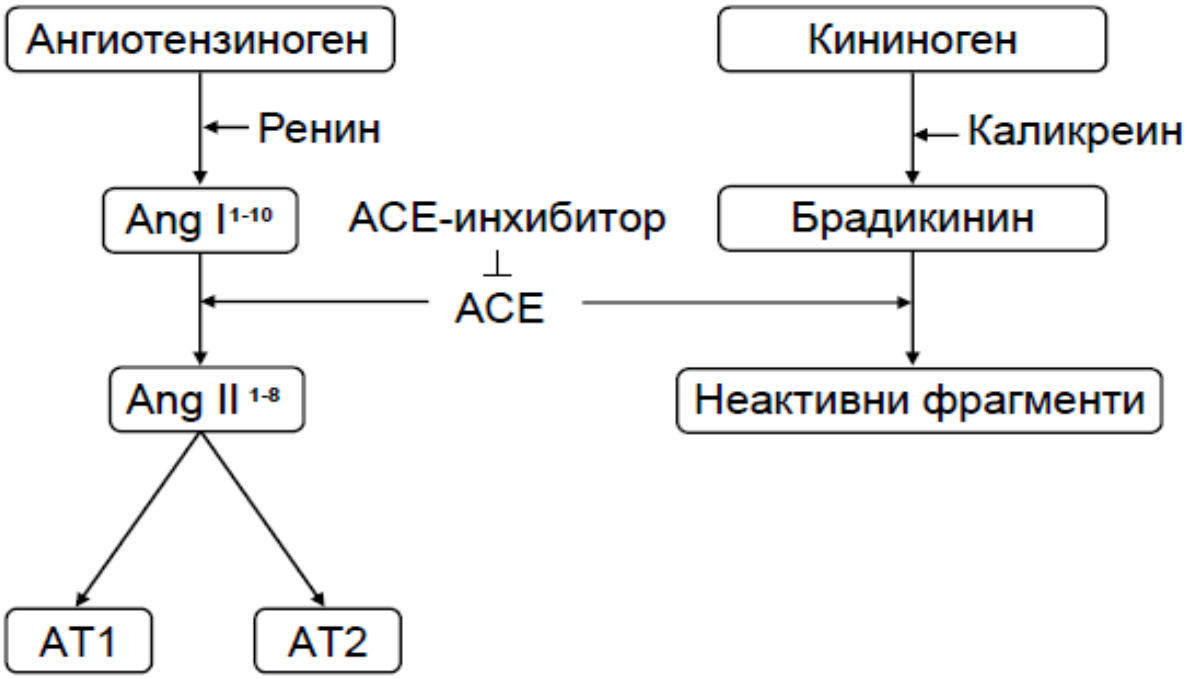
1.1.1. Исторически преглед

Системата ренин-ангиотензин алдостерон е много стара в еволюционно отношение – появила се е като система за запазване на течностите и солите в земноводните, когато животът е излязъл на сушата. Рибите нямат RAS, защото тя не им е необходима.

През 1898 г. финландският патофизиолог Robert Tiegerstedt и неговият студент, шведът Per Bergman откриват ренина [Kunikullaya UK et al, 2012]. Те забелязват, че инжектирането на непречистен солеви екстракт от заешки бъбрек повишава АН на експериментални животни. Веществото, определящо този ефект е намерено в кортикалната бъбречна тъкан, но не и в медулата и се разрушава при висока температура. Авторите заключават, че то има белтъчна природа и го наричат ренин. Те допускат, че “ренинът вероятно е в директна или индиректна асоциация с хипертрофията на сърцето, установена при бъбречните заболявания и АХ” [Phillips MI and Schmidt-Ott KM, 1999]. По-късно Tiegerstedt установява, че бъбречни екстракти предизвикват значим пресорен ефект при нефректомирани животни. Въпреки, че това е началото на разбирането на ролята на бъбреците и RAS в патогенезата на АХ, откритието бива изоставено в продължение на почти 40 години, тъй като други изследователи не успяват да потвърдят тези наблюдения. Невъзможността да бъдат възпроизведени резултатите на Tiegerstedt вероятно се дължи на лесното разрушаване на молекулата на ренина при съхранение на екстарктите

на стайна температура. През 1934 г. Goldbatt и сътрудници демонстрират, че клампирането на бъбречната артерия на куче води до повишаване на АН, чиито профил е подобен на този на АХ, наблюдавана при хора [Goldblatt H et al, 1934]. Повишението на АН е съпроводено от повишение на плазмената ренинова активност. Така Goldbatt формулира хипотезата за рениновата хипертония. През 1940 г., две групи, независимо една от друга, установяват, че ренинът е ензим, който действа върху плазмен протеинов субстрат, катализирайки образуването на вещество, което повишава АН [Braun-Menendez E et al, 1940; Page IH and Helmer OM, 1940]. Първата група го нарича хипертензин, а втората група - ангиотонин. Тези два термина са използвани за около двадесет години, след което се постига споразумение за предефиниране на веществото с пресорен ефект като ангиотензин. В средата на 50-те години са изолирани две форми на ангиотензина, един декапептид, наречен ангиотензин I (Ang I), от който под влияние на ACE се получава октапептидът Ang II [Skeggs LT Jr et al, 1956]. Демонстрирано е, че октапептидът е по-активната форма на ангиотензина. През 1957 г., Bumpus и колеги синтезират Ang II, което дава тласък на задълбоченото му изучаване [Bumpus FM et al, 1957].

Така се оформя представата за класическата циркулираща RAS като линейна ензимна каскада, която включва ренин, ангиотензиноген, ангиотензин I (Ang I), ACE, Ang II и ангиотензинови рецептори тип 1 и тип 2 (AT1 и AT2) **(Фигура 1)**.



Фигура 1. Класическа циркулираща система ренин-ангиотензин. Ang – ангиотензин; ACE - ангиотензин конвертиращ ензим; AT - ангиотензинов рецептор.

1.1.2. Ренин: синтез и фактори, стимулиращи секрецията му

Аспартилпротеазата ренин е ключовият ензим, който определя скоростта на образуване на Ang II.

Той се синтезира и секретира от специализирани грануларни клетки на юкстагломерулния апарат (ЮГА) на бъбрека. Изоензими на ренина се образуват в мозъка и в ендотелните клетки на кръвоносните съдове.

Ренинът се кодира от гена REN, дълъг 12 килобази (kb), съдържащ 8 интрона [Hobart PM et al, 1984]. Неговата информационна (матрична) рибонуклеинова киселина (иРНК) кодира препроренин, който се състои от 406 аминокиселни и има пре- и про-сегменти, изградени съответно от 20 и 46 аминокиселини. От препроренина, чрез отделяне на пресегмента се образува проренин. От него, под въздействието на проконвертаза 1 или катепсин B, настъпва отделяне на просегмента чрез протеолиза и се получава ренин, който се състои от 340 аминокиселини и има молекулна маса 37 kDa [Murakami K et al, 1984]. За локалната RAS в тъканите (дискутирана в раздел 1.1.6.1.) е характерно непротеолитичното активиране на проренина чрез конформационни промени в молекулата му [Derkx FHM et al, 1992]. Установено е, че плазмената

концентрация на проренина е около 10 пъти по-висока от тази на ренина [Danser AH and Deinum J, 2005]. Повишените плазмени нива на проренина корелират и дори предхождат микроваскуларните диабетни усложнения, въпреки че нивото на ренина остава в ниско-референтните граници [Deinum J et al, 1999]. Физиологичната плазмена концентрация на ренина е в обхвата на пикомоли. Допуска се, че в тъканите, особено в интерстициалната течност, концентрацията му може да е до 100 пъти по-висока. Плазменият му полуживот е ~ 15 минути.

Секрецията на ренина се стимулира от:

а) Намаляване на бъбречното перфузионно налягане при понижаване на АН или намаляване на кръвния обем, което се отчита от барорецептерите (барорецепторен механизъм) [Илиева Г et al, 1992].

б) Намаляване концентрацията на натриев хлорид в ултрафилтрата на нефроните, което се отчита от macula densa на ЮГА.

в) Повишен тонус на симпатиковия дял на вегетативната нервна система чрез β1-адренергични рецептори, разположени в клетките, секретиращи ренин.

г) хиперкалциемия, предизвикана с тахистин или калциеви антагонисти, като комлексът Са-калмодулин се явява вторичен посредник [Ilieva G et al, 1994; Ilieva G et al, 1995; Илиева Г et al, 1996 (б); Толекова А и Янков К, 2002; Tolekova A et al, 2005]. Важно е и модулиращото влияние на азотния оксид NO [Markova P et al, 2006].

Ангиотензиногенът е единственият известен субстрат на ренина. Под действието на ренина от неговата молекула се откъсват аминокиселини и той се превръща в Ang I.

1.1.3. Ангиотензиноген: синтез и фактори, стимулиращи секрецията му

Ангиотензиногенът е прекурсор на всички ангиотензинови пептиди. Той се синтезира и секретира в черния дроб, като този процес е непрекъснат.

Неговият ген се намира на дългото рамо на 1-ва хромозома в локус 1q42-q43 и е изграден от 5 екзона. Експресира се главно в черния дроб, но също така и в мозъка, големите съдове, бъбреците и мастната тъкан [Procopciuc L et al, 2002]. Той детерминира преангиотензиноген, съдържащ сигнален пептид, изграден от 24 до 33 аминокиселини. От него се получава крайният ангиотензиноген, α-глобулин, съставен от 453 аминокиселини, с молекулно тегло 55 000 – 60 000 Da. В N-край на ангиотензиногена се намира участък, който е видово специфичен и е небходим в процеса на разпознаване на ангиотензиногена от ренина [Nakagawa T et al, 2007]. Полиморфизмът на гена на ангиотензиногена е асоцииран с АХ при пациентите с или без ЗД-2, но опитите за определяне на отговора към антихипертензивни медикаменти в зависимост от този полиморфизъм все още не са довели до окончателни резултати [Bettinaglio P et al, 2002; Koopmans RP et al, 2003; Robinson M and Williams SM, 2004].

Секрецията на ангиотензиногена се стимулира от естрогени, глюкокортикоиди, хормона на щитовидната жлеза, инсулин, Ang II, проинфламаторни фактори.

Ангиотензиногенът се хидролизира под действието на ренина, при което се получава Ang I (Asp^1-Arg^2-Val^3-Tyr^4-Ile^5-His^6-Pro^7-Phe^8-His^9-Leu^{10}), който е слабоактивен или неактивен.

1.1.4. Ангиотензин конвертиращ ензим: синтез, структура и биологична характеристика

Под влияние на ACE (дипептидилкарбокси пептидаза) от молекулата на Ang I се отделя участъка His^9-Leu^{10} и се получава мощният вазоконстриктор Ang II (Asp^1-Arg^2-Val^3-Tyr^4-Ile^5-His^6-Pro^7-Phe^8) (**Фигура 1**).

Генът, кодиращ ACE, е локализиран върху хромозома 17. Той се характеризира с инсерция-делеция (ID) полиморфизъм на интрон 16, определящ наличието на три генотипа (II, DD и ID) и 47% фенотипна вариация в нивото на серумния ACE [Sayed-Tabatabaei FA et al, 2006]. Алелът D на ID

полиморфизма е асоцииран с по-високи нива на ACE и алдостерон, повишено разграждане на брадикинина, увеличен риск за АХ, хипертрофия на лявата камера (ХЛК), атеросклероза и нефропатия [Hadjadj S et al, 2001; Sayed-Tabatabaei FA et al, 2006], но вероятно е протективен срещу болеста на Алцхаймер [Sayed-Tabatabaei FA et al, 2006]. Полиморфизмът II предпазва от развитието на ДН, вероятно защото е асоцииран с по-слаба активност на ACE и по-ниска глюкозо-индуцирана гломерулна хиперфилтрация [Marre M, 1999]. Полиморфизмът II детерминира понижаване на трансформиращия растежен фактор-бета1 (TGF-β1) при терапия с ARB, което позволява да се направи предположението, че изборът на лекарство, в зависимост от генотипа на пациента, е важен при лечението на ДН [Seki N et al, 2006]. Наскоро е предположена асоциация между ID полиморфизма на ACE и риска от развитието на диабет и ДН, която обаче остава непотвърдена от проведения мета анализ [Liu G et al, 2014].

Ангиотензин конвертиращият ензим е изграден от 1277 аминокиселини, молекулното му тегло е 170 000 Da, притежава голям извънклетъчен домен с азотен край, малък вътреклетъчен домен с карбоксилен край и хидрофобен участък с 17 аминокиселини, който свързва извънклетъчната част с клетъчната мембрана.

Този ензим е относително неспецифичен и отцепва дипептиди от субстрати с различна аминокиселинна последователност. Има най-голям афинитет към субстратите с една свободна карбоксилна група в аминокиселината от карбоксилния край. Важно условие за неговата активност е, че пролинът не трябва да бъде предпоследна аминокиселина.

Представен е в много тъкани и органи - бял дроб, бъбреци, съдови ендотелни клетки, сърце, мозък, като не е задължително неговите циркулиращи нива да отразяват активността на локалната му продукция [Veltmar A et al, 1991].

Превръщането на Ang I в Ang II в плазмата е сравнително бавно. В тъканите този процес е по-бърз, което се дължи до голяма степен на активността на трансмембранния ACE в ендотелните клетки на кръвоносната система.

Установено е, че ACE е идентичен с киназа II, ензимът, който инактивира брадикинина и други пептиди с вазодилатиращо действие **(Фигура 1)**. Така, ACE играе съществена роля в две физиологични системи: класическата RAS, която произвежда вазоконстриктора Ang II и системата каликреин-кининоген, която разгражда вазодилататора брадикинин. Широкото разпространение и мултифункционалните свойства на ACE определят важната му роля в различни патофизиологични процеси и го правят интересна терапевтична цел.

1.1.5. Ангиотензин II: рецептори и ефекти

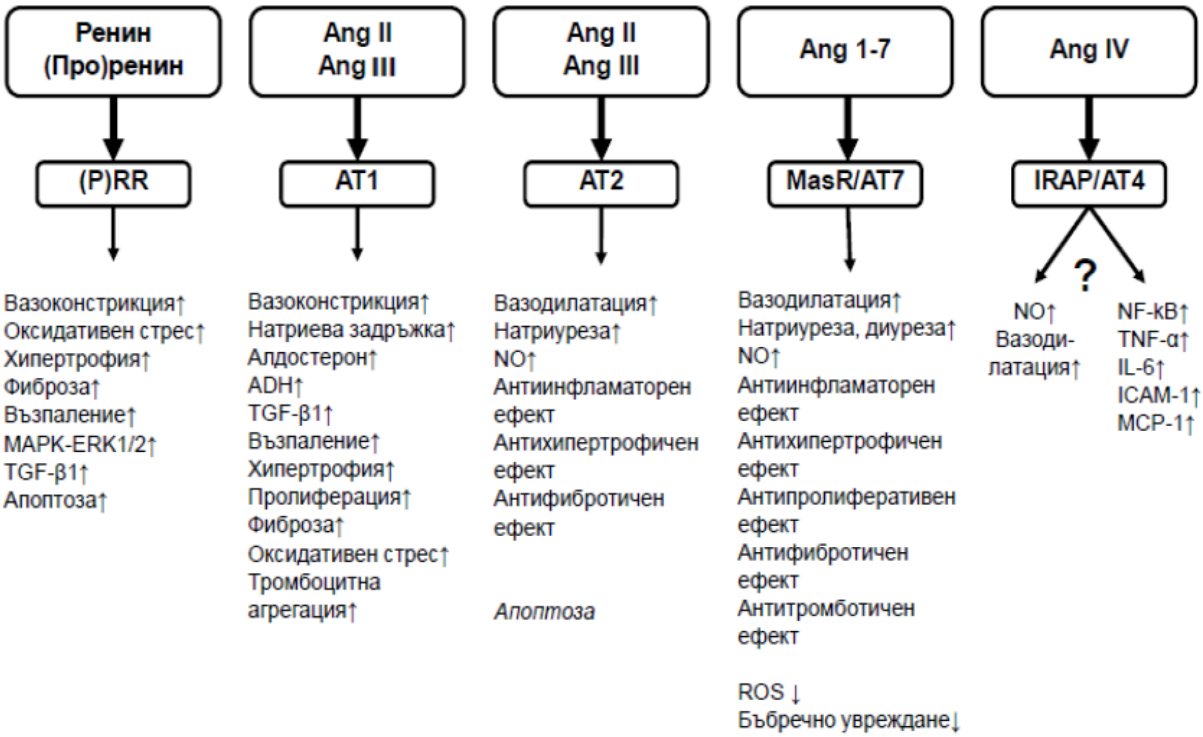
Ангиотензин II (Asp^1-Arg^2-Val^3-Tyr^4-Ile^5-His^6-Pro^7-Phe^8) е основният ефекторен пептид на RAS, който се образува от Ang I под действието на ACE.

Активността на Ang II се медиира от два G-протеин свързани рецептори, наречени AT1 и AT2 [de Gasparo M et al, 2000], които по принцип, но не винаги, водят до противоположни ефекти.

AT1 е изграден от 359 аминокисекини, а AT2 от 363 аминокисекини, като в тяхната структура се наблюдава 34% хомоложна аминокиселинна последователност. Описани са поне 50 полиморфизми на гена на AT1. Изучава се тяхната асоциация със сърдечно-съдовите и бъбречните заболявания, например установено е, че полиморфизмът A1166C (трансверсия A-C в позиция 1166) е асоцииран с АХ и повишен риск за коронаропатия [Alvarez R et al, 1998]. Експресията на AT1 и AT2 се регулира по различен начин, като регулирането също е и тъканно-специфично [Ardaillou R, 1999].

- **AT1 рецептори** - преобладават при възрастните. Те са широко разпространени и медиират всички известни биологични ефекти на Ang II. Тяхното активиране води до мощна вазоконстрикция, натриева задръжка, жажда, освобождаване на вазопресин (ADH) и алдостерон **(Фигура 2)** [Ilieva G

et al, 1990; Tolekova A and Popov B, 1999]. Напоследък се изтъква, че активирането на AT1 стимулира оксидативния стрес и увеличава продукцията на реактивни кислородни радикали и TGF-β1, основни медиатори на възпалителните процеси и фиброгенезата. Те от своя страна стимулират различни сигнални трансдукционни системи: фосфолипази C и A2, протеинкиназа C, митоген-активираната протеинкиназа (MAPK), тирозин кинази, инхибират аденилат циклазата, отварят калциевите канали [Ardaillou R, 1999]. Това потенцира процесите, които участват в развитието на атеросклероза и съдово стареене като пролиферация на съдовите гладко-мускулни клетки (СГМК), образуване на фиброза, възпаление, тромбоцитна агрегация, а на ниво бъбреци се стимулира пролиферацията на мезангиалните клетки, натрупване на матрикс и развитието на гломерулосклероза [Timmermans PB et al, 1993; Parvanova A et al, 2005; Ruiz-Ortega M et al, 2006].



Фигура 2. Ефекти на класическите и некласическите компоненти на RAS. Ang - ангиотензин; (P)RR (про)ренин рецептор; AT1, AT2, AT4, AT7 - ангиотензинови рецептори тип 1, тип 2, тип 4, тип 7; MasR – Mas рецептор; IRAP - инсулин-регулирана аминопептидаза; MAPK – митоген-активирана протеин киназа; ERK1/2 - екстрацелуларни сигнал-регулирани кинази 1 и 2; TGF-β1 - трансформиращ растежен фактор-бета1; ADH - антидиуретичен хормон; NO - азотен оксид; ROS – реактивни кислородни радикали; NK-kB - нуклеарен фактор капа-бета; TNF-α - тумор некрозис фактор-алфа; IL-6 – интерлевкин-6; ICAM-1 – междуклетъчна адхезионна молекула-1; MCP-1 - моноцит хемотаксичен протеин-1.

Ангиотензин II нарушава равновесието между двата сигнални пътя на инсулина (на фосфатидилинозитол-3-киназата (PI3-K) и на MAPK), потиска адипонектина, предизвиква апоптоза на бета-клетките в панкреаса [Velloso La et al, 2006; Ran J et al, 2006; Chu KY et al, 2006]. Това засилва инсулиновата резистентност, която е патогенетичната основа за развитието на ЗД и неговите съдови усложнения [Groop LC and Eriksson JG, 1992; DeFronzo RA, 1997; Parvanova A et al, 2002; Fonseca VA, 2006; Parvanova A et al, 2006].

Голяма част от тези ефекти са индиректни и се медиират от растежни фактори, цитокини, ET-1, тромбоцитен растежен фактор. Трябва да се отбележи, че AT1 са намерени и в ендотелните клетки. Тяхното активиране стимулира образуването на NO и простациклин (PGI2), които противодействат на директния съдосвиващ ефект на Ang II върху подлежащите СГМК [Ardaillou R, 1999].

- **AT2 рецепторите** са разпространени във феталните тъкани като концентрацията им намалява след раждането на детето и при възрасните са представени в по-ограничено количество [Ardaillou R, 1999]. Активирането на AT2 увеличава продукцията на NO и стимулира протеин тирозин фосфатазата, което най-често води до ефекти, противоположни на ефектите на AT1 - вазодилатация, натриуреза, инхибиране пролиферацията на СГМК и развитието на фиброзна тъкан **(Фигура 2)**. В централната нервна система (ЦНС) е наблюдавано медииране на невротропни ефекти и затова AT2 се считат за нов таргет в лечението на черепно-мозъчните травми [Carey RM et al, 2001; Culman J et al, 2001; Padia SH et al, 2008; Umschweif G et al, 2014]. Трябва да се отбележи, че небалансираното стимулиране на AT2 може да доведе до клетъчна апоптоза, индукция на нуклеарен фактор капа-бета (NF-kB) и на хемокини, стимулиране хипертрофията на сърдечните миоцити, развитие на сърдечна фиброза [Chamoux E et al, 2000; Ichihara S et al, 2001].

Ангиотензин II, въздействайки върху AT1 и AT2, повлиява периферното съдово съпротивление, бъбречната и сърдечно-съдовата функция.

Ефекти върху периферното съдово съпротивление

1. Директна вазоконстрикция

2. Стимулира периферната адренергична медиация

а) повишава освобождаването на норадреналин

б) понижава обратното поемане на норадреналин

3. Стимулира симпатиковия тонус в ЦНС

4. Антагонизира ефектите на NO

Действието върху периферните съдове води до бърз хипертензивен отговор.

Ефекти върху бъбречната функция

А. Тубулна система на нефрона

1. Директно стимулира обратната резорбция на натрий в проксималните тубули

2. Повишава синтезирането и отделянето на алдостерон от кората на надбъбречната жлеза, който от своя страна стимулира активната обратна резорбция на натрий, пасивната обратна резорбция на вода и стимулира секрецията на K^+ и H^+ в дисталните извити каналчета

3. Повишава секрецията на ADH от неврохипофизата, който стимулира обратна резорбция на вода в дисталните извити и събирателни каналчета

Б. Бъбречна хемодинамика

1. Директна вазоконстрикция на аферентните и еферентните артериоли, контракция на мезангиалните гломеруларни клетки

2. Стимулиране на норадренергичната трансмисия в бъбрека

Действието на Ang II върху бъбреците води до задържане на натрий и вода, увеличаване на циркулиращия обем течности, намаляване на скоростта на гломерулна филтрация (СГФ). Това определя бавния хипертензивен отговор.

Сърдечно-съдова система

1. Хемодинамични ефекти

а) повишава сърдечното преднатоварване

б) повишава сърдечното следнатоварване

в) повишава силата на сърдечните съкращения

г) повишава ударния обем

2. Нехемодинамични ефекти

а) Увеличава експресията на прото-онкогените

б) Увеличава продукцията на растежни фактори

в) Увеличава продукцията на протеини в екстрацелуларния матрикс

г) Предизвиква ендотелна дисфункция

Действието на Ang II върху сърдечно-съдовата система води до сърдечно-съдова хипертрофия и тъканно ремоделиране, което го определя като основен патогенетичен фактор в ССЗ.

Класическата RAS се счита за ендокринна система, която е основен регулатор на АН, водно-солевата хомеостаза, синтеза и секрецията на алдостерона.

1.1.6. Нови концепции за RAS

1.1.6.1. Локална RAS

Промяната на представата за RAS като класическа ендокринна система започва с допускането на наличието на локална сърдечна RAS поради липсата на добра корелация между нивото на Ang II, активността на циркулиращия ренин и благоприятния ефект от инхибирането на RAS. С потвърждаването на хипотезата [Dzau VJ, 1993; Urata H et al, 1995] се откриват и локални RAS в мозъка, хипофизата, бъбреците, черния дроб, панкреаса, надбъбречната жлеза, мастната тъкан и половите органи [Mitchell KD and Navar LG, 1991; Hollenberg NK et al, 1998; Leung PS, 2004]. Те съдържат всички компоненти, необходими за продукцията на Ang II. Докладвано е и за наличието на цяла

вътреклетъчна функционална RAS в редица тъкани и органи [Kumar R et al, 2007]. Интрацелуларният Ang II активира вътреклетъчни и/или ядрени рецептори, медиира вътреклетъчни сигнални пътища и индуцира клетъчни и/или ядрени отговори, независимо от рецепторите, разположени по клетъчната повърхност [Zhuo JL and Li XC, 2011].

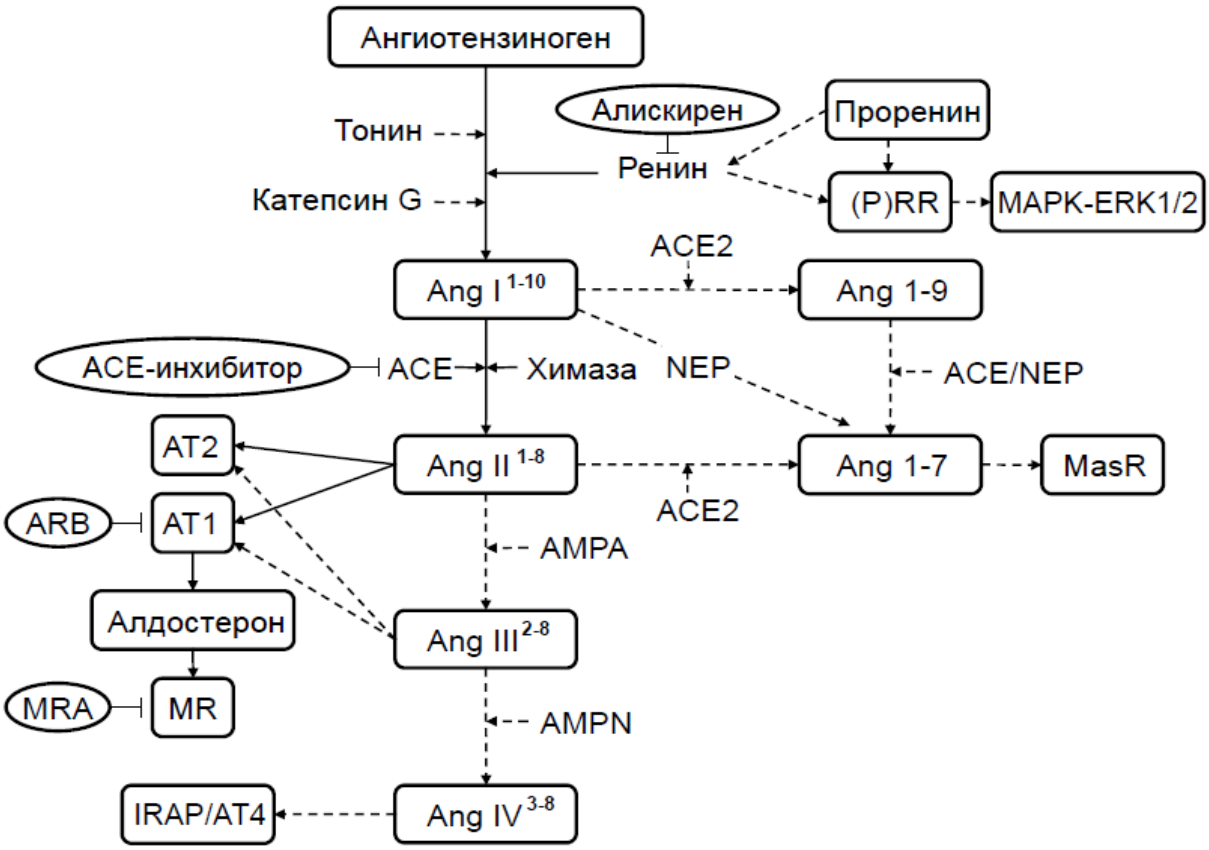
Смята се, че локално образуваният Ang II оказва своите ефекти както независимо от системната RAS, така и в тясно взаимодействие с нея, тъй като циркулиращите компоненти на RAS, като ренин и ангиотензиноген, могат да постъпят от плазмата в тъканите. Установено е например, че почти цялото количество ренин в локалните RAS е от бъбречен произход [Deinum J et al, 1999]. Затова се приема, че циркулиращата и локалните RAS имат комплементарно действие [Zhuo JL et al, 2013]. Циркулиращата RAS е по-важна за регулирането на АН и водно-електролитното равновесие, докато локалната RAS е водеща в регулирането на функцията на органите и тъканното ремоделиране, поради стимулиращия ефект върху процесите на пролиферация, растеж и протеинов синтез [Paul M et al, 2006].

Така, с откриването на локалните RAS в тъканите и в органите, класическата представа за RAS като типична ендокринна система се променя значително и става ясно, че тя функционира също автокринно и паракринно.

1.1.6.2. Алтернативни пътища за образуване на Ang II

При локалната, за разлика от циркулиращата RAS, има алтернативни ензими, като химаза, катепсин G и тонин, които превръщат Ang I в Ang II **(Фигура 3)**. От тях най-важен е ензимът химаза, открит в сърцето и бъбреците [Urata H al, 1993]. Химазата се съхранява в макромолекулни комплекси с хепарин в секреторните гранули на мастоцитите [Unger T and Li J, 2004]. Комплексът става ензимно активен след освобождаване от гранулите, напр. при съдово увреждане. В нормална съдова тъкан химазата е неактивна и може да доведе до продукция на Ang II само в увредени или атеросклеротично променени артериални стени. Според някои автори значението на химазата е

по-голямо *in vitro*, отколкото *in vivo* [Wei CC et al, 1999]. Неуспешни са опитите за откриване на асоциация между генния полиморфизъм на химазата, миокардната маса и стойностите на АН [Ortlepp JR, 2002]. Въпреки това, в ерата на преките антагонисти на Ang II, алтернативните пътища на неговото образуване и възможностите за тяхното повлияване продължават да будят интерес.



Фигура 3. Съвременна концепция за ензимните пътища на RAS. (P)RR – ренин/проренинов рецептор; Ang – ангиотензин; ACE - ангиотензин конвертиращ ензим; AT - ангиотензинов рецептор; MasR – mas онкоген, рецептор за Ang 1-7; IRAP – инсулин-регулирана аминопептидаза или AT4 рецептор; AMPA – аминопептидаза А; AMPN – аминопептидаза N; NEP – неутрална ендопептидаза; MAPK – митоген-активирана протеинкиназа; ERK1/2 – екстрацелуларни сигнал-регулирани кинази 1 и 2; ARB – антагонист на рецепторите на ангиотензин II; MR - минералкортикоиден рецептор; MRA - минералкортикоиден рецепторен антагонист.

Намерено е, че химазните инхибитори потискат възпалителния процес, формирането на фиброза и колаген, образуването на тъканен Ang II и подобряват дисфункцията на лявата камера на сърцето [Sukenaga Y et al, 2002; Matsumoto T et al, 2003]. Тези резултати са обещаващи и са стимул за бъдещи изследвания.

1.1.7. Нови компоненти на RAS

В днешно време RAS не е това, което беше и нейното реално структурно и функционално състояние не е задължително това, което си мислим, че е ... През последните две-три десетилетия непрекъснато се откриват нови компоненти, които продължават да променят знанията и представите за нея ...

1.1.7.1. Ренин / Проренинови рецептори

През 2002 г. е открит рецептор, който свързва и активира както ренина, така и неговия прекурсор проренина, и затова е наречен (про)ренин рецептор ((P)RR) [Nguyen G et al, 2002]. (P)RR) е изграден от 350 аминокиселини и има единичен трансмембранен домен [Nguyen G et al, 2002]. Установен е и втори рецептор – манозо-6-фосфат (M6P) рецептор, идентичен с инсулино-подобния растежен фактор II, който бързо свързва ренина и проренина и ги дезактивира (клирънс-рецептор) [Danser AHJ and Saris JJ, 2002]. (P)RR се намира във висока концентрация в сърцето, мозъка, плацентата и висцералната мастна тъкан, и в по-ниски концентрации – в бъбреците, черния дроб и подкожната мастна тъкан [Nguyen G et al, 2002; Achard V et al, 2007]. (P)RR участва в локалната и системната продукция на Ang II.

Рецептор-свързаният проренин проявява повишена протеолитична активност и увеличава образуването на Ang I. В същото време проренинът може да индуцира и друг сигнален път, който не се потиска от инхибиторите на ренина, като алискирен [Sakoda M et al, 2007]. В действителност, проренин-(P)RR се счита като самостоятелен компонент на некласическата RAS **(Фигура 3)**. Sakoda и сътрудници показват, че проренинът, подобно на действието на Ang II върху AT1 в човешки СГМК, активира MAPK/екстрацелуларни сигнал-регулирани кинази 1 и 2 (MAPK/ERK1/2), които предават екстарцецуларния сигнал към ядрената дезоксирибонуклеинова киселина. Така проренинът повишава продукцията на TGF-β1, който от своя страна, паралелно на Ang II повишава контрактилитета на СГМК и стимулира развитието на хипертрофия и

фиброза **(Фигура 2)** [Nguyen G et al, 2002; Sakoda M et al, 2007; Krop M et al, 2013]. Освен, че активира описания интрацелуларен сигнален път, (P)RR) повишава каталитичната активност на свързания с него ренин върху клетъчната повърхност. Водят се дискусии във връзка с локализацията на този рецептор. Има публикации, които показват предимно вътреклетъчно перинуклеарно разположение на рецептора, който взаимодейства с интернализирания ренин или несекретираната форма на ензима [Schefe JH et al, 2006; Peters J, 2013]. Тези данни са непотвърдени, но будят интерес във връзка с наличието и на интрацелуларна RAS.

Въпреки, че натрупаните резултати показват вероятно участие на проренина и (P)RR в патогенетичните тъканни процеси има още много да се работи за доказване на индивидуалната им роля, защото много от ефектите са медиирани от Ang II/AT1.

1.1.7.2. Ангиотензин конвертиращ ензим тип 2

Ангиотензин конвертиращият ензим тип 2 (ACE2) е открит от две изследователски групи, независимо една от друга [Donoghue M et al, 2000; Tipnis SR et al, 2000]. Той е цинк металопротеаза, структурно близка до ACE (40% идентичност и 60% хомоложност), изградена от 805 аминокиселини. Съдържа един цинк-свързващ домен и малка сигнална пептидна последователност от азотния край (17 аминокиселини).

Генът, отговорен за синтеза на ACE2, е локализиран в X хромозомата (Xp22), съдържа 18 екзони, някои от които имат значително сходство с размерите на първите 17 екзони на човешкия ACE [Tipnis SR et al, 2000]. Northern блот анализът, който е стандарт при откриването и количественото определяне на иРНК показва, че първичният транскрипт на иРНК на ACE2 има размер 3.4 kb и е най-силно изразен в бъбречните тубули, интрареналните съдове, сърцето, коронарния ендотел и тестисите, където са установени максимални концентрации на ACE2 [Tipnis SR et al, 2000; Koitka A et al, 2008].

В опити с експериментални животни е установено, че мутациите в гена, отговорен за синтеза на ACE2 са асоциирани със сигнификантно потискане на сърдечния контрактилитет и с дисрегулация на хипоксия-индуцируемите гени в сърдечния мускул, което подсказва, че ACE2 има важна роля в регулирането на сърдечната функция [Crackower MA et al, 2002].

Генът на ACE2 е експресиран и в панкреаса на мишки с експериментално индуциран диабет. При лишаването от този ген първата фаза на инсулиновата секреция в отговор на глюкозния стимул намалява, което води до прогресивно увреждане на глюкозния толеранс [Niu MJ et al, 2008]

Трябва да се отбележи, че ACE2 не метаболизира брадикинина и за разлика от ACE не се повлиява от ACE-инхибиторите.

ACE2 има два субстрата - Ang I и Ang II, като афинитетът на ACE2 към Ang II е 400 пъти по-голям в сравнение с афинитета към Ang I. От Ang I, чрез делция на левцин, се получава Ang 1-9 (Asp^1-Arg^2-Val^3-Tyr^4-Ile^5-His^6-Pro^7-Phe^8-His^9), за който все още не е известно дали има съдова активност **(Фигура 3)**. От Ang II, чрез делеция на фенилаланин при С-край, се получава Ang 1-7 (Asp^1-Arg^2-Val^3-Tyr^4-Ile^5-His^6-Pro^7), който предизвиква голям интерес през последните години. Освен ACE2 в неговото образуване участват и други ензими. Той се получава от Ang I под влияние на неутралната ендопептидаза (NEP), от Ang 1-9 под влияние на ACE и NEP, и от Ang II под влияние на пролилкарбоксипептидаза [Dilauro M and Burns KD, 2009].

Ang 1-7 осъществява своите ефекти чрез специфичен мембранен G-протеин-свързан рецептор, наречен Mas (MasR), кодиран от прото-онкогена Mas [Santos RA et al, 2008; Varagic J et al, 2008]. Ang 1-7 потенцира ефектите на брадикинина, увеличава продукцията на NO, предизвиква вазодилатация и потиска активирането на ERK1/2 от страна на Ang II **(Фигура 2)**. Проявява антипролиферативен, антиангиогенен и антитромботичен ефект и се явява кардиопротектор при исхемична болест на сърцето и при сърдечна недостатъчност (СН) [Kucharewicz I et al, 2002]. Предположено е, че Ang 1-7

противодействия на ефектите на Ang II като това зависи от съотношението между активността на ACE→Ang II и ACE2→Ang 1-7 [Ferrario CM et al, 1997; Santos RA et al, 2008]. Дефицитът на ACE2 е асоцииран с по-висока концентация на Ang II [Batlle D et al, 2012]. Така ACE2 се явява регулатор на нивото и активността на Ang II [Ferrario CM et al, 1997].

Потенциращият ефект на ACE2 върху Ang 1-7/MasR сигнализацията в клетките води до подобряване на инсулиновата чувствителност и на нивата на кръвната захар в животни с експериментален диабет, което прави метаболитния път ACE2 / Ang 1-7 / MasR важен в превенцията и лечението на ЗД-2 и неговите усложнения [Batlle D et al, 2012; Chhabra KH et al, 2013].

Представените данни показват, че терапевтичните стратегии, които поддържат активността на ACE2 и нивото на Ang 1-7 са многообещаващи.

1.1.7.3. Други ангиотензинови пептиди

Ang II се метаболизира и до други биологично активни фрагменти. Чрез последователна делеция на аспарагинова киселина и аргинин от N-край, под действието съответно на аминопептидаза А и аминопептидаза N, се получават Ang III (ангиотензин 2-8, Arg^2-Val^3-Tyr^4-Ile^5-His^6-Pro^7-Phe^8) и Ang IV (ангиотензин 3-8, Val^3-Tyr^4-Ile^5-His^6-Pro^7-Phe) [Padia SH et al, 2007] **(Фигура 3)**.

Хептапептидът Ang III действа върху рецепторите на Ang II. До днес не са открити негови специфични рецептори. Ang III предизвиква вазоконстрикция и освобождаване на алдостерон почти със същата ефективност като Ang II [Gammelgaard I et al, 2006]. Въпреки това Ang II остава основен ефектор на RAS, тъй като метаболитният клирънс на Ang III е 5 пъти по-бърз от този на Ang II [Gammelgaard I et al, 2006].

Ang IV проявява слаб афинитет към AT1 и AT2 в сравнение с Ang II, но притежава свой собствен рецептор AT4, към който има голям афинитет и специфичност **(Фигура 2 и Фигура 3)**. През 2001 г. Albiston и сътрудници, изучавайки молекулната характеристика на AT4 установяват, че той е идентичен с инсулин-регулираната аминопептидаза (IRAP), член на фамилията

на цинк-зависими мембранни аминопептидази [Albiston AL et al, 2001]. Авторите показват също, че лигандите за AT4 инхибират каталитичната активност на IRAP и удължават полуживота на субстратите на този ензим (вазопресин, окситоцин, lys-брадикинин и др.). AT4 е намерен в различни тъкани – мозък, сърце, кръвоносни съдове и бъбреци [Handa RK et al, 1998; Chai SY et al, 2004]. Докладвано е, че Ang IV увеличава синтеза и освобождаването на NO, повишава церебралния кръвен ток в плъхове [Kramár EA et al, 1998], има протективен ефект срещу исхемичен инсулт [Faure S et al, 2006], повишаването на кръвната захар [Wong YC et al, 2011] и дори срещу развитието на атеросклероза [Vinh A et al, 2008]. Установено е, че стимулира когнитивните функции при мишки и плъхове без да бъде изяснен механизмът му на действие [Albiston AL et al, 2001; Chai SY et al, 2004] и се допуска, че Ang IV или неговите аналози могат да бъдат използвани за лечение на болестта на Алцхаймер [Albiston AL et al, 2011 (a)]. В същото време е описано *in vitro* активиране на ензимния път на NF-κB в СГМК, при което се увеличава производството на провъзпалителни фактори като интерлевкин-6 (IL-6) и тумор некрозис фактор-алфа (TNF-α) [Esteban V et al, 2005]. Това дава възможност да се допусне, че Ang IV участва във възпалителните процеси на съдовата стена и в развитието на ССЗ [Numaguchi Y et al, 2009]. Вероятно тази активност е свързана и с действието на Ang IV върху AT1.

Ролята на новите ангиотензинови пептиди в бъбречните функции е разгледана в раздел 1.1.8.

1.1.8. Роля на локалната RAS в бъбречните функции

Ефектите на класическата циркулираща RAS върху бъбречните функции са описани в раздел 1.1.5. Въпреки, че RAS е необходима и за нормалното морфологично развитие на бъбреците [Niimura F et al, 1995], тя остава основен медиатор в бъбречните увреждания, включително и при ДН. От една страна, RAS участва в патогенезата на АХ, която е един от определящите фактори за развитието на ДН. От друга страна, ДН възниква и в условията на нормално АН

[Wada J et al, 2011], потвърждаващо централната роля на интрареналната RAS, която е активирана още в ранните стадии на диабета [Vijayaraghavan K and Deedwania PC, 2005].

Натрупаните нови резултати показват, че бъбречната RAS има най-малко пет ензимни пътя:

- **ACE / Ang II / AT1**
- **ACE2 / Ang 1-7 / MasR**
- **Проренин / (P)RR / МАРК-ERK1/2**
- **ANG II / ANG III / AT2**
- **ANG IV / AT4 / IRAP**

1.1.8.1. ACE / AngII / AT1

Уставено е, че ангиотензиногенът, прекурсорът на RAS и ACE, основният ензим на тази система, са представени в различни бъбречни клетки – тубулни епителни клетки, съдови ендотелни клетки и гломерулни мезангиални клетки [Pohl M et al, 2010]. Счита се, че ACE вероятно има доминираща роля при образуването на Ang II в нормални физиологични условия, а други пептидази като химазите от мастните клетки, допринасят за повишаването на Ang II при патологични състояния [Sadjadi J et al, 2005 (a)]. Локалната продукция на Ang II, обаче, е интензивна както при патологични, така и при нормални условия, което обяснява по-високата му концентрация в бъбреците, особено в интерстициума, проксималните тубули и вътреклетъчните ендозомални компартменти, в сравнение с тази в плазмата [Seikaly MG et al, 1990; Carey RM and Siragy HM, 2003; Parvanova A et al, 2005]. Класическа догма е, че експресията и активирането на RAS се регулират от самия Ang II чрез отрицателен feedback механизъм. Трябва да се отбележи, че при продължителна инфузия на Ang II в експериментални хипертензивни животни се наблюдава експресия на проренин и ренин, и увеличена продукция на Ang II [Sadjadi J et al, 2005 (б)]. Това показва наличието и на положителна forward връзка, която засилва AT1-медиираните

увреждащи ефекти като вазоконстрикция, задръжка на натрий и вода, увеличаване на вътрегломерулното налягане, стимулиране натрупването на протеини в екстрацелуларния матрикс, пролиферация на мезангиалните клетки, увреждане цитоскелета на подоцитите и увеличаване размера на порите, което улеснява ултрафилтрацията на протеините [Kobori H et al, 2001; Prieto MC et al, 2011; Navar LG et al, 2011]. Някои от ултрафилтрираните протеини се отделят с урината, други кумулират в подоцитите или се реабсорбират от проксималните тубулни клетки, където от своя страна оказват нефротоксично въздействие [Morelli et al, 1990; Benigni A et al, 1995; Remuzzi G and Bertani T, 1998]. Засегнатите подоцити и тубулни клетки освобождават растежни фактори, вазоактивни и проинфламаторни медиатори, които потенцират оксидативния стрес, инфламаторните процеси, клетъчния растеж и причиняват гломерулосклероза, намаляване на филтрационната повърхност и на СГФ, и тубулоинтерстициално увреждане [Benigni A ei al, 1995; Remuzzi G and Bertani T, 1998]. Така Ang II се явява ключов фактор в хемодинамичните и структурните промени при хроничните бъбречни заболявания, включително и на тези при ДН. В условията на ЗД, хипергликемията активира RAS, която увеличава локално образувания Ang II и потенцира тези патогенетични механизми [Логофетов А et al, 1988; Giacchetti G et al, 2005; Ko SH et al, 2006].

Постигнатите клинични резултати в лечението на ДН с инхибитори на RAS доказват важното патогенетично значение на класическата хормонална система и на основния ѝ ензимен път в развитието на бъбречните усложнения при ЗД [Brenner BM et al, 2001; Lewis EJ et al, 2001**;** Parvanova A et al, 2005].

1.1.8.2. ACE2 / Ang 1-7 / MasR

Активирането на втория ензимен път, ACE2 / Ang 1-7 / MasR, води до вазодилатация, стимулиране на натриурезата и диурезата, увеличаване на NO и простагландините, потискане на пролиферацията, развитието на фиброза и оксидативния стрес, като противодейства на основните ефекти на класическия ензимен път ACE / AngII / AT1 [Kucharewicz I et al, 2002; Chappell MC, 2007;

Dilauro M and Burns KD, 2009] **(Фигура 2)**. Високата експресия на ACE2 в бъбреците, особено в проксималните тубули, където е ко-локализиран с ACE и рецепторите на Ang II подсказва важното значение на този ензим в регулирането на баланса между реналните ефекти на Ang II и Ang 1-7. Този баланс се нарушава при вроден или придобит дефицит на ACE2, което води до доминиране на увреждащото действие на Ang II и влошаване на бъбречната функция и албуминурията при експериментални модели [Koitka A et al, 2008]. Има данни, че ACE2 е с намалена експресия в подоцитите на бъбреците на мишки с експериментален диабет, докато свръхекспресията на човешки ACE2 в тези животни предотвратява ранното гломерулно увреждане, развитието на албуминурия, съхранява структурата и броя на подоцитите, намалява кортикалната експресия на TGF-β1 [Nadarajah R et al, 2012]. При пациенти със ЗД-2 и ДН се установява по-високо съотношение на ACE/ACE2, в сравнение със здравите контроли и се допуска, че то е асоциирано с бъбречното увреждане [Mizuiri S et al, 2008]. Въз основа на тези данни се предполага, че ACE2 е ендогенен ренопротективен ензим, който може да бъде таргет в профилактиката и лечението на бъбречните заболявания [Koitka A et al, 2008; Batlle D et al, 2012].

Високата активност на Ang II и на ACE2 в бъбреците обяснява и високото ниво на Ang 1-7 в тези органи [Dilauro M and Burns KD, 2009]. Въпреки, че ефектите на Ang 1-7 в бъбреците се медиират главно от MasR, описани са взаимодействия и с други рецептори като AT1, AT2, ядрени рецептори [Zimmerman D and Burns KD, 2012].

Въпреки, че все повече данни подкрепят значението на Ang 1-7 като антагонист на AT1-медиираните ефекти на Ang II, неговата роля в бъбречните заболявания остава неясна. В някои експерименти, макар да изглежда парадоксално, Ang 1-7 изостря бъбречното увреждане [Shao Y et al, 2008; Zimmerman D and Burns KD, 2012]. Най-вероятно дозата, пътят или схемата на прилагане, състоянието на локалната RAS, специфичната клетъчна

сигнализация или не-MasR-медиирани сигнални пътища оказват влияние върху крайния му ефект. Всичко това предстои да бъде изследвано, тъй като Ang 1-7 остава привлекателна потенциална терапевтична цел при бъбречните заболявания.

1.1.8.3. Проренин / (P)RR / МАРК-ERK 1/2

Takahashi и сътрудници намират повишена експресия на (P)RR и повишена активност на ензимния път проренин / (P)RR / МАРК-ERK1/2 в бъбреците на пациенти с ДН и допускат, че той има важна роля в развитието на фиброза в крайния стадий на бъбречното заболяване [Takahashi K et al, 2010]. Инфузия с HRP, инхибитор на некаталитичното активиране на (P)RR, нормализира нивото на Ang II, намалява гломерулосклерозата, предотвратява и дори предизвиква обратно развитие на ДН при плъхове с експериментално предизвикан диабет [Ichihara A et al, 2004; Ichihara A et al, 2006]. В изолирани мезангиални клетки екзогенният ренин увеличава експресията на TGF-β1 и на инхибитора на тромбоцитния активатор-1 (PAI-1), които потенцират прогресивното бъбречно увреждане. Изказва се хипотезата, че някои от ефектите свързани с активирането на (P)RR в бъбреците са независими от образуването на Ang II [Gonzalez AA and Prieto MC, 2015].

Въпреки представените експериментални данни все още няма окончателно решение за специфичната патофизиологична роля на този ензимен път в човешката патология. Има автори, които не успяват да потвърдят нефропротективния ефект на антагониста на (P)RR - HRP [Muller DN et al, 2008], а според други (P)RR вероятно е необходим за поддържането на нормалната структура и функция на подоцитите [Oshima Y et al, 2011]. Противоречивите резултати водят и до критични анализи. Първо, въпреки, че експресията на проренин и (P)RR е много по-голяма в мишки, в сравнение с тази в плъхове и хора, мишките не развиват АХ, сърдечно-съдови и бъбречни заболявания както се очаква. Второ, за да демонстрира асоциация с тези заболявания проренинът трябва да е свръхекспресиран стотици, дори хиляди

пъти в трансгенетични плъхове и мишки, което не може да бъде възпроизведено при хора. Трето, много от бъбречните и сърдечно-съдовите изменения, предизвикани от проренина, са Ang II/AT1-зависими и е много трудно да се направи извод за индивидуалната роля на проренина и (P)RR [Campbell DJ, 2008]. Бъдещи изследвания ще уточнят специфичната патофизиологична роля на този ензимен път при хората. Ако обаче тя бъде протвърдена, това ще промени цялостната концепция за значението на проренина и (P)RR в тъканната RAS и тяхното инхибиране ще се превърне в потенциална терапевтична цел.

1.1.8.4. ANG II / ANG III / AT2

В бъбречната интерстициална течност концентрацията Ang III е 1000 пъти по-висока от тази в плазмата (подобно на Ang II) [Seikaly MG et al, 1990]. В бъбрек на плъх Ang III, но не и Ang II, индуцира AT2-медиирана натриуреза [Padia SH et al, 2008], като натриуретичният ефект се засилва при инхибирането на аминопептидаза N – ензимът, който превръща Ang III в Ang IV **(Фигура 3)** [Padia SH et al, 2007]. Други автори обаче установяват AT1-зависим антинатриуретичен ефект и изказват предположението, че активирането на AT1- и AT2-рецепторите и съответният ефект на Ang III върху натриевата екскреция зависят от неговата концентрация [Zhuo JL et al, 2013]. Дали инхибирането на аминопептидаза N, което води до потенциране на AT2-зависимия натриуретичен ефект ще се окаже ренопротективно при патологични състояния с натриева и водна ретенция като АХ, хронична сърдечна недостатъчност (ХСН) и хронична бъбречна недостатъчност (ХБН), е обект на бъдещи изследвания.

1.1.8.5. ANG IV / AT4 / IRAP

Аминопетидаза N хидролизира Ang III до хексапептида Ang IV в бъбреците **(Фигура 3)**, където е установено и масово представяне на неговия рецептор IRAP [Albiston AL et al, 2011 (б)]. Първоначално е установено, че Ang IV увеличава кортикалния бъбречен кръвоток и намалява транспорта на натрий

в изолирани проксимални тубули чрез повишаване на NO, независимо от AT1 и AT2 [Handa RK et al, 1998]. Други автори установяват AT1-медиирано намаление на бъбречния кръвоток без промяна в АН [Fitzgerald SM et al, 1999], а трети докладват, че Ang IV предизвиква AT1-зависима ренална вазоконстрикция и повишава АН при анестезирани плъхове [Li XC et al, 2006]. Така, физиологичната роля на Ang IV / AT4 в регулацията на бъбречната функция и АН остава все още неизяснена. Трудно е да се разграничат специфичните ефекти на Ang IV тъй като от една страна циркулиращите и тъканните нива на Ang IV са по-ниски от тези на Ang II, а от друга страна част от ефектите на Ang IV са AT1-медиирани.

1.1.8.6. Интрацелуларна RAS

Освен наличието на цяла функционална RAS в бъбречните клетки е установено, че циркулиращият, паракринният и автокринният Ang II може да навлезе чрез AT1-медииран uptake и да се интернализира, преди всичко в клетките на проксималните тубули [Kumar R et al, 2007]. Според класическата рецепторна теория интернализираният Ang II трябва да се разгради в лизозомите. В случая се установява, че част от интернализираният Ang II успява да избегне лизозомалната деградация и да кумулира вътреклетъчно, например в ендозомите [Imig JD et al, 1999; Zhuo JL et al, 2002]. Дори е демонстрирано наличието на специфични функционални AT1- и AT2-рецептори в ендозомите на кортикалните бъбречни клетки, в митохондриите на проксималните тубули и в клетъчните ядра на кортикалните клетки [Imig JD et al, 1999; Zhuo JL et al, 2002; Abadir PM et al, 2011]. Опитите, целящи да установят ролята на вътреклетъчния Ang II показват, че неговото микроинжектиране в бъбречна клетка, изолирана от проксималния тубул, води до повишаване на вътреклетъчния калциев отговор, който се потиска от ARB (лосартан), но не и от антагониста на AT2-рецептора (PD123319). Това показва, че вътреклетъчният отговор на Ang II се опосредства от AT1 [Zhuo JL et al, 2006]. Добавянето на Ang II в *in vitro* среда с изолирани ядра от кортикални

бъбречни клетки на плъхове стимулира ядрения AT1a и повишава транскрипцията на иРНК за моноцит хемотаксичния протеин-1(MCP-1) и TGF-β1, които имат важна роля в клетъчната пролиферация и хипертрофия, в развитието на тъканна фиброза и транспорта на натрий в бъбреците [Li XC and Zhuo JL, 2008]. Отново този отговор е потиснат от лосартан, но не и от PD123319. В подобен експеримент е установено, че Ang II и Ang 1-7 стимулират от една страна ядрения AT2 и рецептора на Ang 1-7, което увеличава продукцията на NO, а от друга страна активират AT1, което повишава синтеза на супероксидния йон [Gwathmey TM et al, 2009]. Redding и колеги, създават трансгенетични мишки със свръхекспресия на химерен Ang II, свързан с циан флуоресцентен протеин, който се регулира от металотионеина - генен промотор от мишки. Химерният протеин е разположен вътреклетъчно и е лишен от секреторна сигнална активност. Въпреки, че плазменото ниво на Ang II остава непроменено, АН на опитните животни се повишава и се установява формиране на микротромби в гломерулните капиляри и малките съдове на бъбреците [Redding KM et al, 2010]. При подобни условия е показано, че свръхекспресията на химерния Ang II в проксимални тубулни клетки е асоциирана с повишаване на АН и с намаляване на екскрецията на натрий. Хипертензивният отговор отново е потиснат от лосартан [Li XC and Zhuo JL, 2013]. Представените данни потвърждават, че вътреклетъчният Ang II води до AT1-зависимо повишаване на резорбцията на натрий и вода в проксималните тубули, с което участва в регулирането на АН. Възможностите за повлияване на вътреклетъчния Ang II в човешката патология остават все още неизяснени.

Изучаването на некласическите ензимни пътища на RAS ще допринесе както за уточняване на тяхната патофизиологична роля, така и за откриване на нови възможности за лечение на бъбречните заболявания.

1.1.9. Фармакологично инхибиране на RAS u диабетна нефропатия

1.1.9.1. Артериална хипертензия и албуминурия – основен таргет в ренопротекцията

През 1976 г. Mogensen показва, че антихипертензивната терапия забавя намаляването на СГФ при пациенти със ЗД-1 и изявена ДН и определя АХ като основен рисков фактор (РФ) за прогресията на бъбречните заболявания [Mogensen CE, 1976]. След това авторът показва, че освен АХ също и микроалбуминурията е силен предиктор за развитието на ДН [Mogensen CE and Christensen CK, 1984]. В действителност микроалбуминурията е първият клиничен признак на ДН и годишно се развива в 2-5% от диабетиците [Gall MA et al, 1997]. Пациентите със ЗД-1 и ЗД-2 и микроалбуминурия имат съответно 21- и 9 пъти по-висок риск от развитие на ДН, в сравнение с пациентите с нормоалбуминурия [Brenner BM, 2008]. Микроалбуминурията отразява не само бъбречно увреждане, тя често рефлектира генерализирана ендотелна дисфункция и е асоциирана с повишен кардиоваскуларен риск [Mattock MB et al, 1998; Ritz E, 2003]. Диабетно болните с микроалбуминурия имат три пъти по-висока честота на смъртност от ССЗ, в сравнение с тези без микроалбуминурия [Adler AI et al, 2003], като 40-50 % от пациентите със ЗД-2 и микроалбуминурия умират от ССЗ преди да достигнат до ТБН [Eurich DT et al, 2004; Parving HH et al, 2004]. Ефективното намаляване на микро- и макроалбуминурията е асоциирано с ограничаване на бъбречните и кардиоваскуларните усложнения при пациентите със ЗД [De Zeeuw D, 2004]. Изказва се предположението, че всяко ниво на албуминурия, дори и в границите на нормалните стойности, е РФ за ССЗ при пациенти с или без ЗД [Gerstein HC et al, 2001; Hillege HL et al, 2002; Wachtell K et al, 2003; Arnlöv J et al, 2005].

Понижаването на АН, предотвратяване появата на микроалбуминурия (първична превенция) и забавянето на нейната прогресия (вторична превенция) се явяват основен таргет в клиничните стратегии на ренопротекцията [De Zeeuw D, 2004].

1.1.9.2. Исторически данни за фармакологичното инхибиране на RAS

През 1977 г. Ondetti и колеги разработват първия инхибитор на ACE, каптоприл, за лечение на реноваскуларна хипертензия и откриват нова ера в изучаването на патофизиологичната роля на RAS в бъбречните заболявания [Ondetti MA et al, 1977]. През 1986 г. Zatz и сътрудници показват, че лечението с ACE-инхибитора еналаприл намалява гломерулната хипертония, подобрява структурното увреждане на гломерулите и предотвратява появата на протеинурия при плъхове с експериментално индуциран диабет [Zatz R et al, 1986]. Това е първото доказателство за ролята на RAS в патогенезата на ДН, което стимулира развитието на лекарствата, потискащи нейната активност. През 90-те години се провеждат големи рандомизирани контролирани клинични проучвания, които доказват, че инхибирането на ACE води до ренопротекция при прогресивни хронични бъбречни заболявания, включително и изявена ДН при ЗД-1 [Lewis EJ et al, 1993; The GISEN group, 1997]. Постепенно към ACE-инхибиторите се добавят и други инхибитори на RAS - антагонистите на рецепторите на Ang II и на алдостерона, инхибиторите на ренина. Така настъпва ерата на инхибиторите на RAS и тяхната роля в ренопротекцията.

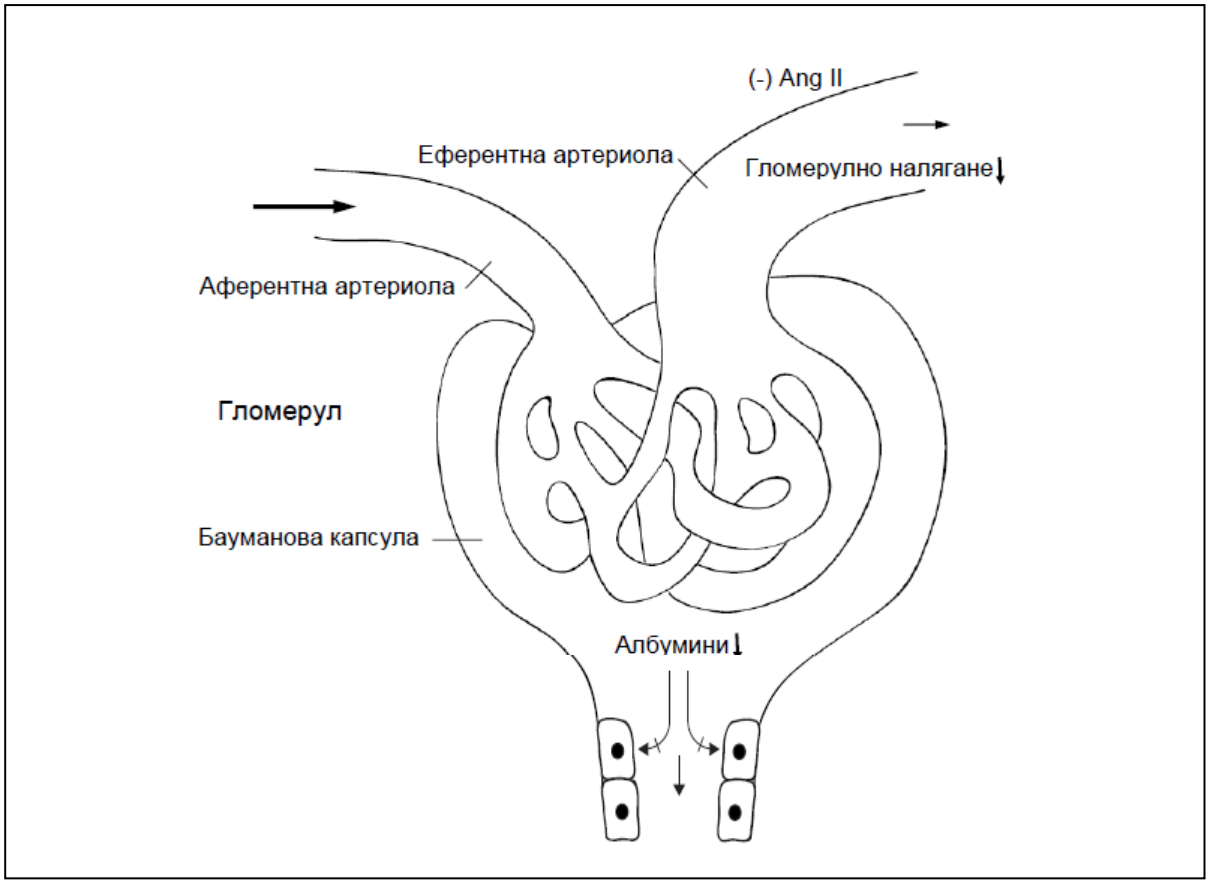
1.1.9.3. Потенциални механизми, участващи в ренопротекцията

1.1.9.3.1. Инхибиране на ACE

Инхибирането на ACE намалява превръщането на Ang I в Ang II, което отслабва ефектите на Ang II, свързани с активирането на AT1 и AT2.

Важна роля за ренопротективния ефект при инхибирането на ACE оказва повлияването на основния патогенетичен маханизъм в развитието на ДН, а именно отслабване на пресорния ефект на Ang II върху еферентните артериоли [Zatz R et al, 1986; Raij L et al, 1989] **(Фигура 4)**. Тяхната селективна дилатация води до понижаване на гломерулното налягане и ограничаване екскрецията на плазмените албумини с урината. За това допринася и ограничаването на увреждащото действие на Ang II върху ГБМ, което намалява нейния пермеабилитет за плазмените албумини [Perico N et al, 2008]. В резултат се

ограничава и нефротоксичния ефект на албумините при навлизането им в подоцитите и клетките на проксималните извити каналчета [Morelli et al, 1990; Benigni A et al, 1995; Remuzzi G and Bertani T, 1998].



Фигура 4. Хемодинамичен механизъм, участващ в нефропротективния ефект при инхибирането на ACE.

Трябва обаче да се отбележи, че образуването на Ang II не се потиска напълно, защото не се засяга формирането на Ang II от локалните ACE-независими пътища (химази, катепсин G), които се възползват от увеличения Ang I **(Фигура 3)**, т.е. локалната продукция на Ang II се засяга в по-слаба степен в сравнение със системната му продукция [Nishiyama A et al, 2002]. Независимо от факта, че първоначално нивото на Ang II се понижава, след няколко седмици може да се върне към нормалните стойности – т. нар. “феномен на избягването” [Juillerat L et al, 1990]. Въпреки това, инхибирането на ACE води до ефективно понижаване на АН, защото се потиска разграждането на вазодилататора брадикинин, който стимулира освобождаването и на други вазодилататорни субстанции като NO и PGI2 [Lüscher TF, Yang Z, 1993].

Установено е и, че ACE сам по себе си може да действа като рецептор, разположен върху клетъчната повърхност, който при свързването с ACE-инхибитор задейства сигнална каскада, стимулираща синтеза на PGI2 [Fleming I et al, 2005].

Скорошни данни за новите ензимни пътища на RAS показват, че при инхибирането на ACE се наблюдава повишаване на плазмените и тъканните нива на Ang 1-7, който противодейства на ефектите на Ang II. Това е свързано с увеличаване на неговото образуване от Ang I под влияние на ендопептидазите **(Фигура 3)**, повишаване експресията и активността на ACE2 в бъбрека и сърцето, и потискане стимулиращия ефект на ACE върху плазмения клирънс на Ang 1-7 [Tikellis C et al, 2003; Patel VB et al, 2014].

В крайна сметка брадикининът, NO, PGI2 и Ang 1-7 от една страна потенцират вазодилатацията и натриурезата, което спомага за поддържането на траен антихипертензивен ефект, независимо от феномена на избягването и от увеличаването на плазмената ренинова активност, което се наблюдава при инхибирането на RAS, а от друга страна те потискат възпалителните процеси, индуцирани от Ang II, стимулират разграждането на екстрацелуларния матрикс, ограничават бъбречната хипертрофия и потискат развитието на гломерулосклероза. Това обуславя органопротективния ефект, който се наблюдава при инхибирането на ACE [Orth S et al, 1993; Hutchison FN et al, 1995].

При инхибирането на RAS се наблюдава подобряване на инсулиновата резистентност, защото се ограничава потискащото действие на Ang II върху фосфатидилинозитол-3 киназния инсулинов път, намаляват се оксидативният стрес и възпалението, увеличава се перфузията в скелетните мускули и микроциркулацията на панкреасните островни клетки [Fonseca VA, 2006; Pan Y et al, 2015]. Това също допринася за нефропротективния ефект при инхибирането на ACE, тъй като инсулиновата резистентност е патофизиологичната основа за развитието на ЗД-2 и микроалбуминурия [Groop

LC and Eriksson JG, 1992; DeFronzo RA, 1997; Parvanova A et al, 2002; Parvanova A et al, 2006].

Описаните механизми, хемодинамичен, антипролиферативен и противовъзпалителен, са в основата на ренопротективния ефект при инхибирането на ACE и дават възможност да се предположи, че това може да бъде успешен подход и в превенцията на микроалбуминурията.

1.1.9.3.2. Блокиране на рецепторите на Ang II

Лекарствата, които блокират рецепторите на Ang II, ARBs или т.нар. сартани, проявяват селективност към AT1 [Mimran A and Ribstein J, 1999] и потискат всички системни и локални увреждащи ефекти на Ang II. Счита се, че потискането на тези ефекти е по-пълно в сравнение с това, което се получава при инхибирането на ACE, тъй като не се наблюдава “феномен на избягването” и не се засягат благоприятните ефекти (антипролиферативен и противовъзпалителен), медиирани от AT2. Дори се допуска от една страна, че увеличеният Ang II стимулира AT2 [Campbell DJ et al, 1995] и потенцира каскадата брадикинин/NO/cGMP [Tsutsumi Y et al, 1999]. Показано е, че селективният AT2 рецепторен агонист, C21, успешно намалява албуминурията при плъхове с експериментално предизвикан диабет [Castoldi G et al, 2014], което дава основание да се предположи, че стимулирането на AT2 е важен механизъм в ренопротекцията. От друга страна, от увеличения Ang II под влияние на ACE2, се засилва образуването на новооткрития вазодилататор Ang 1-7. Това допринася за антихипертензивния и нефропротективния ефект, който се наблюдава при блокирането на AT1.

Както при инхибирането на ACE, така и при блокирането на AT1 е докладвано подобряване на увредения пермеабилитет на ГБМ и намаляване на протеинурията [Perico N et al, 2008].

1.1.9.3.3. Комбинирано инхибиране на ACE и AT1

Cross-over проучване, което сравнява ефектите на ACE-инхибиторите и ARBs, приложени самостоятелно установява, че 18% от пациентите отговарят на антихипертензивния ефект на ACE-инхибитора, но не и на ARB, и 15% отговарят на ARB, но не и на ACE-инхибитора [Stergiou GS et al, 2001]. Прави се заключението, че при повече от една трета от пациентите антихипертнзивният отговор към едната група лекарства не може да предскаже отговора към другата група и обратно. Тези данни показват, че макар да повлияват обща физиологична система, разликите в мястото и конкретния механизъм на действие на двата класа лекарства може да има важно практическо значение. Това е и едно от основанията за тяхното комбинирано приложение, за което се предполага, че ще осъществи оптмална блокада на RAS тъй като повлиява както бионаличността на Ang II, така и неговата активност на рецепторно ниво. Прибавянето на ACE-инхибитор към ARB ще ограничи компенсаторното образуване на Ang II, което се наблюдава при самостоятелното приложение на ARBs, докато прибавянето на ARB към ACE-инхибитор ще противодейства на ефекта на Ang II, който се образува чрез ACE-независими пътища, при самостоятелното приложение на ACE-инхибитори. Очаква се, че комбинираното инхибиране на ACE и AT1 може да доведе не само до адитивен, но и до синергичен ефект, и ще усигури максимална ренопротекция [Rao MV et al, 2008].

1.1.9.3.4. Блокиране на бавните L-тип потенциал-зависими калциеви канали

Блокирането на бавните L-тип потенциал-зависими калциеви канали предотвратява навлизането на Ca^{2+} в СГМК и в клетките на миокарда. Това води до дилатация на периферните и коронарните съдове, понижаване на АН и подобряване на миокардната перфузия [Ferrari R et al, 1994].

Установено е, че различните CCBs имат различен ефект върху гломерулната хемодинамика [Smith AC et al, 1998]. Старата генерация

дихидропиридинови CCBs (dCCBs) предизвикват вазодилатация само на аферентната артериола, повишават вътрегломерулното налягане, което може да увеличи протеинурията [Abbott KC and Bakris G, 1993]. Новите dCCBs (манидипин, бенидипин) и недихидропиридиновите (ndCCBs) като верапамил и дилзем, предизвикват вазодилатация и на еферентната артериола, понижават вътрегломерулното налягане и би трябвало да намалят протеинурията и да окажат ренопротективен ефект [Epstein M, 1992; Weidmann P et al, 1992; Hayashi K et al, 2007]. В подкрепа на потенциалния ренопротективен ефект на CCBs са и данните за възможна антимитогенна активност на ниво гломерули/мезангиум, която ограничава бъбречната хипертрофия и забавя развитието на гломерулосклероза и загубата на функционални нефрони [Epstein M, 1992].

1.1.9.3.5. Комбинирано блокиране на RAS и на бавните L-тип потенциал-зависими калциеви канали

Изглежда, че едновременното инхибиране на ACE и блокирането на бавните L-тип потенциал-зависими калциеви канали може да доведе до комплементарни ефекти, тъй като инхибирането на ACE намалява образуването на Ang II, а блокирането на калциевите канали отслабва ваконстрикторното действие на Ang II [Ilieva G et al, 1995; Tolekova A et al, 1996; Илиева Г et al, 1996 (a); Илиева Г и Толекова А, 2002]. Затова се очаква, че комбинацията между ACE-инхибитори и CCBs ще предложи някои предимства като по-добро понижаване на АН [Kaplan NM, 1997; Ménard J and Bellet M, 1993], комплементарност в диуретичния и натриуретичния ефект [Kaplan NM, 1995], неутрален или благоприятен ефект върху въглехидратния и липидния метаболитен профил [Ferrier C et al, 1991; Weidmann P et al, 1992], а също и стимулиране продукцията на NO чрез кинин-зависими механизми, което значимо намалява нивата на възпалителните маркери (TNF-α, NF-kB, IL-6) [Zhang X et al, 2000]. Теоретично, комбинацията на тези лекарствени групи трябва да бъде по-ефективна в ренопротекцията от самостоятелното им приложение и да доведе до синергично намаляване на протеинурията, поради

по-доброто понижаване на вътрегломерулното налягане и повишаването на бъбречната перфузия [Tolins JP and Raij L, 1991].

1.1.9.4. Предотвратяване прогресията на макроалбуминурия към ТБН

1.1.9.4.1. Захарен Диабет тип 1

През 1985 г. Taguma и колеги, първи показват, че каптоприл, приложен в дози, които не влияят върху системното АН, води до регресия на нефротичния синдром при десет пациенти с азотемия и изявена ДН [Taguma Y et al, 1985]. В края на 80-те години рандомизирани клинични проучвания показват, че намаляването на СГФ е по-бавно при пациентите лекувани с АСЕ-инхибитор, в сравнение с тези, които са без АСЕ-инхибитор [Parving HH et al, 1988; Bjorck S et al, 1992]. През 1993 г. Collaborative study установява, че 3-годишната терапия с каптоприл намалява с 50% честота на поява на комбинираната крайна цел от удвояване на серумния креатинин, прогресия до ТБН или смърт, в сравнение с плацебо **(Таблица 1)**, при пациенти с албуминурия >500 mg/24h и креатинин <221 µmol/l (<2.5 mg/dl).

Таблица 1. Основни рандомизирани контролирани проучвания с инхибитори на RAS при пациенти със ЗД-1 и ЗД-2 преди 2004 г.

Проучване (година)	Пациенти, достигнали до крайната точка / Общ брой пациенти (%)		Инхибитор на RAS	HR на крайната точка при пациентите с инхибитор на RAS (95% CI)	P
	Пациенти с RAS инхибитор	Плацебо			
Предотвратяване на ТБН и смърт					
Collaborative Study (1993)	25/207 (12%)	43/202 (21%)	ACE-инхибитор	0.52 (0.16–0.67)	0.007
RENAAL (2001)	327/751 (44%)	359/762 (47%)	ARB	0.84 (0.72–0.98)	0.02
IDNT (2001)	189/579 (33%)	222/569 (39%)	ARB	0.81 (0.67–0.99)	0.03
Предотвратяване на изявена ДН (макроалбуминурия)					
MICRO-HOPE (2000)	117/1,808 (6%)	149/1,769 (8%)	ACE-инхибитор	0.75 (0.64–0.88)	0.027
LIFE (2002)	27/586 (8%)	31/609 (11%)	ARB	ND	ND
IRMA 2 (2001)	10/194 (5%)	30/201 (15%)	ARB	0.30 (0.14–0.61)	<0.001
Предотвратяване на начална ДН (микроалбуминурия)					
EUCLID (1997)	13/213 (6%)	18/227 (8%)	ACE-инхибитор	1.30 (0.64–2.70)	0.5
J-MIND (2001)	23/105 (22%)	15/95 (16%)	ACE-инхибитор	ND	ND

Многофакторните анализи установяват, че ренопротективният резултат е независим от промените в АН и се обяснява със значителното намаляване екскрецията на протеините при лечението с каптоприл. Тази терапия редуцира също наполовина риска от сърдечно-съдова смъртност, считан като самостоятелна крайна цел. Това са първите данни в научната литература, които показват, че АСЕ-инхибиторите имат и специфичен кардиопротективен ефект при пациенти със ЗД.

1.1.9.4.2. Захарен Диабет тип 2

Почти 10 години след публикуването на Collaborative study, проучванията Reduction of Endpoints in Non-insulin dependent diabetes mellitus with the Angiotensin II Antagonist Losartan (RENAAL) и Irbesartan in Diabetic Nephropathy Trial (IDNT) показват, че терапията с ARBs *vs* плацебо намалява честотата на поява на комбинираната крайна точка от удвояване на серумния креатинин, прогресия до ТБН или смърт, съответно с 16% и 19%, в две големи групи от пациенти със ЗД-2 и изявена ДН **(Таблица 1)** [Brenner BM et al, 2001; Lewis EJ et al, 2001]. Ренопротективният ефект е свързан със сигнификантно намаление на екскрецията на протеините с урината и е независим от малките разлики в АН между изследваните групи. И двете проучвания показват, че ранното намаляване на екскрецията на протеините с урината е асоциирано с по-бавна загуба на бъбречната функция и с намаляване на сърдечно-съдовата смъртност в дългосрочен план [de Zeeuw D, 2004]. Въпреки това, забавянето на прогресията на ДН и намаляването на риска от ТБН е само с около 20%, твърде малко на фона на глобалния проблем, който създава ДН.

Няма големи рандомизирани изследвания, които сравняват директно антипротеинуричния ефект на двете големи групи лекартсва, инхибиращи RAS, при лечението на изявената ДН. Проучване с ретроспективен дизайн, в който не е приложен рандомизирания метод, сравнява ефектите на АСЕ-инхибиторите и ARBs при 100 пациенти със ЗД-2 и ДН, и не открива разлики

между двете групи в промяната на протеинурията и на АН по време на 25-месечното проследяване на пациентите [Ozturk S et al, 2009].

Доколкото ни е известно, ние проведохме първото рандомизирано, пилотно, проспективно, едноцентрово проучване с четири паралелни групи на терапия при 38 хипертензивни пациенти със ЗД-2 и изявена ДН, което сравнява антипротеинуричните ефекти на АСЕ-инхибитора еналаприл (20 mg/ден) и на ARB лосартан (100 mg/ден) (първична цел) [Parvanova A et al, 2001]. При измерването на протеинурията, СГФ и реналния плазмен ток (RPF) са приложени методи златни стандарти. Установява се по-голямо понижаване на протеинурията при терапията с еналаприл, въз основа на което се оформя предположението, че инхибирането на АСЕ води до по-ефективен нефропротективен ефект, в сравнение с блокирането на рецепторите на Ang II. Вторичната цел на проучването и получените резултати са дискутиран в раздел 1.1.9.7.

В ход е голямо, проспективно, рандомизирано проучване - A prospective, randomized, open label blinded end point (probe) trial to evaluate whether, at comparable blood pressure control, combined therapy with the ACE inhibitor benazepril and the angiotensin II receptor blocker (ARB) VALsartan reduces progression to ESRD more effectively than benazepril or valsartan alone In high risk patients with type 2 Diabetes and overt nephropathy (VALID), което има за цел да изследва дали при сравним контрол на АН, АСЕ-инхибиторът беназеприл 20 mg/ден и ARB валсартан 320 mg/ден, приложени самостоятелно за среден тригодишен период, имат подобен протективен ефект срещу развитието на ТБН и ССЗ (фатални и нефатални) или комбинацията им в двойно по-ниска доза (беназеприл 10 mg/ден + валсартан 160 mg/ден) предлага по-добра защита срещу програмираните крайни точки (NCT055217, държавен регистър на Италия за клинични проучвания; EudraCT N 2006-005951-14) [Parvanova AI et al, 2012 (б)].

1.1.9.5. Предотвратяване прогресията на микроалбуминурия към макроалбуминурия

1.1.9.5.1. Експериментални данни

Установено е, че терапията с АСЕ-инхибитор, започната в момента на индуцирането на ЗД, почти напълно предотвратява функционалните и структурните промени, характерни за експерименталната ДН при плъхове [Zatz R et al, 1986]. По-късно е показано, че инхибирането на RAS намалява протеинурията и потиска развитието на гломерулосклероза, ако лечението е започнато скоро след предизвикването на ЗД, но ако лекарството е приложено при наличието на функционални и структурни бъбречни промени, то остава неефективно. Вероятно, резултатът от инхибирането на RAS е функция от момента на развитие на заболяването [Perico N et al, 1994]. Тези данни полагат основата на проучвания, които изследват ефикасността на ранното прилагане на инхибиторите на RAS в човешката патология.

1.1.9.5.2. Захарен Диабет тип 1

Проучванията European Microalbuminuria Captopril Study и North American Microalbuminuria Study показват, че инхибирането на АСЕ, сравнено с плацебо, е свързано с намаляване честота на развитие на изявена ДН (дефинирана като развитие на персистираща макроалбуминурия) и със запазване на бъбречната функция при нормотензивни пациенти със ЗД-1, микроалбуминурия и нормална бъбречна функция [Viberti G et al, 1994; ACE Inhibitors in Diabetic Nephropathy Trialist Group, 2001]. Мета-анализ на 12 проучвания, обхващащ 698 пациенти със ЗД-1 и микроалбуминурия, проследени в продължение най-малко на 1 година показва, че АСЕ-инхибиторите, сравнени с плацебо, намаляват честотата на поява на макроалбуминурия с 62% [ACE Inhibitors in Diabetic Nephropathy Trialist Group, 2001]. Още по-важен е фактът, че предотвратяването на макроалбуминурията е асоциирано със запазване на нормалната бъбречна функция през следващите 8 години [Parving HH and Hovind P, 2002].

1.1.9.5.3. Захарен Диабет тип 2

Показано е, че при пациенти със ЗД-2 с или без АХ, АСЕ-инхибиторите забавят прогресията на микроалбуминурията към макроалбуминурия и запазват бъбречната функция [Lebovitz HE et al, 1994; Trevisan R and Tiengo A, 1995].

В проучването Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) над 9000 пациенти с повишен риск от ССЗ (3577 със ЗД) са рандомизирани да получават АСЕ-инхибитора рамиприл или плацебо в продължение средно на 5 години [Yusuf S et al, 2000]. Това изследване е ценно с двата си изключително важни резултата. Първо, показва, че терапията с рамиприл, при високорискови пациенти, намалява с 22% честотата на поява на миокарден инфаркт, инсулт или сърдечно-съдова смърт, в сравнение с плацебо, при сравним контрол на АН в двете групи и потвърждава кардиопротективния ефект на АСЕ-инхибиторите. Второ, терапията с рамиприл ограничава честота на развитие на макроалбуминурия при пациентите със ЗД и потвърждава нефропротективния ефект на АСЕ-инхибиторите [Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators, 2000].

Първото официално доказателство, че изявената ДН може да бъде предотвратена с ARBs, е направено от рандомизираното клинично проучване IRbesartan in patients with type 2 diabetes and MicroAlbuminuria (IRMA), в което участват 590 хипертензивни пациенти със ЗД-2 и микроалбуминурия [Parving HH et al, 2001]. Изследването установява, че 2-годишното лечение с 300 mg/ден ирбесартан (ARB), намалява три пъти честотата на поява на макроалбуминурия в сравнение с плацебо **(Таблица 1)**, докато по-ниската доза от 150 mg/ден е неефективна.

Проучвания, сравняващи АСЕ-инхибиторите и ARBs, установяват, че двете групи лекарства имат подобен антипротеинуричен и антихипертензивен ефект [Mogensen CE et al, 2000; Lacourcière Y et al, 2000; Barnett AH et al, 2004].

1.1.9.6. Предотвратяване появата на микроалбуминурия

1.1.9.6.1. Захрен Диабет тип 1

В проучването EURODIAB Controlled trial of Lisinopril in Insulin-Dependent diabetes (EUCLID), 530 пациенти със ЗД-1 и нормо- или микроалбуминурия, са рандомизирани да приемат терапия с лизиноприл или плацебо, поне за 2 години. Показано е, че при пациентите, лекувани с лизиноприл, албуминурията е с 2.2 μg/min по-ниска в сравнение с плацебо. Този ефект, обаче, е наблюдаван само при пациентите, които са имали микроалбуминурия при започването на изследването и не е установен при пациентите с нормоалбуминурия **(Таблица 1)** [The EUCLID Study Group, 1997].

1.1.9.6.2. Захарен Диабет тип 2

Проучването Japan Multicenter Investigation of antihypertensive treatment for Nephropathy in Diabetics (J-MIND) обхваща 201 хипертензивни пациенти със ЗД-2 и нормоалбуминурия и установява, че честотата на микроалбуминурия е по-ниска при пациентите, рандомизирани да получават еналаприл в продължение на 2 години, в сравнение с контролите, които получават dCCB нифедипин (15.8% *vs* 21%) **(Таблица 1)** [Baba S, 2001]. Тези данни обаче не се считат за показателни, тъй като изследването е лишено от необходимата мощност за откриване на специфичен ефект на лечението върху появата на микроалбуминурия.

1.1.9.7. Ренопротекция с комбинирано инхибиране на ACE и блокиране на рецепторите на Ang II

Допуска се, че комбинираното потискане на RAS чрез инхибиране на ACE и блокиране на рецепторите на Ang II може да намали протеинурията по-ефективно от монотерапията, но дали това е адитивен ефект или би могло да бъде постигнато само с едно от лекарствата, приложено в максимална доза, или се касае за синергичен ефект между двете групи лекарства, остава все още неизяснено.

В пилотното, рандомизирано, проспективно, едноцентрово проучване с четири паралелни групи на лечение при хипертензивни пациенти със ЗД-2 и изявена ДН, цитирано в раздел 1.1.9.4.2., вторичната цел е изследване и сравняване на антипротеинуричния ефект на комбинираното инхибиране на RAS с еналаприл и лосартан, приложени в двойно по-ниски дози (10 mg/ден + 50 mg/ден), с този на еналаприл (20 mg/ден), лосартан (100 mg/ден) и dCCB фелодипин (10 mg/ден), приложени самостоятелно [Parvanova A et al, 2001]. При подобен контрол на АН, комбинацията еналаприл и лосартан демонстрира превъзходство и намалява протеинурията в по-голяма степен, в сравнение с приложените монотерапии. Този резултат се потвърждава от мета-анализ на 10 проучвания при пациенти с ДН, който докладва, че комбинирането на ACE-инхибитор и ARB води до по-ефективно намаляване на протеинурията в сравнение с ACE-инхибитора, приложен самостоятелно в изследванията с кратка, но не и с голяма продължителност [Jennings DL et al, 2007]. Отбелязано е обаче, че антипротеинуричният ефект е почти неизменно свързан с понижаване на АН и на СГФ, поради което този анализ не може да направи заключението, че по-изразеното намаляване на протеинурията е специфичен ефект на двойното инхибиране на RAS.

Голямото лонгитудинално мултицентрово проучване ONgoing Telmisartan Alone and in combination with Ramipril Global End-point Trial (ONTARGET), което обхваща 25 620 пациенти с атеросклеротични съдови заболявания или ЗД с органно увреждане в крайна фаза показва, че комбинираното лечение с телмисартан и рамиприл, въпреки че намалява албуминурията в по-голяма степен отколкото монотерапията, като цяло влошава основната крайна комбинирана ренална цел на проучването (достигане до диализа, удвояване на серумния креатинин и смърт) [Mann JF et al, 2008]. Първоначално това изследване внася много смут във връзка с ролята на двойното блокиране на RAS и безопасността при прилагането на този подход. Обаче, внимателното анализиране на резултатите показва, че високата честота на нежеланите

лекарствени реакции (НЛР) от страна на бъбреците се дължи главно на случаите на остра бъбречна недостатъчност, нуждаещи се от хемодиализа, която е провокирана от преходна хипоперфузия на тези органи, поради силното понижаване на АН, хиповлемия или исхемично бъбречно заболяване, което обаче отминава при спиране на терапията [Ruggenenti P and Remuzzi G, 2013 (б)]. Това са хемодинамични НЛР, свързани с двойното инхибиране на RAS, които не могат да бъдат считани като ренален резултат, свързан с протеинурията или с прогресията на хроничното бъбречно заболяване. Следователно, трябва да се направи заключението, че двойното инхибиране на RAS не подобрява бъбречната функция и дори може да я влоши при пациентите без протеинурия. Този резултат не трябва да се екстраполира при пациентите с протеинурични нефропатии, при които намаляването на протеинурията е важен таргет за подобряване на бъбречните показатели и това няма нужда да бъде преоткривано и доказвано отново заради резултатите от ONTARGET, а двойната блоката на RAS за сега е най-ефективният подход за постигането му [Ruggenenti P et al, 2008; Ruggenenti P and Remuzzi G, 2013 (а)]. Допуска се, че антипротеинуричният ефект зависи и от вида на бъбречното увреждане [Kim MJ et al, 2003]. Мета-анализ потвърждава, че комбинираната терапия с ACE-инхибитор и ARB редуцира по-силно протеинурията, в сравнение със самостоятелното приложение на тези лекарства, при пациенти с недиабетна ХБН [Kunz R et al, 2008]. В много по-сложната патогенеза на ДН, Ang II не е еднозначно отговорен за нарушаването на бъбречната хемодинамика и бариерната функцията на ГБМ. В нея участват също хипергликемията, инсулиновата резистентност, оксидативния стрес, които модулират патофизиологичните процеси в бъбреците чрез RAS-независими пътища [Kim MJ et al, 2003; Parvanova A et al, 2004]. Въпреки това, много скорошен мета-анализ потвърждава, че двойната блокада на RAS е най-добрият и безопасен подход за забавяне или предотвратяване на ТБН и при пациентите с ДН [Palmer SC et al, 2015]. Отправен е призив към диабетолози,

нефролози и отговорните органи по препоръките за лечение на ЗД и ДН да преразгледат отново потенциала на тази терапия, от която се наблюдава отдръпване през последните години, като се подчертава важността на внимателната индивидуална клинична оценка при определянето на дозите на лекарствата в двойната комбинация [Ruggenenti P and Remuzzi G, 2015]. Очакват се и резултатите от текущото лонгитудинално клинично изследване VALID, посочено в раздел 1.1.9.4.2., което изследва дали двойната блокада на RAS с ACE-инхиботор и ARB води до по-ефективна ренопротекция, отколкото инхибирането на RAS само с едно от тези лекарства [Parvanova AI et al, 2012 (б)].

В ход е и друго голямо, проспективно, рандомизирано проучване - A prospective, randomized, open label blinded end point (probe) trial to evaluate whether, combined therapy with the ACE-inhibitor benazepril and the angiotensin II receptor blocker VAlsartan, Reduces the Incidence of microalbuminuria more Effectively than benazepril or valsartan alone in hypertensive patients with TYpe 2 diabetes and high-normal albuminuria (VARIETY), което има за цел да изследва дали при сравним контрол на АН, комбинираното приложение на беназеприл и валсартан, назначени в двойно по-ниски дози (10 mg/ден и 160 mg/ден), намалява честотата на микроалбуминурия по-ефективно, отколкото самостоятелното инхибиране на RAS с пълна доза беназеприл (20 mg/ден) (NCT 00503152, държавен регистър на Италия за клинични проучвания; EudraCT N 2006-005954-62) [Parvanova AI et al, 2012 (a)].

1.1.9.8. Роля на блокирането на бавните L-тип потенциал-зависими калциеви канали в ренопротекцията при ЗД-2

Даните за dCCB и ndCCB разкриват, че има различия в ренопротективния им ефект. Мета-анализи на проучвания с ndCCB и dCCB при пациенти с АХ, протеинурия, с или без ЗД, установяват, че при сравним контрол на АН, ndCCBs намаляват протеинурията с около 30%, а dCCB не оказват статистически значим ефект [Weidmann P et al, 1992; Bakris GL et al, 2004]. Лонгитудинални

проучвания намират, че ndCCB като верапамил и дилтиазем, забавят прогресирането на ДН много по-добре от β-блокерите и, че ефектът им по отношение запазване на бъбречната функция е сравним с този на ACE-инхибитора лизиноприл [Bakris GL and Williams B, 1995; Bakris GL et al, 1996]. Авторите предлагат ndCCB да се използват като лекарство на избор за понижаване на АН, самостоятелно или в комбинация с инхибитор на RAS, при пациенти с хронични протеинурични нефропатии.

Сравнявайки директно реналните ефекти на CCBs с тези на инхибиторите на RAS, при хипертензивни пациенти със ЗД-2, някои автори докладват, че няма разлика в степента на промяна на СГФ и изказват идеята, че дори ACE-инхибиторите да намаляват албуминурията в по-голяма степен от CCBs, това не означава задължително по-голяма ренопротекция, а по-скоро определя възможност за по-голяма сърдечно-съдова протекция [Nosadini R and Tonolo G, 2002].

1.1.9.9. Роля на комбинираното инхибиране на ACE и блокирането на бавните L-тип потенциал-зависими калциеви канали в ренопротекцията при ЗД-2

Комбинацията трандолаприл и верапамил, при подобно понижаване на АН и добър профил полза/риск, намалява албуминурията в по-голяма степен, отколкото двете лекарства, приложени самостоятелно при хипертензивни пациенти със ЗД-2 и ДН [Bakris GL et al, 1998]. Дискутира се адитивен антипротеинуричен ефект, който може да има важна роля в забавяне прогресията на ДН при ЗД-2. Ефектът на комбинацията трандолаприл и верапамил върху АН, албуминурията и метаболитния профил е сравнен с този на комбинацията между β-блокер и диуретик, при хипертензивни пациенти със ЗД-2 и ДН [Schneider M et al, 1996]. При подобно понижение на АН, комбинацията трандолаприл и верапамил е по-ефективна в ограничаването на албуминурията и остава метаболитно неутрална, в сравнение с комбинацията β-блокер и диуретик, която не понижава албуминурията и влошава

инсулиновата резистентност. Авторите достигат до заключението, че тази комбинация е потенциално ценна за лечението на АХ при пациенти със ЗД.

Лонгитудинално, рандомизирано, двойно-сляпо, контролирано проучване при пациенти с ХБН и протеинурия сравнява антипротеинуричния ефект на β-блокера атенолол, ACE-инхибитора трандолаприл, ndCCB верапамил и комбинацията трандолаприл и верапамил, и установява, че при подобно понижаване на АН, само ACE-инхибиторът трандолаприл, приложен самостоятелно или комбиниран с верапамил, намалява протеинурията [PROCOPA Study Group, 2002]. Това потвърждава ренопротективния ефект при самостоятелното инхибиране на ACE, но поставя под съмнение адитивния антипротеинуричен ефект при комбинираното инхибиране на ACE и блокирането на бавните L-тип потенциал-зависими калциеви канали с ndCCB, което заслужава да бъде изследвано.

Проучването The DElapril and MAnidipine for Nephroprotection in Diabetes (DEMAND), обхващащо 380 хипертензивни пациенти със ЗД-2, с нормо- и микроалбуминурия и нормална СГФ, е първото, което изследва ефекта на комбинацията между новия dCCB манидипин (10 mg/ден) и ACE-инхибитора делаприл (30 mg/ден) върху СГФ и го сравнява с този на плацебо [Ruggenenti P et al, 2011]. Получените резултати показват, че комбинираното приложение на двете лекарства не забавя понижаването на СГФ, но намалява случаите на ССЗ, ретинопатия, невропатия и стабилизира инсулиновата чувствителност.

Няма данни дали ndCCBs, приложени самостоятелно или в комбинация с инхибитори на RAS, са ефективни в превенцията на микроалбуминурия при пациенти със ЗД-2 и нормоалбуминурия.

1.2. Ендотелин

През 1988 г. широк интерес предизвиква откриването на ЕТ-1, един от най-силните ендогенни вазоконстриктори в човешкото тяло, който се образува главно в ендотелните, но също така и в СГМК, в макрофагите и в други клетки, характерни за хроничното възпаление [Yanagisawa M et al, 1988; Zeiher A et al, 1995].

1.2.1. Структура, синтез, катаболизъм, рецептори и основни ефекти

Семейството на ЕТ се състои от три пептиди - ЕТ-1, ЕТ-2 и ЕТ-3, изградени от 21-аминокиселини, от които най-широко разпространен и най-активен е ЕТ-1. Характерно за структурата им е наличието на две вътреверижни дисулфидни връзки, чието положение варира с не повече от 6 аминокиселини.

Трите изоформи на ЕТ са кодирани от отделни гени. Генът на ЕТ-1 се намира в хромозома 6 [Arinami T et al, 1991]. Синтезът и секрецията на ЕТ-1 се контролират на ниво генна транскрипция, чиято активност се регулира от взаимодействието на много тъканно-специфични транскрипционни фактори като активаторен протеин-1, GATA свързващ протеин 2, CAAT-свързващ нуклеарен фактор-1 и други [Yamashita K et al, 2001]. Плазменият полуживот на на ЕТ-1 е кратък (~ 15 минути), което се дължи на наличието на три нестабилни AUUUA участъка в неговата иРНК [Inoue A et al, 1989]. Всяка промяна в стабилността ѝ води до промяна в скоростта на синтеза на ЕТ-1 [Douthwaite JA et al, 2003]. Тази иРНК кодира пре-пропептид с 212 аминокиселини, от който под влияние на сигналната пептидаза се получава про-ЕТ-1. Благодарение на специфична ендопептидаза про-ЕТ-1 се превръща Big-ET-1, съдържащ 38 аминокиселини [Yanagisawa M et al, 1988]. Big-ET-1 се намира в кръвообращението, но е два пъти по-слаб вазоконстриктор в сравнение с ЕТ-1 [D'Orleans-Juste P et al, 2003]. Под влияние на цинк-зависимия ендотелин конвертиращ ензим (ECE) Big-ET-1 се превръща в ЕТ-1. ECE има три изоформи - ECE-1, ECE-2 и ECE-3 [D'Orleans-Juste P et al, 2003]. ECE-1 се намира главно в ендотелните клетки, има най-голям афинитет към Big-ET-1 и оптимално pH на

действие 6.8 [Xu D et al, 1994]. Самият той има четири изоформи - ECE-1a, ECE-1b, ECE-1c и ECE-1d, които се различават по азотния край и по разположението в клетката. ECE-1a се намира във вътреклетъчните везикули и по клетъчната повърхност, ECE-1b - в ендозомите, ECE-1c и ECE-1d - по външната повъхност на клетъчната мембрана, което показва, че ET-1 може да се образува от Big-ET-1 както вътреклетъчно, така и извънклетъчно, може да се складира и съответно освобождава от везикулите под въздействието на различни стимули [Russell FD et al, 1998; D'Orleans-Juste P et al, 2003]. Предполага се, че и извънклетъчните метаболитни процеси в ET-та система имат важно физиологично значение, защото плазмената концентрация на Big-ET-1 е по-голяма от тази на ET-1.

ECE-2 има около 60% хомоложност с ECE-1, предствен е от четири изоформи, които се различават по азотния край и по разположението в клетката [Emoto N and Yanagisawa M, 1995]. Оптималното pH на действие е 5.5, което дава възможност да се направи заключението, че ECE-2 е активен преди всичко в апарата на Голджи [Emoto N and Yanagisawa M, 1995].

В експеримент с мишки с комбиниран knockout на ECE-1 и ECE-2 се установяват измерими нива на ET-1, което доказва, че и други протеази и химази могат да катализират образуването на ET-1 [Yanagisawa H et al, 2000]. Тяхното физиологично значение е обект на бъдещи изследвания.

Освен в ендотелните клетки ET-1 се образува също в различни тъкани и органи както при нормални, така и при патологични условия. Основни активатори на синтеза на ET-1 в организма са факторите, водещи до ендотелна дисфункция и съдово възпаление, като хипоксия, хемодинамичен съдов стрес, Ang II, катехоламини, тромбин, тромбоксан A2, окислени липопротеини и други [Navar L et al, 2008].

Най-малко два ензима разграждат ET-1 – NEP, която има неутрално pH на действие [D'Orleans-Juste P et al, 2003] и от деамидазата, която е с кисело pH на действие [Jackman HL et al, 1992]. Различните профили на pH на действие

на ензимите предполагат и различни биологични роли. Счита се, че бъбречният катаболизъм на ЕТ-1 е от важно значение, тъй като ЕТ-1 причинява продължително повишаване на АН в двустранно нефректомирани плъхове [Kohno M et al, 1989]. Докладвано е, че циркулиращият ЕТ-1 не се открива в урината на здрави индивиди [Abassi ZA et al, 1992].

Описани са два основни рецептора на ЕТ – ET_A рецептор (ET_AP) и ET_B рецептор (ET_BP), които се кодират от два различни гена. Генът на ET_AP се намира върху хромозома 4, съдържа 427 аминокиселини и неговият афинитет към изоформите на ЕТ е съответно ЕТ-1 ≥ ЕТ-2 »ЕТ-3 [Hosoda K et al, 1992]. Генът на ET_BP се намира върху хромозома 13, съдържа 442 аминокиселини и проявява еднакъв афинитет към всички изоформи на ЕТ [Arai H et al, 1990].

ET_AP и ET_BP са широко разпространени в почти всички тъкани като в дадена клетка може да са представени единият или двата рецептора, разположени както върху мембраната, така и в ядрото [Jacques D et al, 2006]. Като цяло, ET_AP преобладава в СГМК, а ET_BP преобладава в ендотелните клетки. Рецепторите на ЕТ са свързани с пептиди от фамилията на G-протеина (Gi, GQ, GS и $Ga_{12/13}$) [Dulin N et al, 1999], които опосредстват активирането на многобройни ензимни системи - аденилат циклаза, циклооксигеназа, цитохром Р-450, азотен оксид синтаза, серин/треонин кинази, тирозин кинази и други [Sorokin A and Kohan DE, 2003]. ET_AP има по-висок афинитет към ЕТ-1 и ЕТ-2 в сравнение с ЕТ-3, докато ET_BP се свързва с трите изоформи на ЕТ с еднакъв афинитет. Сързването на ЕТ-1 с неговите рецептори има почти необратим характер, което обуславя продължителните му биологични ефекти. В действителност ЕТ-1 може да остане свързан с рецепторите си до 2 часа, предизвиквайки активна сигнална трансдукция [Chun M et al, 1995].

Основната роля на ЕТ е да регулира съдовия тонус при здрави индивиди. Активирането на ET_AP и ET_BP много често, но не винаги води до противоположни ефекти. Например, активирането на ET_AP предизвиква вазоконстрикция и пролиферация, докато активирането на ET_BP води до

вазодилатация и инхибиране на пролиферацията [Yanagisawa M et al, 1988; Lüscher TF and Barton M, 2000]. Важен е фактът, че ET_BP регулира и клирънса на ЕТ-1 [Lüscher TF and Barton M, 2000]. Крайният ефект от възбуждането на рецепторите на ЕТ е увеличаване на системното съдово съпротивление и повишаване на АН. Този потенциално увреждащ ефект се засилва от способността ЕТ да стимулира растежните фактори и цитокините, които предизвикват адхезия на неутрофилите, агрегация на тромбоцитите и натрупване на протеини в екстрацелуларния матрикс [Lüscher TF and Barton M, 2000]. Взети заедно, тези ефекти могат да ускорят развитието на АХ и съдовите заболявания, което показва, че ЕТ е важен модулатор на функциите на сърдечната, бъбречната и ендокринната система [Lüscher TF and Barton M, 2000].

1.2.2. Основни концепции за биологията на ендотелина

- Биологията на ЕТ е проучена най-добре в рамките на локалната микросреда. Плазмените нива на ЕТ като цяло са твърде ниски за да активират ЕТ-те рецептори. Концентрацията на ЕТ-1 варира от 1-5 pmol и рядко надхвърля 25 pmol дори при патологични условия, а концентрациите на другите изоформи варират от неоткриваеми до много ниски нива [Kohan DE et al, 2011 (a)]. За разлика, локалните тъканни концентрации на ЕТ са по-високи от тези в циркулацията и могат да оказват физиологично действие. Двуполюсните клетки, каквито са ендотелните съдови клетки и тубулните клетки на бъбреците, секретират ЕТ-1 предимно към срещуположната на лумена страна, съответно към СГМК и към бъбречния интерстициум, където са разположени и по-голяма част от рецепторите на ЕТ. Това дава основание да се предположи, че ЕТ функционира предимно като автокринен и паракринен регулатор. Тези съображения помагат да се обясни широкия спектър от физиологични реакциии, контролирани от ЕТ, някои от които често са противоположни по действие.

- Синтезът на ЕТ-1 се регулира предимно на ниво генна транскрипция, в чийто контрол участват множество фактори, активиращи богат набор от вътреклетъчни сигнални пътища. Като цяло, вазоконстрикторите предимно стимулират, а вазодилататорите потискат синтеза на ЕТ-1 [Kohan DE et al, 2011 (a)]. Освен това, тъй като и освобождаването на ЕТ-1 зависи до голяма степен от генната транскрипция, нейната регулация може да доведе до значително усилване и удължаване на действието на ЕТ-1. Тази концепция е в потвърждение на дълготрайния ефект на ЕТ-1.

1.2.3. Роля на ендотелина в бъбречните функции

Системата на ЕТ е широко застъпена в бъбреците, които имат 10 пъти по-висока чувствителност към неговото действие в сравнение с другите органи [Speed JS and Pollock DM, 2013]. Сложните механизми на възбуждане на рецепторите на ЕТ, последвани от многобройни различни ефекти, налагат разглеждането на ролята на ЕТ във всяка бъбречна клетка поотделно.

1.2.3.1. Ендотелин и съдова система на бъбреците

1.2.3.1.1. Синтез, експресия и ефекти на ЕТ в бъбречната микроциркулация

Имунохистохимични изследвания потвърждават, че ендотелните клетки на човешките интерлобуларни и дъгообразни артерии и на гломерулните капиляри синтезират Big-ЕТ-1 и ЕТ-1, като върху тяхната повърхност е открит ECE-1 [Karet FE and Davenport AP, 1996; Pupilli C et al, 1997]. Интересно е, че в СГМК на ендотел-позитивните артериални сегменти липсва имуноцветяване за ECE-1 [Karet FE and Davenport AP, 1996]. ECE-1 е открит в правите съдове (vasa recta) и в тубулните елементи на бъбречната медула.

Приблизително 30% от рецепторите в кортекса и медулата на човешкия бъбрек са ET_AP [Nambi P et al, 1992]. Двата рецепторни подвида са представени в аферентните и еферентните артериоли [Inscho EW et al, 2005], в дъгообразните артерии, в интерлобуларните артерии и вени, в гломерулните артериоли [Davenport AP et al, 1994]. И тук ET_AP преобладава в СГМК, а ET_BP

преобладава в ендотелните клетки и бъбречните тубули [Wendel M et al, 2006]. Експресията на ЕТ-те рецептори в бъбречните съдове се влияе от промените във физиологичното състояние. Например, хроничното увеличаване на ЕТ-1 потиска силно експресията на ET_AP, докато ефектът върху ET_BP е много по-слабо изразен [Kuc RE and Davenport AP, 2000]. Азотният оксид увеличава експресията на ET_AP в СГМК [Redmond EM et al, 1996]. Хроничният прием на сол повишава експресията на ET_BP, но не и тази на ET_AP [Schneider MP et al, 2007]. Това разкрива нови възможности за регулация на ефектите на ЕТ.

Изследвания върху различни експериментални модели *in vitro* и *in vivo,* показват еднозначно, че ЕТ е силен вазоконстриктор на аферентните артериоли, докато ефектът му върху еферентните артериоли е по-слаб и варира от вазоконстрикция до вазодилатация [Loutzenhiser R et al, 1990; Fretschner M et al, 1991; Lanese DM et al, 1992; Pollock DM et al, 2005]. Съдосвиващата активност на различните изоформи на ЕТ е съответно ЕТ-1>ЕТ-2»ЕТ-3 и зависи от концентрацията им [Edwards RM et al, 1990; Imig JD et al, 2000; Inscho EW et al, 2005]. Предполага се, че ЕТ-1 медиира вазоконстрикцията на аферентните артериоли чрез активирането на ET_AP и ET_BP като е показано, че антагонизмът на ET_AP намалява, а антагонизмът на ET_AP и ET_BP напълно премахва съдовия спазъм [Endlich K et al, 1996; Inscho EW et al, 2005; Kohan DE et al, 2011 (a)]. Във вазоконстрикцията на еферентните артериоли също участват и двата вида рецептори, но взаимодействието между тях е много по-сложно [Endlich K et al, 1996; Kohan DE et al, 2011 (a)]. Блокарането на ET_BP в еферентните артериоли води до повишаване на вазоконстрикторната активност на ЕТ-1, а тяхното активиране с агониста S6c предизвиква вазодилатация [Inscho EW et al, 2005]. Блокирането на ET_AP в еферентните артериоли, предизвиква умерена вазодилатация при ниски концентрации на ЕТ-1 (10-100 pM), но с повишаване на концентрацията на ЕТ-1 (1 и 10 nM) настъпва силна вазоконстрикция [Inscho EW et al, 2005]. Това показва, че при активирането на ET_BP в ендотелните клетки на еферентните

артериоли съдоразширяващият ефект има доминираща роля, докато ET_BP-зависимата вазоконстрикция се наблюдава само при по-високи концентрации на ЕТ-1, т.е. ET_BP в ендотелните клетки имат по-висок афинитет към ЕТ-1, в сравнение с ET_BP в СГМК. Затова еферентните артериоли отговарят на ЕТ-1 с вазоконстрикция или вазодилатация в зависимост от взаимодействието между рецепторите, концентарцията на ЕТ-1, а също и от условията на заобикалящата микросреда.

Въз основа на гореизложеното се стига до заключението, че в нормални физиологични условия ET_BP предизвиква вазоконстрикция на аферентните артериоли и вазодилатация на еферентните артериоли.

Микропункционни проучвания с антагонисти на ЕТ-1 потвърждават, че бъбречната микроциркулацията е под влиянието на ендогенния ЕТ-1. Инфузия с бозентан, двоен антагонист на ET_AP/ET_BP, намалява леко АН и много по-изразено гломерулното капилярно налягане [Qiu C et al, 1995]. При същите условия, селективното блокиране на ET_AP не оказва ефект върху средното артериално налягане (САН) и гломерулната хемодинамика. Тези резултати дават възможност да се предположи, че ендогенният ЕТ упражнява тоничен вазодилатиращ ефект върху бъбречната микроциркулация, който се опосредства от ET_BP и се модулира от NO и други вазоактивни медиатори като тромбоксан, катехоламини или Ang II [Chou SY and Porush JG, 1995; Qiu C et al, 1995].

1.2.3.1.2. Ефекти на ЕТ върху медуларния бъбречен кръвоток

ЕТ оказва силно съдосвиващо действие върху изолирани от плъх низходящи vasa recta [Pallone TL et al, 2003]. Съобщава се също, че ЕТ увеличава медуларния кръвоток в заешки бъбрек *in vivo*, като в същото време намалява цялостния бъбречен и кортикален кръвен ток [Evans R et al, 2001]. Антагонизмът на ET_AP намалява АН, но повишава кортикалния и медуларния кръвоток. Инхибирането на ET_BP повишава АН, намалява общия и кортикалния бъбречен кръвоток и не оказва съществен ефект върху медуларния кръвоток.

Това потвърждава, че ET_BP е важен регулатор на ефектите на ЕТ-1 върху медуларния кръвоток, докато ET_AP е по-важен в регулирането на кортикалната микроциркулация.

1.2.3.1.3. Сигнални пътища на ЕТ в бъбречното кръвообращение

Бъбречната микроваскуларна вазоконстрикция е свързана с повишаване на вътреклетъчния калций $[Ca^{2+}]_I$, резултат както от увеличено навлизане на Ca^{2+} в клетките, така и от промени в неговата мобилизация от вътреклетъчните депа [Navar L et al, 2008]. ЕТ бързо увеличава $[Ca^{2+}]_I$ в СГМК като активността на изоформите на ЕТ върху пиковото повишаване на $[Ca^{2+}]_I$ е съответно ЕТ-1> ЕТ-2»ЕТ-3 [Schroeder AC et al, 2000]. Пикът в отговора към действието на ЕТ-1 и ЕТ-2 е последван от по-малко, но трайно платообразно повишаване на $[Ca^{2+}]_I$. Пикът се генерира предимно от Ca^{2+}, мобилизиран от вътреклетъчните депа, докато трайното повишаване на $[Ca^{2+}]_I$ е свързано с навлизането на Ca^{2+} от извънклетъчните пространства. Установено е, че калциевите ET_AP- и ET_BP-стимулирани отговори се потискат от съответните рецепторни антагонисти на ЕТ, а комбинираната ET_AP/ET_BP блокада елиминира тези отговори, демонстрирайки селективна рецепторна зависимост в повишаването на $[Ca^{2+}]_I$ [Fellner SK and Arendshorst WJ, 2004].

Участието на Ca^{2+} в ЕТ-медиираната вазоконстрикция привлича вниманието и върху ефектите на CCBs. Някои автори докладват, че CCBs значително намаляват бъбречната вазоконстрикция предизвикана от ЕТ-1 [Pollock DM et al, 2005], докато други не установяват такъв ефект [Fretschner M et al, 1991]. Тези несъответствия вероятно отразяват различията в използваните *in vivo* и *in vitro* методики.

Освен $[Ca^{2+}]_I$, ЕТ-1 увеличава реактивните кислородни радикали, активира фосфолипаза А2, стимулира образуването на арахидонова киселина, циклооксигеназа и метаболити на цитохром Р450 в тубулните и съдовите бъбречни клетки [Oyekan A et al, 1997], които от своя страна потенцират съдосвиващия му ефект. Инхибирането на циклооксигеназата или цитохром

P450 и дезактивирането на свободните радикали от своя страна намаляват ЕТ-стимулираната вазоконстрикция [Oyekan A et al, 1997; Imig JD, 2000].

1.2.3.2. Синтез и ефекти на ЕТ в гломерулните и мезангиалните клетки

Гломерулните епителни клетки и подоцитите на хора и експериментални животни синтезират ЕТ-1 [Cybulsky AV et al, 1993; Morigi M et al, 2005]. Намерено е, че ET_BP са локализирани в подоцитите на гломерулите на плъхове [Yamamoto T et al, 2002], а ET_AP – в епителни клетки на човешките гломерули [Chen X et al, 1995].

ЕТ-1 предизвиква промени в цитоскелета на гломерулните епителни клетки и на подоцитите, повишава $[Ca^{2+}]_I$ в подоцитите и париеталните клетки, и увеличава пермеабилитета на ГБМ за протеините, което потвърждава вероятната автокринна функция на ЕТ-1 в тези клетки [Morigi M et al, 2006]. Няма директни данни, че модулирането на фунцията на гломерулните епителни клетки води до промени в бъбречния кръвоток и СГФ [Rebibou JM et al, 1992; Marchetti J et al, 1995].

Мезангиалните клетки синтезират ЕТ-1, което се стимулира от самият ЕТ чрез ET_BP [Iwasaki S et al, 1995], Ang II [Ikeda M et al, 1995], тромбоксан А2 [Zoja C et al, 1991], ADH [Ikeda M et al, 1995; Tahara A et al, 2007], тромбин, интерлевкин-1 (IL-1), реактивни кислородни радикали и други [Kohan De et al, 2011 (a)]. В мезангиалните клетки са представени и двата вида рецептори на ЕТ [Herman WH et al, 1998]. Тяхното активиране е свързано с активирането на Ca^{2+}-та сигнална система и продукцията на цикличен гуанозин монофосфат (cGMP) [Owada A et al, 1994]. Интересен факт е, че свързващият капацитет на ЕТ-те рецептори в мезангиалните клетки намалява значително при предварително инкубиране с ЕТ-1 (рецепторна десенсибилизация) [Baldi E and Dunn MJ, 1991].

ЕТ-1 стимулира клетъчната контракция, хипертрофията и пролиферацията на мезангиалните клетки, и натрупването на извънклетъчен

матрикс, най-вече чрез активирането на ET_AP [Takeda M et al, 1992; Sorokin A and Kohan DE, 2003].

1.2.3.3. Синтез на ЕТ и експресия на рецепторите му в отделните тубулни сегменти

Епителните клетки на проксималните каналчета синтезират по-малко количество ЕТ в сравнение с дебелото възходящо рамо на бримката на Хенле и със събирателните каналчета (СК) [Kohan DE, 1991]. По-слаба е и експресията на ET_AP и ET_BP.

В клетките на тънкото низходящо рамо на бримката на Хенле някои автори установяват, а други не, продукция на ЕТ [Pupilli C et al, 1994; Moridaira K et al, 2003]. Дори тези клетки да образуват ЕТ, то това най-вероятно е в много малко количество и неговата биологична роля е неясна.

Противоречиви са данните и за клетките на дебелото възходящо рамо на бримката на Хенле, като и тук някои автори не откриват ЕТ-1 или иРНК [Uchida S et al, 1992; Ujiie K et al, 1992; Bruzzi I et al, 1997], а други установяват минимални концентрации ЕТ-1 [Kohan DE, 1991; Chen M et al, 1993; Herrera M et al, 2005], които вероятно осъществяват своя ефект чрез активиране на ET_BP**.**

Основният източник на ЕТ-1 в бъбреците е вътрешната медуларна част на СК, а тяхната външна медуларна част е на второ място [Kohan DE, 1991; Ujiie K et al, 1992; Uchida S et al, 1992; Chen M et al, 1993; Kohan DE, 1993; Chen M et al, 1993; Herman WH et al, 1998]. Двете медуларни части на СК имат най-голямо съдържание на ECE-1 [Pupilli C et al, 1997]. Така, бъбречната медула има най-високи нива на ЕТ-1 в човешкото тяло [Kitamura K et al, 1989; Simonson MS, 1993]. Най-представени в СК са ET_BP, с най-изразена експресия във вътрешната медуларна част [Kohan DE and Padilla E, 1992; Karet FE et al, 1993; Wendel M et al, 2006]. По-голяма част от рецепторите на ЕТ се експресират по базолатералната стена на клетките на СК, което подкрепя концепцията за автокринната роля на ЕТ-1 [Uchida S et al, 1991; Kohan DE and Padilla E, 1992].

1.2.3.4. Роля на ЕТ в регулацията на водния транспорт

Регулирането на водния транспорт в бъбреците е най-сложният физиологичен махнизъм с участието на ЕТ-1. Установено е, че ЕТ увеличава екскрецията на вода, дори приложен в дози, които намаляват бъбречният кръвоток [Schnermann J et al,1992; Rossi NF, 1993]. Селективните агонисти на ET_BP също увеличават отделянето на урина, въпреки че тълкуването на резултатите се затруднява от техния вазодилатиращ ефект върху бъбречните съдове [Clavell AL et al, 1995; Matsuo G et al,1997]. От своя страна, високият прием на вода увеличава продукцията и екскрецията на ЕТ-1, който инхибира водната реабсорбция и оказва диуретичен ефект [Kohan DE and Padilla E, 1993; Worgall S et al, 1994; Kohan D, 1997]. В експериментални модели е показано, че липсата на ЕТ-1 в СК увеличава чувствителността към ADH и се стига до извода че ЕТ-1, образуван в СК, действа като физиологичен инхибитор на водната реабсорбция индуцирана от ADH, вероятно чрез повлияване на ET_BP [Ge Y et al, 2005].

1.2.3.5. Роля на ЕТ в регулацията на транспорта на натрий

Високият прием на натрий увеличава продукцията на ЕТ-1, който активира ET_BP и чрез различни механизми намалява активността и общия брой на отворените епителни натриеви каналчета, инхибира натриево-калиевата аденозин-трифосфатаза (Na^+/K^+-ATP) в проксималните каналчета, потиска образуването на ренин от ЮГА, увеличава продукцията на NO, който от своя страна инхибира транспорта на Cl^-. Всичко това води до стимулиране на натриурезата в отговор на повишения солеви прием [Kopp UC et al, 1984; Kohan DE, 2011].

1.2.3.6. Роля на ЕТ в регулацията на алкално-киселинното равновесие

Киселата среда, типично индуцирана от съвременните преработени и консервирани храни, стимулира образуването на ЕТ-1, който потенцира екскрецията на H^+ [Remer T, 2001; Licht C et al, 2004]. В проксималното извито каналче ЕТ-1 увеличава активността на Na^+/H^+ транспортер тип 3 чрез ET_BP

[Laghmani K et al, 2002], а в дисталния нефрон той стимулира секрецията на протони и реабсорбцията на бикарбонати [Weiner ID et al, 1999]. Освен в регулацията на алкално-киселинното равновесие при нормални условия, ET-1 вероятно допринася за ацидозата, свързана с прогресията на ХБН [Kohan DE, 2011].

1.2.4. Ендотелин и системата ренин-ангиотензин

1.2.4.1. Ендотелин и ренин

Има данни, че ET-1 инхибира освобождаването на ренин от ЮГА чрез Ca^{2+}-зависим механизъм [Takagi M et al, 1988; Otsuka A et al, 1989] или чрез модулиращото влияние на NO [Markova P et al, 2007]. Предполага се, че ендогенният ET-1, стимулиран от висок прием на сол, намалява отделянето на ренин, стимулирано от други фактори като изопротеренол, повишена симпатикова активност и цикличен аденозин монофосфат (cAMP), вероятно чрез ET_BP-зависимо освобождаване на NO [Kurtz A et al, 1991; Ritthaler T et al, 1995; Kohan DE et al, 2011 (a)]. Тази хипотеза се подкрепя от експериментални и клинични проучвания, които установяват повишена активност на плазмения ренин при дълготрайна блокада на рецепторите на ET [Schricker K et al, 1995; Krum H et al, 1998].

1.2.4.2. Ендотелин и ангиотензин II

Ендотелинът и Ang II са малки вазоактивни пептиди, които имат много общи характеристики. Те активират G-протеин свързани рецептори, водят до силна вазоконстрикция и действието им се модулира от промените в приема на сол. Между тях има и директни взаимодействия. Например, Ang II стимулира образуването и освобождаването на ET-1 [Resink TJ et al, 1990; Imai T et al, 1992; Ito H et al, 1993]. За отбелязване е, че съдосвиващият ефект, предизвикан от Ang II е много по-бърз и по-кратък от този на ET-1. От своя страна, ET-1 също потенцира хипертензивния ефект на хронично повишения Ang II, потвърдено от факта, че антагонистите на ET намаляват вазоконстрикторния

ефект на Ang II и понижават АН [Chen L et al, 1995; Balakrishnan SM et al, 1996; d'Uscio LV et al, 1997].

1.2.5. Бъбречен ЕТ и артериална хипертензия

Силният съдосвиващ ефект определя ЕТ като важен фактор в патогенезата на АХ [Iglarz M and Schiffrin EL, 2003]. Неговата роля обаче се усложнява от противоположните ефекти при активирането на ET_AP и ET_BP и от факта, че той функционира като автокринен и паракринен медиатор. Скоро след синтезирането на селективните антагонисти на ET_AP и на двойните антагонисти на ET_A и ET_BP става ясно, че хипотензивният им ефект се наблюдава само в сол-сензитивни експериментални модели [Iglarz M and Schiffrin EL, 2003].

Фармакологичното блокиране на ET_BP или генетична мутация на ET_BP увеличават ендогенния ЕТ-1, който активира ET_AP и повишава АН дори и при животни на диета с нормален прием на сол [Gariepy CE et al, 2000]. Повишеното АН може да се понижи с антагонист на ET_AP. Тези данни водят до предположението, че нормалната функция на ET_BP е да предотвратява ET_AP-зависимото повишаване на АН.

Трудно е оценяването на ролята на интраренално образувния ЕТ-1 в патогенезата на АХ. При АХ нивото на ЕТ-1 или експресията на ЕТ рецептори може да са повишени, но това може да се дискутира и като опит на ЕТ да стимулира ET_BP за да увеличи екскрецията на натрий и на вода и по този начин да понижи АН. От друга страна, увеличената активност на ET_AP при АХ може да намали бъбречния кръвоток и СГФ, и да доведе до задържане на течности, потенцирайки хипертензивното състояние.

При хора с АХ плазменото ниво на ЕТ-1 може да е повишено или да бъде непроменено [Allen SW et al, 1993; Hoffman A et al, 1994]. Не е известно дали повишеното ниво на ЕТ-1 е резултат от увеличено производство или е последица от намален клирънс на пептида. Разнообразието в данните отразява генетичната хетерогенност на населението, нивото на приетата сол с храната,

степента на стрес при вземането на кръв, както и редица други фактори. Плазменият ЕТ-1 е по-висок при афро-американците, в сравнение със съответното по възраст население на бялата раса [Ergul S et al, 1996]. Не е ясно дали това е свързано с факта, че афро-американците имат по-висока честота на сол-сензитивната хипертензия [Harshfield GA et al, 1991].

Както селективните ET_AP, така и двойните ET_AP/ET_BP антагонисти, могат да намалят АН при много от хипертензивните пациенти [Dhaun N et al, 2008]. Тяхната употреба е официално одобрена за лечение на пулмонална хипертония. Първата синтезирана от този клас молекула е Бозентан, двоен ET_AP/ ET_BP антагонист.

1.2.6. Роля на ЕТ в диабетната нефропатия

Диабетната нефропатия е интересна мишена в блокадата на ЕТ-те ефекти поради няколко причини. Първо, синтезът и ефектите на ЕТ-1 се повишават в условията на хипергликемия, хиперинсулинемия и гломерулна хипертония [Takahashi K et al, 1990; Lee TJ et al,1994; De Mattia G et al, 1998; Benz K and Amann K, 2011]. Второ, в засегнатите участъци като микроциркулация, мезангиални клетки и подоцити, се откриват аномалии в системата на ЕТ [Barton M, 2010]. Трето, свръхактивният ЕТ-1 води до загуба на подоцити и стимулира процесите на възпаление, пролиферация, фиброза и гломерулосклероза [Benz K and Amann K, 2011; Lenoir O et al, 2014].

1.2.6.1. Експериментални проучвания

Съществуват данни, че антагонистите на рецепторите на ЕТ подобряват експерименталната ДН [Hocher B et al, 2001; Saleh MA et al, 2011]. Интерес представлява скорошно проучване върху нови мутантни мишки с индуцирана специфична двойна делеция на ET_AP и ET_BP в подоцитите, което не само доказва, че тези мишки са защитени срещу диабет-индуцираната загуба на подоцитите и придружаващата гломерулосклероза, но също така предоставя доказателства, че ET_BP играе вероятно точно такава важна роля в патогенезата на ДН, каквато има и ET_AP [Lenoir O et al, 2014]. Тези данни поставят под

съмнение широко разпространеното схващане, че увреждащото действие на ЕТ при диабет се дължи само на активирането на ET_AP. В действителност, активирането на ET_BP води до увеличаване на $[Ca^{2+}]_I$ и стимулиране на сигналните пътища на NF-κB и на β-катенина, аналогично на активирането на ET_AP. Тъй като функцията на ET_BP в подоцитите на мишки с диабет е нарушена в по-голяма степен в сравнение с тази на ET_AP, може да се направи извода за значителния количествен принос на увреждащото действие на ET_BP. Това е и първото изследване, което изказва предположението за важната роля на ко-сигнализацията на ЕТ-те рецептори за функцията на подоцитите и за тяхното увреждане при ЗД. Резултатите показват, че може би двойната блокада на ET_AP и ET_BP е необходима за постигне на максимален терапевтичен ефект при ДН. Това е много важно, защото се поставя под въпрос стратегията на клиничните изследвания, насочени само към антагонизма на ET_AP, с цел да се избегнат НЛР, свързани с антагонизма на ET_BP. Резултатите на Lenoir и сътрудници са интересни и поради факта, че определят нарушенията в сигналните пътища на ЕТ в подоцитите като един от основните фактори в патогенезата на ДН. Това фокусира вниманието към антагонизма на ефектите на ЕТ като терапевтичен подход за намаляване на протеинурията и прогресията на ДН.

1.2.6.2. Клинични проучвания

Съвсем наскоро е установено, че антагонистите на рецепторите на ЕТ намаляват протеинурията при диабетна и недиабетна ХБН [Kohan DE and Pollock DM, 2013]. Проучването ASCEND (A Randomised, Double Blind, Placebo Controlled, Parallel Group Study to Assess the Effect of the Endothelin Receptor Antagonist Avosentan on Time to Doubling of Serum Creatinine, End Stage Renal Disease or Death in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Diabetic Nephropathy) обхваща 1392 пациенти и оценява ефекта на авосентан, антагонист на ET_AP, върху времето за удвояване на серумния креатинин, достигане до ТБН или смърт при пациенти със ЗД-2 и ДН [Mann JF et al, 2010].

Авосентан успява да намали протеинурията с почти 50%, факт, който е наблюдаван в по-малки предишни изследвания [Kohan DE and Pollock DM, 2013]. Въпреки това, проучването ASCEND е прекратено преждевременно, поради високата честота на сериозни НЛР, като оток и сърдечна недостатъчност, свързани с приложението на авосентан, което подлага на съмнение неговата полза [Kohan DE et al, 2011 (б); Kohan DE et al, 2012]. Тези НЛР не са изненада поради сложността на системата на ЕТ, свързана не само с повсеместното ѝ разпространение в човешкото тяло, но също така и с различните доза-зависими ефекти на ЕТ-1, модулирани от множество растежни фактори, NO и цитокини. Освен това е установено, че при блокадата на ЕТ-те рецептори някои пациенти са по-склонни към НЛР, в сравнение с други пациенти [Kohan DE et al, 2012].

В друго скорошно многоцентрово, интернационално проучване de Zeeuw и сътрудници, изследват ефикасността (намаляване на албуминурията) и профила полза/риск на атрасентан (селективен антагонист на ET_AP), комбиниран с инхибитор на RAS [de Zeeuw D et al, 2014]. То е продължение на предишно изследване, изучаващо ефекта доза-отговор на атрасентан, в което добавянето на това лекарство към инхибитор на RAS намалява албуминурията без да увеличава НЛР, свързани с отоци [Kohan et al, 2011]. Проучването на de Zeeuw и сътрудници, потвърждава ефективността на атрасентан в голяма група пациенти и освен това изучава възможните механизми, свързани с появата на НЛР. Първо, те внимателно подбират пациентите като изключват от участие тези, за които има данни за водно-електролитни нарушения и задържане на течности или са предразположени към такива поради някава обективна причина. От друга страна, те използват селективния антагонист на ET_AP, атрасентан, при който би трябвало да е запазено благоприятното действие на ET_BP върху водно-солевия баланс. На трето място, те прилагат най-ниската доза атрасентан, която понижава екскрецията на албумина и има благоприятен профил по отношение на НЛР. Това проучване се счита за важен успех поради

факта, че то определя безопасната и ефективна доза атрасентан, която ще се използва в бъдещи клинични изследвания. Въпреки, че тези резултати са стъпка напред в изучаването на системата на ЕТ, трябва да се работи още много, особено като се имат предвид данните на Lenoir и сътрудници, които предполагат, че блокирането на ET_BP също е необходимо за постигане на максимален ефект от антагонизма на ЕТ-те рецепторите [Lenoir O et al, 2014]. Изследванията на Lenoir и на de Zeeuw, и на техните сътрудници, отразяват тенденцията за насърчаване на бързото внедряване на основни научни открития в клинично значими стратегии, т.нар. концепция за транслиращи изследвания в медицината (translational research), която се наблюдава в Съединените щати [Rubio DM et al, 2010; Platt LD et al, 2010]. Транслиращите изследвания се опитват да скъсят времето за преминаване на фундаменталните открития в клиничната практика. Фундаменталните изследвания доставят основни резултати, които трябва да бъдат "преведени" в практическа полза, но също дават и информация, необходима за разработване на стратегии за преодоляване на НЛР. Тази концепция е стимул и за настоящото клинично проучване (в ход) Study Of Diabetic Nephropathy with Atrasentan (SONAR), което изследва ефикасността на атрасентан в предотвратяване прогресията на ДН [Fernandez-Fernandez B et al, 2014].

Явно, за да се разбере потенциалната терапевтична роля на антагонистите на рецепторите на ЕТ-1 трябва да продължи изучаването на основните им механизми на действие, на механизмите, чрез които тези молекули водят до НЛР и механизмите, чрез които НЛР биха могли да бъдат ограничени. Това ще подобри профила полза/риск на лекарствата повлияващи системата на ЕТ и ще помогне за създаването на нови стратегии за лечение на ДН.

1.3. Натриуретични пептиди

През 1981 година de Bold AJ и сътр. забелязват, че при инжектирането на екстракт от предсърдна тъкан, но не и от камерна тъкан, върху експериментални животни се наблюдава засилване на натриурезата [de Bold AJ et al, 1981]. Това води до откриване на предсърдния натриуретичен пептид (ANP - atrial natriuretic peptide) и до установяване на ендокринната функция на сърцето [de Bold AJ et al, 1985]. По-късно при човека се откриват и други NP – B-тип натриуретичен пептид (BNP – brain natriuretic peptide) и C-тип натриуретичен пептид (CNP), които освен натриуретична, притежават също диуретична и вазодилатираща активност [Kangawa K and Matsuo H, 1984].

Оттогава, вече повече от 30 години, семейството на NP е обект на научно-изследователски и клиничен интерес поради благоприятните физиологични ефекти върху сърдечната и отделителната системи.

1.3.1. Структура, синтез, катаболизъм, рецептори и механизъм на действие

Предсърдният натриуретичен пептид е изграден от 28 аминокиселини. В центъра на молекулата, чрез дисулфиден мост между два цистеинови остатъка в позиции 7 и 23, е формиран пръстен от 17 аминокиселини. Пръстенът е общ за ANP, BNP и CNP.

Генът на ANP има 3 екзони и 2 интрона. Той кодира препро-ANP, съдържащ 151-аминокиселини, от който при отцепването на 25 аминокиселини от N-край се получава про-ANP (126 аминокиселини). Под влиянието на корин, една мембраносвързана серин протеаза, се получава крайният ANP, който всъщност е изграден от последните 28-аминокиселини на C-край на про-ANP. Последните два фрагмента циркулират в плазмата и тяхната концентрация се повишава при увеличаване на вътресъдовия обем, например при ХСН. Има данни, че фрагментът от N-край също притежава биологична активност, подобна на тази на ANP [Vesely D et al, 1994]. ANP се синтезира главно от предсърдията и по-малко от камерите на едно нормално сърце, докато

камерите на хипертрофиралото сърце демонстрират увеличена продукция на ANP [Saito Y et al, 1989]. Генът на ANP е представен и в бъбреците, определя образуването на пептид, уродилатин, който е изграден от 32 аминокиселини [Schulz-Knappe P et al, 1988].

Човешкият про-BNP е изграден от 108 аминокиселини. BNP се образува главно във вентрикулните миоцити и фибробласти, и съдържа 32 аминокиселини [Levin ER et al, 1998; Potter LR et al, 2009]. Концентрацията и на двата фрагмента е висока при пациенти с миокардна хипертрофия и ХСН.

Третият член от фамилията на NP, CNP, има два представителя, които се получават от общ про-CNP. Първият пептид е изграден от 22 аминокиселини и се съдържа в С-край на втория пептид, който се състои от 53 аминокиселини. Първият пептид преобладава в ЦНС, най-вече в предния дял на хипофизата, в бъбреците и в ендотелните клетки на съдовете. Той е по-активен в сравнение с втория пептид [Levin ER et al, 1998; Potter LR et al, 2009].

Синтезирането на NP се стимулира от:

- разтягане на предсърдията в резултат на повишен сърдечен обем и при увеличен стрес на миокардната стена [Levin ER et al, 1998]
- повишена активност на симпатиковата нервна система
- ангиотензин II
- ендотелин
- вазопресин
- ограничаване на калорийния внос [Dessì-Fulgheri P et al, 1998]

Натриуретичните пептиди се елиминират по два начина:

- Чрез свързване с клирънсовия рецептор NPR_C, с последващо интернализиране и разграждане в клетката [Levin ER et al, 1998]
- Чрез разграждане от мембраносвързана NEP, наричана още неприлизин. Този ензим е широко разпространен в бъбреците, белия дроб, червата, мозъка и сърцето. Интересно е, че NEP разгражда също и

вазоконстрикторите ET-1 и Ang II, които противодействат на вазодилатиращия ефект на NP [Sagnella GA, 2001; D'Orleans-Juste P et al, 2003].

Досега са идентифицирани три мембранни рецептори на NP - NPR_A, NPR_B и NPR_C. NPR_A е представен в големите кръвоносни съдове, където има също и NPR_B, макар и в по-малко количество. NPR_B доминира в мозъка. И двата рецептора се намират в надбъбречните жлези и в бъбреците. Те имат подобна структура, активират гуанилат циклазата и увеличават вътреклетъчния cGMP. Той активира cGMP-зависимата протеинкиназа, която от своя страна фосфорилира белтъчните вериги в определени серинови и треонинови участъци, водещо до медииране на много от сърдечно-съдовите и бъбречните функции в човека. Третият рецептор, NPR_C, е отговорен за клирънса и дезактивирането на NP. Активността на ANP и BNP се опосредства главно чрез NPR_A, а тази на CNP главно чрез NPR_B. Всички NP се свързват с NPR_C [Levin ER et al, 1998; Potter LR et al, 2009].

1.3.2. Основни физиологични ефекти

1.3.2.1. Бъбреци

В бъбреците ANP води до:

- дилатация на аферентните и вазоконстрикция на еферентните артериоли на гломерулите, увеличаване на бъбречния кръвоток, повишаване на вътрегломерулното капилярно налягане, релаксиране на мезангиалните клетки и увеличаване на ефективната площ за филтрация [Levin ER et al, 1998; Marin-Grez M et al, 1986]
- повишена екскреция на натрий с урината, поради намаляване на неговата реабсорбция в дисталните извити каналчета и в кортикалната част на СК на нефрона [Dillingham MA and Anderson RJ, 1986; Goetz KL, 1988]
- повишено отделяне на вода, поради ограничаване на действието на ADH в кортикалната част на СК [Goetz KL, 1988]
- Потискане секрецията на ренин и инхибиране на RAS [Wijeyaratne CN and Moult PJA, 1993]

- Уродилатин, единствен NP произведен в бъбреците, стимулира диурезата и натриурезата в дози, дори по-ниски от дозите на ANP [Saxenhofer H et al, 1990]. Изглежда също, че той е по-устойчив на инактивиращото действие на ендопептидазата, което го прави потенциален терапевтичен таргет

1.3.2.2. Сърце и кръвоносни съдове

В сърцето и кръвоносните съдове ANP води до:

- Релаксиране на гладката мускулатура на артериолите и венулите поради повишаване на cGMP и инхибиране действието на катехоламините. Вазодилатиращият ефект не зависи от целостта на ендотела .

- Намаляване на преднатоварването на сърцето, подобряване на миокардния кръвоток и подобряване на сърдечната функция

- Потискане хипертрофията на сърдечния мускул [Levin ER et al, 1998]

- Понижаване прага на активиране на вагалните рефлекси и потискане рефлекторната тахикардия и вазоконстрикция, които съпътстват намаляването на преднатоварването [Schultz HD et al, 1988]

Показано е, че мишки, лишени от NPR_A, развиват тежка кардио-фиброза и умират [Kong X et al, 2007]

1.3.2.3. Централна нервна система

И трите NP се синтезират в ЦНС, макар и в различно количество, като в най-голяма степен е представен CNP [Levin ER et al, 1998]. Установено е, че ET-1, ADH, норадреналин (но не и Ang II), стимулиртат освобождаването на ANP от клетъчна култура на хипоталамусни неврони [Levin ER et al, 1991; Huang W et al, 1992; Levin ER et al, 1992]. Въпреки, че NP не преминават хематоенцефалната бариера, те достигат местата лишени от такава, където:

- Инхибират освобождаването на ADH от хипофизата, а според някои автори и на адренокортикотропния хормон [Samson WK, 1992]

- Намаляват симпатиковия тонус [Schultz HD et al, 1988; Yang RH et al, 1992]

- Ограничават приемането на сол и вода по централен път, което потенцира периферния натриуретичен и диуретичен ефект. Това показва, че при контролирането на водно-електролитното равновесие, съществува координация между централните и периферните механизми на действие на NP

1.3.2.4. Мастна тъкан

ANP активира NPR_A в мембраната на адипоцитите, увеличава вътреклетъчната концентрация на cGMP, който индуцира фосфорилирането на хормон-чувствителната липаза и увеличава освобождаването на мастни киселини [Dessì-Fulgheri P et al, 1998].

Крайният ефект, до който водят NP, е повишаване екскрецията на натрий и вода, намаляване на вътресъдовия обем, понижаване на АН, повишаване на липолизата. Активността им се свързва с кардиопротективно, антифибротично, антихипертрофично, антимитогенно, антиинфламаторно и клетъчно протективно действие. Като цяло, натриуретичната пептидна система е неврохормонална система, която противодейства на системата ренин-ангиотензин алдостерон и на симпатиковата нервна система, и играе компенсаторна роля в случаите на обемно обременяване, АХ и значима вазоконстрикция [Levin ER et al, 1998].

1.3.3. Други натриуретични пептиди

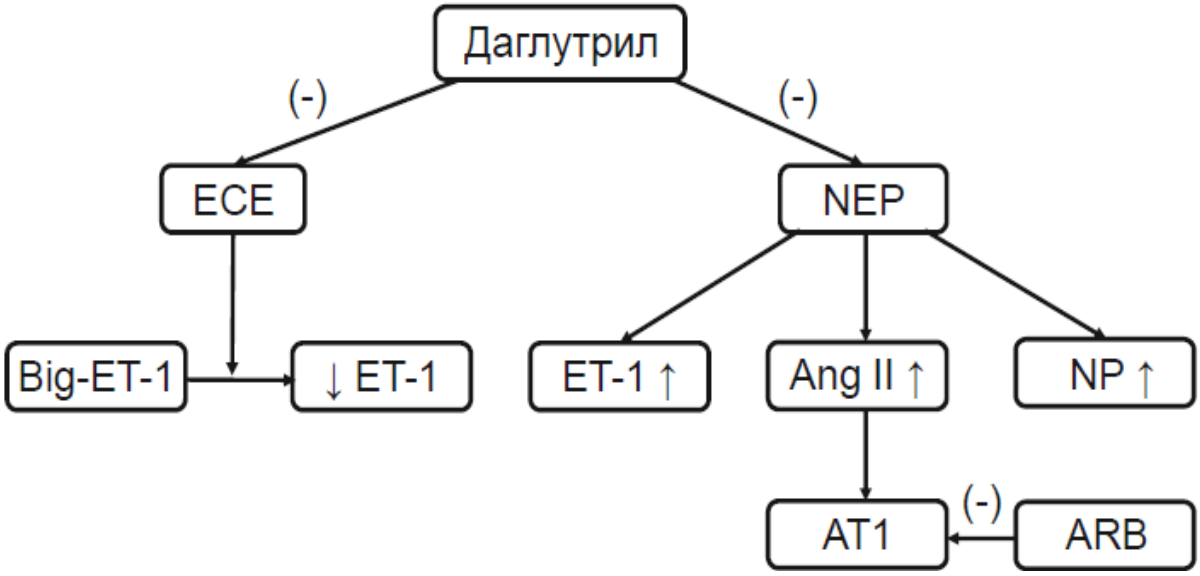
Други подоби пептиди в човека са гуанилин и урогуанилин (15 и 16 аминокиселини, съответно), които се образуват главно в стомашно-чревната лигавица и участват в локалната регулация на водно-солевия транспорт [Greenberg RN et al, 1997]. Освен при бозайниците са описани още натриуретичен пептид от сьомга [Tervonen V et al, 1998] и Dendroaspis натриуретичен пептид (DNP) в отровата на източната зелена мамба (Dendroaspis angusticeps) [Schweitz H et al, 1992]. Установява се, че те имат подобна структура и свойства.

1.3.4. Възможности за клинично приложение

Повишаването на нивото и активността на NP е таргет при лечението на ХСН повече от две десетилетия. Пероралното приемане на тези пептиди е неефективно, а дълготрайното парентерално приложение е неудобно. Това води до разработването на алтернативен подход за увеличаване на тяхната концентрация и удължаване на действието им, чрез инхибиране на ензима, който ги разгражда. Така, във фаза на активно проучване се намират инхибиторите на NEP [Rubattu S et al, 2008].

Привлекателна е и стратегията, при която се търси да се извлече максимална полза от инхибирането на два или повече ензими [Tikkanen I et al, 2002]. Лекарствата, които инхибиторат едновременно ACE и NEP или ECE и NEP се наричат вазопептидазни инхибитори. От първоначално разработените молекули (екадотрил, кандоксатрил, омапатрилат), които инхибиторат едновременно ACE и NEP, най-много клинични данни има за омапатрилат. Той е изследван при пациенти с АХ и ХСН, но въпреки доказания антихипертензивен ефект, приложението му остава проблемно във връзка с високата честота на случаите с ангиоедем [Dawson A and Struthers AD, 2002]. Този сериозен страничен ефект се получава поради това, че едновременното инхибиране на ACE и NEP води до увеличаване на брадикинина, който директно или индиректно може да причини ангиоедем, а също и поради факта, че омапатрилат инхибира и трети ензим, метаболизиращ брадикинина – аминопептидаза P [Messerli FH and Nussberger J, 2000].

Работи се и върху лекарствени молекули, които инхибират едновременно NEP и ECE, ензимът, потенциращ образуването на мощния вазоконстриктор ET-1 **(Фигура 5)**. Очаква се, че тази комбинация ще има предимство пред лекарствата, които потискат само единия от ензимите, защото:



Фигура 5. Основание за комбинирано инхибиране на ECE и NEP на фона на блокирането на AT1 с ARB.

1. Тя ще потенцира вазодилатиращото, антиинфламаторното, антихипертрофичното, антифибротичното и антимитогенното действие на NP и ще ограничи вазоконстрикторното, проинфламаторното и профибротичното действие на ET-1.

2. Потенцирането на натриурезата чрез блокиране на NEP, ще помогне да се избегне основния страничен ефект, който се наблюдава при приложението на неселктивните антагонисти на ET-те рецептори, а именно задържането на натрий и течности.

3. Тъй като NEP разгражда също ET-1 и Ang II [Sagnella GA, 2001], нейното самостоятелно инхибиране може да потенцира ефектите на тези вазоконстриктори, а те от своя страна биха могли да ограничат вазодилатиращото действие на NP. Комбинираното NEP/ECE инхибиране преодолява вазоконстрикторния ефект на ET-1, но не и на Ang II. От тук се оформя и хипотезата, че комбинираното инхибиране на NEP и ECE би могло да бъде още по-ефективно при ограничаване активността на Ang II чрез блокиране на AT1 с ARB.

Експериментални и клинични изследвания показват, че подходът с двойното инхибиране на NEP и ECE е ефективен и има благоприятен ефект

при лечението на АХ, белодробна хипертония и ХСН, както върху тежестта на клиничната картина, така и върху ремоделирането на съдовете и сърдечния мускул [Dawson A and Struthers AD, 2002; Tabrizchi R, 2003].

Тъй като ET-1 и NP участват в регулацията на основните бъбречни функции, комбинираното NEP/ECE инхибиране би могло да има приложение и при лечението на ДН. Една от малкото синтезирани молекули, които достигат до клинични изследвания е даглутрил (SLV306), продукт на Solvay Pharmaceuticals **(Фигура 5)**. Основният ѝ метаболит, KC12615, е мощен инхибитор на NEP и ECE. В експериментални модели на АХ и в клинични проучвания при здрави доброволци, при пациенти с ХСН или с есенциална хипертония е доказано, че даглутрил ефективно намалява АН, не причинява сериозни и необратими НЛР, и че приложението му е безопасно [Tabrizchi R, 2003; Dickstein K et al, 2004]. По отношение на ДН е докладвано, че даглутрил, подобно на ACE-инхибиторите, намалява екскрецията на протеините и албумина в урината на плъхове с експериментално предизвикана ДН, ефект който е независим от понижаването на АН [Thöne-Reinke C et al, 2004]. Паралелно на този резултат, хистологичното изследване потвърждава, че новата малекула почти напълно предотвратява развитието на интерстициална фиброза в бъбреците на експерименталните животни.

1.4. Изводи от литературния обзор

Диабетната нефропатия е широко разпространена в целия свят. Тя продължава да влошава качеството на живот на болните от ЗД и да увеличава сърдечно-съдовата заболеваемост и смъртност. Въпросите за профилактиката и лечението на ДН са от първостепенна важност за клиничната практика и научния свят.

Микроалбуминурията е първият клиничен белег на ДН [Viberti GC et al, 1982; Mogensen CE, 1984]. Предотвратяването на появата ѝ (първична превенция) и забавянето на нейната прогресия до макроалбуминурия (вторична превенция) са основен таргет в ренопротективните стратегии [De Zeeuw D, 2004].

В многофакторната патогенеза на ДН участват редица хемодинамични, метаболитни и хуморални фактори, които се намират в сложни взаимодействия помежду си. От тях, ключова роля имат патологично активираните RAS и системата на ендотелина. Инхибирането на тези системи е основен подход в лечението на ДН.

Какво е установено при пациентите със ЗД-2 по отношение прогресията на:

А. Микроалбуминурия → макроалбуминурия

1. Потискането на RAS, чрез инхибиране на ACE или блокиране на рецепторите на Ang II, успешно забавя прогресията на микроалбуминурията до макроалбуминурия [Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators, 2000; Parving HH et al, 2001].

2. Блокирането на бавните L-тип потенциал-зависими калциеви канали, също може да забави тази прогресия и може да потенцира ефекта, получен при инхибирането на ACE [Bakris GL and Williams B, 1995; Bakris GL et al, 1996; Bakris GL et al, 1998].

Б. Макроалбуминурия → ТБН

1. Потискането на RAS чрез блокиране на рецепторите на Ang II забавя прогресията на макроалбуминурията до ТБН, но само с 20% [Brenner BM et al, 2001; Lewis EJ et al, 2001].

2. Антагонистите на рецепторите на ЕТ намаляват макроалбуминурията почти с 50%, но високата честота на сериозни НЛР, свързани със задържането на течности, подлага на съмнение тяхната полза [Mann JF et al, 2010; Kohan DE et al, 2012].

Микроалбуминурията освен, че е белег на бъбречно увреждане също е и всепризнат РФ за ССЗ при пациентите със ЗД-2. Тя често рефлектира генерализирана ендотелна дисфункция, която вероятно е в основата на асоциацията ѝ със ССЗ [Mattock MB et al, 1998; Ritz E, 2003]. Дали албуминурията, която е в границите на нормалните стойности (нормоалбуминурия), прогнозира дългосрочен сърдечно-съдов риск и дали инхибирането на АСЕ при тези пациенти води до дългосрочна кардиопротекция не е потвърдено.

При пациентите със ЗД-2 се очертават следните нерешени проблеми:

1. До 2004 г. няма голямо рандомизирано клинично проучване, което да изследва възможността за превенция на микроалбуминурията.

2. Наличните терапии не са достатъчни за забавяне прогресията на микро- и макроалбуминурията до ТБН.

3. Не се знае дали нормоалбуминурията е асоциирана с дългосрочен кардиоваскуларен риск.

4. Не се знае каква е ролята на ранното инхибиране на АСЕ в дългосрочната кардиопротекция.

Възможни подходи за разрешаване на представените проблеми:

1. Подобряване на съществуващите терапевтични стратегии с лекарствата потискащи различни компоненти на RAS, чрез рационални комбинации между тях, от което се очаква по-пълна блокада на патологично активираната система, или чрез комбиниране на инхибиторите на RAS с антихипертензивни лекарства с друг механизъм на действие, което би могло да доведе до адитивен или синергичен нефропротективен ефект.

2. Създаване на нови лекарствени молекули с нови механизми на действие, които повлияват и други фактори, участващи в патогенезата на ДН.

Въз основа на гореизложените данни са формулирани работните хипотези, посочени в раздел 1.5.

1.5. Работни хипотези

I. Диабетна нефропатия, профилактика и лечение

При хипертензивни пациенти със ЗД-2:

1. Инхибирането на ACE, самостоятелно или в комбинация с блокирането на бавните L-тип потенциал-зависими калциеви канали може да предотврати или да забави появата на микроалбуминурия.

2. Комбинираното инхибиране на ACE и на бавните L-тип потенциал-зависими калциеви канали може допълнително да забави прогресията на микроалбуминурията до макроалбуминурия, в сравнение със самостоятелното инхибиране на ACE и да ограничи асоциираните с нея сърдечно-съдови заболявания.

3. Комбинираното инхибиране на ECE и NEP на фона на антагонизма на рецепторите на Ang II може да намали микро- и макроалбуминурията.

II. Нормоалбуминурия, кардиоваскуларен риск, инхибиране на ACE

При хипертензивни пациенти със ЗД-2:

1. Нормоалбуминурията е асоциирана с повишен дългосрочен сърдечно-съдов риск.

2. Ранното инхибиране на ACE намалява риска от сърдечно-съдови заболявания в дългосрочен план.

ВТОРА ГЛАВА

ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛИ

I. Диабетна нефропатия, профилактика и лечение

При хипертензивни пациенти със ЗД-2, с или без ДН, да се изследва:

1. Участието на RAS в патогенезата на микроалбуминурията и ролята на инхибирането на ACE, самостоятелно или в комбинация с блокирането на бавните L-тип потенциал-зависими калциеви канали в профилактиката и лечението на микроалбуминурията и асоциираните сърдечно-съдови заболявания.
2. Участието на ET-1 и NP в патогенезата на микро- и макроалбуминурията и ролята на комбинираното инхибиране на ECE и NEP на фона на антагонизма на рецепторите на ангиотензин II в лечението на микро- и макроалбуминурията.

II. Нормоалбуминурия, кардиоваскуларен риск, инхибиране на ACE

При хипертензивни пациенти със ЗД-2 и нормоалбуминурия да се изследва:

1. Дали нормоалбуминурията прогнозира дългосрочен сърдечно-съдов риск.
2. Дали инхибирането на ACE при тези пациенти води до дългосрочна кардиопротекция.

ЗАДАЧИ

I. Диабетна нефропатия, профилактика и лечение

При хипертензивни пациенти със ЗД-2 да се изследва:

1. Ефекта на инхибитора на АСЕ трандолаприл, приложен самостоятелно или в комбинация с ndCCB верапамил, върху честотата на поява на микроалбуминурия.

2. Дали добавянето на ndCCB верапамил към АСЕ-инхибитора трандолаприл може:

а) допълнително да забави прогресията на микроалбуминурията до макроалбуминурия

б) да потенцира регресията на микроалбуминурията до нормоалбуминурия

в) допълнително да ограничи сърдечно-съдовите заболявания

3. Ефектите на комбинирания ECE/NEP инхибитор, даглутрил, на фона на лосартан, върху микро- и макроалбуминурията, артериалното налягане, бъбречната функция и профила на безопасност.

II. Нормоалбуминурия, кардиоваскуларен риск, АСЕ-инхибитори

При хипертензивни пациенти със ЗД-2 и нормоалбуминурия да се изследва:

1. Има ли асоциация между нормоалбуминурията и дългосрочния сърдечно-съдов риск.

2. Ролята на рано започнатата терапия с АСЕ-инхибитора трандолаприл в дългосрочната кардиопротекция.

ТРЕТА ГЛАВА

КОНТИНГЕНТИ И МЕТОДИКИ

Дисертационната разработка представя данни и резултати от две лонгитудинални, рандомизирани, контролирани проучвания, от които едното (BENEDICT) е съставено от две фази (A и B) и от Удължено проучване на фаза A (Extension study).

3.1. BErgamo NEphrologic DIabetes Complications Trial (BENEDICT)

3.1.1. Контингенти

Изследвани са амбулаторни пациенти със ЗД-2 (n=1407), посещаващи Катедрата по Бъбречна медицина при Института за фармакологични изследвания Марио Негри, Вила Камоци, Раника и седем Отделения по Диабетология в Италия.

Критерии за подбор

- ЗД-2 с давност <25 години, критерии на СЗО [Herman WH and Wareham NJ, 1999]
- мъже и жени на възраст ≥40 години
- артериална хипертензия, дефинирана като систолно кръвно налягане (СКН) ≥130 mmHg и диастолно кръвно налягане (ДКН) ≥85 mmHg без антихипертензивна терапия или наличие на съпътстваща антихипертензивна терапия [American Diabetes Association, 1998; The sixth report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure, 1997]
- скорост на екскреция на албумина:

  Фаза A <20 μg/min

  Фаза B ≥20 ≤200 μg/min
- серумен креатинин <1.5 mg/dl (<133 μmol/L)
- гликолизиран хемоглобин (HbA_{1c}) <11%

Критерии за изключване

- клинични и хистологични данни за недиабетни бъбречни заболявания; съдови заболявания на бъбреците; обструктивни уропатии
- остри ССЗ през последните 6 месеца
- ХСН, III-IV клас по NYHA
- системни автоимунни заболявания
- малигнени заболявания
- алергия към ACE-инхибитори и ndCCBs
- клинични противопоказания за прекъсване на терапия с инхибитор на ACE, ndCCB или ARB
- клинични противопоказания за прилагане на ndCCBs (брадикардия, забавено атриовентрикуларно (AV) провеждане, ХСН)

3.1.2. Дизайн на проучването

BENEDICT е многоцентрово, лонгитудинално, рандомизирано, двойно-сляпо с паралелни групи и две фази (А и В) клинично проучване (NCT00235014, държавен регистър на Италия за клинични проучвания). Това е независимо, академично изследване, програмирано, координирано и мониторирано от Института за фармакологични изследвания Марио Негри.

Във фаза А (първична превенция) се изследва дали ACE-инхибиторът трандолаприл, комбиниран с ndCCB верапамил или трандолаприл и верапамил, приложени самостоятелно, могат да намалят честотата на поява на микроалбуминурия (крайна точка, study end point) при хипертензивни пациенти със ЗД-2, нормоалбуминурия и нормална бъбречна функция, в сравнение с плацебо.

Във фаза В (вторична превенция) се изследва дали добавянето на ndCCB верапамил към ACE-инхибитора трандолаприл може допълнително да забави прогресията на микроалбуминурията до макроалбуминурия (основна цел), да потенцира регресията на микроалбуминурията до нормоалбуминурия и

да ограничи ССЗ (вторични цели), при хипертензивни пациенти със ЗД-2, микроалбуминурия и нормална бъбречна функция.

По време на първоначалния преглед се снема пълна анамнеза. Всяка терапия с инхибитори на RAS се преустановява за 6 седмици - период на отмиване (washout) и всяко предишно лечение с ndCCB се спира за триседмичен период на отмиване **(Фигура 6)**.



Фигура 6. Дизайн на проучването BENEDICT (фаза А, фаза В, Удължено проучване).

В края на периода на отмиване пациентите, които са с доказана нормоалбуминурия и отговарят на критериите за участие се рандомизират да получават една от четирите терапии, предвидени от проекта за фаза А, най-малко за три години:

- ВераТран 180/2 mg/ден, фиксирана комбинация от верапамил 180 mg (лекарствена форма с удължено освобождаване) и трандолаприл 2 mg
- трандолаприл 2 mg/ден
- верапамил 240 mg/ден (лекарствена форма с удължено освобождаване)
- плацебо 1 таблетка/ден

Във фаза В участват две категории пациенти: пациенти, които в края на периода на отмиване са с доказана микроалбуминурия и отговарят на критериите за участие, и пациенти, които са развили микроалбуминурия по време на участието им във фаза А. Проектът за фаза В предвижда рандомизация с две терапии, които трябва да продължат най-малко две години:

- ВераТран 180/2 mg/ден, фиксирана комбинация от верапамил 180 mg (лекарствена форма с удължено освобождаване) и трандолаприл 2 mg
- трандолаприл 2 mg/ден

За постигане на таргетната стойност на АН 120/80 mmHg е разрешено да се използват допълнителни антихипертензивни лекарства [BENEDICT Group, 2003]:

- хидрохлоротиазид 25 mg/ден, фуроземид 50 mg/ден
- доксазозин 16 mg/ден, празозин 16 mg/ден, клонидин 0.6 mg/ден
- бета-блокери (разрешени по специфични показания, като исхемична болест на сърцето, но само при отсъствие на брадикардия или забавено AV-провеждане, потвърдено с електрокардиограма (ЕКГ))
- миноксидил 20 mg/ден или дългодействащи dCCBs

Не е разрешено използването на калий-съхраняващи диуретици, инхибитори на RAS и ndCCBs.

По време на проучването пациентите продължават обичайната си антидиабетна терапия и спазват нискокалорична диета. Препоръчаното ниво на HbA_{1c} е <7%. Не се въвеждат ограничения в хранителния режим по отношение приема на сол и протеини.

В момента на рандомизацията и на всеки шест месеца след това се контролират АН, проба на първа сутрешна урина, AER и биохимично изследване на кръв, което включва кръвна захар, HbA_{1c}, липиден профил (тотален серумен холестерол, високо-плътностни липопротеини (HDL), ниско-плътностни липопротеини (LDL) и триглицериди) **(Фигура 6)**. Една седмица, един месец и на всеки три месеца след рандомизацията се извършват

прегледи, в които се контролират АН, проба на първа сутрешна урина и избрани кръвни показатели (кръвна захар, серумен калий, натрий, урея, креатинин). В момента на рандомизацията и във всеки годишен преглед се извършва ЕКГ изследване. При всяка промяна в антихипертензивната терапия и в случаите, когато това е клинично необходимо се осъществява допълнителен контрол на АН, лабораторните показатели и ЕКГ изследване (safety visit). Всички изследвания се извършват и в края на проучването, дефиниран като момента, в който последният рандомизиран пациент завършва тригодишния период на лечение за фаза А, двегодишния период на лечение за фаза В и всеки път, когато някой от пациентите достига крайната точка на проучването (study end point) [BENEDICT Group, 2003].

Нежеланите реакции се кодират с използването на Терминологичната система за класификация на нежеланите реакции на Hoechst. Многократните съобщения за една и съща нежелана реакция се преброяват само веднъж, като се взема предвид най-тежко протеклия случай. Фаталните и нефатални нежелани реакции се отчитат отделно, в съответната терапевтична група, а също и при всички пациенти взети заедно.

Изследването е проведено в съгласие с Директивите на Европейското общество за “Добра Клинична Практика за Клинични Проучвания с Лекарствени Продукти в Европейския Съюз” (EEC) 91/507 и последващите им ревизии, Декларацията от Хелзинки (1964), а също и Законите и Разпоредбите за изследвания с лекарствени препарати в Италия.

Проучването е частично спонсоризирано от Abbott (Ludwigshafen, Germany), като финансирането не е включено в подготвянето на проекта, анализите и интерпретацията на данните.

Всички пациенти дават писмено информирано съгласие за участие в изследването. Клиничният проект е одобрен от Комисията по Етика при Института за фармакологични изследвания Марио Негри, Италия и от Комисиите по Етика към всеки клиничен център, участващ в проучването.

Фармакологична характеристика и основание за изследване на Трандолаприл, Верапамил и тяхната комбинация

Трандолаприлът е представител на АСЕ-инхибиторите, които не съдържат сулфхидрилна група. Той е неактивен прекурсор (pro-drug). Метаболизира се в черния дроб до активен трандолаприлат с бионаличност 40-60%. Пиковата плазмена концентрция се постига между 1–4 час, а до равновесна плазмена концентрация се достига на 4-я ден от започването на терапията. Елиминирането на трандолаприлат от плазмата е бифазно. През първата бърза фаза (~3.5 ч.) се елиминира трандолаприлатът, който е в относителен излишък спрямо АСЕ. Втората фаза е значително удължена, защото останалият трандолаприлат има висок афинитет към АСЕ, с който образува комплекс, характеризиращ се с ниска скорост на дисоциация [Zannad F, 1993]. В плазмата могат да бъдат открити следи от трандолаприлат дори 3 седмици след спиране на терапията. Активността на АСЕ се потиска на 30-та минута след оралното приемане на трандолаприл, пикът на действие е на 6-я час, на 24-я час все още е потисната 80% от активността на ензима. Това осигурява продължителна периферна вазодилатция и трайно 24-часово понижаване на СКН и ДКН [Song JC and White CM, 2002]. Елиминира се главно с урината. Реналният клирънс на трандолаприлат е асоцииран с клирънса на креатинина, поради което при бъбречна недостатъчност дозата на трандолаприл се намалява съобразно креатининовия клирънс. При чернодробна цироза метаболизмът се забавя и плазмената концентрация на неактивния трандолаприл се повишава. Фармакокинетиката на трандолаприл не се влияе от храната. Ефективната антихипертензивна доза, която се използва най-често е 2 mg/ден [De Bruijn JH et al, 1994; Steiner G and Pauly NC, 1994]. Антихипертензивният ефект на трандолаприл е сравним с този на лизиноприл и еналаприл и е по-добър от този на каптоприл [Zannad F, 1993]. Трандолаприл е един от най-липофилните АСЕ-инхибитори. Това гарантира добро тъканно проникване и потискане на локалния АСЕ в бъбреците,

миокарда и ендотелните клетки на кръвоносните съдове, което осигурява освен антихипертензивен също и добър органопротективен ефект [Zannad F, 1993]. Докладвано е, че този АСЕ-инхибитор успешно понижава микроалбуминурията при пациенти със ЗД-2 и АХ [Bauduceau B et al, 1998].

Верапамил е представител на ndCCBs. При орално приложение се резорбира 90% от приложената доза. При еднократно приложение бионаличността му е 20–35% поради интензивен метаболизъм в черния дроб (ефект на първото преминаване), но при многократно приложение бионаличността му се увеличава с още 30% [Schomerus M et al, 1976]. При използването на лекарствената форма с удължено освобождаване пиковата плазмена концентрция се постига на 3–5 ч., плазменият полуживот е 5-7 ч., а до равновесна плазмена концентрация се достига на 3–4 ден от започването на терапията. Свързването с плазмените протеини е до 90%. Елеминира се главно с урината. Фармакокинетиката на верапамил не се влияе от храната, слабо се повлиява при бъбречна недостатъчност. При чернодробна цироза метаболизмът се забавя и плазменият полуживот се удължава. Верапамил освен, че е периферен вазодилататор, който понижава АН, има изразен ефект върху сърдечната дейност, защото потиска синоатриалния и атриовентрикуларния възел и забавя сърдечната честота за разлика от dCCBs, които предизвикват рефлекторна тахикардия. Подобрява също и миокардната перфузия [Ferrari R et al, 1994]. Експериментални данни показват, че верапамил директно потиска синтеза и освобождаването на катехоламини [Kailasam MT et al, 1995], потиска обратната резорбция на натрий и вода в бъбречните тубули, което потенцира антихипертензивния му ефект [Epstein M, 1993]. Препоръчаната дневна доза е от 180 - 240 mg/ден до 240 mg два пъти дневно (http://www.drugs.com/dosage/trandolapril-verapamil.html). Установено е, че ndCCBs като верапамил и дилтиазем, забавят прогресията на ДН [Bakris GL and Williams B, 1995; Bakris GL et al, 1996], като ефектът се дължи на дилатацията на еферентната артериола и намаляването на вътрегломерулното налягане.

Комбинация трандолаприл и верапамил (ВераТран). Трандолаприл и верапамил имат съвместими фармакокинетики, които не се повлияват взаимно дори и при приложението на високи дози (трандолаприл 8 mg и верапамил 240 mg) [Mancia G et al, 1997]. За да се получи съответствие с продължителния 24-часов антихипертензивен ефект на трандолаприл, в комбинацията ВераТран е използван верапамил в лекарствена форма с удължено освобождаване. Фиксираните дози от 180/2 mg в комбинацията ВераТран са избрани заради по-доброто понижаване на АН в сравнение с комбинациите 120/0,5 mg и 180/1 mg и по-добрия профил полза/риск. ВераТран, сравнен с двете лекарства приложени самостоятелно, намалява по-ефективно АН измерено както в лекарския кабинет, така и при 24-часово мониториране [Mancia G et al, 1997]. Антихипертензивната активност на ВераТран не се влияе от приема на натрий, защото АСЕ-инхибиторите са по-ефективни при диета бедна на натрий, а верапамил има по-голяма антихипертензивна активност при диета богата на натрий. Има данни, че комбинираното приложение на трандолаприл и верапамил, при подобно понижаване на АН, намалява албуминурията в по-голяма степен, отколкото двете лекарства, приложени самостоятелно, при хипертензивни пациенти със ЗД-2 и ДН [Bakris GL et al, 1998]. Комбинацията има добър профил полза/риск, честотата на НЛР е подобна на тази при самостоятелното приложение на двете лекарства.

3.1.3. The BENEDICT-A Extension Study (Удължено проучване на BENEDICT-A)

3.1.3.1. Контингенти

Изследвани са пациенти с нормоалбуминурия, които са участвали във фаза А на проучването BENEDICT и са подписали информирано съгласие за участие в Удълженото проучване на този проект.

3.1.3.2. Дизайн на проучването

Това е предварително планирано Удължено обсервационно проучване на BENEDICT-A, което изследва наличието на асоциация между нормалните стойности на албуминурията на изходното ниво и дългосрочния сърдечно-съдов риск, и ролята на рано започнатата терапия с ACE-инхибитор в дългосрочната кардиопротекция.

На всички пациенти, след завършване на фаза A, се назначава терапия с ACE-инхибитор и се предлага участие в Удълженото проучване. Пациентите, подписали информирано съгласие, се разделят на две групи, в зависимост от това дали са получавали ACE-инхибитор по време на основното проучване. Прегледите се извършват на всеки шест месеца, измерва се АН и се изследва AER. Основният резултат е появата на един от компонентите на комбинираната крайна точка (composite end point):

1. Фатален (включително внезапна смърт)

2. Нефатални основни ССЗ:

а) коронарни - остър инфаркт на миокарда, нестабилна ангина пекторис, коронарна реваскуларизация

б) мозъчносъдови – инсулт, преходна церебрална исхемична атака, каротидна реваскуларизация или ангиопластика

в) периферносъдови - артериална реваскуларизация или байпас, ампутация

г) хоспитализация поради ХСН

Наличието на фатални случаи е потвърдено от Здравният регистър на Област Бергамо, Италия.

Проектът е одобрен от Комисията по Етика при Института за фармакологични изследвания Марио Негри, Италия и от Комисиите по Етика към всеки клиничен център, участващ в изследването.

3.2. Изследване ефикасността и профила на безопасност на даглутрил при пациенти със ЗД-2, диабетна нефропатия и артериална хипертензия

Рандомизирано, лонгитудинално, двойно-сляпо, плацебо-контролирано, cross-over (кръстосан експеримент), едноцентрово проучване, което изследва ефектите на инхибитора на ECE и NEP, даглутрил 300 mg/ден, върху AER, АН, бъбречната функция и профила на безопасност, в сравнение с плацебо на фона на лосартан 100 mg/ден, при пациенти със ЗД-2, ДН (микро- и макроалбуминурия) и добре контролирано АН (NCT00160225, държавен регистър на Италия за клинични проучвания).

3.2.1. Контингенти

Изследвани са амбулаторни пациенти със ЗД-2 (n=45), посещаващи Катедрата по Бъбречна медицина при Института за фармакологични изследвания Марио Негри, Вила Камоци, Раника.

Критерии за подбор

- ЗД-2, критерии на СЗО [World Health Organization-International, 1999]
- мъже и жени на възраст ≥18 години
- СКН <140 mmHg, ДКН <90 mmHg със съпътстваща антихипертензивна терапия
- 24-ч. AER ≥20 <1000 μg/min
- серумен креатинин <200 μmol/L

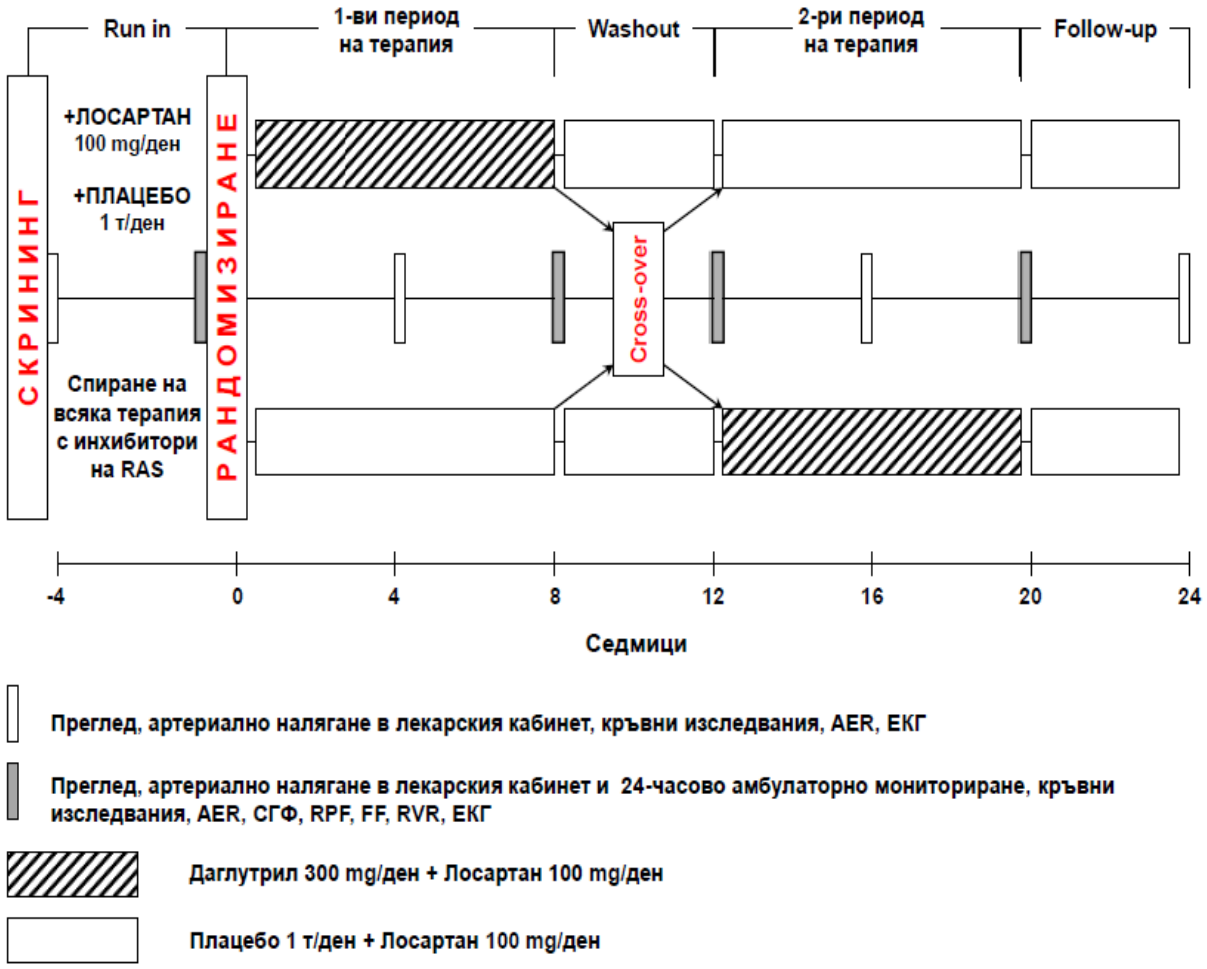
Критерии за изключване

- клинични и хистологични данни за недиабетни бъбречни заболявания; съдови заболявания на бъбреците; обструктивни уропатии
- чернодробни заболявания (концентрация на чернодробните трансаминази два пъти по-висока от горната референтна стойност)
- остри ССЗ през последните 6 месеца
- ХСН III-IV клас по NYHA
- стеноза на митралната или аортната клапа

- хипертрофична кардиомиопатия
- системни автоимунни заболявания
- малигнени заболявания
- алергия към ARB
- прием на хормонална контрацептивна терапия
- клинични противопоказания за прекъсване на терапия с ACE-инхибитор

3.2.2. Дизайн на проучването, изпитван лекарствен продукт

Това проучване изследва ефекта на даглутрил върху 24-часовата AER (първична крайна точка), АН и бъбречната функция при хипертензивни пациенти със ЗД-2 и ДН (микро- и макроалбуминурия). Набирането на пациентите се извършва в периода от месец май 2005 г. до месец декември 2006 г. В началото на проучването пациентите са прегледани от диабетолог. По време на скрининг прегледа се спира терапията с инхибитор на RAS (при наличие на такава) и се назначават лосартан 100 mg/ден и плацебо, след което следва 4-седмичен единично-сляп Run-in период, в който пациентите не са информирани за лекрството (плацебо), което получават **(Фигура 7)**. В края на Run-in периода се извършват базални изследвания и пациентите, които отговарят на критериите за участие се рандомизират централно от Clinical Supplies Department of Solvay Pharmaceuticals, Weesp, Netherlands, чрез компютърна програма за рандомизация, изготвена от този център. Пациентите се разделят на две групи на случаен принцип (1:1). Едната група започва 8-седмично лечение с даглутрил 300 mg/ден, а другата 8-седмично лечение с плацебо. В момента на рандомизирането проучването става двойно-сляпо, при което пациентите и изследователите са маскирани за вида на терапията. Последва 4-седмичен период на отмиване на ефекта от приложената терапия (washout). Продължителността на този период е съобразена с плазмения полуживот на даглутрил $t_{1/2}$ = 2-4 часа, което позволява да се отхвърли възможното наслагване на ефектите на изследваните лекарства (carry-over).



Фигура 7. Дизайн на проучването, изследващо ефектите на даглутрил.

След това пациентите от първата група започват 8-седмично лечение с плацебо, а пациентите от втората група преминават на 8-седмично лечение с даглутрил 300 mg/ден (cross-over). След втория 8-седмичен период, приемът на експерименталното лекарство се спира и пациентите продължават терапия само с лосартан 100 mg/ден за още 4 седмици (follow-up). По време на изследването не се извършват промени в диетата и в съпътстващата терапия на пациентите. В началото и в края на всеки от описаните периоди на проучването, в режим дневен стационар, в два последователни дена, се измерват AER, СГФ, RPF, бъбречно съдово съпротивление (RVR), филтрационна фракция (FF), фракциониран клирънс на албумина и IgG, Big-ендотелин, N-про-ANP, АН в лекарския кабинет, амбулаторно 24-часово АН и биохимичен кръвен профил.

Изследването е проведено в съгласие с Директивите за клинични проучвания на Европейския съюз (2001/20/EC), Нормите за Добра Клинична Практика и Декларацията от Хелзинки (1964). Всички пациенти дават писмено информирано съгласие за участие в проучването. Проектът е одобрен от Комисията по Етика при Института за фармакологични изследвания Марио Негри, Италия и от Комисията по Етика към Специализираната Агенция по Здравеопазването, Бергамо.

Използваната таблетна форма се нарича даглутрил-6 и съдържа 300 mg SLV306. Дозата е препоръчана от производителя въз основа на факта, че след прием на еднократна доза даглутрил 300 mg от здрави доброволци, максималната плазмена концентрация на активния метаболит KC12615 е приблизително 1000 ng/ml, а площта под кривата (AUC) е ~2500 ngxh/ml, което е сравнимо с резултатите, получени при прилагането на лекарствена форма даглутрил-5, съдържаща единична доза 400 mg даглутрил [Tabrizchi R, 2003; Bayes M et al, 2003]. Дозата 400 mg даглутрил демонстрира и най-голям антихипертензивен ефект при пациенти с АХ и ХСН (клинично проучване фаза 2, непубликувани данни). Установено е също, че даглутрил, назначен в доза 200 mg два пъти дневно, намалява ДКН в седнало положение с – 8.6 mmHg, като терапевтичната разлика в сравнение с плацебо (-1.7 mmHg) е статистически значима. Изследваните две по-ниски дози имат по-слаб антихипертензивен ефект, статистически значим само в някои от параметрите, регистрирани при 24-часовото амбулаторно мониториране на АН, в сравнение с плацебо. При здрави доброволци, еднократни дози до 1500 mg се понасят добре и са безопасни [Tabrizchi R, 2003].

3.3. Източник на данните

Във всички проучвания, първичната информация е събрана директно от пациентите по време на медицинските прегледи и от съществуващите бази данни в съответните Отделения по Диабетология. Всички демографски, клинични и лабораторни данни са нанесени в специални клинични досиета.

Първичната информация от BENEDICT и неговото Удължено проучване е проверена и кодирана от Катедрата по Клиничен Мониторинг при Института за фармакологични изследвания Марио Негри, Раника, Италия, след което е въведена в компютърната база данни и е предадена в Катедрата по Биостатистика.

Проучването с новата лекарствена молекула, даглурил, е проверено от Групата по Клиничен Мониторинг при Contract Research Organization COVANCE, САЩ, филиал Милано, Италия, обслужваща Фармацевтични и Биотехнологични индустрии, занимаващи се с развитие на нови лекарства.

3.4. Признаци на наблюдението

3.4.1. Факториални (Таблица 2).

Таблица 2. Изучавани факториални признаци.

- Възраст
- Пол
- ИТМ
- Давност на диабета
- Тютюнопушене
- СКН
- ДКН
- САН
- HbA_{1c}
- Кръвна захар
- Тотален холестерол
- HDL-холестерол
- LDL-холестерол
- Триглицериди
- Пикочна киселина
- Серумен креатинин
- СГФ
- AER
- Анамнеза за ССЗ
- Изследвани лекарства в BENEDICT-A
  - Трандолаприл – Верапамил
  - Трандолаприл
  - Верапамил
  - Плацебо
- Изследвани лекарства в BENEDICT-B
  - Трандолаприл – Верапамил
  - Трандолаприл
- Терапия с ACE-инхибитор
- Терапия без ACE-инхибитор
- Терапия с Даглутрил
- Антидиабетна терапия
- Антихипертензивна терапия
- Липидопонижаваща терапия
- Антиагрегантна терапия

3.4.2. Резултативни (Таблица 3).

Таблица 3. Изучавани резултативни признаци.

- AER
- Сърдечносъдови заболявания
- Артериално налягане:
- В лекарския кабинет
- СКН
- ДКН
- Пулсово налягане
- САН
- Амбулаторно 24-ч. артериално налягане
- СКН
- ДКН
- Пулсово налягане
- САН
- Дневен период
- СКН
- ДКН
- Пулсово налягане
- САН
- Нощен период
- СКН
- ДКН
- Пулсово налягане
- САН
- СГФ
- RVR
- FF
- Бъбречен плазмоток
- Фракциониран клирънс на албумина
- Фракциониран клирънс на IgG
- Big-ендотелин
- N-про-ANP

3.5. Клинични и лабораторни методи

3.5.1. Измерване на гломерулна филтрационна скорост и други основни показатели на бъбречната функция.

Скоростта на гломерулна филтрация се измерва чрез определяне плазмения клирънс на рентгеноконтрастното вещество йохексол (Omnipaque 300; Nycomed Amershan Sorin, Milano, Italy) [Gaspari F et al, 1995]. Пет ml разтвор на йохексол (647 mg/ml) се инжектират венозно за 2 минути (болус). Часът на началото и края на болусното инжектиране на йохексола се записват на специален формуляр, изготвен според стандартите на метода за измерване

на СГФ. При пациенти със СГФ >40 ml/min се вземат по 5 ml кръв на 120-та, 150-та, 180-та, 210-та и 240-тата минута (изчислени въз основа на часа, регистриран за край на болуса). При пациенти със СГФ <40 ml/min кръвта се взема на 120-та, 180-та, 240-та, 300-та, 360-та, 420-та и 480-тата минута. Пробите се центрофугират (3000 min^{-1} за 10 min), плазмата се отделя и се съхранява при -20°. Плазмената концентрация на йохексола се определя чрез HPLC метод (Beckman System Gold Chromatograph, Italy), а неговият клирънс се изчислява, в съответствие с еднокомпартментен модел на разпределение, с формулата:

$CL_1 = D / AUC$

където CL_1 – клирънс, D – доза на йохексола (3.235 g), AUC – площ под кривата на плазмената концентрация на йохексола.

След това стойността се коригира с формулата на Bröchner-Mortensen и се получава плазмения клирънс на йохексола (СГФ):

СГФ (ml/min) = 0.990778 x CL_1 – 0.001218 x CL_1^2 [Bröchner-Mortensen J, 1972]

Получената стойност за СГФ се нормализира според телесната повърхност:

BSA = 0,024265 x $kg^{0,5378}$ x $h^{0,3964}$ [Haycock GB et al, 1978], където:

BSA – телесна повърхност (m^2), h - височина (m)

СГФ → ml/min/1.73m^2

Реналният плазмен ток се измерва чрез определяне плазмения клирънс на парааминохипуровата киселина (Iacopo Monico, Mestre, Italy), [Gaspari F et al, 1995]. Филтрационната фракция (FF) и бъбречното съдово съпротивление (RVR) се изчисляват съответно с формулите:

FF = СГФ / RPF

RVR = САН / RPF

Фракционираните клирънси на албумина и IgG се изчисляват чрез коригиране на техните клирънси, получени при измерването на СГФ.

3.5.2. Измерване на скорост на екскреция на албумина

Скоростта на екскреция на албумина се определя в три последователни нощни колекции на урина или в три последователни 24-часови колекции, направени по точно определени инструкции [Eshøj O, et al, 1987]. За целта пациентите са снабдени с три добре измити бидони, в които е поставен консервантът тимол. Върху бидоните са залепени етикети с името на пациента, номера на скринирането, името на проучването и указания за начина, по който се събира урината.

3.5.2.1. Процедура за събиране на нощна урина

Вечерта преди лягане пациентът уринира, изхвърля отделената порция урина и записва часа на последното за деня уриниране върху специално означено място на етикета на първия бидон. От този момент започва образуването на нощната урина и затова ако на пациента се наложи да уринира през нощта, той трябва да събере урината в бидона. Сутринта, пациентът събира сутрешната порция урина в бидона и отбелязва часа и датата върху специално означено място на етикета. С това събирането на урина от първата нощ приключва. Същата процедура се спазва и през следващите две нощи. На третата сутрин, след като приключи събирането на урината от третата нощ, пациентът доставя колекциите на урина в клиничния център за изследване.

3.5.2.2. Процедура за събиране на три последователни 24-часови колекции на урина

Сутринта пациентът уринира, изхвърля отделената порция урина и записва часа върху специално означено място на етикета на първия бидон. От този момент започва образуването и съответно събирането на 24-часовата урина. Събирането на урина от първите 24 часа приключва със събирането на сутрешната порция урина от следващия ден. Пациентът отбелязва часа и датата върху специално означено място на етикета. Същата процедура се спазва и през следващите два дена. След като приключи събирането на

урината от третия ден, пациентът доставя колекциите на урина в клиничния център за изследване.

Към изследване на AER се преминава след изключване на вероятна инфекция на пикочните пътища с тест лента (наличие на нитрити и левкоцити) и след изключване на недиабетно гломерулно заболяване (наличие на кръв). За тази цел пациентът е снабден и с епруветка, в която събира сутрешна урина (~ 10–15 ml) от третия ден.

Концентрацията на албумина в урината се определя чрез специфичен чувствителен нефелометричен метод (Array 360 System, Beckman, Milano, Italy), въведен от Teppo [Teppo AM and Groop L, 1985]. Чувствителността на метода е 2 mg/l.

AER се изчислява по формулата:

AER = $[CU_{alb}xV]$:Duration, където CU_{alb} – концентрация на албумина в урината (µg/min), V – обем на събраната урина (ml), Duration – времетраене на колекцията (min)

AER трябва да бъде еднаква в две от трите последователни нощни колекции на урина и трябва да бъде потвърдена в две последователни изследвания през 2 месеца, за да може да бъде класифицирана като:

нормоалбуминурия <20.00 µg/min

микроалбуминурия ≥20.00 µg/min <200.00 µg/min

макроалбуминурия ≥200.00 µg/min

В клиничното досие на пациента се регистрират и трите стойности.

3.5.3. Измерване на артериално налягане

3.5.3.1. В лекарския кабинет

Измерването се извършва сутрин на гладно, между 7.00 - 10.00 ч., преди приемането на следващата доза антихипертензивно лекарство и след десетминутен покой. Пациентът е в седнало положение, АН и сърдечната честота се измерват със сфигмоманометър три пъти през интервал от 2 минути. В клиничното досие се записват и трите измерени стойности и се

изчислява средната аритметична стойност на СКН, ДКН и сърдечната честота. САН се изчислява по формулата: САН = ДКН + (СКН - ДКН)/3.

В проучването, изследващо ефектите на новата молекула даглутрил, измерването на АН се извършва с полуавтоматичен електронен апарат Omron HEM-705CP (Tokyo, Japan), върху доминантната ръка на пациента, тази, върху която са измерени по-високи стойности на АН. Тя е предварително определена и отбелязана в клиничното му досие. След първото измерване се изчакват 10 минути и се извършват още 3 измервания през интервал от 2 минути. Апаратът е свързан с принтерно устройство, което дава възможност четирите измерени стойности и съответният час, в който са регистрирани да се принтират и да се приложат в клиничното досие на пациента, в което измерените стойности се записват и мануално. В статистическите анализи участват средните аритметични стойности на СКН, ДКН, пулсовото налягане (СКН - ДКН) и сърдечната честота на последните 3 измервания.

3.5.3.2. Амбулаторно 24-часово мониториране на артериално налягане

В проучването с даглутрил, амбулаторното 24-часово АН е мониторирано в началото и края на всеки период на терапия със Spacelabs equipment (Redmont, Washington, USA), който е програмиран да извършва измервания през 15 минутни интервали в дневния период (06.00-22.00) и през 30 минутни интервали в нощния период (22.00-06.00). Програмирането се извършва от ауторизиран за това проучване център на Contract Research Organization COVANCE, САЩ, филиал в Англия, с който се осъществява връзка със специална телефонна линия. Критерии за валидност на записа на 24-часовото АН: 52 регистрирани стойности през дневния период и по 2 - за всеки час от деня; 12 регистрирани стойности през нощния период и по 1 - за всеки час от нощта. При непокриване на тези критерии записът се счита за невалиден и пациентът трябва да повтори изследването.

3.5.4. Други биохимични измервания:

С автоматичен анализатор Beckman Synchron CX5 (Milano, Italy) се извършва измерване на серумните концентрации на:

а) креатинин (mg/dl; µmol/l)

б) пикочна киселина (mg/dl)

б) липиди:

тотален холестерол (mg/dl; mmol/l)

HDL- холестерол (mg/dl; mmol/l)

LDL- холестерол (mg/dl; mmol/l)

триглицериди (mg/dl; mmol/l)

г) кръвна захар (mg/dl)

Чрез HPLC метод (Beckman System Gold Chromatograph, Milano, Italy) се определя HbA_{1c}. Референтните лабораторни граници са от 3.53 до 5.21% [Kilpatrick BS et al, 1994].

3.5.5. Определяне размера на извадките

3.5.5.1. BENEDICT-A

Основна мярка за ефективността на приложената терапия е времето за поява на трайна микроалбуминурия (AER ≥ 20 µg/min) в поне две от три последователни нощни колекции на урина, потвърдено след два месеца с ново изследване на 3 последователни нощни колекции на урина, в които най-малко две от трите проби демонстрират AER ≥ 20 µg/min [Ruggenenti P and Remuzzi G, 1997]. Въз основа на приемането, че за три години честота на поява на микроалбуминурия в групата на пациентите приемащи плацебо е 9.5% [Fioretto P et al, 1992], а в групата на пациентите приемащи комбинираната терапия трандолаприл-верапамил, тази честота е 3.1%, е изчислено, че във всяка от четирите групи е необходимо да се включат по 225 пациенти, при което проучването ще има 80% мощност за да установи очакваната разлика за тригодишния период на терапия, при използването на двустранен тест с 5% грешка от първи тип. Като се има предвид вероятността за евентуално

оттегляне на пациентите е планирано включването на 300 пациенти във всяка от четирите групи.

3.5.5.2. Удължено проучване на BENEDICT (BENEDICT Extension study)

Това е обсервационно удължено проучване, което обхваща всички пациенти с нормоалбуминурия, рандомизирани в BENEDICT-A, които подписват информирано съгласие за лонгитудиналното наблюдение.

3.5.5.3. BENEDICT-B

Първоначално е планирано в BENEDICT-B да бъдат включени освен пациентите, които развиват микроалбуминурия по време на BENEDICT-A, също и всички пациенти с доказана микроалбуминурия по време на скинирането, като това да продължи до завършването на BENEDICT-A [BENEDICT Group, 2003]. Обаче, публикуването на резултатите от проучването IRbesartan in Patients with Type 2 Diabetes and MicroAlbuminuria (IRMA-2) дава възможност размерът на извадката за BENEDICT-B да бъде изчислен въз основа на честотата на поява на макроалбуминурия в двете групи от пациенти, получаващи ирбесартан 150 и 300 mg/ден (средно 14.5% за период >2 години) [Parving HH et al, 2001]. Приемайки подобна честота в контролната група е прогнозирано, че 29% от пациентите, получаващи само трандолаприл ще прогресират до макроалбуминурия за период на проследяване >4 години. Въз основа на данните [Bakris GL et al, 1998], че тази честота може да бъде намалена с 50% при добавянето на верапамил към трандолаприл е изчислено, че включването на 131 пациенти във всяка група на лечение ще осигури 80% мощност за откриване намаляване на честотата на поява на макроалбуминурия от 29% до 14.5% за follow-up период >4 години (α=0.05, двустранен тест, log-rank тест). Предвиждайки вероятността за евентуално оттегляне на пациентите е планирано включването по 140 пациенти във всяка група.

3.5.5.4. Изследване ефикасността и профила на безопасност на даглутрил при пациенти със ЗД-2, ДН и АХ

Размерът на извадката е определен въз основа на разликата между логаритмуваната 24-часова AER (първична крайна точка) на групите, получаващи плацебо и даглутрил (сдвоен t-тест). Тази разлика е изчислена като 5-20 µg/min (SD 1-12) въз основа на данни от пациенти, посещаващи центъра за клинични изследвания. Четиридесет пациенти са необходими за установяване на 40% разлика между групите с даглутрил и плацебо, с ниво на значимост α=0.05 и 80% мощност.

Въз основа на данни от записи на амбулаторно мониторирано 24-часово артериално налягане на пациенти, посещаващи центъра за клинични изследвания, се очаква 24-часовото средно СКН преди започването на терапията да бъде 135 mmHg (SD 10). Изчислено е, че 40 пациенти ще са достатъчни за откриване на разлика от 5 mmHg (130 *vs* 135 mmHg) в 24-часовото СКН между групите с даглутрил и плацебо, с ниво на значимост α=0.05 и 86% мощност.

3.5.6. Методи за статистически анализ

Катедрата по Биостатистика извършва статистическа групировка, прегрупиране и анализ на мониторираната първична база данни.

Планът за статистическия анализ на проучването BENEDICT е направен от д-р Richard Kay (Parexel International).

В анализите на първичните и вторичните крайни точки на BENEDICT-A са използвани данните на всички рандомизирани пациенти, с изключение на четирима пациенти, които не са приели нито една доза от изпитваното лекарство и един пациент, за който е установено, че при рандомизарането е имал микроалбуминурия (n=1204). При анализиране профила на безопасност на приложените терапии са изключени четиримата пациенти, които никога не са приели изследваното лекарство (n=1205). В анализите на Удълженото проучване на BENEDICT са използвани всички данни от BENEDICT-A без тези

на пациента с микроалбуминрия (n=1208) и всички данни на пациентите, подписали информирано съгласие за участие в Удълженото обсервационно проучване (n=1069). В анализите на BENEDICT-B и в проучването с даглутрил са използвани данните на всички рандомизирани пациенти, съответно n=281 и n=45.

Проведени са следните статистически анализи:

Дескриптивен анализ – честотно разпределение на разглежданите признаци, разбити по групи

Вариационен анализ – изчисляване на средните стойности и показателите за разсейване на количествените признаци

Алтернативен анализ – изучаване на качествени признаци

Корелационен анализ – установяване/доказване на взаимовръзка между два или повече показатели. Формула на Pearson, обикновен коефициент на корелация r

Регресионни анализи - представяне тенденциите на различни показатели във времето. Линейна и нелинейна регресия, еднофакторни логистични регресии, множествени логистични регресии за определяне на Odds Ratio (OR, силата на риска за отделните РФ) и Hazard Ratio (HR, кумулативен коефициент на риска по време на цялото проучване) и техните доверителни интервали (95% Confidence Interval - 95% CI)

Дисперсионен анализ ANOVA - изучаване влиянието на една или няколко групиращи променливи върху една количествена

Repeated measures ANOVA - анализ на разлики между групи

Цензурирани данни за времето на събитието (interval-censored data) - определяне времето за поява на дадено събитие [Allison PD, 1995; Collett D, 1994]

Accelerated failure-time model - количествено определяне ефекта на един независим параметър върху ускоряването или забавянето на крайното събитие (acceleration factor), спрямо друг независим параметър [Collett D, 1994]

Криви на Kaplan-Meier - непараметрична оценка на разпределението на вероятността за крайното събитие за една извадка. Изчислява се делът от индивиди в дадена популация, поставени при едни и същи условия, в които се появява изследваното събитие в определен период от време

Регресия на Кокс (Cox Regression, Cox proportional hazard model) - полу-параметричен предиктивен метод, базиран на множествена линейна регресия. Изследва връзката между преживяемостта на индивидите и няколко фактора (независими променливи) и предвижда риска от смърт [Collett D, 1994]. Ключово предположение в регресията на Кокс е пропорционалналността на рисковете, което е проверено с log-rank и Schoenfeld residuals

Авторегресионен модел - описване периодично променливи параметри, които зависят линейно от собствените си предишни стойности [Lombardi F and Parati G, 2000]

Imputation missing values - методи, които са базирани на заместване на липсващите стойности. Приложено е параметрично множествено импутиране с верига уравнения и непараметрично импутиране с вмъкване на средната аритметична стойност на наличните данни

Модифициран intention-to-treat анализ – анализ на първичните и вторичните променливи за ефикасност, който включва всички рандомизирани пациенти, които са взели поне една доза от изследваното лекарство и след това имат поне едно измерване на параметрите за ефикасност

Неравенство на Бонферони - проверка на различни хипотези чрез построяване на доверителни интервали, с цел да се направи едновременно заключение за много параметри

Графичен анализ – за онагледяване на получените резултати

За установяване на статистическа зависимост, представена в табличен вид, са използвани следните критерии:

Т-тест на Student – параметричен тест за проверка на хипотези за различие между две независими извадки – прилага се когато има нормално (Гаус-Лапласово) разпределение на стойностите в извадката

Непараметричен тест на Wilcoxon – за проверка на хипотези за различие между две независими извадки

Точен критерий на Фишер (Fisher's exact test) и тест $\chi 2$ – за проверка на хипотези за наличие на връзка между дълготрайни променливи

Kruscal-Wallis test - множествено сравнение, непараметричен тест за откриване различие между три групи, изпозван е $\chi 2$

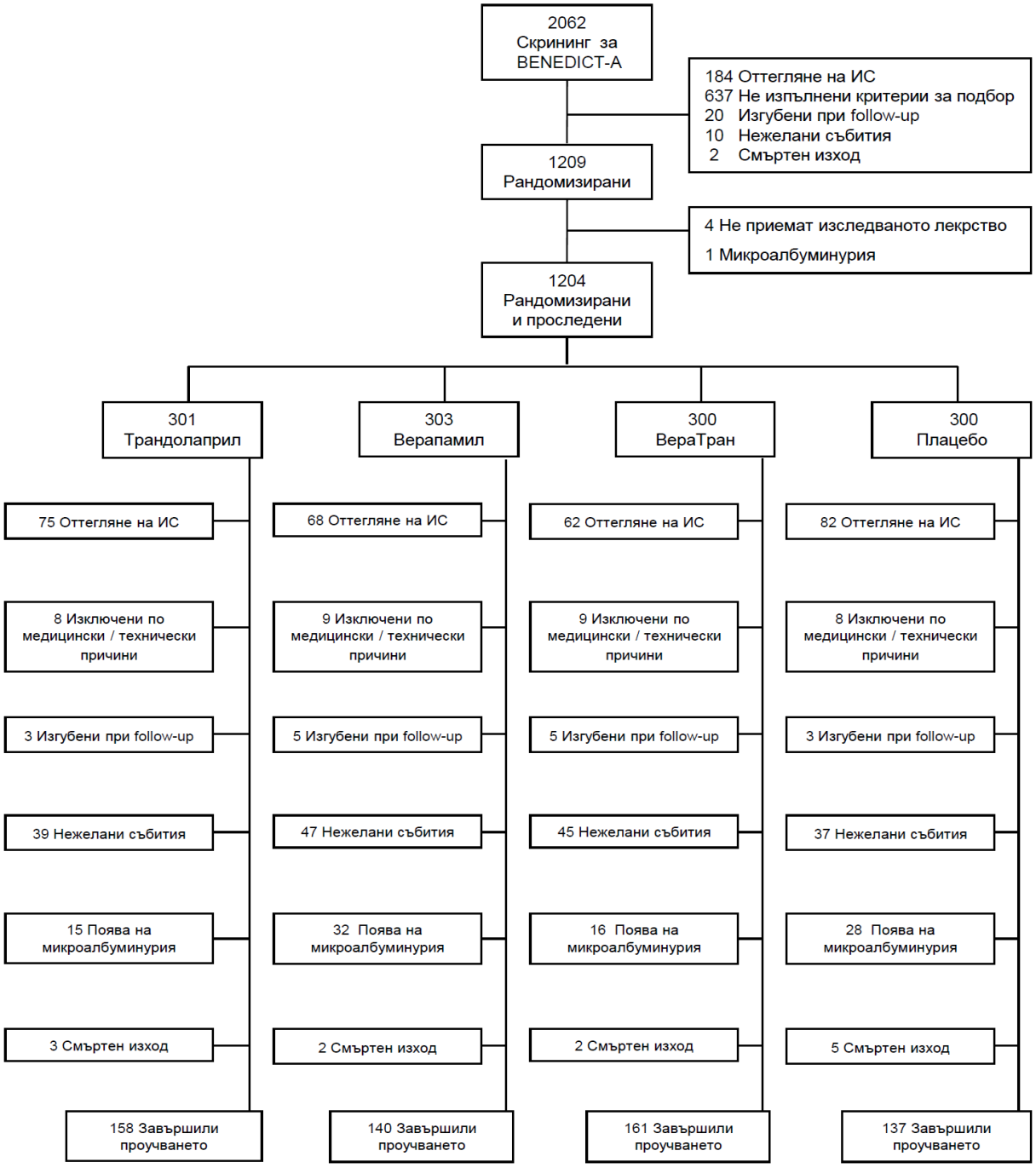
Тест на Kolmogorov-Smirnov и тест на Shapiro-Wilk – за проверка на вида на разпределението

Нивото на значимост на нулевата хипотеза е възприето като $p<0.05$. Всички изчисления и анализи са извършени с помощта на стандартен статистически и графичен софтуер SAS (версия 8.0, версия 9.1), SPSS (Inc., Chicago, IL, версия 17.0.1), STATA (версия 11.0, версия 12), MS Excel.

Изследователският екип изказва благодарност на Мария Ганева, Никола Мотерлини (посмъртно), д-р Естебан Порини PhD, D.Sc., Аннализа Перна, завеждащ катедра Биостатистика към Института за фармакологични изследвания Марио Негри, Раника, Италия, за статистическата обработка на данните от тези проучвания.

ЧЕТВЪРТА ГЛАВА
РЕЗУЛТАТИ

4.1. Изследване ефекта на АСЕ-инхибира трандолаприл, приложен самостоятелно или в комбинация с ndCCB верапамил, върху честотата на поява на микроалбуминурия при хипертензивни пациенти със ЗД-2 и нормоалбуминрия



Фигура 8. Профил на проучването BENEDICT-A.

От 1997 г. до 2000 г. общо 1209 хипертензивни пациенти със ЗД-2 и нормоалбуминурия бяха рандомизирани да получават една от четирите терапии: ВераТран 180/2 mg/ден, трандолаприл 2 mg/ден, верапамил 240 mg/ден и плацебо 1 таблетка/ден. От тях 1204 пациенти бяха проследени средно за 3.6 години (IQR, минимум–максимум интервал 1.3-4.3) **(Фигура 8)**.

Изходните демографски, клинични, лабораторни характеристики и периодът на проследяване (follow-up) на пациентите от четирите групи бяха подобни **(Таблица 4)**.

Таблица 4. Демографски, клинични и лабораторни характеристики на изходното ниво на пациентите от четирите групи, рандомизирани да получават съответно Трандолаприл, Верапамил, ВераТран и плацебо.

Показател	Трандолаприл n = 301	Верапамил n = 303	ВераТран n = 300	Плацебо n = 300
Демографски				
Възраст [години]	61.6 ± 8.1	62.5 ± 8.2	62.7 ± 7.7	62.6 ± 8.2
Мъжки пол, n [%]†	157 (52.2)	164 (54.1)	165 (55.0)	149 (49.7)
Клинични				
ИТМ [kg/m^2]	29.1 ± 4.7	29.5 ± 4.6	29.2 ± 5.3	28.6 ± 4.2
Давност на диабета [години]	7.7 ± 6.7	8.2 ± 6.4	7.7 ± 6.7	7.8 ± 6.8
Тютюнопушене, n [%]†				
Не	169 (56.2)	185 (61.1)	157 (52.3)	187 (62.3)
Ех-пушачи	91 (30.2)	88 (29.0)	107 (35.7)	76 (25.3)
Да	41 (13.6)	30 (9.9)	36 (12.0)	37 (12.4)
Артериално налягане [mmHg]				
СКН	150.8 ± 14.8	150.1 ± 13.1	150.5 ± 13.3	151.9 ± 15.4
ДКН	87.4 ± 7.7	87.5 ± 7.2	87.3 ± 8.1	87.7 ± 7.6
САН	108.6 ± 8.6	108.4 ± 7.7	108.3 ± 8.4	109.1 ± 8.7
Лабораторни				
HbA1c [%]*	5.8 ± 1.4	5.9 ± 1.3	5.8 ± 1.4	5.8 ± 1.4
Кръвна захар [mg/dl]	160.9 ± 46.8	162.6 ± 47.7	160.8 ± 47.0	161.4 ± 47.2
Албуминурия [μg/min]º	5.02 (3.47÷8.89)	5.91 (3.76÷10.55)	5.3 (3.54÷9.24)	5.07 (3.55÷8.78)
Серумен креатинин [mg/dl]	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.2
Триглицериди [mg/dl]	147.0 ± 82.3	143.2 ± 87.7	147.5 ± 79.5	147.0 ± 79.8
Тотален холестерол [mg/dl]	207.2 ± 37.4	210.1 ± 36.9	206.9 ± 34.3	215.1 ± 38.0
LDL [mg/dl]	160.0 ± 36.4	163.4 ± 36.0	159.7 ± 34.0	168.0 ± 37.5
HDL [mg/dl]	46.9 ± 12.2	46.9 ± 12.1	47.0 ± 12.2	46.9 ± 11.9

Данните са средна аритметична стойност ± стандартно отклонение (SD); †Абсолютна честота (%); ºМедиана (минимум-максимум, интервал); *HbA_{1c}, референтни стойности 3.53-5.21%; Серумен креатинин, мярната единица mg/dl се превръща в μmol/L чрез умножаване по 88.4; Триглицериди и Тотален холестерол, мярната единица mg/dl се превръща в mmol/L чрез умножаване, съответно по 0.01129 и 0.02586.

Лекарствата, приемани от пациентите в началото на проучването и по време на проследяването са показани на **Таблица 5**.

Таблица 5. Основни терапии при пациентите с нормоалбуминурия, рандомизирани да получават Трандолаприл, Верапамил, ВераТран и Плацебо, на изходното ниво и по време на тяхното проследяване (follow-up).

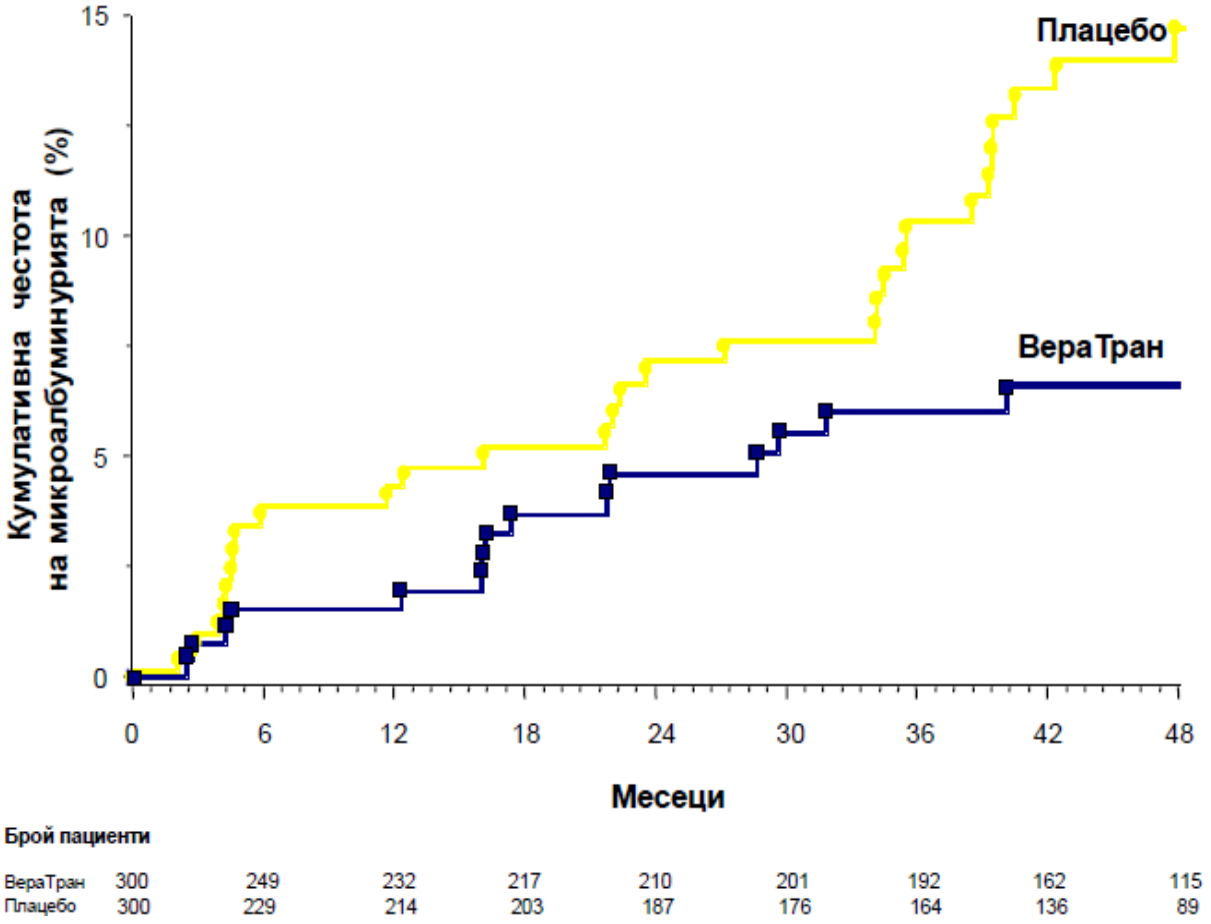
ТЕРАПИЯ	ИЗХОДНО НИВО				FOLLOW-UP			
	Трандолаприл n=301	Верапамил n=303	ВераТран n=300	Плацебо n=300	Трандолаприл n=301	Верапамил n=303	ВераТран n=300	Плацебо n=300
Антидиабетна								
Само диета	79 (26.3)	92 (30.4)	96 (32.0)	88 (29.3)	51 (16.9)	62 (20.5)	72 (24.0)	61 (20.3)
Перорални антидиабетни лекарства	195 (64.8)	169 (55.8)	165 (55.0)	175 (58.3)	199 (66.1)	183 (60.4)	175 (58.3)	186 (62.0)
Инсулин и перорални антидиабетни лекарства	15 (5.0)	25 (8.3)	19 (6.3)	19 (6.3)	36 (12.0)	45 (14.9)	34 (11.3)	36 (12.0)
Само инсулин	12 (4.0)	17 (5.6)	20 (6.7)	18 (6.0)	15 (5.0)	13 (4.3)	19 (6.3)	17 (5.7)
Антихипертензивна								
Диуретици	66 (21.9)	70 (23.1)	58 (19.3)	65 (21.7)	51 (16.9)	65 (21.5)	51 (17.0)	65 (21.7)
Бета-блокери	31 (10.3)	24 (7.9)	23 (7.7)	25 (8.3)	29 (9.6)	21 (6.9)	26 (8.7)	29 (9.7)
dCCB	73 (24.3)	88 (29.0)	87 (29.0)	90 (30.0)	79 (26.3)	77 (25.4)°	74 (24.7)°	98 (32.7)
Симпатиколитици	68 (22.6)	63 (20.8)	59 (19.7)	56 (18.7)	137 (45.5)°	149 (49.2)	109 (36.3)*	163 (54.3)
Липидопонижаваща								
Статини	25 (8.3)	10 (3.3)	27 (9.0)	25 (8.3)	39 (13.0)	35 (11.6)°	48 (16.0)	54 (18.0)
Фибрати	11 (3.7)	18 (5.9)	5 (1.7)	8 (2.7)	9 (3.0)	16 (5.3)	11 (3.7)	10 (3.3)
Статини и фибрати	1 (0.3)	0 (0.0)	1 (0.3)	2 (0.7)	7 (2.3)	8 (2.6)	4 (1.3)	5 (1.7)
Тромбоцитни антиагреганти	7 (2.3)	7 (2.3)	7 (2.3)	7 (2.3)	26 (8.6)	25 (8.3)	25 (8.3)	19 (6.3)

Данните са абсолютна честота (%); * p<0.0001 *vs* placebo; °p<0.05 *vs* placebo.

Комбинацията ВераТран сравненена с плацебо

Трайна микроалбуминурия се появи при 17 от 300-та пациенти (5.7%), получаващи комбинацията ВераТран и при 30 от 300-та пациенти (10.0%), получаващи плацебо. Кривите на Kaplan-Meier за двете групи видимо се разделиха три месеца след започване на терапията **(Фигура 9)**. При контролиране на променливите в изходното ниво ускоряващият фактор бе 0.39 (95% CI 0.19-0.80, P=0.01) в групата ВераТран, сравнена с плацебо. По този начин комбинираната терапия ВераТран забави статистически значимо появата на микроалбуминурия с фактор 2.6. Некоригираното (unadjusted) сравнение показа подобни резултати. След коригиране за влиянието на СКН и ДКН върху появата на микроалбуминурия, измерени при проследяването на пациентите,

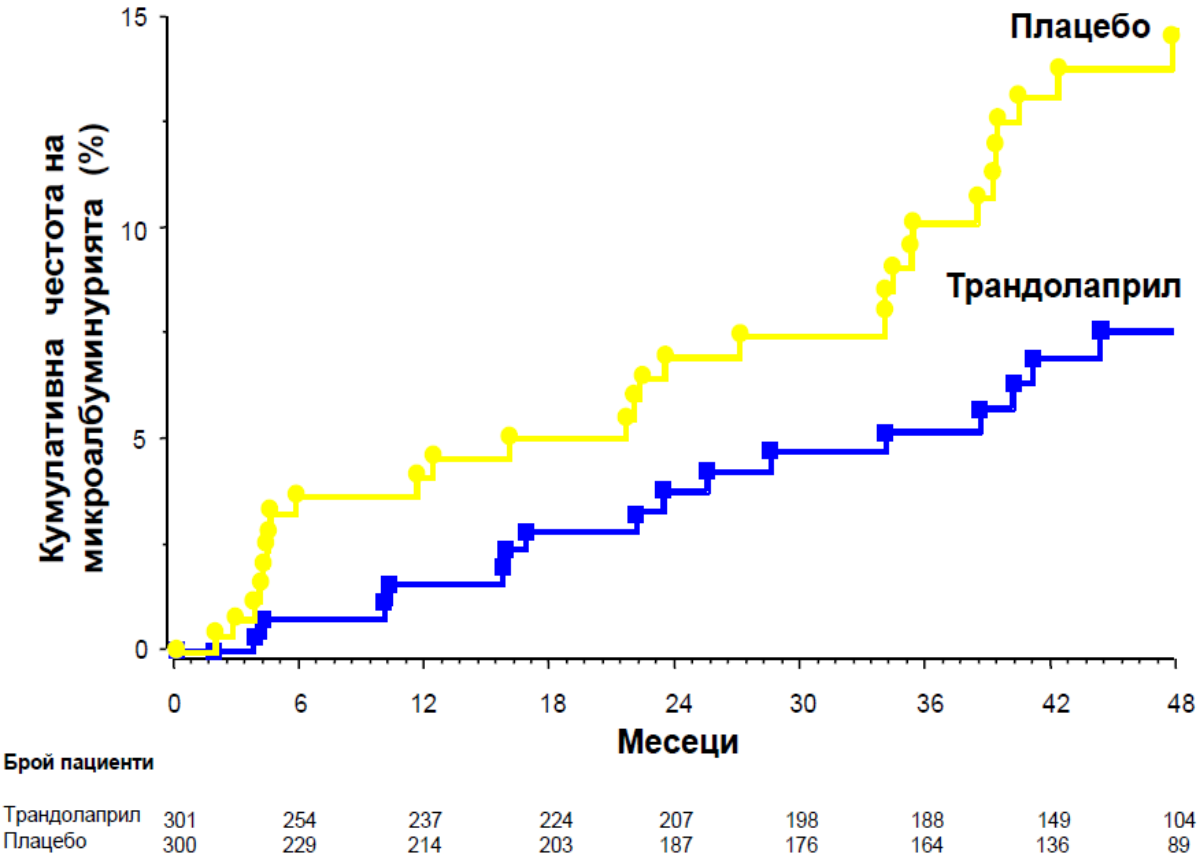
получихме съответно ускоряващ фактор за СКН от 0.46 (95% CI, 0.22-0.93; P=0.03) и 0.46 за ДКН (95 CI, 0.22-0.95; P=0.04).



Фигура 9. Криви на Kaplan-Meier за процента на пациентите, развили микроалбуминурия в групите с ВераТран и плацебо. Разликата между двете групи, коригирана за предварително определени променливи на изходното ниво, беше статистически значима (P=0.01) съгласно accelerated failure-time model.

Трандолаприл и верапамил, приложени самостоятелно и сравнени с плацебо

Трайна микроалбуминурия се появи при 18 от 301 пациенти, получаващи трандолаприл (6.0%) и при 36 от общо 303 пациенти, получаващи верапамил (11.9%). Кривите на Kaplan-Meier за групите с трандолаприл и верапамил, сравнени с плацебо, видимо се разделиха три месеца след започване на терапията, но докато в групата с трандолаприл разделянето продължи и при проследяването на пациентите, то в групата с верапамил разделянето изчезна след 3-та година **(Фигура 10, Фигура 11)**.

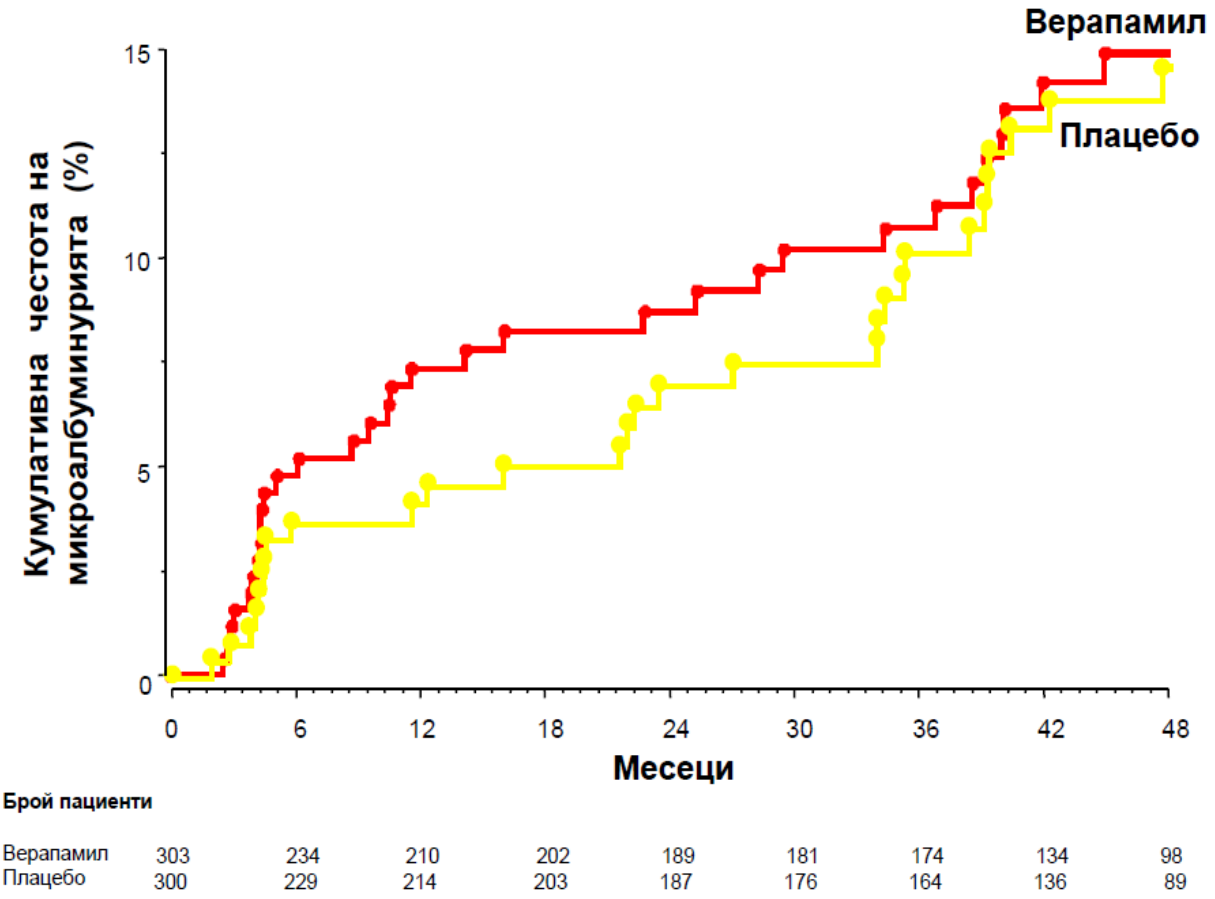


Фигура 10. Криви на Kaplan-Meier за процентът на пациентите, развили микроалбуминурия в групите с трандолаприл и плацебо. Разликата между двете групи пациенти, коригирана за предварително определени променливи на изходното ниво, беше статистически значима (P=0.01) съгласно accelerated failure-time model.

При контролиране на променливите в изходното ниво, полученият ускоряващ фактор за трандолаприл, сравнен с плацебо, беше 0.47 (95% CI 0.26-0.83, P=0.01). По този начин, терапията с трандолаприл забави статистически значимо появата на микроалбуминурия с фактор 2.1. Некоригираното (unadjusted) сравнение потвърди този резултат. След коригиране за влиянието на СКН и ДКН върху появата на микроалбуминурия, измерени при проследяването на пациентите, получихме съответно ускоряващ фактор 0.50 за СКН (95% CI 0.28-0.90, P=0.02) и 0.52 за ДКН (95% CI 0.30-0.92, P=0.03).

При контролиране на променливите в изходното ниво, полученият ускоряващ фактор, в групата верапамил сравнена с плацебо, бе 0.83 (95% CI, 0.45-1.51; P=0.54) **(Фигура 11)**. Без корекция за изходните променливи,

ускоряващият фактор бе 1.34 (95% CI 0.67-2.68, P=0.41). Верапамил не забави статистически значимо появата на микроалбуминурия дори и при контролиране за ролята на СКН и ДКН, измерени при проследяването на пациентите.

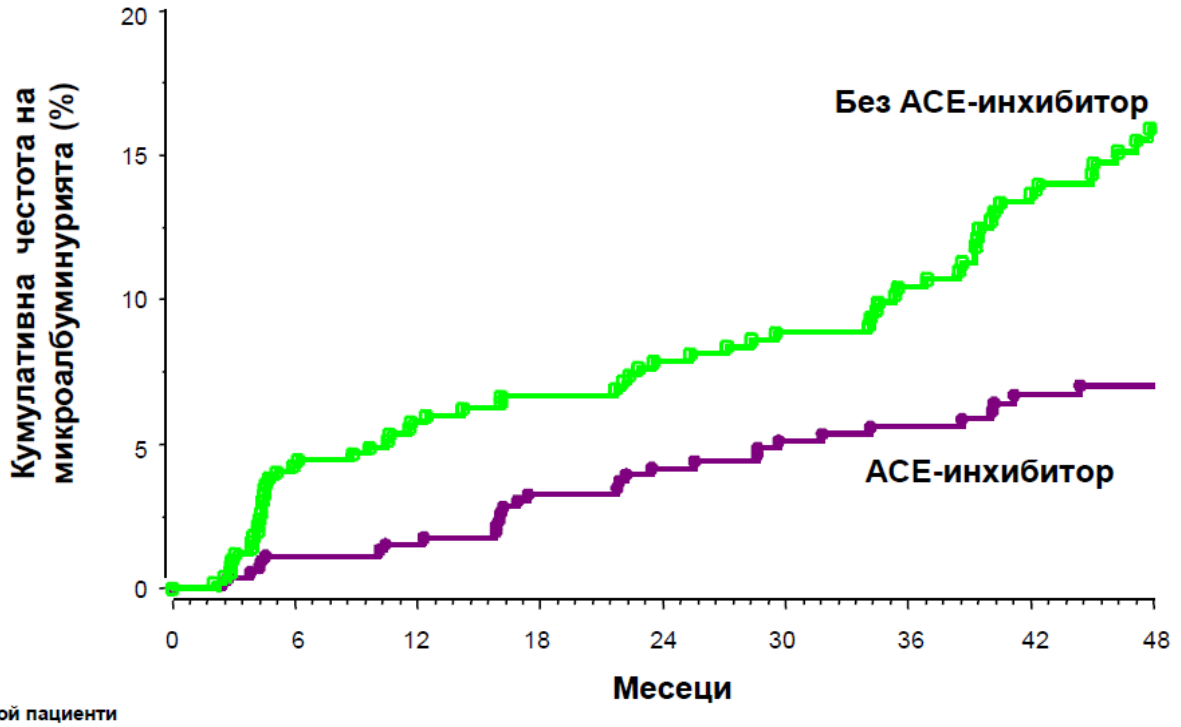


Фигура 11. Криви на Kaplan-Meier за процента на пациентите, развили микроалбуминурия в групите с верапамил и плацебо. Разликата между двете групи не беше статистически значима (P=0.54).

Комбинираната терапия ВераТран и трандолаприл, приложен самостоятелно, забавиха статистически значимо появата на микроалбуминурия при сравнение с верапамил. При контролиране на променливите в изходно ниво, полученият ускоряващ фактор бе съответно, 0.40 за ВераТран (95% CI 0.19-0.85, P=0.02) и 0.53 за трандолаприл (95% CI 0.29-0.96, P=0.04).

Инхибиране на ACE или блокиране на бавните L-тип потенциал-зависими калциеви канали с ndCCB

Общо 601 пациенти проведоха терапия с ACE-инхибитора трандолаприл, самостоятелно или комбиниран с верапамил (603 не получаваха ACE-инхибитор); 603 пациенти проведоха терапия с ndCCB верапамил, самостоятелно или комбиниран с трандолаприл (601 не получаваха ndCCB). Изходните клинични и лабораторни характеристики бяха подобни както между пациентите, които бяха с или без ACE-инхибитор, така и между тези, които са бяха с или без ndCCB (данните не са показани). Трайна микроалбуминурия се появи при 35 от 601 пациенти, получаващи ACE-инхибитор (5.8%) и при 66 от 603 пациенти, които бяха без ACE-инхибитор (10.9%). Кривите на Kaplan-Meier за двете групи (с или без ACE-инхибитор) видимо се разделиха три месеца след започване на терапията, като разделянето се задържа статистически значимо и при проследяването на пациентите **(Фигура 12)**.

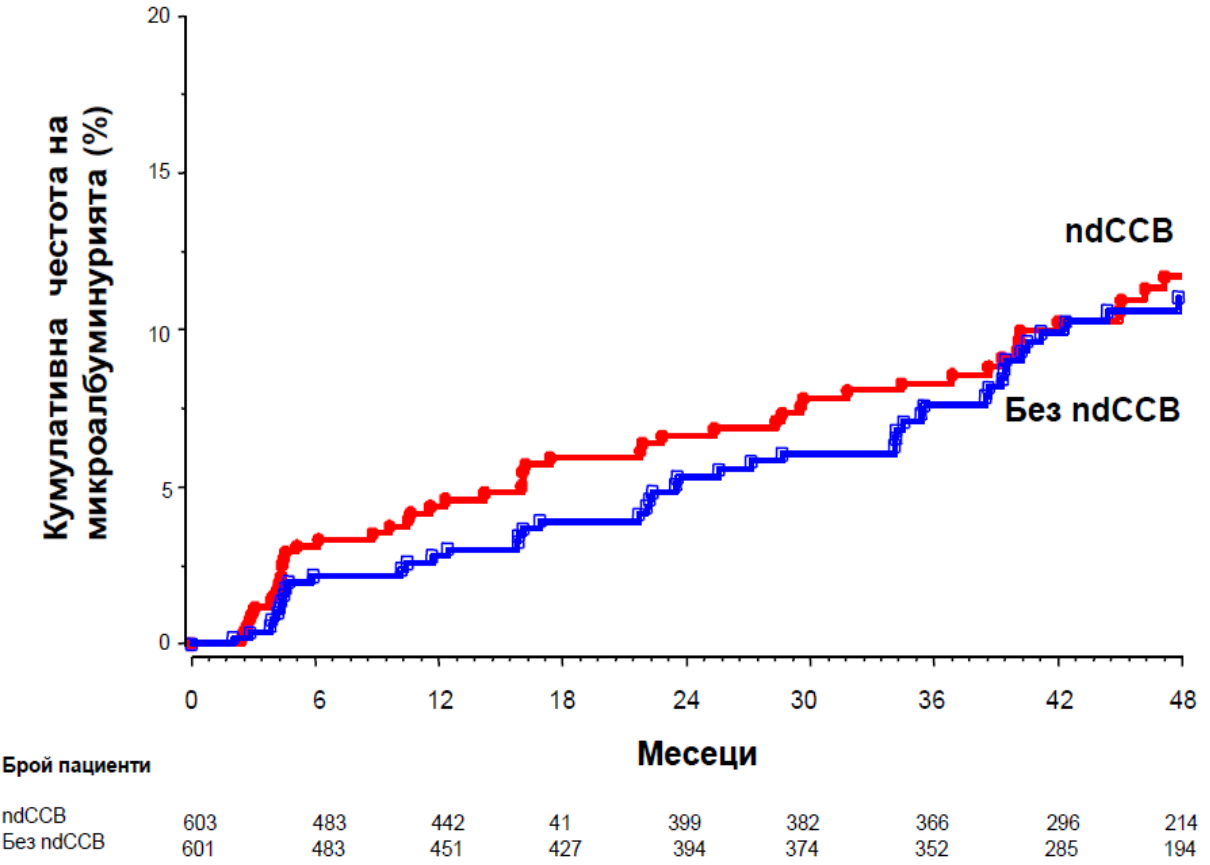


Брой пациенти

ACE-инхибитор	601	503	469	441	417	399	380	311	220
Без ACE-инхибитор	603	463	424	405	376	357	338	270	188

Фигура 12. Криви на Kaplan-Meier за процента на пациентите, развили микроалбуминурия в групите с или без ACE-инхибитор. Разликата между двете групи, коригирана за предварително определени променливи на изходното ниво беше статистически значима (P=0.001) съгласно accelerated failure-time model.

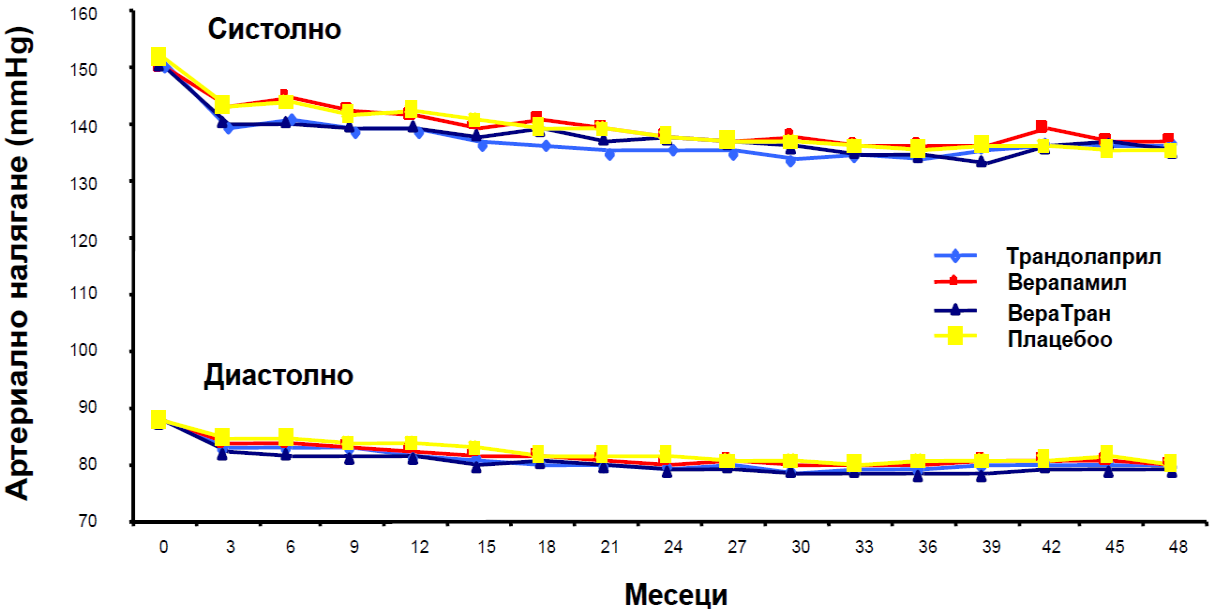
При контролиране на променливите в изходното ниво, полученият ускоряващ фактор бе 0.44 (95% CI 0.27-0.70, P<0.001) при пациентите получили ACE-инхибитор в сравнение с пациентите без ACE-инхибитор. Така, терапията с ACE-инхибитор забави статистически значимо появата на микроалбуминурия с фактор 2.3. След коригиране за влиянието на СКН и ДКН върху появата на микроалбуминурия при проследяването на пациентите, получихме съответно ускоряващ фактор за СКН от 0.51 (95% CI 0.32-0.81, P=0.005) и 0.50 за ДКН (95% CI 0.32-0.79, P=0.003). Трайна микроалбуминурия се появи при 53 от 603 пациенти (8.8%), получаващи ndCCB и при 48 от 601 пациенти (8.0%) без ndCCB. Терапията с верапамил не забави статистически значимо появата на микроалбуминурия, дори след контролиране за изходните променливи и за СКН и ДКН при проследяването на пациентите **(Фигура 13)**.



Фигура 13. Криви на Kaplan-Meier за процента на пациентите, развили микроалбуминурия в групите с или без ndCCB. Разликата между двете групи, коригирана за предварително определени променливи на изходното ниво, не беше статистически значима (P=0.92) съгласно accelerated failure-time model.

Артериално налягане и ACE-инхибитор

Стойностите на артериалното налягане преди започването на терапията са представени на **Таблица 4,** а по време на проучването на **Фигура 14**. По време на проучването, в групата на пациентите получаващи ВераТран, средното СКН беше 139±10 mmHg и средното ДКН беше 80±6 mmHg; съответните стойности в групата на пациентите получаващи трандолаприл бяха 139±12 mmHg и 81±6 mmHg; в групата на пациентите получаващи верапамил бяха 141±10 mmHg и 82±6 mmHg; в групата на пациентите получаващи плацебо бяха 142±12 mmHg и 83±6 mmHg.



Брой пациенти

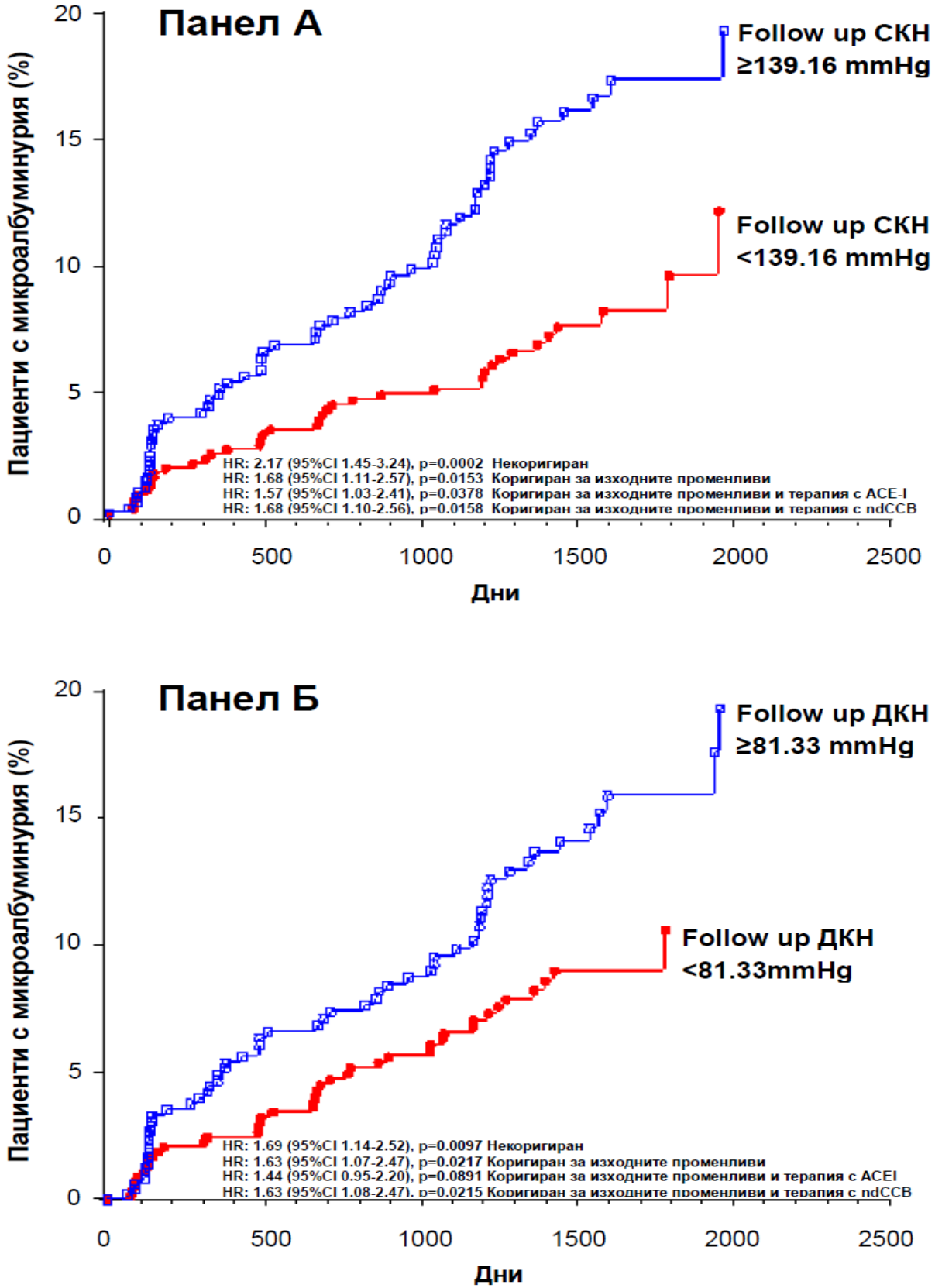
Трандолаприл	301	270	262	249	239	231	225	218	212	204	201	196	190	167	145	115	90
Верапамил	303	256	241	223	216	205	203	197	196	189	183	177	172	153	136	112	89
ВераТран	300	266	255	243	234	226	223	216	214	208	203	197	194	175	161	133	102
Плацебо	300	258	235	224	218	208	206	200	194	183	180	172	167	151	130	113	84

Фигура 14. Систолно и дистолно артериално налягане на четирите групи пациенти по време на проучването.

Сравняването на СКН и ДКН по време на проучването показа статистически значима разлика (P≤0.002) както между групите с ВераТран и плацебо, така и между групите с трандолаприл и плацебо, докато разликите между групите с верапамил и плацебо не бяха значими. В групата с ВераТран САН беше 100±6 mmHg, а в групите с трандолаприл, верапамил и плацебо беше, съответно 101±7 mmHg, 102±6 mmHg и 103±7 mmHg (P<0.001 при

сравнението между групите с трандолаприл и плацебо или групите с ВераТран и плацебо; докато при сравнението между групите с верапамил и плацебо разликата не беше статистически значима).

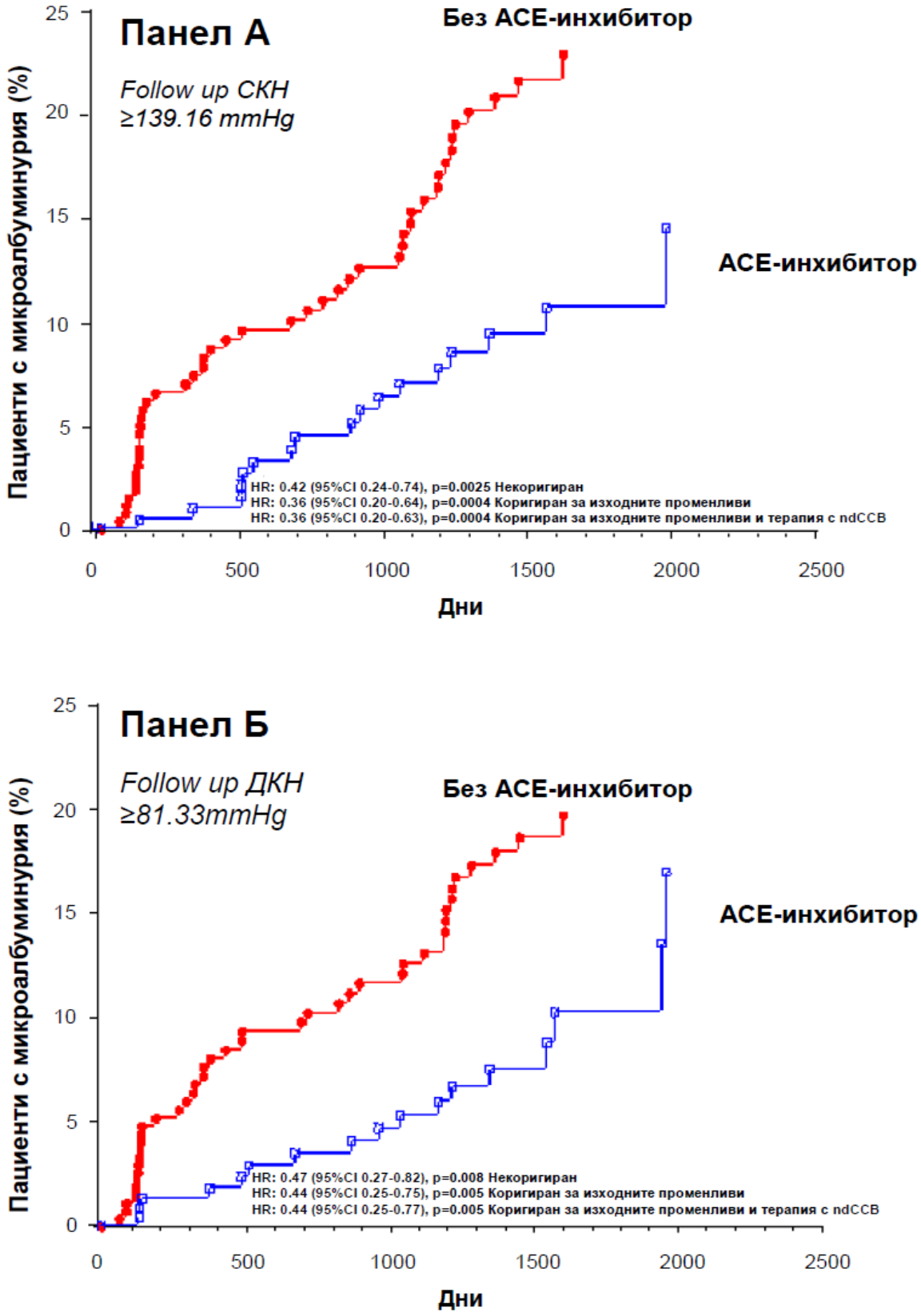
Направеният post-hoc анализ показа, че изходните стойности на СКН, ДКН и САН не бяха асоциирани с появата на микроалбуминурия (некоригирани и коригирани регресии на Cox). При проследяването на пациентите (follow-up), честотата на поява микроалбуминурия беше значимо по-висока при пациентите с по-лош контрол на АН, при които съответно СКН, ДКН, САН бяха над медианите (непоказани данни). Некоригираните и коригираните регресионни модели на Cox показаха, че по-високите стойности на АН бяха асоциирани с повишен риск от развитие на микроалбуминурия: СКН, некоригиран HR 1.05 (95% CI 1.03-1.07, P<0.0001), коригиран HR 1.04 (95% CI 1.02-1.6, P=0.0002), ДКН, некоригиран HR 1.06 (95% CI 1.02-1.11, P=0.0015), коригиран HR 1.05 (95% CI 1.01-1.10, P=0.0085) и САН, некоригиран HR 1.09 (95% CI 1.5-1.13, P<0.0001), коригиран HR 1.07 (95% CI 1.03-1.10, P=0.0004) **(Фигура 15, Панел А и Панел Б)**. Рискът, асоцииран със стойностите на ДКН над медианата, беше значим след коригиране за изходните променливи и съпътстващата терапия с ndCCB, но загуби сигнификантност след корекция за съпътстващата терапия с ACE-инхибитор. В групата с лош контрол на АН, пациентите, които приемаха ACE-инхибитор имаха значително по-ниска честота на микроалбуминурия, в сравнение с тези, които бяха без ACE-инхиботор **(Фигура 16, Панел А и Панел Б)**. В групата пациенти със стойности на АН под медианата, честотата на поява на микроалбуминурия беше подобна между пациентите с или без ACE-инхибитор (непоказани данни). Трябва да се отбележи, че при пациентите, които имаха стойности на АН над медианата и приемаха ACE-инхибитор, честотата на микроалбуминурията беше понижена до нива, сравними с тези на пациентите с добре контролирано АН, независимо от вида на антихипертензивната терапия, с която са рандомизарани.



Фигура 15. Пациенти, развили микроалбуминурия по време на проучването според follow-up стойностите на СКН (Панел А) и ДКН (Панел Б), съответно над и под медианата.

Намаляването на риска от микроалбуминурия, постигнат с АСЕ-инхибитора трандолаприл, беше значим дори след коригиране за влиянието на изходните

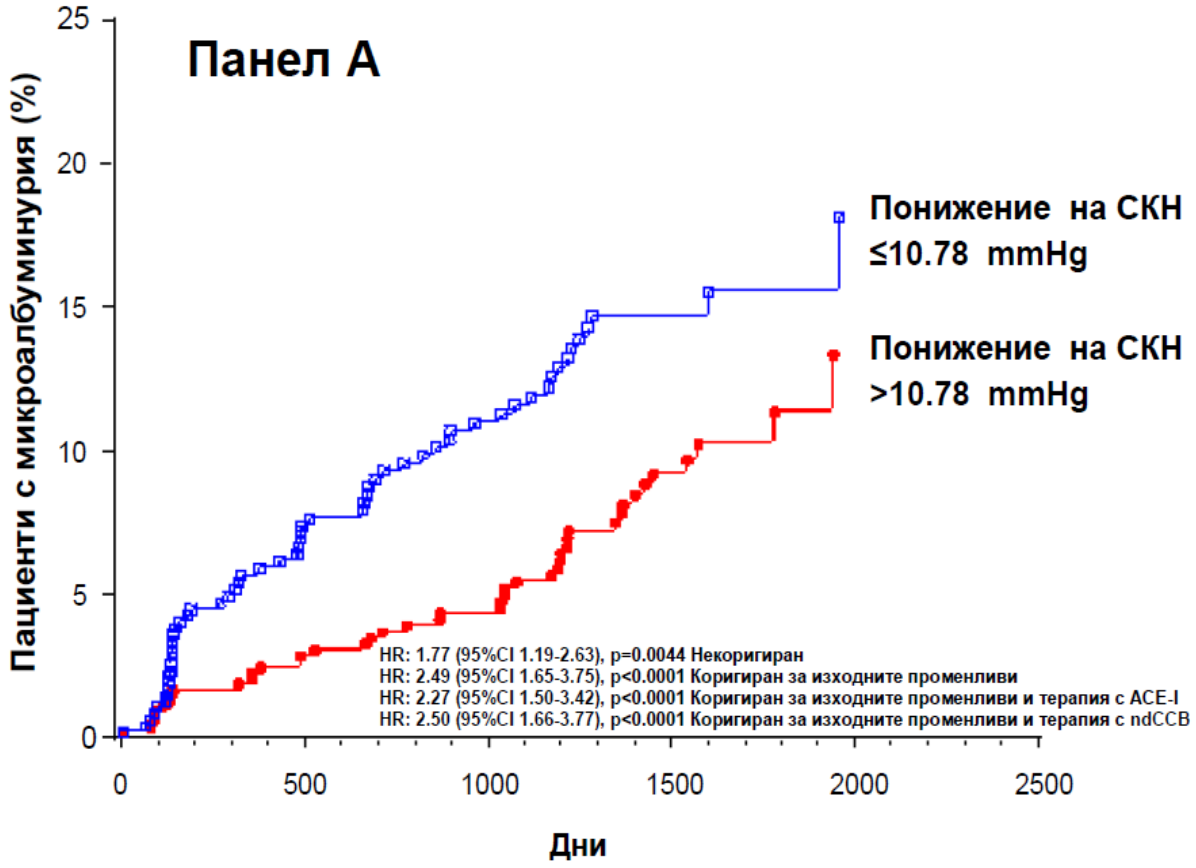
параметри и съпътстващата терапия с ndCCB **(Фигура 16, Панел А и Панел Б)**.

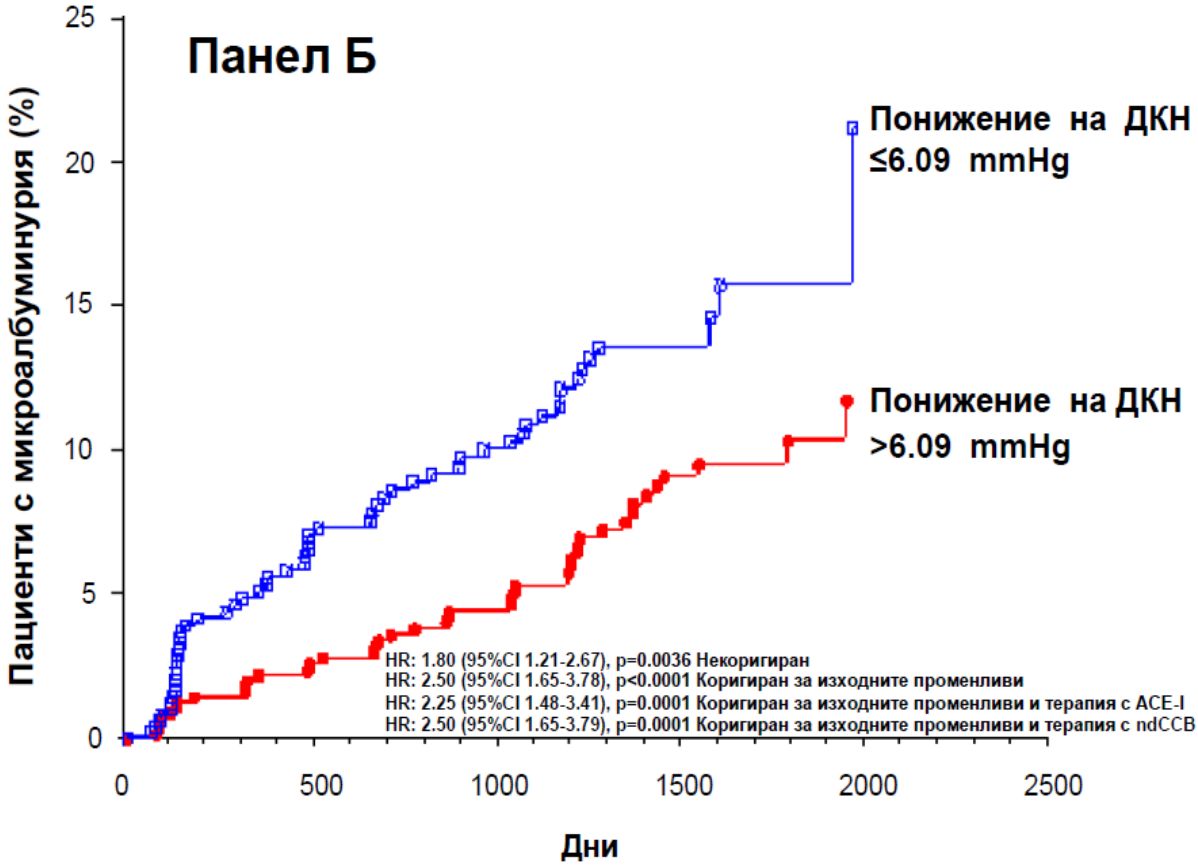


Фигура 16. Пациенти с follow-up СКН (Панел А) и ДКН (Панел Б) над медианата и развили микроалбуминурия при проследяването според наличието или не на ACE-инхибитор.

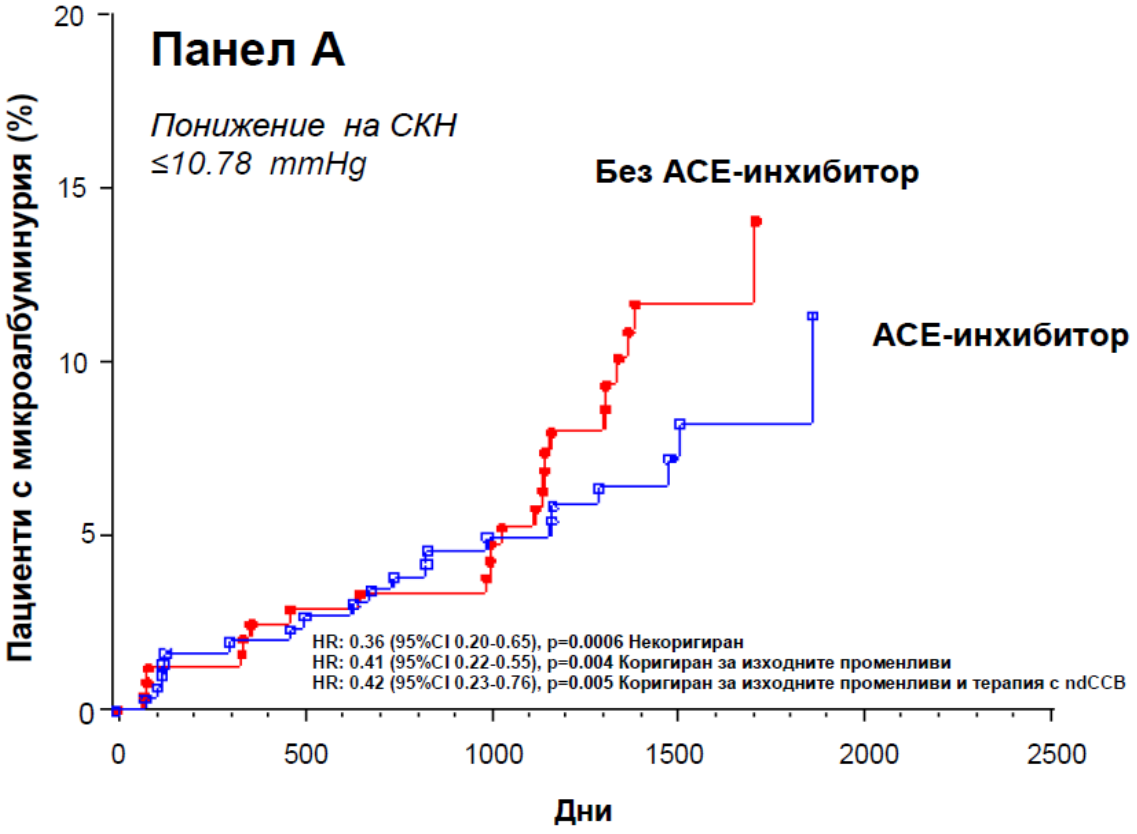
Пациентите със стойности на СКН, ДКН и САН под медианата, сравнени с тези, чиито стойности бяха над медианата, по-често приемаха комбинирата терапия ВераТран или АСЕ-инхибитора трандолаприл самостоятелно, и при тях по-рядко беше добавяна съпътстваща антихипертензивна терапия.

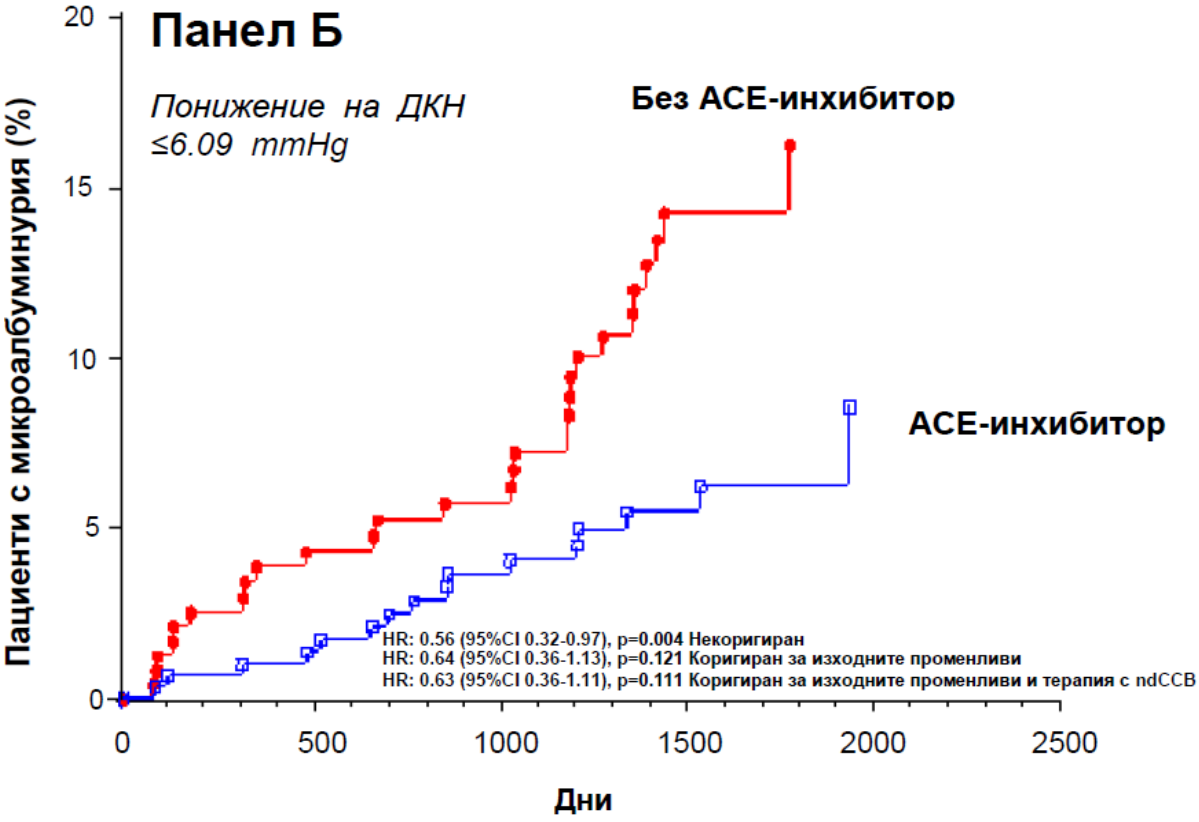
При проследяването (follow-up), честотата на поява на микроалбуминурия беше сигнификантно по-висока при пациенти с по-малко понижение на АН, в сравнение с пациентите с по-голямо понижение на АН **(Фигура 17, Панел А и Панел Б)**. Некоригираните и коригираните регресионни модели на Cox показаха, че по-големите понижения на АН бяха асоциирани с по-нисък риск от развитие на микроалбуминурия: СКН, некоригиран HR 1.03 (95% CI 1.02-1.05, P=0.0001), коригиран HR 1.05 (95% CI 1.03-1.07, P<0.0001), ДКН, некоригиран HR 1.05 (95% CI 1.02-1.08, P=0.0018), коригиран HR 1.07 (95% CI 1.04-1.10, P<0.0001) и САН, некоригиран HR 1.05 (95% CI 1.03-1.08, P=0.0001), коригиран HR 1.08 (95% CI 1.05-1.11, P<0.0001). Пациентите, които показаха по-голямо намаление на АН, по-често приемаха комбинацията ВераТран или АСЕ-инхибитора трандолаприл самостоятелно, като при тях по-рядко са налагаше добавянето на друго антихипертензивно лекарство, в сравнение с тези, които бяха с по-лош контрол на АН. Сред пациентите, показали по-малко понижение на АН, тези, които приемаха АСЕ-инхибитор, сравнени с пациентите, които бяха без АСЕ-инхибитор, бяха с по-ниска честота на поява на микроалбуминурия, като тази честота беше сравнима, с честота на микроалбуминурия при пациентите, показали по-голямо понижение на АН, независимо от терапията, с която са били рандомизирани. Намаляването на риска от микроалбуминурия при пацинетите с по-лош контрол на АН, постигнато с АСЕ-инхибитора тарндолаприл, се запази дори и след коригиране за изходните променливи и наличието на съпътстваща терапия с ndCCB **(Фигура 18, Панел А)**.





Фигура 17. Пациенти, развили микроалбуминурия по време на проучването според follow-up намалението на СКН (Панел А) и на ДКН (Панел Б), съответно над и под медианата.





Фигура 18. Пациенти с follow-up намаление на СКН (Панел А) и на ДКН (Панел Б) под медианата и развили микроалбуминурия при проследяването според наличието или не на АСЕ-инхибитор.

Подобна тенденция беше наблюдавана и за ДКН, но намаляването на риска не беше значимо след коригирането за изходните параметри **(Фигура 18, Панел Б)**. Независимо от разделянето на пациентите на групи според контрола на АН, нямаше значими разлики в честотата на микроалбуминурията между пациентите, които приемаха ndCCB или плацебо.

Други резултати

По време на проучването нямаше статистически значими разлики в нивото на кръвната захар и липидния профил между изследваните групи пациенти. Във всички групи СГФ беше подобна и не се наблюдаваха статистически значими промени при проследяването на пациентите (данните не са показани).

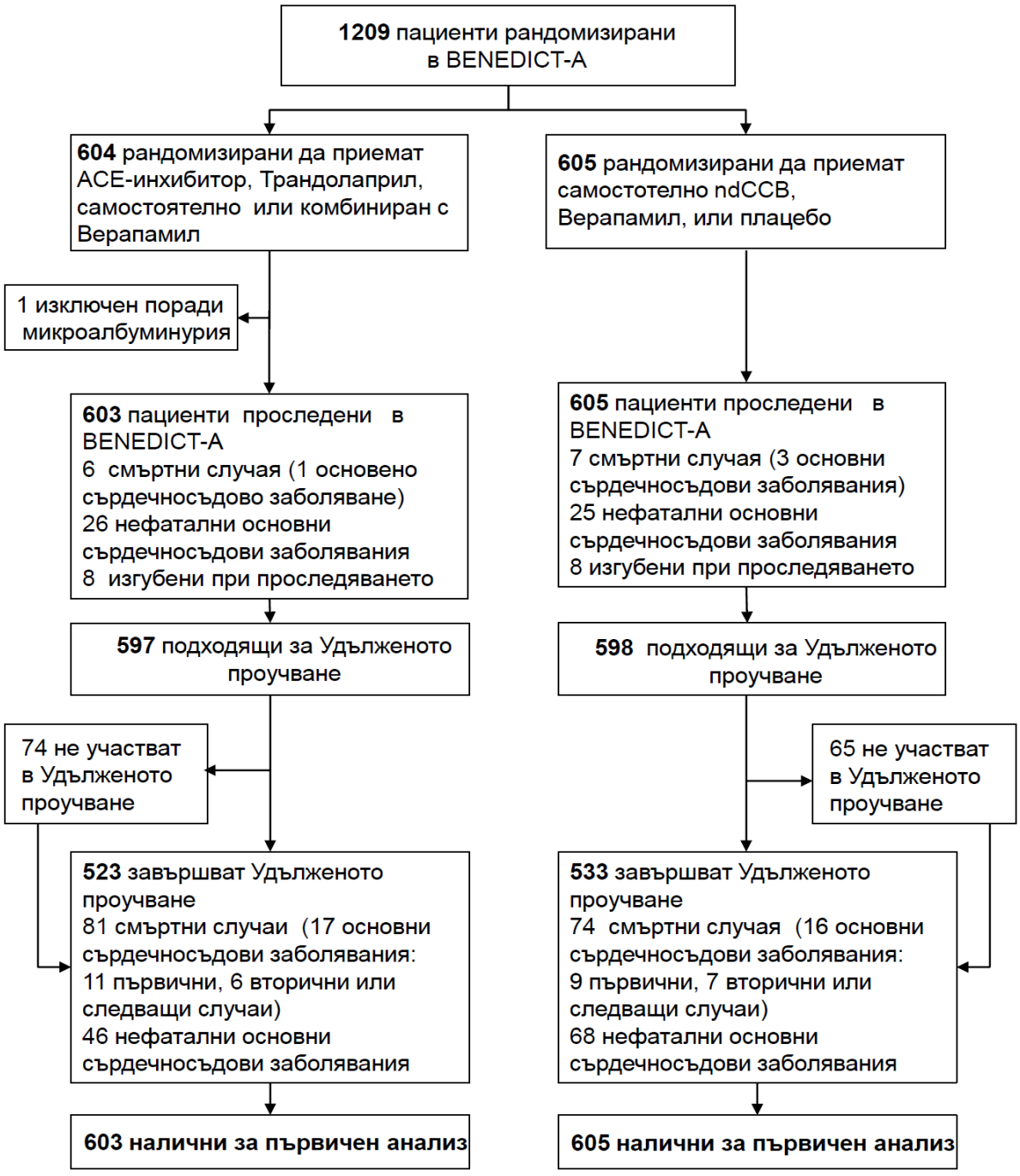
Нежелани усложнения

Общо 297 пациенти имаха поне едно сериозно нежелано усложнение в периода между приемането на първата доза от изследваното лекарство и две седмици след прекратяване на проучването. Дванадесет пациенти починаха по време на проучването и един пациент от групата с трандолаприл почина от колоректален аденокарцином на 14-я ден след приключване на изследването. Един пациент, приемащ трандолаприл, един верапамил и 3 пациенти приемащи плацебо починаха от кардиоваскуларни усложнения. В групата пациенти, която получаваше ВераТран, не бяха регистрирани фатални сърдечно-съдови усложнения. Наблюдавахме подобна честотата на нефаталните сериозни усложнения в четирите изследвани групи (22.3% в групата с ВераТран, 26.6% в групата с трандолаприл, 22.1% в групата с верапамил и 23.3% в групата с плацебо), включително и в нефаталните сърдечно-съдови усложнения (3.7% в групата с ВераТран, 4.0% в групата с трандолаприл, 4.3% в групата с верапамил и 4.0% в групата с плацебо). При един пациент, който беше на терапия с ВераТран, се появи първа степен AV-блок и при един пациент получаващ верапамил се установи появата на втора степен AV-блок. При 11 пациенти се появи суха кашлица, която доведе до

преустановяване на тяхното участие в проучването (5 в групата с ВераТран, 4 в групата с трандолаприл и 2 в групата с плацебо).

4.2. Изследване наличието на асоциация между нормоалбуминурия и дългосрочния сърдечно-съдов риск и ролята на рано започнатата терапия с ACE-инхибитор в дългосрочната кардиопротекция при пациенти със ЗД-2, нормоалбуминурия и АХ, рандомизирани в BENEDICT-A

От общо 1208 хипертензивни пациенти със ЗД-2 и нормоалбуминурия, рандомизирани във фаза А на проучването BENEDICT в периода 1997–2000 г.,



Фигура 19. Профил на Удълженото проучване на BENEDICT-A.

1069 (87.4%) пациенти бяха проследени в Удълженото проучване на BENEDICT-A до 31/12/2008 г., средно 9.12 години (IQR, минимум–максимум интервал 6.16-9.86) **(Фигура 19)**. Характеристиките на изходното ниво на пациентите, които участваха (1069) и не участваха (139) в Удълженото проучване бяха подобни, с изключение на преобладаването на мъже, по-ниските нива на HbA_{1c} и LDL/HDL при пациентите, участващи в проучването (непоказани данни)**.** Характеристиките на изходното ниво на всички пациенти, на пациентите с или без ССЗ, са показани на **Таблица 6**.

Таблица 6. Характеристики на изходното ниво на всички пациенти, взети заедно и на пациентите с или без сърдечно-съдови заболявания по време на проследяването.

Показател	Всички пациенти	Без сърдечно-съдови заболявания	Със сърдечно-съдови заболявания	$p^{\S}$
Пациенти, n [%]†	1208	1019 (84.4)	189 (15.6)	
Демографски				
Възраст [години]	62.33 ± 8.05	61.85 ± 8.12	64.92 ± 7.15	< 0.001
Мъжки пол, n [%]†	638 (52.8)	521 (51.1)	117 (61.9)	0.004
Клинични				
Анамнеза за ССЗ, n [%]†	52 (4.3)	34 (3.3)	18 (9.5)	< 0.001
Давност на диабета [години]º	6 (3-11)	6 (2-11)	7 (3-12)	0.18
Тютюнопушене, n [%]				
Не	700 (57.9)	600 (58.9)	100 (52.9)	0.21
Ех-пушачи	362 (30.0)	302 (29.6)	60 (31.7)	0.20
Да	146 (12.1)	117 (11.5)	29 (15.3)	0.20
ИТМ [kg/m^2]	29.08 ± 4.72	29.16 ± 4.72	28.66 ± 4.68	0.19
Артериално налягане [mmHg]				
СКН	150.82 ±14.16	150.77 ± 14.17	151.10 ± 14.16	0.77
ДКН	87.46 ± 7.63	87.60 ± 7.47	86.60 ± 8.44	0.13
САН	108.58 ± 8.35	108.66 ± 8.21	108.17 ± 9.07	0.45
Лабораторни				
HbA_{1c} [%]ª	5.79 ± 1.37	5.73 ± 1.36	6.16 ± 1.37	< 0.001
Кръвна захар [mg/dL]	161.34 ± 47.05	160.00 ± 46.67	168.52 ± 48.57	0.03
Тотален холестерол [mg/dl]	209.78 ± 36.74	209.05 ± 37.21	213.67 ± 33.93	0.11
HDL [mg/dl]	46.94 ± 12.06	47.29 ± 12.11	45.06 ± 11.65	0.02
LDL [mg/dl]	162.75 ± 36.05	161.60 ±36.36	168.82 ± 33.81	0.01
Триглицериди [mg/dl]º	125 (91-181)	124 (91-177)	134 (91-194)	0.12
Серумен креатинин [mg/dl]	0.90 ± 0.16	0.90 ± 0.15	0.93 ± 0.17	0.02
Пикочна киселина [mg/dl]	4.09 ± 1.18	5.01 ± 1.19	5.00 ± 1.13	0.90
Албуминурия [μg/min]º	5.24 (3.5-9.3)	5.09 (3.5-8.7)	7.08 (3.7-11.6)	< 0.001
Терапии				
Според рандомизацията				
Плацебо	302 (25.0)	258 (25.3)	44 (23.3)	
Верапамил	303 (25.1)	243 (23.8)	60 (31.7)	0.15
Трандолпарил	302 (25.0)	259 (25.4)	43 (22.8)	
ВераТран	301 (24.9)	259 (25.4)	42 (22.2)	
Антихипертензивни лекарства, n [%]*	664 (55.0)	556 (54.6)	108(57.1)	0.32
Брой антихипертензивни лекарства **	2 (1-2)	2 (1-2)	2 (1-3)	0.28
Липидопонижаващи, n [%]	138 (11.4)	119 (11.7)	19 (10.0)	0.30
Аспирин, n [%]	28 (2.3)	17 (1.7)	11 (5.8)	0.002
Follow-up [години]	9.12 (6.16-.86)	9.09 (6.0-9.81)	9.28 (7.7-10.10)	0.03

Данните са средна аритметична стойност ± стандартно отклонение (SD); †Абсолютна честота (%); ºМедиана (минимум-максимум, интервал); ªHbA_{1c}, референтни стойности 3.53-5.21%; *Различно от лекарството в проучването; **Включително лекарството в проучването; §сравнения между пациентите с *vs* без сърдечно-съдови заболявания.

На изходното ниво медианата на AER беше 5.24 µg/min (обхват 0.44-19.85 µg/min). Само при 10% от участниците AER беше по-висока от 14 µg/min. По време на периода на проследяване 168 пациенти починаха, от които 37 (22%) поради кардиоваскуларни причини. Бяха наблюдавани общо 212 основни ССЗ при 189 пациенти.

Първична комбинирана крайна точка (Primary composite end point)

От рандомизираните 1208 пациенти, при 189 (15.6%) наблюдавахме усложнения, дефинирани в primary composite end point, средно 2.14 случая/100 пациенти/година. От тях фатални бяха 24 (12.7%) (3 се дължаха на внезапна смърт, 1.6%). Нефаталните ССЗ бяха съответно: 105 (55.6%) коронарни, 39 (20.6%) мозъчносъдови, 31 (16.4%) периферно-съдови и 11 (5.8%) хоспитализация поради ХСН **(Таблица 7)**.

Таблица 7. Пациенти с новопоявили се фатални и нефатални основни сърдечно-съдови заболявания (първична комбинирана крайна точка).

Сърдечно-съдови заболявания	Пациенти (n)
Коронарно сърдечно заболяване (n=105)	
Нестабилна ангина пекторис	14
Нестабилна ангина пекторис + стентиране/реваскуларизация	40
Остър инфаркт на миокарда	46
Остър инфаркт на миокарда + стентиране/реваскуларизация	5
Хронична сърдечна недостатъчност	11
Инсулт или преходна церебрална исхемична атака (n=39)	
Инсулт	24
Преходна церебрална исхемична атака	15
Внезапна смърт	3
Периферно съдово заболяване (n=31)	
Тежка каротидна обструкция	5
Тежка каротидна обструкция + стентиране или ангиопластика	8
Тежка периферна обструкция	8
Тежка периферна обструкция + стентиране или байпас	10
Общо	189

По време на BENEDICT-A бяха регистрирани 55 ССЗ (4 фатални), а по време на Удълженото проучване настъпиха 133 ССЗ (20 фатални). Пациентите, които достигнаха до крайната точка при проследяването бяха по-възрастни, бяха по-често от мъжки пол, имаха по-висока честота на ССЗ на изходното ниво, по-високи стойности на албуминурия, серумен креатинин, HbA_{1c} и LDL/HDL, в

сравнение с пациентите без ССЗ **(Таблица 6)**. Другите изходни характеристики на двете групи пациенти бяха подобни.

Характеристики на изходното ниво и сърдечно-съдов риск

Еднофакторният регресионен пропорционален анализ на рисковете на Cox показа, че напредналата възраст, мъжкият пол, по-голямата давност на диабета, наличието на предишни ССЗ, по-високото съотношение LDL/HDL, по-високите нива на креатинин и AER са статистически значими и са асоциирани с повишения риск от новопоявили се ССЗ **(Таблица 8)**.

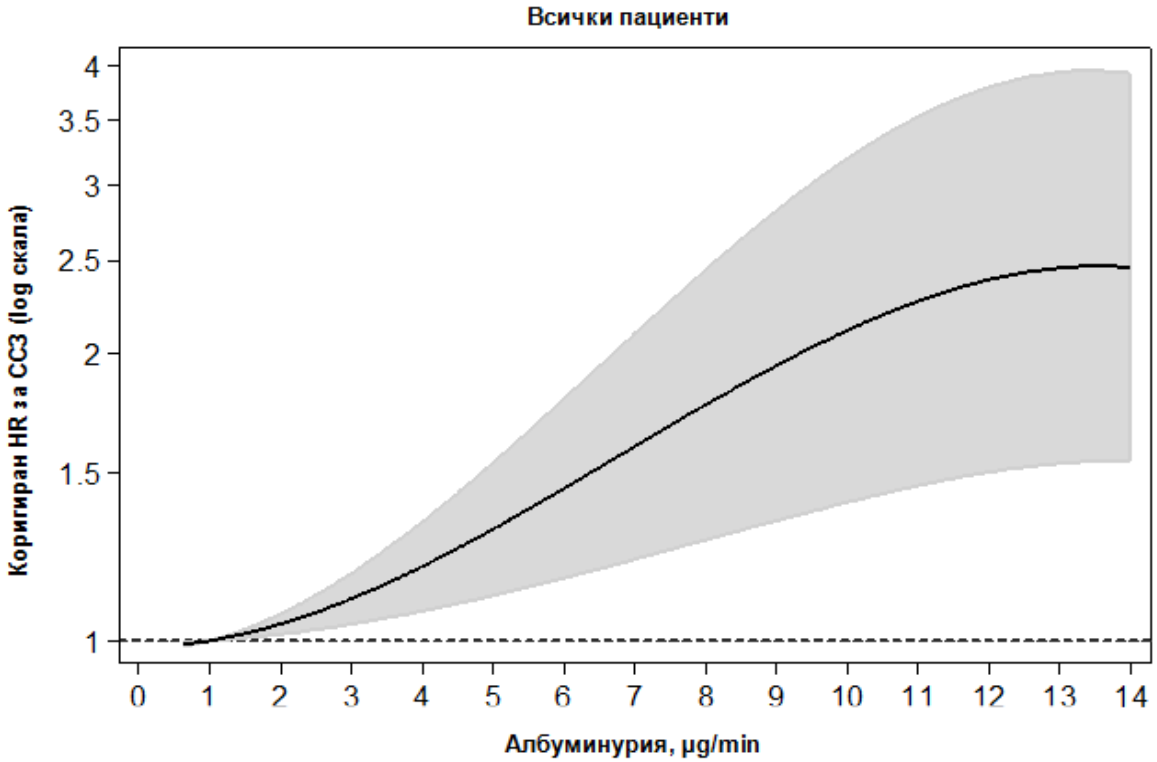
Таблица 8. Еднофакторен и множествен регресионен пропорционален анализ на Cox на рисковите фактори за прогнозиране на сърдечно-съдовите заболявания (ССЗ), формиращи Първичната комбинирана крайна точка (Primary composite end point).

Параметри	Еднофакторен			Многофакторен		
	HR	95 % CI	P	OR	95 % CI	P
Възраст	1.05	1.03/1.07	< 0.001	1.06	1.04/1.08	< 0.0001
Пол - жени *vs* мъже	1.46	1.09/ 1.96	0.01	1.58	1.07/2.32	0.02
Давност на диабета	1.02	1.002/1.043	0.03	0.99	0.97/1.02	0.88
Анамнеза за ССЗ	3.02	1.85/ 4.91	< 0.001	2.97	1.79 /4.93	< 0.0001
Тютюнопушене	1.38	0.93/2.04	0.11	1.25	0.81 /1.92	0.31
ИТМ	0.96	0.95/1.009	0.16	0.99	0.96 /1.03	0.65
Средно артериално налягане	0.99	0.97/1.008	0.31	0.98	0.96 /1.00	0.05
HbA_{1c}*	2.87	1.56/5.27	0.001	3.17	1.55 /6.48	0.002
LDL/HDL*	1.93	1.26 / 2.94	0.002	2.03	1.21 /3.39	0.007
Триглицериди	1.001	0.999/1.003	0.07	1.00	0.99/1.002	0.90
Серумен креатинин*	2.54	1.10/5.85	0.03	0.86	0.31/2.42	0.78
Албуминурия*	1.055	1.026/1.086	< 0.0001	1.06	1.02/1.08	0.002
Пикочна киселина	1.002	0.891/ 1.127	0.97	1.01	0.88/1.16	0.90
Рандомизация с ACE-инхибитор	0.818	0.614/1.089	0.17	0.84	0.63/1.13	0.25
Наличие на липидопонижаваща терапия	0.857	0.533/1.377	0.52	0.79	0.48/1.29	0.34

*Логаритмично-трансформирани параметри.

Многофакторният анализ потвърди, че AER е статистически значима и е асоциирана с повишния риск от ССЗ [коефициент на риска, HR 1.06; (95% CI 1.02-1.08)]. Всяко повишаване на AER на изходното ниво с 1 µg/min повишава с 6% риска от поява на ССЗ по време на проследяването на пациентите. Други независими предиктори на кардиоваскуларния риск бяха напредналата възраст, мъжкият пол, предишни ССЗ, по-високите нива на HbA_{1c} и на съотношението LDL/HDL. Не се наблюдаваха статистически значими асоциации между AER и другите параметри на изходното ниво. Предположението за пропорционалност не беше нарушено (Schoenfeld residuals: P=0.26).

Многофакторният анализ с втора степен на полиноминална трансформация на AER описа асоциацията между AER и CC3 с по-ниско отклонение, в сравнение с анализа с логаритмична трансформация на AER (931.32 *vs* 934.27, съответно) и демонстрира нейния непрекъснат нелинеен характер **(Фигура 20)**.



Фигура 20. Коригиран коефициент на риска (HR) от основни CC3 в зависимост от изходната AER. Непрекъсната линия показва оценената асоциация, когато логаритмувания риск се моделира като линейна функция на логаритмуваната AER. Референтната стойност (HR=1) е определена при AER <1 µg/min. Засенчената зона включва 95% CI за по-обща функционална асоциация, оценена от P-splines. HR е коригиран за възраст, пол, давност на диабета, анамнеза за CC3, тютюнопушене, индекс на телесна маса, средно артериално налягане, логаритмуваните стойности на HbA_{1c}, LDL/HDL, триглицериди и серумен креатинин, както и това дали пациентът е бил рандомизиран да получава ACE-инхибитор.

Дори AER 1-2 µg/min беше статистически значима и беше асоциирана с повишен сърдечно-съдов риск в сравнение с AER <1 µg/min (HR 1.04; 95% CI 1.2-1.7), взета като референтна стойност. При стойности на AER между 13-14 µg/min, наблюдавахме платообразна тенденция за кардиоваскуларния риск, сравнен с референтната стойност на AER (<1 µg/min) **(Фигура 20)**. Получихме подобни резултати при моделиране на изходната AER с функция spline (данните не са показани). При нива на AER >14 µg/min кардиоваскуларният риск не беше анализиран поради малкия брой пациенти.

Чувствителни анализи

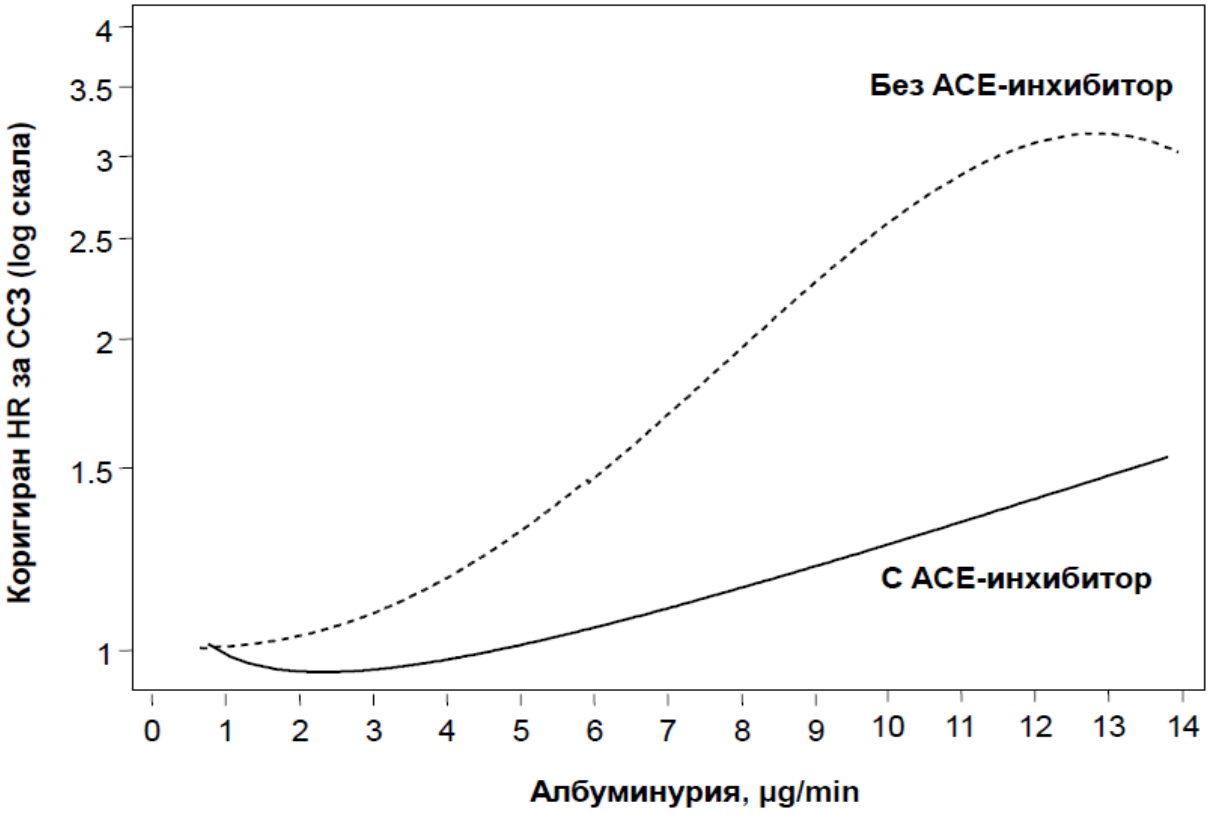
Анализите бяха повторени и в по-малки групи от селекционирани пациенти: при пациенти с нисък кардиоваскуларен риск, които бяха без ССЗ при включването им в изследването или имаха трайна нормоалбуминурия по време на цялото проучване; при пациенти със ССЗ, без случаите на реваскуларизации и ампутации; при пациенти само с коронарни инциденти (данните не са показани). За разлика от АН, албуминурията в края на BENEDICT-A, т.е. в началото на Удълженото проучване, прогнозираше ССЗ в последващото проследяване, потвърдено както от еднофакторния [OR 1.41 (95% CI 1.15-1.74, P=0.001)], така и от многофакторния анализ [OR 1.29 (95% CI 1.04-1.60, P=0.001)]. В съответствие с това, пациентите с трайна нискостепенна нормоалбуминурия, сравнени с тези с трайна високостепенна нормоалбуминурия (т.е., AER <1 SD или >1 SD от средната стойност на AER в края на BENEDICT-A) имаха три пъти по-ниска честота (8% *vs* 24%; P=0.027) на ССЗ.

Сърдечно-съдов риск според терапията с АСЕ-инхибитор

На изходното ниво, характеристиките на пациентите, които първоначално бяха рандомизирани да получават АСЕ-инхибитора трандолаприл, самостоятелно или в комбинация с верапамил, бяха подобни с тези на пациентите, рандомизирани да получават терапия само с верапамил или плацебо [De Cosmo S et al, 2009]. От общо 603 пациенти, получаващи терапия с трандолаприл, 84 (13.9%) имаха поне едно основно ССЗ, в сравнение с 105 от 605 пациенти (17.4%), неприемащи трандолаприл (P=0.08). По време на BENEDICT-A 27 (4.5%) участници, получаващи АСЕ-инхибитор, прогресираха до крайната точка, в сравнение с 28 (4.6%) пациенти, които не получаваха АСЕ-инхибитор (P=0.49). Обаче, по време на Удълженото проучване 57 пациенти, лекувани с АСЕ-инхибитор, достиганаха до крайната точка, в сравнение с 77 пациенти, неполучаващи АСЕ-инхибитор. Така, честотата на ССЗ беше

статистически значимо по-ниска при пациентите с ACE-инхибитор (9.5% *vs* 12.7%; P=0.043).

В групата на пациентите, които не получаваха ACE-инхибитор наблюдавахме същата непрекъсната, статистически значима асоциация между AER и риска от ССЗ, която започваше при AER 1-2 µg/min, при референтна стойност на AER <1 µg/min (HR 1.02; 95% CI 1.01-1.074). Всяко повишаване на AER на изходното ниво дори с 1 µg/min увеличаваше този риск по време на Удълженото проучване. Отново наблюдавахме платообразна тенденция за кардиоваскуларния риск при AER 13-14 µg/min, сравнен с референтната стойност на AER (<1 µg/min) (HR 3.15; 95% CI 1.76-5.63) **(Фигура 21)**.

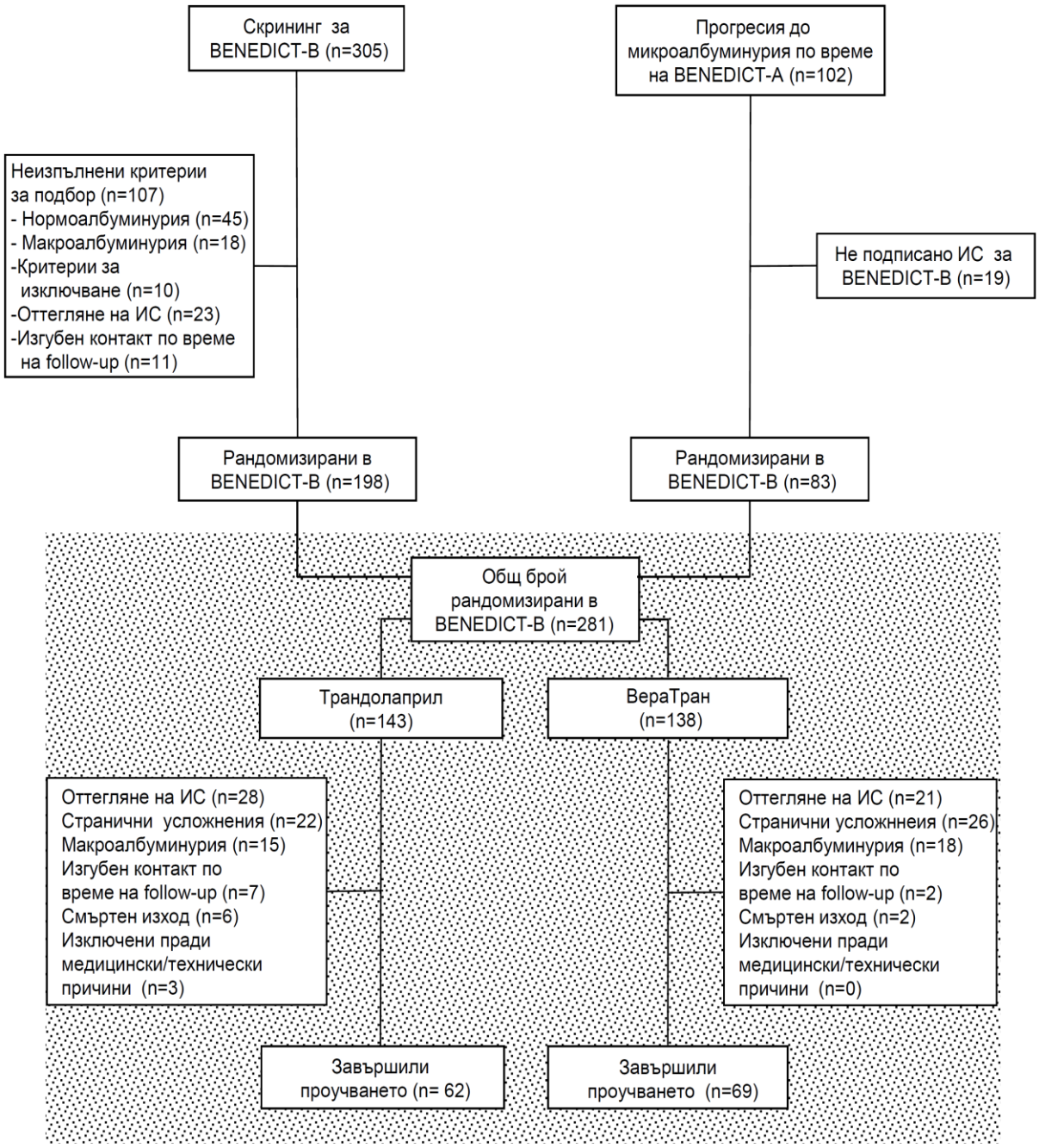


Фигура 21. Коригирани коефициенти на риска (HRs) от основни ССЗ в зависимост от изходната AER при пациентите, които са били рандомизирани да получават ACE-инхибитор (трандолаприл, приложен самостоятелно или комбиниран с верапамил), означени с непрекъсната линия, или са били без ACE-инхибитор (верапамил или плацебо), означени с пунктирана линия. Линиите показват оценената асоциация, когато логаритмувания риск се моделира като линейна функция на логаритмуваната AER. Референтната стойност (HR=1) е определена при AER <1 µg/min. HRs са коригирани за възраст, пол, давност на диабета, анамнеза за ССЗ, тютюнопушене, индекс на телесна маса, средно артериално налягане, логаритмуваните стойности на HbA_{1c}, LDL/HDL, триглицериди и серумен креатинин, както и това дали пациентът е бил рандомизиран да получава ACE-инхибитор.

Обаче, при пациентите, които в BENEDICT-A приемаха ACE-инхибитор рискът от основни ССЗ беше еднакво нисък за всяка стойност на AER в началото на проучването и не наблюдавахме асоциация между повишаването на албуминурията и риска от ССЗ по време на целия период на наблюдение **(Фигура 21).**

4.3. Изследване дали добавянето на ndCCB верапамил към ACE-инхибитора трандолаприл, може допълнително да забави прогресията на микроалбуминурията до макроалбуминурия (основна цел), да потенцира регресията на микроалбуминурията до нормоалбуминурия и да ограничи ССЗ (вторични цели) при хипертензивни пациенти със ЗД-2, микроалбуминурия и нормална бъбречна функция

Профилът на проучването BENEDICT-B е показан на **Фигура 22.**



Фигура 22. Профил на проучването BENEDICT-B.

От февруари 1998 г. до февруари 2004 г., общо 281 пациенти с микроалбуминурия бяха рандомизирани да получават трандолаприл 2 mg/ден или ВераТран 180/2 mg/ден. От тях 198 са пациенти с микроалбуминурия от момента на тяхното включване в проучването (*de novo*) и 83 са пациенти, които са развили микроалбуминурия по време на участието си във фаза А.

Пациентите бяха проследени за среден период от време 4.5 години (IQR, минимум–максимум интервал 2.2–5.9). Между двете групи нямаше статистически значими разлики в основните демографски, клинични и лабораторни характеристики, а също и в съпътстващите терапии в началото на проучването и по време на проследяването **(Таблица 9 и Таблица 10)**.

Таблица 9. Демографски, клинични и лабораторни характеристики на изходното ниво на пациентите от двете групи, рандомизирани да получават съответно ВераТран и Трандолаприл.

Показател	**ВераТран** (n = 138)	**Трандолаприл** (n = 143)
Демографски		
Възраст [години]	62.3 ± 8.5	62.4 ± 8.2
Мъжки пол, n [%]	104 (75.4)	103 (72.0)
Клинични		
ИТМ [kg/m^2]	29.4 ± 4.7	30.0 ± 4.7
Давност на диабета [години]	9.0 ± 7.0	9.5 ± 6.9
Тютюнопушене, n [%]		
Да	27 (18.9)	29 (21.0)
Не	54 (41.2)	65 (43.5)
Ех-пушачи	57 (39.9)	49 (35.5)
Артериално налягане [mmHg]		
СКН	150.1 ± 16.0	148.9 ± 16.7
ДКН	86.5 ± 9.5	86.2 ± 9.0
САН	107.7 ± 10.5	107.1 ± 10.4
Лабораторни		
HbA_{1c} [%]*	6.1 ± 1.7	6.1 ± 1.7
Албуминурия [μg/min]º	38.1 (28.1-77.3)	39.1 (26.4-71.3)
Серумен креатинин [μmol/L]	85.0 ± 15.9	83.8 ± 16.0
Триглицериди [mmol/L]	1.9 ± 1.1	1.8 ± 0.9
Тотален холестерол [mmol/L]	5.37 ± 1.00	5.36 ± 0.95
Бивши участници от BENEDICT-A	41 (29.7)	42 (29.4)

Данните са средна аритметична стойност ± стандартно отклонение (SD); Абсолютна честота [%]; *HbA_{1c}, референтни стойности 3.53-5.21%; ºМедиана (минимум-максимум интервал).

Таблица 10. Основни терапии при пациентите, рандомизирани да получават ВераТран и Трандолаприл, на изходното ниво и по време на тяхното проследяване (follow-up).

ТЕРАПИЯ	ИЗХОДНО НИВО		FOLLOW-UP	
	ВераТран n=138	Трандолаприл n=143	ВераТран n=138	Трандолаприл n=143
Антидиабетна				
Само перорални антидиабетни лекарства	79 (57.2)	84 (58.7)	72 (52.2)	69 (48.2)
Инсулин и перорални антидиабетни лекарства	12 (8.7)	17 (11.9)	29 (21.0)	41 (28.7)
Само инсулин	14 (10.1)	11 (7.7)	16 (11.6)	10 (6.7)
Антихипертензивна				
Диуретици	43 (31.2)	47 (32.9)	121 (87.7)	121 (84.6)
Бета-блокери	8 (5.8)	9 (6.3)	20 (14.5)	23 (16.1)
dCCB	36 (26.1)	44 (30.8)	61 (44.2)	72 (50.3)
Симпатиколитици	42 (30.4)	46 (32.2)	92 (66.7)	100 (69.9)
Липидопонижаваща				
Статини	12 (8.7)	10 (6.7)	29 (21.0)	25 (17.5)
Фибрати	6 (4.3)	6 (4.2)	5 (3.6)	5 (3.5)
Статини и фибрати	0	0	5 (3.6)	4 (2.8)
Тромбоцитни антиагреганти	6 (4.3)	5 (3.5)	21 (15.2)	15 (10.5)

Абсолютна честота (%); Не се установиха статистически значими разлики в терапиите между двете групи пациенти както на изходното ниво, така и при проследяването им.

Контрол на артериалното налягане

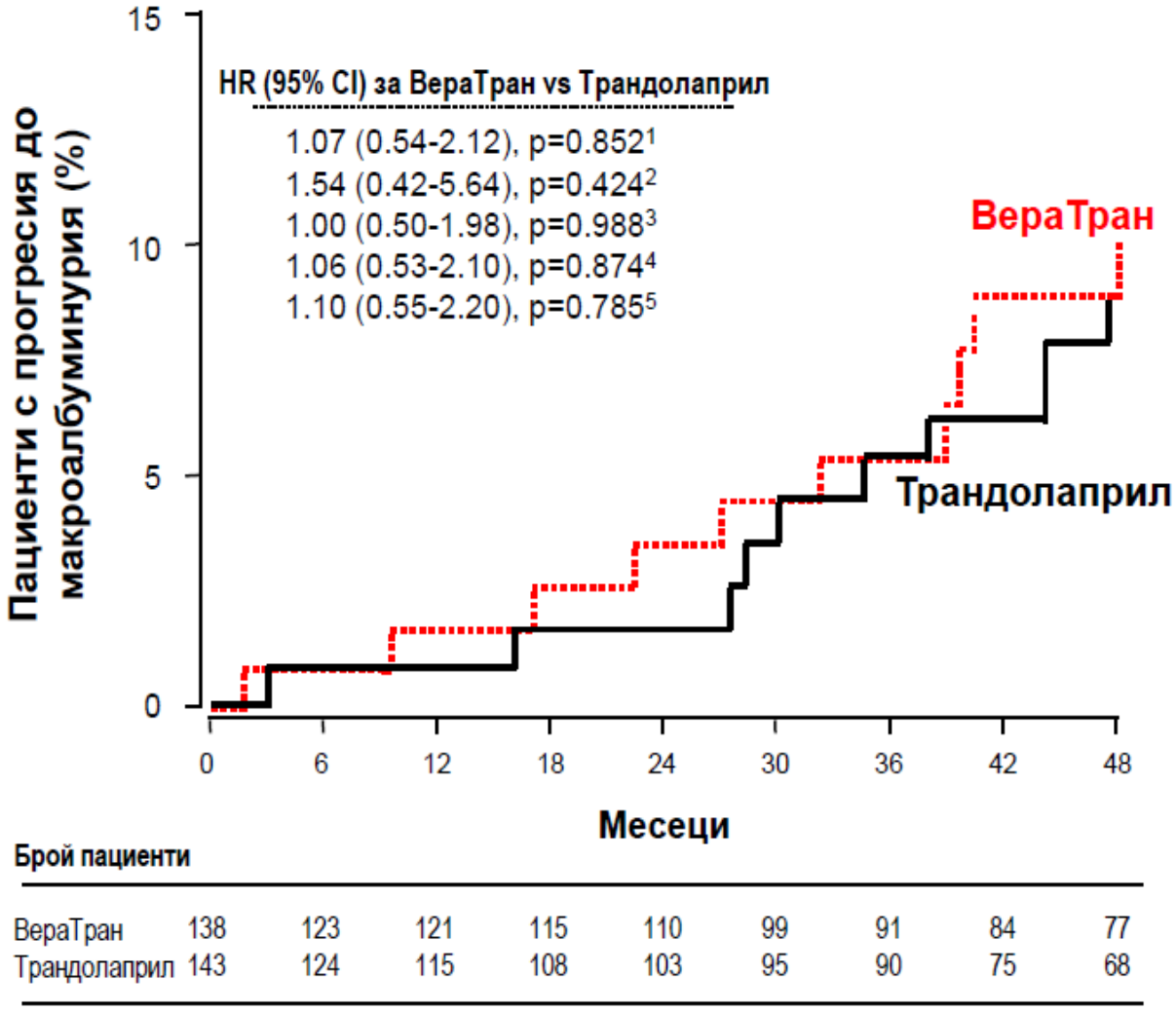
При всички пациенти взети заедно, средните стойности на СКН и ДКН се понижиха от 149.5±16.4 mmHg и 86.3±9.3 mmHg в началото до 141.4±11.8 mmHg и 81.9±6.5 mmHg в края на проучването (P<0.0001 за двете сравнения). В двете групи разгледани поотделно, се установи подобно понижаване на СКН (7.8±13.7 mmHg *vs* 7.9±14.1 mmHg, P=0.98) и на ДКН (4.7±8.1mmHg *vs* 4.0±8.3 mmHg, P=0.473), като в края на проучването нямаше разлики между СКН (141.0±11.5 mmHg *vs* 141.8±12.2 mmHg, P=0.58) и ДКН (81.6±6.4 mmHg *vs* 82.3±6.7 mmHg, P=0.37). При 46 (33.3%) пациенти в групата ВераТран и 38 (26.6%) пациенти в групата трандолаприл таргетната цел на АН беше постигната поне в един от медицинските прегледи, запланувани в периода на проследяване.

Албуминурия

При всички пациенти взети заедно, AER (медиана, IQR), се понижи статистически значимо от 38.7 μg/min (27.6-72.1 μg/min) в началото до 26.8 μg/min (12.6-54.6 μg/min) в края на проучването (P=0.0001). Средното намаление на AER в групата ВераТран (34.6%) и в групата трандолаприл (46.1%) беше подобно (P=0.96, ANCOVA).

Прогресия до макроалбуминурия

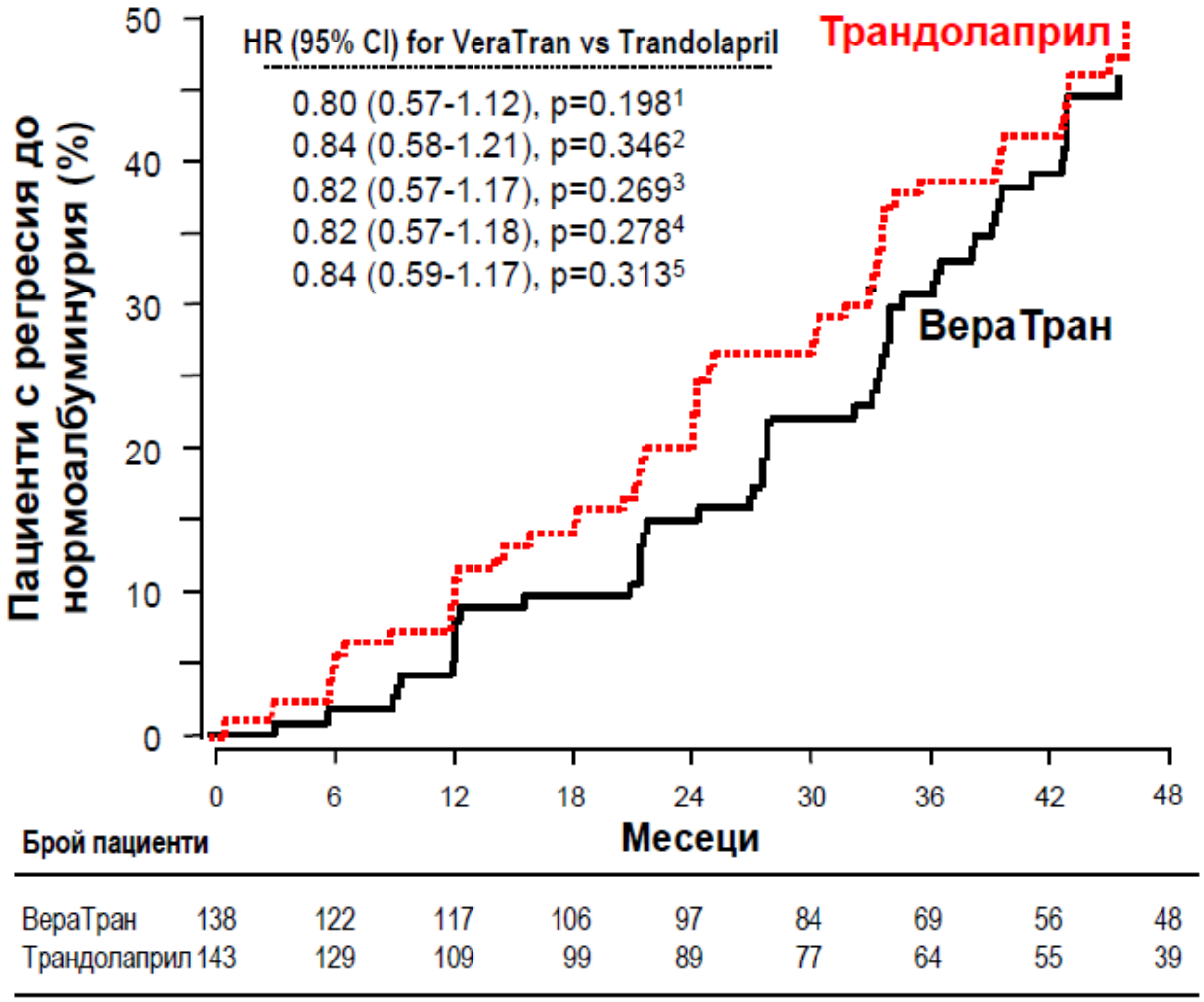
От всички пациенти взети заедно, 33 пациенти (11.7%) развиха трайна макроалбуминурия, потвърдена в две последователни изследвания на урината през два месеца, като 18 (13.0%) пациенти бяха в групата ВераТран и 15 (10.5%) пациенти бяха в групата трандолаприл. Честотата на поява на макроалбуминурия беше подобна между двете групи [некоригиран коефициент на риска (unadjusted HR) 1.07 (95% CI 0.54-2.12, P=0.852)] и се запази такава дори и след коригиране за влиянието върху появата на макроалбуминурия на предварително детерминирани изходни параметри и на СКН, ДКН и HbA_{1c}, измерени при проследяването на пациентите **(Фигура 23)**.



Фигура 23. Криви на Kaplan-Meier, показващи процента от пациентите с прогресия до макроалбуминурия в групите, разделени в зависимост от терапията. Разликата в честотата на прогресия на микроалбуминурията между двете групи не беше статистически значима както при некоригираните анализи (1), така и след коригирането за изходните параметри (2) и follow-up стойностите на СКН (3), ДКН (3) и HbA_{1c} (5).

Регресия до нормоалбуминурия

От всички пациенти взети заедно, AER се понижи статистически значимо до стойности от нормалния диапазон при 133 (47.3%), като 62 (44.9%) пациенти бяха в групата ВераТран и 71 (49.7%) пациенти бяха в групата трандолаприл. Честотата на регресията до нормоалбуминурия беше подобна между двете групи [некоригиран HR 0.80 (95% CI 0.57-1.1, P=0.198)] и се запази такава дори и след коригиране за влиянието върху регресията до нормоалбуминурия на предварително определените изходни параметри и на СКН, ДКН и HbA_{1c}, измерени при проследяването на пациентите **(Фигура 24)**.



Фигура 24. Криви на Kaplan-Meier, показващи процента от пациентите с регресия до нормоалбуминурия в групите, разделени в зависимост от терапията. Разликата в честотата на регресия на микроалбуминурията между двете групи не беше статистически значима както при некоригираните анализи (1), така и след коригирането за изходните параметри (2) и follow-up стойностите на СКН (3), ДКН (4) и HbA_{1c} (5).

Основни сърдечно-съдови усложнения

Общо 41 пациенти имаха фатални (1.8%) или нефатални (12.8%) сърдечно-съдови усложнения по време на проучването, от тях 20 (14.5%) пациенти бяха от групата ВераТран и 21 (14.7%) пациенти бяха от групата трандолаприл **(Таблица 11)**.

Таблица 11. Брой (%) пациенти с поне едно нежелано сериозно усложнение в двете основни групи според рандомизацията.

Сериозни инциденти	ВераТран (n = 138)	Трандолаприл (n = 143)
Фатални	2 (1.4)	7 (4.9)
Основни сърдечно-съдови заболявания	1 (0.7)	4 (2.8)
Внезапна сърдечна смърт	0	4 (2.8)
Инсулт	1 (0.7)	0
Раково заболяване	1 (0.7)	3 (2.1)
Нефатални	56 (40.6)	48 (33.6)
Основни сърдечно-съдови заболявания	19 (13.8)	17 (11.9)
Остър миокарден инфаркт	2 (1.4)	1 (0.7)
Инсулт / Преходна исхемична атака	4 (2.9)	4 (2.8)
Коронарна реваскуларизация	4 (2.9)	4 (2.8)
Каротидна реваскуларизация	2 (1.4)	3 (2.1)
Периферна реваскуларизация / ампутация	4 (2.9)	5 (3.5)
Хоспитализация поради сърдечна недостатъчност	3 (2.2)	0 (0.0)
Други сърдечно-съдови заболявания	6 (4.3)	2 (1.4)*
Раково заболяване	11 (8.0)	9 (6.3)
Други нежелани сериозни усложнения	30 (21.7)	25 (17.5)

*P<0.05 *vs* ВераТран

Честотата на случаите беше подобна между двете групи [некоригиран HR 0.93 (95% CI 0.50-1.72), P=0.816)] и се запази такава дори и след коригиране за влиянието на предварително определените изходни параметри и на СКН, ДКН и HbA_{1c}, измерени при проследяването на пациентите (данните не са показани).

Резултати според регресията или не до нормоалбуминурия

Пациентите, на които албуминурията се понижи до нормални стойности, сравнени с тези, които останаха с трайна микроалбуминурия или прогресираха до макроалбуминурия, по-често бяха от мъжки пол, демонстрираха тенденция за по-високи индекс на телесно тегло (ИТМ) и АН, по-кратка давност на диабета

и по-ниски стойности на HbA_{1c} и AER при започването на проучването **(Таблица 12).**

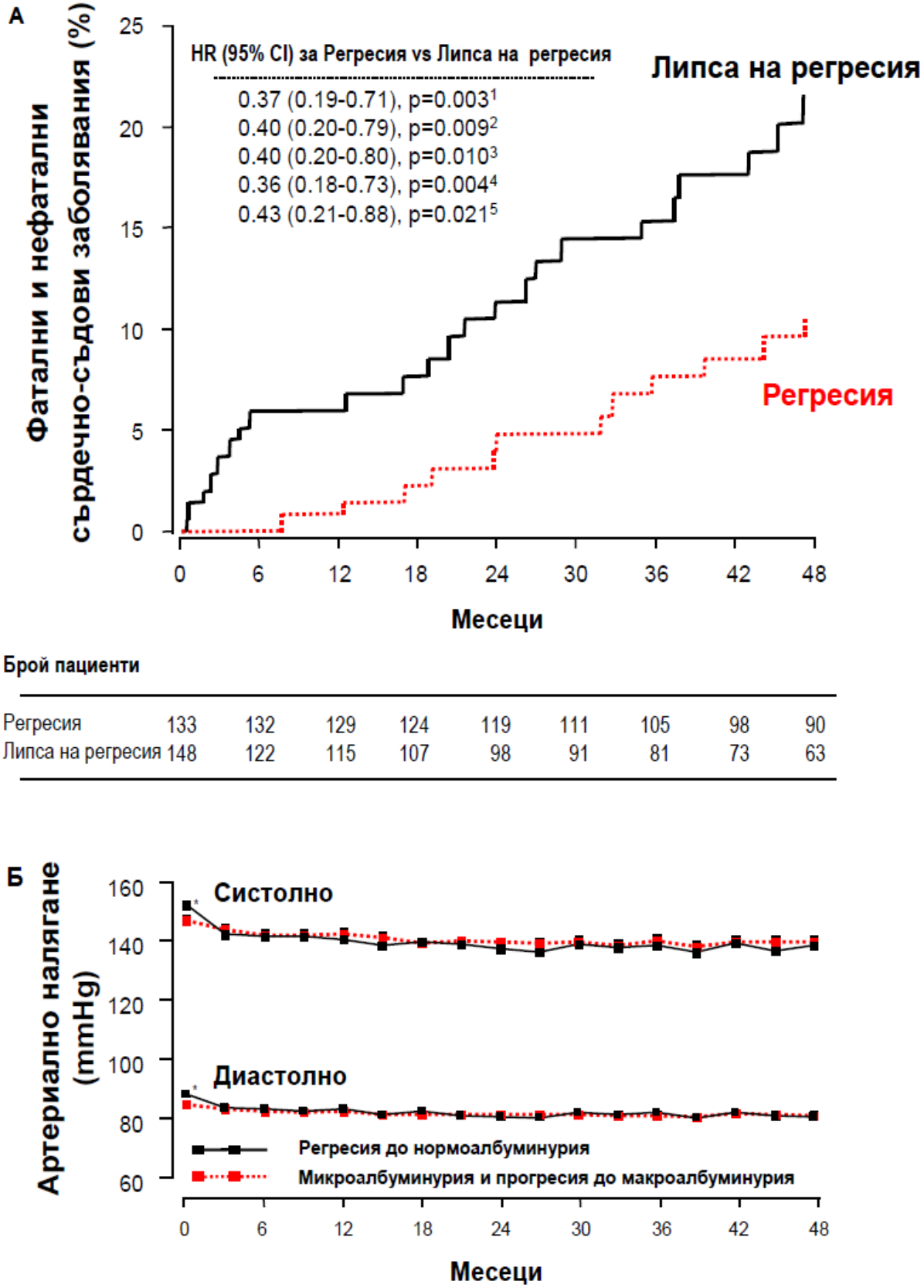
Таблица 12. Характеристика на изходното ниво на пациентите, разделени в зависимост от наличието или не на регресия до нормоалбуминурия по време на тяхното проследяване.

Показател	Регресия n = 133	Липса на регресия n = 148	P
Демографски			
Възраст [години]	62.1 ± 8.0	62.6 ± 8.7	0.628
Мъжки пол, n [%]	90 (67.7)	117 (79.1)	0.031
Клинични			
ИТМ [kg/m^2]	30.2 ± 4.9	29.2 ± 4.5	0.055
Давност на диабета [години]	7.8 ± 6.0	10.5 ± 7.4	0.0015
Тютюнопушене, n [%]			0.879
Да	25 (18.8)	31 (21.0)	
Ex-пушачи	44 (33.0)	39 (26.4)	
Кръвно налягане [mmHg]			
СКН	162.3 ± 46.2	147.1 ± 15.2	0.0074
ДКН	88.2 ± 9.9	84.7 ± 8.4	0.0035
САН	109.5 ± 11.3	105.5 ± 9.2	0.0021
Лабораторни			
HbA_{1c} [%]*	5.9 ± 1.4	6.5 ± 1.7	0.0036
Албуминурия [µg/min]º	34.2 (25.9 – 55.2)	45.2 (30.0 – 92.5)	<0.0001
Серумен креатинин [µmol/L]	83.8 ± 16.8	84.9 ± 15.0	0.517
Триглицериди [mmol/L]	161.7 ± 80.2	159.3 ± 95.6	0.302
Тотален холестерол [mmol/L]	210.8 ± 36.9	204.4 ± 37.8	0.123
Бивши участници от BENEDICT- A	44 (53.0)	39 (47.0)	0.217

Данните са средна аритметична стойност ± стандартно отклонение (SD); Абсолютна честота (%); *HbA_{1c}, референтни стойности 3.53-5.21%; ºМедиана (минимум-максимум, интервал).

Контрол на артериалното налягане и метаболитния профил

Средните стойности на СКН и ДКН се понижиха повече при пациентите, които регресираха до нормоалбуминурия, в сравнение с тези, които прогресираха до макроалбуминурия или останаха с трайна микроалбуминурия (-12.5±13.1 mmHg *vs* -3.6±13.2 mmHg, P<0.001, и - 6.8±8.2 mmHg *vs* – 2.1±7.7 mmHg, P<0.001, съответно), но в края на проучването пациентите с или без регресия на микроалбуминурията имаха подобно АН **(Фигура 25, Панел Б)**. Нямаше разлика между двете групи и в средните стойности на HbA_{1c} (6.5±1.33% *vs* 6.1±1.43%, P=0.889).



Фигура 25. Криви на Kaplan-Meier, показващи процента на фаталните и нефаталните сърдечно-съдови заболявания **(Панел А)** и СКН и ДКН **(Панел Б)** при проследяването на пациентите с или без регресия до нормоалбуминурия. Разликата в честотата на инцидентите между подгрупите беше статистически значима както при некоригираните анализи (1), така и след коригирането за предефинираните изходни параметри (2) и follow-up стойностите на СКН (3), ДКН (4) и HbA_{1c} (5). P<0.05 между двете подгрупи в един и същи момент от проследяването.

Сърдечно-съдови усложнения

Фатални или нефатални сърдечно-съдови усложнения се наблюдаваха в 13 (9.8%) от 133 пациенти, които регресираха до нормоалбуминурия, в сравнение с 28 (18.9%) от 148 пациенти, които останаха с трайна микроалбуминурия или прогресираха до макроалбуминурия **(Таблица 13)**.

Таблица 13. Брой (%) пациенти с поне едно нежелано сериозно усложнение в групите с или без регресия до нормоалбуминурия по време на тяхното проследяване.

Сериозни инциденти	Регресия (n = 133)	Липса на регресия (n = 148)
Фатални	3 (2.3)	6 (4.1)
Основни сърдечно-съдови заболявания	2 (1.5)	3 (2.0)
Внезапна сърдечна смърт	2 (1.5)	2 (1.4)
Инсулт	0	1 (0.7)
Раково заболяване	1 (0.8)	3 (2.0)
Нефатални	47 (35.3)	57 (38.5)
Основни сърдечно-съдови заболявания	11 (8.3)	25 (16.9)*
Остър миокарден инфаркт	1 (0.8)	2 (1.4)
Инсулт / Преходна исхемична атака	3 (2.3)	5 (3.4)
Коронарна реваскуларизация	3 (2.3)	5 (3.4)
Каротидна реваскуларизация	1 (0.8)	4 (2.7)
Периферна реваскуларизация / ампутация	2 (1.5)	7 (4.7)
Хоспитализация поради сърдечна недостатъчност	1 (0.8)	2 (1.4)
Други сърдечно-съдови инциденти	6 (4.5)	2 (1.4)
Раково заболяване	14 (10.5)	6 (4.1)*
Други нежелани сериозни усложнения	23 (17.3)	32 (21.6)

*P<0.05 *vs* Регресия

Разликата между честотите на сърдечно-съдовите усложнения в тези групи беше статистически значима [некоригиран HR 0.37 (95% CI 0.19-0.71), P=0.003)] и се запази такава дори и след коригиране за влиянието на изходните параметри и на СКН, ДКН и HbA_{1c}, измерени при проследяването на пациентите **(Фигура 25, Панел А)**.

Безопасност

Общо 113 пациенти (40.2%) имаха поне едно сериозно нежелано усложнение в периода между приемането на първата доза от изследваното лекарство и две седмици след прекратяване на проучването като 58 (42.0%) от тях бяха в групата ВераТран и 55 (38.5%) пациенти бяха в групата трандолаприл **(Таблица 11)**. В групата на пациентите с трайна

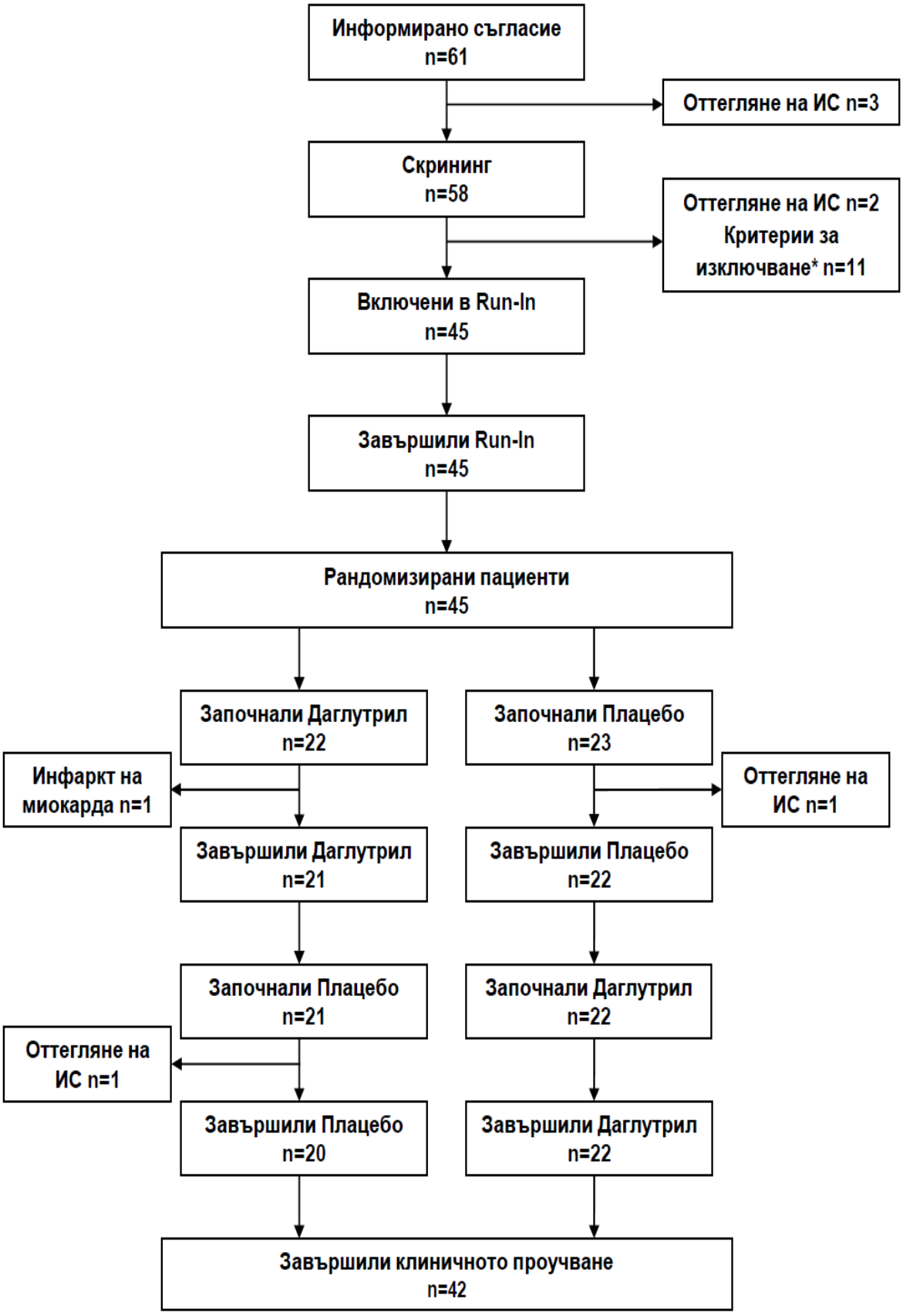
микроалбуминурия или прогресия до макроалбуминурия 63 (42.6%) пациенти имаха поне едно сериозно нежелано усложнение, в сравнение с 50 (37.6%) пациенти в групата с регресия до нормоалбуминурия **(Таблица 13)**. Разликата се дължеше на големия брой сърдечно-съдови усложнения в групата на пациентите без регресия на микроалбуминурията.

Лечението се понесе добре. При 33 пациенти се появи кашлица, която доведе до преустановяване на участието им в проучването, като от тях 20 пациенти (14.5%) бяха в групата ВераТран и 13 (9.1%) в групата трандолаприл. Нито един пациент не се оттегли от проучването поради хиперкалиемия.

4.4. Изследване ефектите на даглутрил, инхибитор на ECE и NEP, върху албуминурията, артериалното налягане, бъбречната функция и профила на безопасност на фона на лосартан, при пациенти със ЗД-2, АХ и диабетна нефропатия (микро- и макроалбуминурия)

От 61 пациенти, подписали информирано съгласие за участие в проучването, 3 пациенти го оттеглиха и 58 пациенти влязоха във фазата на скрининг **(Фигура 26)**. От тях 2 пациента оттеглиха информираното си съгласие, а при 11 пациенти бяха установени критерии за изключване от проучването. Така бяха рандомизирани 45 пациенти, 22 пациенти в групата с последователност на терапията даглутрил–плацебо и 23 пациенти с последователност плацебо–даглутрил. Три пациенти не завършиха проучването: един поради остър инфаркт на миокарда, последван от фатален исхемичен мозъчен инсулт, които според нас не бяха свързани с изпитваното лекарство. Два пациента оттеглиха информираното си съгласие. Оттеглянето на информираното съгласие в различните фази на проучването беше свързано с невъзможност на съответния пациент да участва във всички запланувани изследвания. В статистическите анализи бяха включени резултатите на 42 пациенти.

На всички участници в проучването беше извършено амбулаторно мониториране на артериалното налягане, но в крайните анализи бяха включени само записите на 34 пациенти, които отговаряха на критериите за валидност на пълен 24-часов запис (Трета глава, раздел 3.5.3.2.). Тридесет и шест пациенти извършиха изследвания на бъбречната функция.



Фигура 26. Профил на проучването. ИС – информирано съгласие; * 2 AER <20 µg/min, 4 AER ≥1000 µg/min, 3 хематурия, 1 високо ниво на чернодробните трансаминази, 1 рак на пикочния мехур.

Двете групи пациенти (даглутрил-плацебо, плацебо-даглутрил) не се различаваха по основните демографски, клинични и лабораторни характеристики (**Таблица 14, Таблица 15).**

Таблица 14. Главни демографски и клинични характеристики на двете групи пациенти в момента на рандомизирането.

	Даглутрил - Плацебо			**Плацебо - Даглутрил**		
	n	$\bar{x}$	SD	n	$\bar{x}$	SD
Възраст [години]	22	62.0	7.7	23	65.7	6.4
Пол [мъже/жени]*	22	22/0		23	20/3	
ИТМ [kg/m^2]	22	30.6	4.5	23	30.8	6.2
HbA$_{1c}$ [%]	22	6.20	1.43	23	5.79	1.26
Кръвно налягане [mmHg]						
В лекарския кабинет						
СКН	22	135.9	9.3	23	139.4	9.2
ДКН	22	77.6	6.9	23	77.4	6.4
Пулсово налягане	22	59.5	11.5	23	65.0	12.4
САН	22	99.3	7.5	23	101.9	7.2
Амбулаторно КН						
СКН	17	132.6	9.9	17	130.7	12.1
ДКН	17	74.7	7.3	17	73.5	8.2
Пулсово налягане	17	59.0	9.3	17	57.8	10.1
САН	17	93.6	7.0	17	91.7	8.4
Дневен период						
СКН	17	134.6	10.5	17	132.6	12.6
ДКН	17	76.5	7.6	17	75.2	8.3
Пулсово налягане	17	59.2	9.4	17	58.0	10.5
САН	17	96.2	7.6	17	94.3	8.6
Нощен период						
СКН	17	126.6	11.0	17	124.0	12.2
ДКН	17	68.3	7.8	17	66.8	9.0
Пулсово налягане	17	58.2	10.4	17	57.2	9.3
САН	17	87.7	7.5	17	85.9	9.2

* Абсолютна честота; $\bar{x}$ **-** средна аритметична стойност; SD - стандартно отклонение; HbA$_{1c}$ - гликолизиран хемоглобин; ИТМ - индекс на телесна маса; КН - кръвно налягане; СКН - систолно кръвно налягане; ДКН - диастолно кръвно налягане; САН - средно артериално налягане.

Таблица 15. Основните бъбречни показатели и пептиди на двете групи пациенти в момента на рандомизирането.

	Даглутрил - Плацебо			Плацебо - Даглутрил		
	n	$\bar{x}$	SD	n	$\bar{x}$	SD
24-часова AER [µg/min]°	22	136.2 [81.7-219.3]		23	73.4 [38.9-192.8]	
Бъбречни функционални параметри						
СГФ [ml/min/1.73 m^2]	18	88.9	20.5	18	71.7	24.6
RPF [ml/min/1.73 m^2]	18	387.7	102.1	18	331.6	107.0
Филтрационна фракция (%)	18	26.7	17.3		21.3	5.0
RVR [mmHg/ml/min/1.73 m^2]	18	0.28	0.07		0.34	0.12
Фракционен клирънс на албумина [x10^5]	18	4.70	3.71	18	6.71	7.09
Фракционен клирънс на IgG [x10^5]	18	0.84	1.2	18	0.96	0.89
Екскреция на Na [mEq/24ч]	22	249.3	89.1	23	227.8	65.3
Пептиди						
Big-ендотелин [fmol/ml]	22	0.35	0.05	23	0.37	0.13
N-ANP [pmol/l]	22	1759.1	1274.3	23	2212.8	1349.2

°Медиана (IQR, минимум–максимум) ; $\bar{x}$ - средна аритметична стойност; SD - стандартно отклонение; СГФ - скорост на гломерулна филтрация; RPF - ренален плазмен ток; RVR - бъбречно съдово съпротивление; N-ANP - N-про-атриален натриуретичен пептид.

При повечето пациенти за постигането на таргетната стойност на АН 130/80 mmHg освен лосартан, бяха включени едно или две антихипертензивни лекарства (**Таблица 16**).

Таблица 16. Антихипертензивни лекарства на двете групи пациенти в момента на рандомизирането.

	Даглутрил - Плацебо (n = 22)	Плацебо - Даглутрил (n = 23)	P
Лосартан	22 (100)	23 (100)	
Антиадренергични агенти *	11(50.0)	8 (34.8)	> 0.05
Бета-блокери	4 (18.2)	8 (34.8)	> 0.05
Калциеви антагонисти	7 (31.8)	12 (52.2)	> 0.05
Диуретици	21 (95.5)	18 (78.3)	> 0.05
Пациенти само на лосартан	1 (4.6)	2 (8.7)	> 0.05
+ още едно АХ лекарство	9 (40.9)	6 (26.1)	> 0.05
+ още две АХ лекарства	10 (45.5)	10 (43.5)	> 0.05
+ още три АХ лекарства	2 (9.1)	3 (13.0)	> 0.05
+ още четири АХ лекарства	0	2 (8.7)	> 0.05
Брой АХ лекарства на пациент	3 (2-3)	3 (2-3)	> 0.05
Пациенти с КН <130/80 mmHg	4 (18.2)	1 (4.4)	> 0.05

Абсолютна честота (%); * клонидин или доксазозин; АХ - антихипертензивно лекарство.

Кръвно-захарният профил на всички пациенти беше контролиран с нискокалорийна диета (1600 kcal/ден) и с орални антидиабетни лекарства. При 14 пациенти беше включена и терапия с инсулин.

Приложението на даглутрил и плацебо не доведе до статистически значими разлики в 24-часовата AER както при всички пациентите взети заедно, така и в подгрупите на пациентите с микроалбуминурия или макроалбуминурия **(Таблица 17)**.

Таблица 17. Скорост на екскреция на албумина (AER) при всички пациенти взети заедно и разгледани поотделно според степента на AER в момента на рандомизирането: микроалбуминурия (≥20 <200 µg/min) и макроалбуминурия (≥200 <1000 µg/min).

	Даглутрил			Плацебо			Даглутрил vs Плацебо	
	Преди	След	P*	Преди	След	P*	Абсолютна разлика	P°
Всички пациенти (n=42)	116.0 (51.3 - 211.6)	116.3 (48.3 - 203.3)	0.808	87.8 (45.1 - 190.5)	102.7 (52.7 - 231.0)	0.467	7.6 (-78.7 - 19.0)	0.559
Микроалбуминурия (n=30)	80.9 (43.3 - 134.9)	91.0 (38.3 - 129.3)	0.443	62.6 (40.3 - 105.1)	73.3 (45.7 - 118.8)	0.217	7.4 (-53.4 - 18.8)	0.762
Макроалбуминурия (n=12)	274.5 (232.7 - 382.5)	249.5 (186.1 - 378.2)	0.135	258.3 (178.1 - 396.7)	253.7 (190.1 - 352.7)	0.423	73.9 (-119.5 - 47.6)	0.482

Данните са AER (µg/min), медиана (IQR, минимум-максимум); Intention-to-treat анализ при всички пациенти; Анализи по протокол за пациентите с микроалбуминуруя и макроалбуминурия при рандомизирането; *Paired t-test: преди и след приложената терапия; °Paired t-test: даглутрил *vs* плацебо.

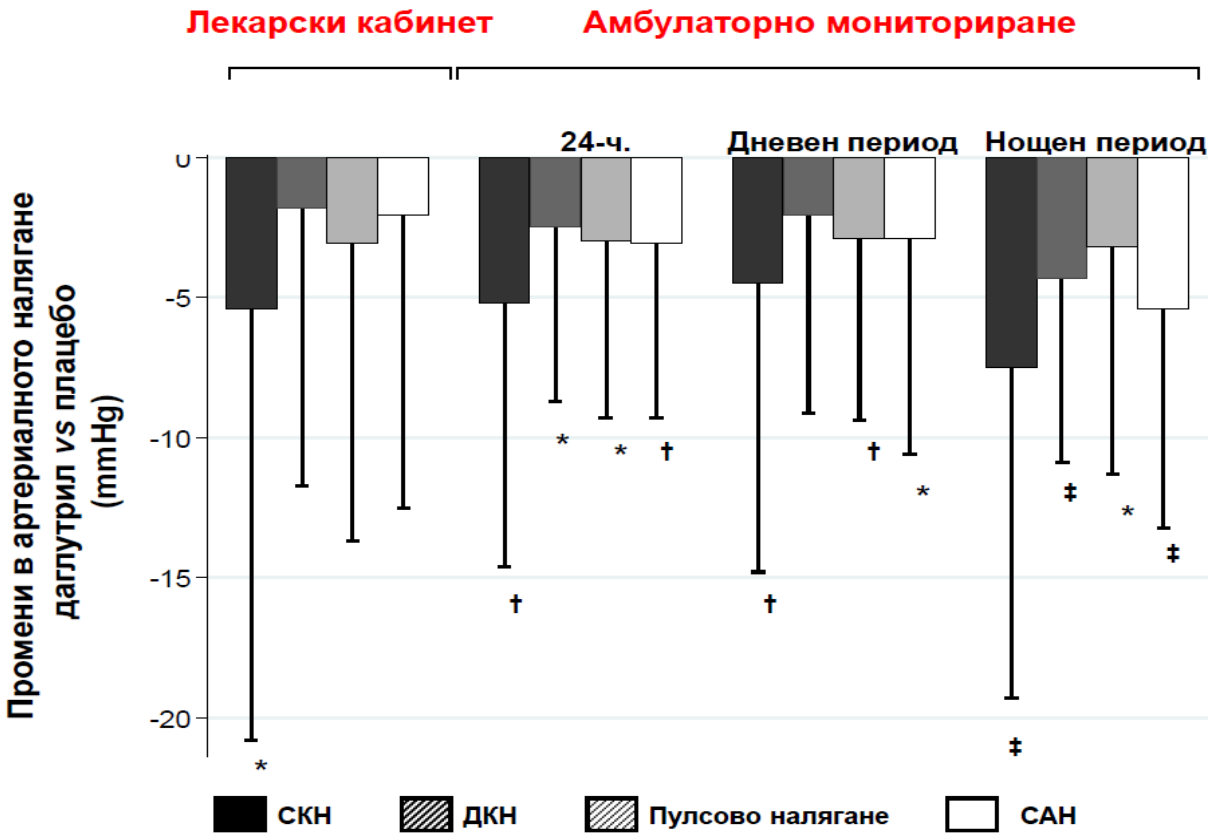
Кръвното налягане (систолно и диастолно), измерено в лекарския кабинет не се промени сигнификантно при терапията с даглутрил, но се увеличи по време на приложението на плацебо **(Таблица 18)**. Разликата между промените в СКН между двете групи пациенти (даглутрил и плацебо) беше статистически значима, докато разликите между промените в диастолното, пулсовото и средното артериално налягане останаха подобни **(Таблица 18, Фигура 27)**.

Двадесет и четири часовият запис на артериалното налягане демонстрира статистически значимо понижение на систолното и пулсовото налягане и липса на промяна в средното и диастолното артериално налягане по време на терапията с даглутрил **(Таблица 18)**.

Таблица 18. Сравняване на стойностите на артериалното налягане преди и след приложението на даглутрил и плацебо, и на разликите между двете терапии.

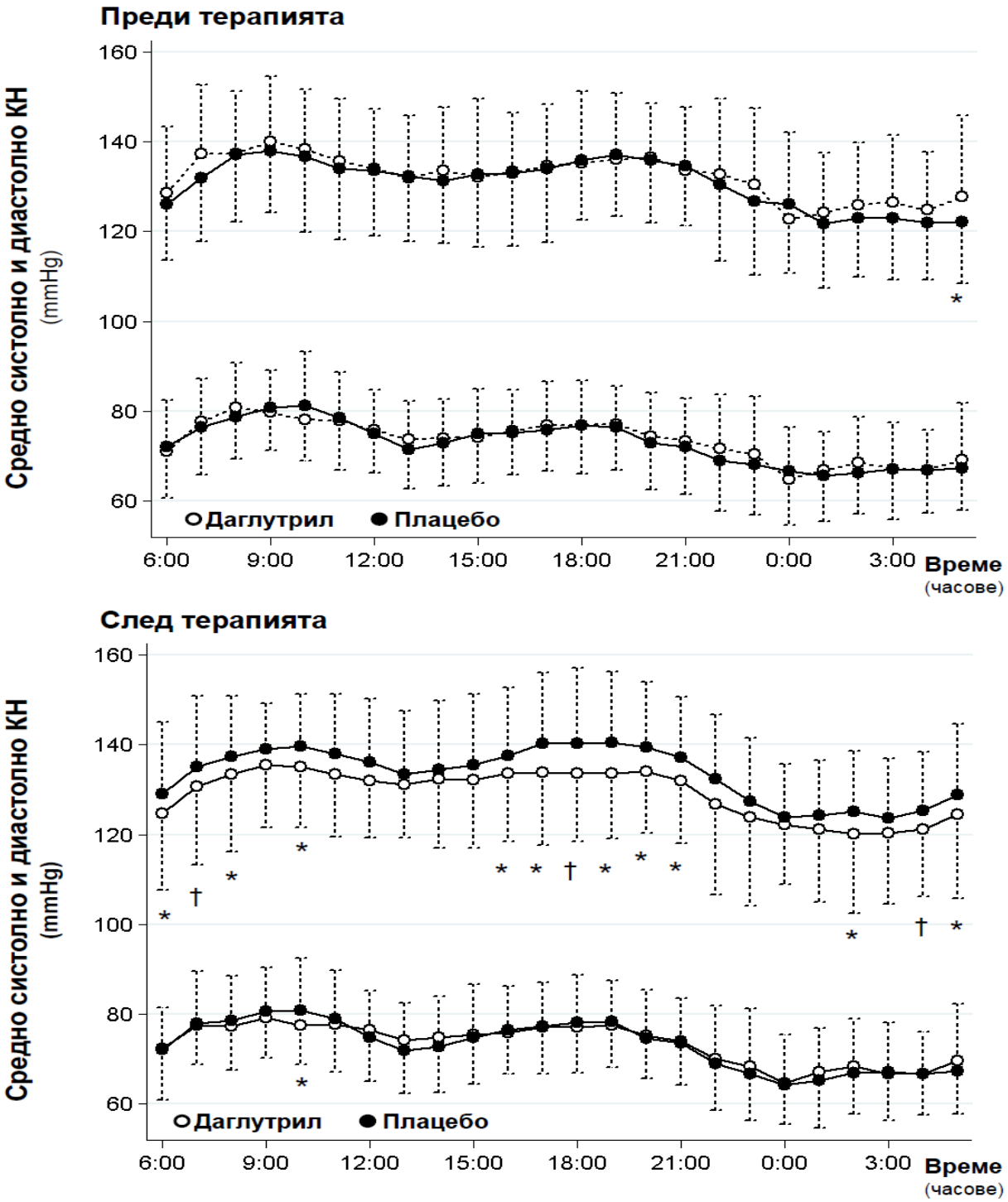
	Даглутрил			Placebo			Даглутрил vs Placebo	
Кръвно налягане [mmHg]	**Преди**	**След**	**P***	**Преди**	**След**	**P***	**Абсолютна разлика**	**P°**
В лекарския кабинет	n=42	n=42		n=42	n=42			
СКН	140.6 ± 14.0	140.8 ± 14.7	0.975	139.5 ± 13.0	144.7 ± 16.7	0.006	-5.4 ± 15.4	0.028
ДКН	79.0 ± 7.9	78.9 ± 8.5	0.886	77.6 ± 7.9	79.9 ± 7.5	0.032	-1.8 ± 9.9	0.245
Пулсово налягане	59.5 ± 11.5	61.9 ± 14.5	0.267	63.6 ± 14.1	64.9 ± 15.8	0.296	-3.1 ± 10.6	0.210
САН	100.6 ± 8.7	99.5 ± 8.5	0.355	100.2± 8.5	101.5 ± 8.6	0.326	-2.1 ± 10.4	0.205
Амбулаторно КН	n=34	n=34		n=34	n=34			
СКН	132.9 ± 10.7	129.9 ± 12.0	0.016	132.4 ± 11.3	134.4 ± 11.5	0.118	-5.2± 9.4	0.0013
ДКН	74.6 ± 7.6	73.9 ± 8.0	0.247	74.0 ± 7.4	76.0 ± 7.3	0.041	-2.5± 6.2	0.015
Пулсово налягане	59.1 ± 9.9	56.9 ± 11.1	0.0034	59.0 ± 10.7	59.4 ± 10.9	0.372	-3.0± 6.3	0.019
САН	93.3 ± 7.3	91.7 ± 8.2	0.058	92.9 ± 7.3	94.4 ± 7.4	0.106	-3.1± 6.2	0.0030
Дневен период	n=34	n=34		n=34	n=34			
СКН	134.7 ± 11.0	132.2 ± 12.0	0.052	134.6 ± 11.8	136.6 ± 12.1	0.142	-4.5± 10.3	0.0080
ДКН	76.3 ± 7.8	75.8 ± 8.2	0.568	75.9 ± 7.6	77.8 ± 7.6	0.061	-2.1± 7.0	0.071
Пулсово налягане	59.3 ± 10.2	57.1 ± 11.1	0.0034	59.3 ± 11.0	59.7 ± 11.2	0.46	-2.9± 6.5	0.0067
САН	95.7 ± 7.5	94.6 ± 8.0	0.214	95.5 ± 7.7	97.4 ± 7.7	0.076	-2.9 ± 7.7	0.022
Нощен период	n=34	n=34		n=34	n=34			
СКН	126.6 ± 12.4	122.2 ± 15.0	0.0055	124.4 ± 11.4	126.9 ± 11.7	0.086	-7.5± 11.8	0.0003
ДКН	68.3 ± 8.5	65.7 ± 9.0	0.0026	66.7 ± 7.8	68.6 ± 8.0	0.087	-4.3± 6.6	0.0002
Пулсово налягане	58.3 ± 10.0	56.5 ± 11.9	0.062	57.6 ± 10.6	58.3 ± 10.8	0.372	-3.2± 8.1	0.019
САН	87.8 ± 8.8	84.6 ± 9.9	0.0026	85.9 ± 7.7	88.1 ± 7.9	0.065	-5.4± 7.8	<0.0001

Данните са представени като средна стойност (mmHg) ± стандартно отклонение (SD); *Многократни измервания ANOVA (Repeated Measures ANOVA): Преди *vs* След; °Repeated measures ANOVA: Даглутрил *vs* Плацебо.



Фигура 27. Промени в артериалното налягане: даглутрил *vs* плацебо. Стандартната грешка е представена като SD. *P<0.05; †P<0.01; ‡P<0.001.

В групата на пациентите приемащи плацебо се наблюдава статистически значимо повишаване на ДКН. Даглутрил, сравнен с плацебо, предизвика статистически значимо понижаване на всички 24-часови показатели на АН с най-силно изразен ефект върху СКН **(Таблица 18, Фигура 27, Фигура 28)**.



Фигура 28. Двадесет и четири часово СКН и ДКН: преди (горен панел) и след (долен панел) терапията с даглутрил и плацебо. Стандартните грешки са представени като SDs. Според авторегресионния модел разликите в СКН и ДКН след терапията с плацебо *vs* даглутрил са статистически значими (P<0.0001 и P=0.01). *P<0.05; †P<0.01.

Според приложения авторегресионен модел разликите в СКН и ДКН в края на терапията с плацебо *vs* даглутрил бяха статистически значими **(Фигура 28)**. Чувствителните анализи, извършени с помощта на параметрични и непараметрични методи на импутиране, заместващи липсващите стойности, потвърдиха достоверността на получените резултати.

Дневните записи на амбулаторното артериално налягане показаха сигнификантно понижение на пулсовото налягане при лечението с даглутрил и липса на промяна при приложението на плацебо. Даглутрил предизвика статистически значимо понижение на систолното, пулсовото и средното артериално налягане, в сравнение с плацебо **(Таблица 18, Фигура 27, Фигура 28)**. Резултатите от нощните записи на АН демонстрираха, че даглутрил сигнификантно понижава систолното, диастолното и средното артериално налягане, докато приложението на плацебо не предизвиква статистически значими разлики в изучаваните параметри. Промените, предизвикани от даглутрил във всички показатели на АН, регистрирани през нощта, бяха статистически значими в сравнение с тези, предизвикани от плацебо **(Таблица 18, Фигура 25, Фигура 26)**.

Скоростта на гломерулна филтрация, реналният плазмен ток, филтрационната фракция и резистентността на бъбречните съдове не се промениха преди и след всеки период на лечение, като ефектът на даглутрил върху тези показатели не се различаваше от този на плацебо **(Таблица 19).** Фракционният клирънс на IgG се увеличи при терапията с даглутрил, но не и при приложението на плацебо. Ефектът на даглутрил върху фракционните клирънси на IgG и на албумина не се различаваше от този на плацебо. Двадесет и четири часовата екскреция на натрий с урината беше стабилна по време на проучването.

Таблица 19. Бъбречни функционални показатели и пептиди (обяснителни параметри).

	Даглутрил			Плацебо			Даглутрил vs Плацебо	
	Преди	След	P*	Преди	След	P*	Абсолютна разлика	P°
Бъбречни функционални параметри								
GFR [ml/min/1.73 m^2]	84.7 ± 23.7	82.9 ± 24.4	0.417	81.8 ± 29.6	85.5 ± 26.7	0.343	-4.8 ± 23.2	0.185
RPF [ml/min/1.73 m^2]	370.7 ± 103.6	361.1 ± 126.1	0.444	357.6 ± 134.3	410.1 ± 177.4	0.114	-36.9 ± 181.0	0.328
Филтрационна фракция [%]	24.5 ± 12.4	23.8 ± 7.3	0.563	22.3 ± 5.7	23.2 ± 5.6	0.555	-5.3 ± 17.0	0.138
RVR [mmHg/ml/min/1.73 m^2]	0.30 ± 0.11	0.31 ± 0.10	0.456	0.32 ± 0.12	0.32 ± 0.18	0.991	0.0 ± 0.2	0.917
Фракционен клирънс на албумина [$x10^5$]	6.15 ± 6.82	8.41 ± 9.44	0.054	6.16 ± 6.95	6.52 ± 6.37	0.804	2.0 ± 8.6	0.144
Фракционен клирънс на IgG [$x10^5$]	0.96 ± 1.06	1.35 ± 1.50	0.016	0.82 ± 0.77	0.87 ± 0.62	0.667	0.4 ± 1.7	0.178
Екскреция на Na [mEq/24-h]	231.0 ± 79.80	216.2 ± 62.5	0.344	234.2 ± 65.1	234.7 ± 99.1	0.360	0.0 ± 0.4	0.814
Пептиди (обяснителни параметри)								
Big-ендотелин [fmol/ml]	0.36 ± 0.09	0.42 ± 0.14	0.0055	0.36 ± 0.09	0.35 ± 0.05	0.747	0.06 ± 0.15	0.010
N-ANP [pmol/l]	1901.3± 1112.3	2089.8± 1337.2	0.109	1943.1 ± 1351.1	1937.1 ± 1297.0	0.950	194.5 ± 1112.7	0.264

GFR - скорост на гломерулна филтрация; RPF - ренален плазмен ток; RVR - бъбречно съдово съпротивление; N-ANP - N-про-атриален натриуретичен пептид; *Повторни измервания ANOVA: преди *vs* след; °Повторни измервания ANOVA: Даглутрил *vs* Плацебо. Данните са средна аритметична стойност ± стандартно отклонение.

При терапията с даглутрил серумната концентрация на Big-ET се увеличи статистически значимо, а на про-ANP не се промени. Приложението на плацебо не доведе до сигнификантни промени в тези показатели. Ефектът на даглутрил върху Big-ET, сравнен с плацебо, беше статистически значим, но не се различаваше от ефекта на плацебо по отношение на про-ANP **(Таблица 19)**. Анализите на първичните и вторичните променливи за ефикасност, направени според протокола, потвърдиха резултатите, получени с модифицираните intention-to-treat анализи (данните не са публикувани). Не установихме carry-over ефект върху изучаваните параметри.

Лечението се понесе добре от всички пациенти. Нямаше сериозни НЛР предизвикани от проведената терапия, а при осем пациенти бяха регистрирани леки НЛР. При 6 от пациентите те бяха по време на приемането на даглутрил: 3 пациенти бяха с периферен оток и един с оток на лицето. При единия от пациентите периферният оток спадна след намаляване дозата на dCCB

ласидипин от 8 mg/ден на 4 mg/ден и повишаване дозата на диуретика хидрохлоротиазид от 25 mg/ден на 50 mg/ден. При втория пациент, отокът не отмина след увеличаване дозата на хидрохлоротиазид от 12.5 mg/ден до 25 mg/ден и се задържа 2 седмици след прекратяване на терапията. Отокът на лицето беше свързан с признаци на задръжка на течности (наддаване на тегло, намалена концентрация на хематокрит и на хемоглобин) и отмина след приключване на лечението. Другите две НЛР, регистрирани по време на лечението с даглутрил, бяха I степен AV-блок и преходна хипотония. Приложението на плацебо също доведе до поява на I степен AV-блок при 2 пациента. Регистрираните осем НЛР не наложиха намаляване на дозата на изследваното лекарство или прекратяване на участието в проучването. Като цяло, даглутрил не предизвика значими промени в концентрациите на хемоглобина и хематокрита, чернодробните ензими, холестерола и триглицеридите, кръвната захар на гладно, HbA_{1c} и индекса на телесна маса (непубликувани данни).

ПЕТА ГЛАВА

ОБСЪЖДАНЕ НА ПОЛУЧЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ

5.1. Изследване ефекта на АСЕ-инхибира трандолаприл, приложен самостоятелно или в комбинация с ndCCB верапамил, върху честотата на поява на микроалбуминурия при хипертензивни пациенти със ЗД-2 и нормоалбуминурия

BENEDCT-A е първото голямо, лонгитудинално, рандомизирано клинично проучване, което изследва дали може да бъде предотвратена появата на трайна микроалбуминурия с комбинацията ВераТран или трандолаприл, приложен самостоятелно, при хипертензивни пациенти със ЗД-2 и нормоалбуминурия. Установява се, че инхибирането на АСЕ с трандолаприл, приложен самостоятелно или комбиниран с ndCCB верапамил намалява честотата на поява на микроалбуминурия, съответно с 53% и 61% в сравнение с плацебо, като ефектът е независим от промените в СКН и ДКН, и е особено силно изразен при пациентите с недобре контролирано АН. Верапамил не успява да намали честотата на поява на микроалбуминурия, неговият ефект е подобен на този на плацебо.

Превенцията на микроалбуминурията е ключов момент в ренопротекцията [UK Prospetcive Diabetes Study (UKPDS) Group, 1998 (a); UK Prospetcive Diabetes Study (UKPDS) Group, 1998 (б); De Zeeuw D, 2004; Williams ME, 2005], но до 2004 г. няма публикувани резултати от голямо рандомизирано клинично проучване, което да изследва възможността за предотвратяване появата ѝ при пациенти със ЗД-2. Все пак има данни, които подсказват, че инхибирането на RAS може да бъде ефективно освен в лечението на ДН, също и в профилактиката на микроалбуминурията. Post hoc анализите на проучването Heart Outcomes Prevention Evaluation study [Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study Investigators, 2000] и проучването The Losartan Intervention For Endpoint reduction (LIFE) [Lindholm LH et al, 2002] установяват по-ниска честота на прогресия на микроалбуминурията до

макроалбуминурия (изявена ДН) при пациенти със ЗД-2, които получават терапия с АСЕ-инхибитор или ARB, в сравнение с контролите без такава терапия. Тези проучвания обаче не могат да изследват честотата на поява на микроалбуминурия, защото в тях участват и пациенти, които вече са развили такава.

Представените резултати показват, че при пациентите със ЗД-2 появата на микроалбуминурия може да бъде ограничена и, че инхибирането на АСЕ има специфичен ренопротективен ефект, който е независим от понижаването на АН, защото се запазва и след коригирането за неговото влияние в началото и в края на изследването. В комплексния механизъм на ренопротективния ефект при инхибирането на АСЕ основна роля играе благоприятното повлияване на бъбречната хемодинамика поради селективна дилатация на еферентните артериоли и намаляване на гломерулното налягането. Това противодейства на увеличаването на трафика на плазмените албумини през ГБМ, предизвикано от активираната RAS [Raij L et al, 1989]. Инхибирането на АСЕ антагонизира и директното увреждащо действие на Ang II върху ГБМ, което допринася за запазването на нейния пермеабилитет [Perico N et al, 2008].

Артериалната хипертензия е един от основните независими РФ за поява и прогресия на микроалбуминурия. Изненадващо, направеният post hoc анализ на получените резултати не установява асоциация между развитието на микроалбуминурия и стойностите на АН на изходното ниво, но потвърждава, че появата на микроалбуминурия е асоциирана с по-високото АН при проследяването на пациентите, независимо от фармакологичната терапия. Анализите показват, че понижаването на АН също има специфичен и независим от другите РФ протективен ефект срещу развитието на микроалбуминурия. Установява се, че при пациентите с АН >140/82 mmHg терапията с АСЕ-инхибитора е по-ефективна в сравнение с другите антихипертензивни лекарства, като намаляването на честотата на поява на микроалбуминурия е същото както при пациентите с АН <140/82 mmHg, при

които индивидуалният риск от развитие на микроалбуминурия е еднакво нисък за всяка от приложените терапии. Това показва предимството на АСЕ-инхибиторите пред другите антихипертензивни лекарства, което е важно за пациентите със ЗД-2, тъй като при тях един от основните проблеми е трудното постигане на препоръчаната таргетна стойност за СКН 120 - 130 mmHg [Pohl MA et al, 2005], дори и с назначаването на два - три антихипертензивни препарата [Chobanian AV, 2003]. Въпреки, че при 62% от пациентите участващи в BENEDICT-A са добавени едно или повече лекарствени средства, само при 14% е постигнато СКН <130 mmHg, като по-голяма част от тези пациенти са получавали комбинацията ВераТран и при тях по-рядко се е налагало добавянето на други антихипертензивни медикаменти. Следователно, комбинираната терапия ВераТран може да се използва за ефективно намаляване на АН, което би помогнало за ограничаване на бъбречните и сърдечно-съдовите усложнения при болните от ЗД-2 и на разходите от добавянето на допълнителни лекарства.

Повечето насоки за лечение на АХ при пациентите със ЗД-2 и без ДН не препоръчват конкретен клас антихипертензивни лекарвства за начало на терапията. Само при пациентите със ЗД и ДН (микро- и макроалбуминурия) се препоръчват инхибитори на RAS [National Kidney Foundation, 2002]. Докладваният специфичен ренопротективен ефект на АСЕ-инхибиторите се подкрепя от мета-анализи, направени след публикуването на нашите резултати, които обхващат рандомизирани проучвания до 2005 и до 2012 година, изучаващи възможността за профилактика на микроалбуминурията с различни антихипертезивни лекарства [Strippoli GF et al, 2005; Strippoli GF et al, 2012]. Те потвърждават, че до момента само инхибиторите на АСЕ са ефективни в превенцията на микроалбуминурията при ЗД-2. Това дава основание АСЕ-инхибиторите да бъдат посочени като лекарства на първи избор за нейната профилактика в стандартите за лечение на АХ при ЗД-2 на редица важни национални и международни организации като

Южноафриканското Обществото по Хипертензия (Southern African Hypertension Society – SAHS), Европейското Общество по Кардиология (European Society of Cardiology - ESC), Европейската Асоциация за Изучаване на Диабета (European Association for the Study of Diabetes - EASD), Европейското Общество по Хипертензия (European Society of Hypertension - ESH), Австрийското Общество по Диабет (Austrian Diabetes Society - ADS), Австрийското Общество по Нефрология (Austrian Society of Nephrology), Американската Асоциация на Клиничните Ендокринолози (American Association of Clinical Endocrinologists – AACE), Американската Национална Бъбречна Фондация (National Kidney Foundation – NKF), Асоциацията на Лекарите Диабетолози и Италианското Диабетологично Общество (Associazione Medici Diabetologi (AMD) - Società Italiana di Diabetologia (SID)) [Seedat YK et al, 2006; Rydén L et al, 2007; Mancia G et al, 2007; Auinger M et al, 2009; Handelsman Y et al, 2011; National Kidney Foundation, 2012; Rydén L et al, 2013; AMD-SID – 2014 www.standarditaliani.it; Rydén L et al, 2014].

Очаква се, че успешното ограничаване на развитието на микроалбуминурия ще доведе до намаляване на асоциираните с нея бъбречни и сърдечно-съдови усложнения, което показва важното значение на получения резултат.

Броят на фаталните ССЗ по време на проучването е изключително малък: един пациент в групата с трандолаприл, един в групата с верапамил и трима в групата с плацебо. Това потвърждава факта, че при пациентите с нормоалбуминурия и със сравнително добър метаболитен контрол кардиоваскуларната смъртност е по-ниска, в сравнение с пациентите, които са развили диабетно бъбречно увреждане.

Левокамерната хипертрофия (ХЛК) е независим РФ за внезапна сърдечна смърт, камерна аритмия, миокардна исхемия и ХСН [Levy D et al, 1990; Koren MJ et al, 1991; Ghali JK et al, 1992]. Установено е, че нейната превенция или регресия намаляват сърдечно-съдовия риск [Mathew J et al,

2001; Okin PM et al, 2003]. В BENEDICT-A на изходното ниво 816 пациенти са без ХЛК, потвърдено с ЕКГ изследване [Ruggenenti P et al, 2008]. Тригодишното проследяване установява, че при пациентите, които получават терапия с ACE-инхибитор, самостоятелно или в комбинация с верапамил (n=423) честота на развитие на ХЛК е 3.1%, докато при тези, които са без ACE-инхибитор (n=376) честотата е 8.2%. Статистически значимата разлика се запазва и след коригиране за влиянието на другите, предварително дефинирани РФ на изходното ниво, а също и след коригиране за влиянието на АН както по време на проследяването на пациентите, така и за неговото понижаване в края, в сравнение с началото на проучването. Инхибирането на ACE ограничава активноста на Ang II, основният етиологичен фактор за хипертрофията на миоцитите и развитието на интерстициална фиброза. Това обуславя специфичния, независим от понижаването на АН, протективен ефект на ACE-инхибиторите и срещу развитието на ХЛК, и потвърждава кардиопротективното им значение, докладвано от други автори [Eurich DT et al, 2004].

Проучването BENEDICT-A показва, че приложените терапии имат добър профил полза/риск. ACE-инхибиторите могат да предизвикат леко преходно повишение на серумния креатинин, поради намаляване на гломерулното капилярно налягане. Смята се, че повишаването на креатинина до 30% е допустимо през първите два месеца, след което се наблюдава стабилизиране на нивото му. Докладвано е дори, че това преходно повишение е асоциирано с дългосрочно съхраняване на бъбречната функция [Bakris GL and Weir MR, 2000]. ACE-инхибиторите причиняват суха дразнеща кашлица при 5-20% от пациентите, поради повишаване нивото на кинините (брадикинин, субстанция Р). При 0.1–0.2% от пациентите се появява рядък, но потенциално животозастрашаващ ангиоедем [Israili ZH and Hall WD, 1992]. ACE-инхибиторите могат да предизвикат и хиперкалиемия поради ограничаване активността на алдостерона. В представеното изследаване, при нито един пациент не се установява остро влошаване на бъбречната функция или хиперкалиемия, които

да наложат преустановяване на терапията. Девет пациенти, 5 в групата с ВераТран и 4 в групата с трандолаприл, прекратяват терапията поради появата на кашлица, която изчезва напълно след спиране на лекарството. Двама пациенти, един в групата с ВераТран и един в групата с верапамил, прекъсват лечението поради забавяне на AV-проводимост. Малкият брой НЛР потвърждава сигурното и безопасно приложение на изследваните медикаменти.

При обсъждането на въпроса за превенция на микроалбуминурията при пациентите със ЗД не може да не се дискутира и втората голяма група антихипертензивни лекарства, които потискат активността на RAS, а именно ARBs. Въпреки убедителните резултати за тяхната роля в забавянето на прогресията на ДН (лекарства на първи избор) [Brenner BM et al, 2001; Lewis EJ et al, 2001], значението им в профилактиката на микроалбуминурията все още е неуточнено, като изненадващо има и негативни резултати.

През 2009 г. три рандомизирани клинични проучвания от програмата DIRECT (DIabetic REtinopathy Candesartan Trials) показват, че инхибирането на RAS с ARB (кандесартан) не забавя появата на микроалбуминурия, което обаче не е основна цел на изследванията, а изучаваният контингент се състои предимно от нормотензивни пациенти със ЗД-1 и ЗД-2 [Bilous R et al, 2009].

За да изясни ролята на ARBs в превенцията на микроалбуминурията, проучването Randomized Olmesartan And Diabetes MicroAlbuminuria Prevention (ROADMAP) изследва 4447 пациенти със ЗД-2, АХ и нормоалбуминурия, и установява, че инхибирането на RAS с ARB, олмесартан 40 mg/ден, намалява риска от поява на микроалбуминурия с 23%, в сравнение с плацебо [Haller H et al, 2011]. Този резултат е получен в условията на отличен контрол на АН, като желаната таргетна стойност <130/80 mmHg е постигната при почти 80% от пациентите, приемащи олмесартан и 71% от пациентите, приемащи плацебо. Изненадващо обаче, в групата с олмесартан се установява по-висок процент на смъртност от ССЗ (0.7%), в сравнение с групата с плацебо (0.1%) (P=0.01).

Предполага се, че това вероятно се дължи на по-високия процент участници с исхемична болест на сърцето в групата с олмесартан още от началото на проучването. Някои от фаталните случаи са наблюдавани при пациенти, при които олмесартан предизвиква хипотензивен ефект. Това отново поставя въпроса за ролята на ниските стойности на АН (СКН <120 mmHg и ДКН <70 mmHg), които водят до хипоперфузия на лявата камера и са асоциирани с повишена кардиоваскуларна смъртност при пациенти със сърдечни заболявния, т.нар. "J крива ефект" [Messerli FH et al, 2006; Sleight P et al, 2009; Grassi G et al, 2010]. Затова, Европейското общество по хипертензия ревизира таргетните стойности и препоръчва СКН не по-ниско от 120 mmHg при тези високорискови пациенти [Mancia G et al, 2009].

Резултатите от проучването ROADMAP са обезпокояващи и предизвикват активни дискусии и анализи на съществуващите данни. Те влизат в противоречие с най-голямото клинично проучване ONTARGET, срявняващо двете основни групи лекарства, потискащи активността на RAS [ONTARGET Investigators, 2008]. Основната му цел е да се изследва дали комбинацията между ARB и ACE-инхибитор, съответно телмисартан (80 mg/ден) и рамиприл (10 mg/ден), е по-ефективна от рамиприл (10 mg/ден), приложен самостоятелно и дали телмисартан (80 mg/ден) е поне толкова ефективен, колкото рамиприл в превенцията на Global Endpoint, съставен от сърдечно-съдова смърт, инфаркт на миокарда, мозъчен инсулт или хоспитализация по повод на сърдечна недостатъчност. В проучването са включени 25 650 пациенти, от тях 9612 със ЗД. Получените резултати показват, че ефектът на телмисартан е подобен на този на рамиприл, за който е докладвано, че при пациенти със ЗД и атеросклеротична болест, понижава сърдечно-съдовата смъртност с 37% и общата смъртност с 24% [Gerstein HC, 2002].

Не бива да се пренебрегва и post hoc анализа на проучването RENAAL, който показва, че блокирането на рецепторите на Ang II с лосартан, при пациенти със ЗД-2 и ДН, намалява сърдечно-съдовата смъртност с 19% [Kowey

PR et al, 2005]. Проучването LIFE установява, че лосартан намалява сърдечно-съдовата смъртност с 37% и общата смъртност с 39% в подгрупата диабетно болни с АХ и ХЛК, в сравнение с приложението на бета блокера атенолол [Lindholm LH et al, 2002].

В опит да се изясни въпроса за риска от сърдечно-съдова смърт при използването на ARBs при пациенти със ЗД-2 с нормо-, микро- или макроалбуминурия е извършен и мета-анализ, който включва всички рандомизирани, плацебо-контролирани проучвания при пациенти със ЗД-2, лекувани с ARB, в които има данни за фатални сърдечно-съдови инциденти [Consuegra-Sánchez L et al, 2012]. Авторите стигат до извода, че независимо от факта, че ARBs забавят прогресията на ДН при пациенти със ЗД-2 и различни ССЗ, тази група лекарства не демонстрира никакви полза, но и никаква вреда, във връзка с общата преживяемост на пациентите. В същото време се поставя въпроса дали микроалбуминурията все още остава достоверен показател за предсказване на риска от развитие на ССЗ [Consuegra-Sánchez L et al, 2012]. Отговор на този въпрос дават резултатите на продължението на BENEDICT-A – The BENEDICT Extension Study, разгледано в Четвърта глава, раздел 4.2 и Пета глава, раздел 5.2, и публикуваните наскоро резултати от продължилото средно 3.3 години обсервационно наблюдение (follow-up) на 1758 пациенти от проучването ROADMAP (881 от групата с олмесартан и 877 пациенти от групата с плацебо, като съответно 62.9% и 60.1% от тях получават терапия с инхибитор на RAS) [Menne J et al, 2014]. Установява се, че пациентите, които са развили микроалбуминурия по време на основното проучване имат по-висока честота на сърдечно-съдовите и мозъчносъдовите заболявания (OR 1.77, CI 1.3-3.3, P=0.039) във follow-up периода, в сравнение с пациентите без бъбречно увреждане. В групата с плацебо са регистрирани седем (0.8%) смъртни случаи, от които 2 са поради кардиоваскуларни причини. В ех-групата с олмесартан са наблюдавани само 3 (0.3%) несърдечно-съдови фатални събития и се отчита намаляване на хоспитализацията поради ХСН (0.3% *vs* 1.4%, OR 0.23, CI 0.06-

0.85, P=0.027). В ex-групата с олмесартан появата на диабетна ретинопатия намалява с 0.9% *vs* 2.6%, OR 0.34, CI 0.15-0.78, P=0.011) и се отчита тенденция за намаляване появата на микроалбуминурия. Най-важният резултат от това наблюдение е, че микроалбуминурията остава валиден маркер за бъдещи ССЗ. Съвсем наскоро е публикувано, че олмесартан намалява с 20% риска от развитие на ХЛК при 1512 пациенти, участващи в проучването ROADMAP (777 в групата с олмесартан), установено чрез анализиране на ЕКГ записи. Резултатът не се обяснява с разлики в АН, а се дължи на специфичен ефект на олмесартан, свързан с инхибирането на ефектите на Ang II [Raff U et al, 2014]. Въпреки тези обнадеждаващи данни, правителството на САЩ организира Medicar[1] beneficiaries, анализ на голяма група пациенти, лекувани с олмесартан (158 054) сравнени с пациенти, приемащи други ARBs (724 673). Анализирани са случаите на остър миокарден инфаркт, инсулт или смърт в специфични подгрупи, определени от наличието на ЗД, дозата на ARB и продължителността на лечението [Graham DJ et al, 2014]. Получените резултати показват, че при пациенти със ЗД приложението на олмесартан във висока доза, в продължение на 6 месеца или повече е асоциирано с повишен риск от смърт, докато при пациентите без ЗД, приложението на олмесартан е асоциирано с намален риск от смърт, в сравнение с използването на други ARBs. Допуска се, че последният ефект се дължи на селективното предписване на олмесартан на пациенти с по-малко здравословни проблеми, установено от някои, но не от всички чувствителни анализи. Приложението на олмесартан в ниска доза не е асоциирано с повишен риск от смърт, независимо от продължителността на лечението.

[1]Medicare е национална социална застрахователна програма, организирана от федералното правителство на Съединените щати през 1966 г., управлявана от Администрацията по здравно финансиране към Министерството по Здравеопазване и човешки ресурси. Medicare покрива здравното осигуряване на хора над 65-годишна възраст.

Докато не се изясни значението на терапията с ARBs за кардиоваскуларния риск при пациентите със ЗД-2, не могат да се направят сигурни заключения и препоръки за превенцията на микроалбуминурия с този клас лекарства.

В заключение, инхибирането на АСЕ е асоциирано със специфичен ренопротективен ефект, който води до успешна превенция на микроалбуминурията. Ренопротективният ефект е независим от понижаването на АН. Ограничаването на скоростта на екскреция на плазмените албумини с урината е резултат от селективната дилатация на еферентните артериоли, което намалява вътрегломерулното налягане, от антагонизирането на увреждащото действие на Ang II върху ГБМ и на неговите митогенни и метаболитни ефекти.

Блокирането на бавните L-тип потенциал-зависими калциеви канали с ndCCB не води до специфичен ренопротективен ефект, въпреки докладваната дилатация на еферентните артериоли и вероятното намаляване на вътрегломерулното налягане. Явно, този хемодинамичен механизъм не е достатъчен, защото не се повлияват митогенните и метаболитните ефекти на основния патогенетичен фактор, Ang II. Следователно, ndCCBs не могат да бъдат използвани за превенция на микроалбуминурията.

При комбинираното инхибиране на АСЕ и на бавните L-тип потенциал-зависими калциеви канали не се наблюдава потенциране на ренопротективния ефект, установен при самостоятелното инхибиране на АСЕ. От една страна инхибирането на АСЕ води до добър хемодинамичен ефект, който няма нужда да бъде потенциран допълнително. От друга страна блокирането на калциевите канали с ndCCB не повлиява всички ефекти на Ang II и не потиска процесите на пролиферация и оксидативен стрес. Затова, един ndCCB не може да бъде добавен към АСЕ-инхибитор с цел потенциране на ренопротективния ефект на АСЕ-инхибитора.

Добрият антихипертензивен ефект на комбинацията АСЕ-инхибитор и ndCCB може да бъде използван за по-лесно постигане на препоръчваните таргетни стойности на АН, което би ограничило добавянето на други лекарствени препарати.

Въз основа на резултатите от BENEDICT-A, потвърдени и от други рандомизирани проучвания, инхибиторите на АСЕ вече се посочват като лекарства на първи избор за превенция на микроалбуминурията при хипертензивни пациенти със ЗД-2 в препоръките на редица европейски и американски асоциации. Очаква се това да ограничи развитието на ДН, на сърдечно-съдови усложнения и смърт. И тъй като пациентите със ЗД-2, АХ и нормоалбуминурия представляват почти 90% от цялата популация на болните от ЗД, това доказва, че получените резултати имат важно клинично значение и са широко приложими.

5.2. Изследване наличието на асоциация между нормоалбуминурия и дългосрочния сърдечно-съдов риск и ролята на рано започнатата терапия с ACE-инхибитор в дългосрочната кардиопротекция при пациенти със ЗД-2, нормоалбуминурия и АХ, рандомизирани в BENEDICT-A

В Удълженото проучване на BENEDICT-A, което обхваща повече от 1000 пациенти със ЗД-2 и нормоалбуминурия, се открива непрекъсната асоциация между албуминурията на изходното ниво и честота на ССЗ по време на почти 10-годишния период на проследяване. Увеличаването на сърдечно-съдовия риск, сравнено с референтния риск при AER <1 μg/min, започва още от стойности на AER 1-2 μg/min, като всяко повишаване на AER на изходното ниво с 1 μg/min допълнително повишава риска от ССЗ с 6%, което се наблюдава до стойности на AER 13-14 μg/min. Над това ниво асоциацията не може да бъде анализирана поради малкия брой пациенти и малкия брой ССЗ. Увеличаването на сърдечно-съдовия риск при повишаването на AER се наблюдава при всички пациенти взети заедно и при пациентите, които в началото на BENEDICT-A са рандомизирани да получават терапия с верапамил или плацебо. При пациентите, които в началото на BENEDICT-A са рандомизирани да получават терапия с ACE-инхибитор, приложен самостоятелно или в комбинация с ndCCB верапамил, не се наблюдава асоциация между повишаването на албуминурията и риска от основни ССЗ по време на целия период на наблюдение, като този риск остава еднакво нисък за всяка стойност на AER на изходното ниво.

Получените резултати не са повлияни от разлики в демографските, клиничните и лабораторните характеристики на пациентите, а също и от съпътстващите терапии, защото те са подобни както в началото на проучването, така и при проследяването на пациентите.

Това е първото голямо лонгитудинално обсервационно проучване при хипертензивни пациенти със ЗД-2 и нормоалбуминурия, което открива наличие на непрекъсната асоциация между нормоалбуминурията и сърдечно-съдовия

риск, независимо от другите РФ. Проучването HOPE, изследващо асоциацията между ССЗ и различните нива на албуминурия, измерена като съотношение албумин/креатинин в еднократна порция сутрешна урина (UACR), при пациенти с или без ЗД, с нормо- и микроалбуминурия и с повишен сърдечно-съдов риск, показва, че всяко ниво на албуминурия е РФ за ССЗ, като рискът се появава дори при нормални стойности на UACR [Gerstein HC et al, 2001]. Проучването Losartan Intervention For End-point reduction in hypertension (LIFE) намира подобна асоциация между албуминурията и ССЗ при пациенти с ХЛК [Wachtell K et al, 2003]. Популационното изследване Framingham показва, че при лица без ЗД, без АХ и с UACR над полово-специфичната горна референтна стойност (3.9 μg/min за мъже и 7.5 μg/min за жени), 6-годишният риск за ССЗ е три пъти по-висок в сравнение с риска на лицата, при които UACR е под тази стойност [Arnlöv J et al, 2005]. Проучването Prevention of Renal and Vascular End Stage Disease (PREVEND) установява, че AER е предиктор на сърдечно-съдовата смъртност в общата популация независимо от другите сърдечно-съдови РФ, като повишеният риск от сърдечно-съдова смъртност се появява при нива на AER, считани за нормални [Hillege HL et al, 2002].

Цитираните изследвания, обаче, обхващат пациенти с AER вариращи от нормоалбуминурия до микро- и макроалбуминурия, като техните резултати до голяма степен са повлияни от добре познатата асоциация между микро- или макроалбуминурията и повишеният сърдечно-съдов риск. Представеното проучване включва само пациенти със ЗД-2 и нормоалбуминурия. Това позволява да се направи извода, че концепцията за праг, който разделя албуминурията на нормо- и микроалбуминурия и разграничава пациентите на такива с и без сърдечно-съдов риск, е несъстоятелна. Докладваните резултати показват, че всяко ниво на измерима албуминурия, дори близо до границата на откриване (1-2 μg/min), установено с най-често използваните имунохимични методи (като нефелометрия или имунотурбидиметрия), е асоциирано със статистически значим риск от ССЗ. Това е в подкрепа на предложението на

някои автори, при разглеждането на албуминурията като РФ да не се прави разграничаване между нормо- и микроалбуминурия, а да се използва терминът “албуминурия-асоциирани заболявания” [Forman JP and Brenner BM, 2006]. Тези резултати са важни, защото ни дават възможност да направим извода, че дори минималното намаляване с 1 μg/min на нормалните стойности на AER, може да ограничи ССЗ в дългосрочен план. Това може да бъде постигнато чрез подобряване на инсулиновата чувствителност [Pistrosch F et al, 2005], метаболитния профил, артериалното налягане [UK Prospective Diabetes Study Group, 1998], загубата на тегло [Chagnac A et al, 2003], инхибирането на активността на RAS [Parving HH et al, 2001; Ruggenenti P et al, 2004].

Важен резултат е и изчезването на асоциацията между албуминурията и ССЗ при пациентите, които в BENEDICT-A са рандомизирани да получават ACE-инхибитора трандолаприл. Всъщност, в тази група албуминурията на изходното ниво не предсказва ССЗ и в нея те са по-малко по време на целия период на наблюдение, в сравнение с групата пациенти, които започват терапия с ACE-инхибитор след завършването на BENEDICT-A. Това потвърждава хипотезата, че ранната терапия с ACE-инхибитор осигурява по-голяма кардиопротекция, в сравнение с по-късното му започване, предложена от авторите на проучването HOPE - The Ongoing Outcomes study (HOPE-TOO), които установяват, че през периода на проследяване (2.6 години), независимо, че всички пациенти получават рамиприл, ССЗ са по-малко в групата, която е започнала терапия с този ACE-инхибитор още от самото начало на основното проучване [Bosch J et al, 2005]. Навременното потискане на патологично активираната RAS вероятно води до запазване функцията и структурата на съдовите ендотелни клетки [Mancini GB et al, 1996], което осигурява специфичен дългосрочен протективен ефект както срещу макроваскуларните усложнения на ЗД-2.

Лонгитудиналното обсервационно проучване на Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) - The Epidemiology of Diabetes Interventions and

Complications (EDIC) study доказва, че превентивният ефект на рано започнатия интензивен метаболитен контрол по отношение на микроваскуларните диабетни усложнения, може да се задържи дълго след неговото преустановяване [The DCCT/EDIC Research Group, 2000]. Допускаме, че докладваният ефект за “дълготрайна терапевтична памет" е валиден също и за ACE-инхибиторите и в този аспект, представените резултати и резултатите от проучването HOPE-TOO могат да се разглеждат като продължение на цитираното изследване.

Предимства и недостатъци

Основно ограничение на проучването е, че то е продължение на клинично изпитване, което първоначално е програмирано с друга цел. Затова представените резултати трябва да бъдат потвърдени от *ad hoc* лонгитудинални проучвания.

Въпреки това данните, събрани от почти 90% от пациентите, завършили BENEDICT-A, отговарят на изискванията на предварително планиран мониторинг и са потвърдени от изчерпателната информация за фаталните случаи, получена от Здравният регистър на Област Бергамо, Италия. Характеристиките на изходното ниво на пациентите, които участват и не участват в Удълженото проучване, както и на пациентите, рандомизирани да получават или да не получават ACE-инхибитор, са подобни. За разлика от дискутираните по-горе популационни проучвания [Hillege HL et al, 2002; Arnlöv J et al, 2005] и от проучванията при пациенти с ХЛК [Wachtell K et al, 2003] и с повишен сърдечно-съдов риск [Gerstein HC et al, 2001], чийто краен резултат най-вероятно е повлиян от факта, че в тях участват пациенти с микро- или макроалбуминурия, представеното проучване, единствено до момента, успява да покаже, че албуминурията е независим предиктор на кардиоваскуларния риск в популация от пациенти само със ЗД-2 и нормоалбуминурия. Периодът на проследяване (~10 години) е най-дълъг в сравнение с цитираните подобни проучвания при пациенти с или без ЗД, изучаващи асоциацията между

изходната албуминурия и ССЗ. Важно предимство е централизираното изследване на лабораторните показатели и измерването на албуминурията в три последователни нощни колекции на урина, което се счита за метод златен стандарт [Eshøj O et al, 1987; Ruggenenti P et al, 2004]. И накрая, съответствието на резултатите, получени с помощта на многофакторния анализ с полиноминална трансформация на AER, с тези получени при моделиране на изходната албуминурия с функция spline, допълнително доказва валидността на данните от изследването.

Бъдещи проучвания трябва да покажат, дали тези резултати са валидни при лица без ЗД и при други раси, дали инхибирането на АСЕ е ефективно в целия интервал от нормоалбуминурия или съществува праг, под който лечението не е свързано с ограничаване на кардиоваскуларния риск.

В заключение, това е първото голямо лонгитудинално обсервационно проучване при хипертензивни пациенти със ЗД-2 и нормоалбуминурия, което показва, че всяко ниво на албуминурия, в границите на нормалните стойности, е асоциирано със значим сърдечно-съдов риск, независимо от другите РФ, като асоциацията е непрекъсната и няма гранична стойност на албуминурията, която да разделя пациентите на такива с или без риск. Следователно, дори минималното намаляване на нормалните стойности на албуминурията може да ограничи ССЗ в дългосрочен план. Фактът, че ранното инхибиране на АСЕ премахва наблюдаваната асоциация между нормоалбуминурията и сърдечно-съдовия риск ще даде възможност за ограничаване на повишения кардиоваскуларен риск при пациентите със ЗД-2.

5.3. Изследване дали добавянето на ndCCB верапамил към АСЕ-инхибитора трандолаприл може допълнително да забави прогресията на микроалбуминурията до макроалбуминурия (основна цел), да потенцира регресията на микроалбуминурията до нормоалбуминурия и да ограничи ССЗ (вторични цели) при хипертензивни пациенти със ЗД-2, микроалбуминурия и нормална бъбречна функция

Проучването BENEDICT-B установява, че при сравним контрол на АН и подобен метаболитен профил, добавянето на ndCCB верапамил към инхибитора на АСЕ трандолаприл не забавя допълнително прогресията на микроалбуминурията до макроалбуминурия (основна цел), както и не потенцира регресията на микроалбуминурията до нормоалбуминурия, в сравнение с трандолаприл, приложен самостоятелно при хипертензивни пациенти със ЗД-2 и микроалбуминурия, които са проследени средно за 4.5 години в условията на рандомизирано, двойно-сляпо, с две паралелни групи клинично изпитване. Честота на значимите ССЗ, като фатален и нефатален остър инфаркт на миокарда, инсулт, коронарна или каротидна реваскуларизация, е сравнима между двете групи.

Получените резултати са в съответствие с резултатите от BENEDICT-A, които показват, че при пациенти със ЗД-2 и нормоалбуминурия верапамил не потенцира ренопротективния ефект на АСЕ-инхибитора както и не проявява специфичен превентивен ефект срещу повишаването на албуминурията. Оспорват се и данните от двегодишно рандомизирано проучване, което докладва, че добавянето на ndCCB дилтиазем към АСЕ-инхибитора каптоприл забавя прогресията на микроалбуминурия към макроалбуминурия по-успешно, в сравнение с контролната група, която приема само каптоприл, при пациенти със ЗД-2 [Perez-Maraver M et al, 2005]. Валидността на тези резултати обаче намалява от факта, че проучването е с отворен дизайн, с малък брой пациенти, които са разпределени небалансирано в терапевтичните групи. Още по-важно

е, че комбинираната терапия води до по-голямо понижаване на АН в сравнение с каптоприл, приложен самостоятелно.

Представените резултати от BENEDICT-A и BENEDICT-B, и критичната оценка на наличните публикации позволяват да се направи извода, че ndCCBs нямат специфичен ренопротективен ефект при пациенти със ЗД-2, с или без ДН.

Важен резултат от BENEDICT-B е, че независимо от вида на приложената терапия само 11.7% от пациентите развиват макроалбуминурия, докато при почти половината пациенти (47.3%) се наблюдава регресия до нормоалбуминурия. Този неочаквано нисък процент на прогресия и висок процент на регресия на микроалбуминурията не могат да бъдат обяснени само с добрия контрол на АН, за който допринася дългодействащият АСЕ-инхибитор трандолаприл и с поддържането на добър метаболитен профил при проследяването на пациентите. В комплексния ренопротективен механизъм при инхибирането на АСЕ на първо място трябва да се посочи намаляването на гломерулното капилярно налягане като резултат от дилатацията на еферентната артериола, което ограничава трафика на албумините през ГБМ. Това в последствие води до намаляване и на навлизането на албумините в проксималните тубулни клетки и лимитира нефротоксичния им ефект в тях [Morelli et al, 1990; Benigni A et al, 1995; Remuzzi G and Bertani T, 1998]. За ренопротективния ефект допринася и потенцирането на ефектите на брадикинина, NO, PGI2 и Ang 1-7, които предизвикват вазодилатация, натриуреза и стимулират разграждането на екстрацелуларния матрикс [Hutchison FN et al, 1995]. Не без значение е и потискането на ефектите на Ang II върху сигналните пътища на инсулина в ендотелните клетки, увеличаването на перфузията в скелетните мускули и подобряването на микроциркулацията в панкреасните островни клетки, което води до намаляване на инсулиновата резистентност – патофизиологичната основа за развитието на ЗД-2 и микроалбуминурията [Groop LC and Eriksson JG, 1992; DeFronzo RA, 1997;

Fonseca VA, 2006; Parvanova A et al, 2002; Parvanova A et al, 2006; Capurso C and Capurso A, 2012]. Описаните механизми са толкова по-ефективни, колкото по-рано се инхибира ACE. Трябва да се отбележи, че медианите на AER на изходното ниво на проучването бяха 38 µg/min и 39 µg/min µg/min, съответно в групите на ВераТран и Трандолаприл, т.е. пациентите са в началната фаза на бъбречните изменения. Следователно, за клиничната практика е важно ранното откриването на пациентите с микроалбуминурия, в момента, когато бъбречното увреждане е все още обратимо. Това ще даде възможност за постигане на ремисия на микроалбуминурията, за ограничаване прогресията на ДН и намаляване на повишения риск от ТБН. Заключението се подкрепя от много скорошен анализ на проучванията BENEDICT, IRMA-2, RENAAL и IDNT, който създава модел на стадиите на ДН въз основа на албуминурията и СГФ, и потвърждава, че колкото по-рано се инхибира RAS в хода на развитието на ДН, толкова по-изразено е забавянето на прогресията ѝ към ТБН [Schievink B et al, 2015].

Докладваните резултати са добре сравними с данните от проучвания, изследващи антипротеинуричния ефект на различни ARBs при пациенти със ЗД-2 и ДН [Parving HH et al, 2001; Viberti G and Wheeldon NM, 2002]. Това показва, че ACE-инхибиторите са не по-малко ефективни от ARBs в стабилизирането или в регресията на микроалбуминурията. В същото време ACE-инхибиторите са по-евтини и повечето от тях не са патентовани, което осигурява по-добър профил ефективност/разходи в сравнение с ARBs и е решаващо предимство за Здравноосигурителните системи, особено в развиващите се страни.

Друг нов резултат в проучването е, че само при 13% от пациентите, които регресират до нормоалбуминурия се наблюдават сериозни ССЗ, в сравнение с 28% от пациентите, които са с трайна микроалбуминурия или прогресират до макроалбуминурия. Намаляването на ССЗ с 50% при пациентите с регресия до нормоалбуминурия не може да бъде обяснено с добрия контрол на АН и

метаболитния профил или с по-ефективното инхибиране на RAS, защото от една страна средните стойности на АН и на HbA_{1c} са подобни между двете групи по време на цялото проучване, а от друга страна – всички пациенти приемат трандолаприл в една и съща доза. Разликата в честотата на ССЗ между групите се запазва статистически значима и след коригиране за влиянието на важните изходни РФ като давност на диабета, СКН, ДКН, HbA_{1c} и AER. Това позволява да се направи извода, че регресията на микроалбуминурията до нормоалбуминурия сама по себе си *(per se*) е предиктор на намаляването на ССЗ, независимо от цялостния сърдечно-съдов риск при започването на проучването. Дали регресията на микроалбуминурията до нормоалбуминурия допринася, независимо от другите фактори, за по-ефективна протекция от ССЗ или само идентифицира пациентите, които могат да извлекат най-голяма полза от инхибирането на АСЕ, е извън целите на настоящето проучване. Въпреки това, тези резултати разширяват заключението на проучването LIFE, което установява, че наличието на трайна микроалбуминурия или нейната прогресия е независим и силен предиктор на сърдечно-съдовата заболеваемост и смъртност в подгрупата на хипертензивните пациенти с ХЛК, ЗД-2 и ДН [Ibsen H et al, 2005].

Представените данни са научна основа и стимул за лонгитудинални клинични проучвания, които трябва да установят дали намаляването на албуминурията би могло да бъде специфичен таргет в сърдечно-съдовата превенция при тези високорискови пациенти [Fox CS et al, 2004; Ibsen H et al, 2005; Araki S et al, 2007].

Терапията, приложена в BENEDICT-B е понесена добре, наблюдавани са ограничен брой НЛР. По-малко от 15% от пациентите прекъсват приемането на ВераТран или трандолаприл поради появата на суха кашлица, която изчезва напълно след спирането на лекарството. Не са регистрирани случаи на тежка хиперкалиемия или остро влошаване на бъбречните показатели, налагащи преустановяване на лечението. Нито един пациент не прекъсва

преждевременно участието си в проучването поради НЛР, свързани с добавянето на ndCCB верапамил към ACE-инхибитора трандолаприл. Това потвърждава безопасния профил на приложената комбинация. По-високото ниво на злокачествени заболявания сред пациентите с ремисия до нормоалбуминурия, в сравнение с пациентите със стабилна или прогресираща микроалбуминурия, е до известна степен неочаквано. Въпреки това, статистически значимата разлика между двете групи изчезва, когато фаталните и нефаталните злокачествени заболявания се разглеждат заедно, което предполага, че първоначалният резултат най-вероятно е случаен (effect of chance).

Предимства и недостатъци

Честота на пациентите, развили макроалбуминурия е по-ниска от очакваната, изчислена въз основа на резултатите от изследването IRMA-2 [Parving HH et al, 2001]. Колкото по-голям от очаквания е протективният ефект на трандолаприл срещу прогресията към макроалбуминурия, толкова повече намалява силата на анализите да демонстрират допълнителен протективен ефект на верапамил срещу същия резултат, което може да се счита за грешка от втори род (type II error). Въпреки това, фактът, че в групата ВераТран има тенденция за по-висока честота на прогресия към макроалбуминурия дава възможност да се предположи, че е малко вероятно добавянето на верапамил да има клинично оценим ефект срещу развитието на макроалбуминурия при хипертензивни пациенти със ЗД-2 и микроалбуминурия, които приемат терапия с ACE-инхибитор.

Липсата на контролна група пациенти без терапия с ACE-инхибитор не позволява да се сравни ефекта на трандолаприл с антихипертензивни лекарства, които не влияят върху RAS. При започването на клиничния проект BENEDICT-B са налични доказателства, че инхибиторите на RAS имат специфичен протективен ефект срещу прогресията на микроалбуминурията към макроалбуминурия при пациенти със ЗД-2 и начална ДН [Parving HH et al, 2001],

което не позволява от етична гледна точка в проучването да бъде включена група пациенти без инхибитор на RAS.

Съществени предимства на изследването са неговият дизайн (проспективно, рандомизирано, двойно-сляпо, с паралелни групи проучване), използването на процедури златен стандарт за измерване на АН и AER, и централизираното извършване на всички лабораторни показатели. Валидността на получените резултати се засилва от почти идентичния контрол на АН и метаболитния профил между двете групи.

В заключение, при комбинираното инхибиране на ACE и на бавните L-тип потенциал-зависими калциеви канали въпреки очаквания ефект на потенциране, поради подобното повлияване на бъбречната хемодинамика, не се наблюдава допълнително забавяне на прогресията или увеличаване на регресията на микроалбуминурията и не се установява допълнително намаляване на ССЗ при хипертензивни пациенти със ЗД-2 и микроалбуминурия. Явно, инхибирането на ACE води до добър хемодинамичен ефект на ниво бъбреци, който не се потенцира допълнително от блокирането на бавните L-тип потенциал-зависими калциеви канали с ndCCBs. От друга страна, блокирането на тези канали не повлиява митогенните и метаболитните ефекти на Ang II и ET-1. Затова в практиката един ndCCB не може да бъде добавен към ACE-инхибитор с цел потенциране на нефро- и кардиопротективните ефекти на ACE-инхибитора. Комбинацията между ACE-инхибитор и ndCCB обаче проявава добър антихипертензивен ефект и може да бъде използвана за по-лесно постигане на препоръчваните таргетни стойности на артериалното налягане, което би ограничило добавянето на други антихипертензивни лекарства.

Независимо от блокирането или не на калциевите канали, навременното инхибиране на ACE води до регресия на микроалбуминурията при приблизително половината от пациентите. За това допринасят, освен благоприятното повлияване на бъбречната хемодинамика, също и

натрупването на брадикинин, NO, PGI2 и Ang 1-7, които потенцират вазодилатацията и натриурезата, потискат оксидативния стрес, развитието на фиброза и стимулират разграждането на екстрацелуларния матрикс. Не с по-малко значение е и антагонизирането на увреждащото действие на Ang II върху ГБМ, което намалява нейния пермеабилитет и подобряването на инсулиновата резистентност, един от основните патогенетични фактори в развитието на ЗД-2 и неговите микро- и макроваскуларни усложнения.

Фактът, че регресията на микроалбуминурията до нормоалбуминурия е асоциирана със значима кардиоваскуларна протекция показва, че намаляването на албуминурията до нормалния диапазон би могло да бъде терапевтична цел в превенцията на сърдечно-съдовите заболявания при пациентите със ЗД-2.

За клиничната практика е важно ранното откриване на пациентите с микроалбуминурия и навременното започване на терапията с АСЕ-инхибитор, което би ограничило бъбречните и сърдечно-съдовите усложнения при ЗД-2.

.

5.4. Изследване ефектите на даглутрил, инхибитор на ECE и NEP, върху албуминурията, артериалното налягане, бъбречната функция и профила на безопасност на фона на лосартан, при пациенти със ЗД-2, АХ и диабетна нефропатия (микро- и макроалбуминурия)

Установяваме, че осем седмичното лечение с даглутрил, на фона на лосартан и други антихипертензивни лекарства, които не влияят върху екскрецията на албумина, бъбречната хемодинамика и бариерната функция на ГБМ, води до понижаване на амбулаторното артериално налягане. Намираме, че лечението е безопасно и се понася добре от всички участници. Това е първото рандомизирано клинично проучване, което изследва ефектите и профила полза/риск на комбинирания ECE/NEP инхибитор даглутрил при пациенти със ЗД-2, ДН и АХ. Проведеното проучване в PubMed, за оригинални публикации на английски в периода между 01.01.1990 г. и 31.12.2012 с термините “endothelin-converting enzyme (ECE) inhibition”, “neutral endopeptidase (NEP) inhibition”, “combined ECE/NEP inhibition”, “daglutril”, “endothelin-1-antagonism”, “type 2 diabetic nephropathy”, “clinical trials”, не открива нито едно клинично проучване, изследващо ефекта на даглутрил върху 24-часовата AER и основните бъбречни функционални параметри или върху АН, измерено в лекарския кабинет или регистрирано като 24-часово амбулаторно мониториране, при пациенти със ЗД-2, АХ и ДН.

Артериалната хипертензия засяга повечето пациенти със ЗД-2 и почти всички пациенти с бъбречни усложнения [Brenner BM et al, 2001; Remuzzi G et al, 2002]. Сериозен проблем за клиничната практика създава систолната хипертензия. Съчетаването ѝ с повишено пулсово налягане, резултат от уплътняване на съдовата стена, е един от основните сърдечно-съдови РФ и я прави резистентна на приложените антихипертензивни лекарства [Os I et al, 2006], особено при пациентите с ДН. Установяваме, че даглутрил ефективно подобрява както измереното в лекарския кабинет, така и амбулаторното 24-часово СКН. Ефектът му върху ДКН е много по-слабо изразен. Намаляването

на СКН често се съпровожда с понижаване на ДКН, което може да доведе до ограничаване на левокамерната перфузия и да повиши риска от сърдечно-съдови усложнения, т.нар J-крива ефект [Messerli FH et al, 2006; Sleight P et al, 2009; Grassi G et al, 2010]. Следователно, откриването на лекарство, което намалява систолното и пулсовото налягане с минимален ефект върху ДКН, би имало важно клинично значение, като се има предвид, че при всяко понижение на СКН с 10 mmHg, рискът от коронарна болест на сърцето намалява с 22%, а този от инсулт намалява с 41% [Law MR et al, 2009]. Ефектът на даглутрил върху 24-часовото АН е по-изразен през нощния период. Това също е релевантно за практиката, тъй като нарушаването на физиологичното понижение на АН през нощта, наблюдавано често при пациентите с ДН, е значим, ранен и силен предиктор на ССЗ, независимо от стойностите на АН, измерени сутрин в лекарския кабинет или от тези, измерени през деня [Boggia J et al, 2007].

По време на лечението с плацебо се установява статистически значимо повишение на СКН и ДКН, измерени в лекарския кабинет, и на ДКН, отчетено в 24-часовото мониториране. Всички други стойности на АН са леко повишени без разликите да достигат статистическа значимост. Повишаването на АН вероятно е резултат от прогресирането на бъбречното заболяване, което влошава АХ. Даглутрил от своя страна поддържа всички стойности на АН, измерени в лекарския кабинет и намалява систолното и пулсовото налягане в 24-часовия запис. Това води до значими разлики в ефектите на даглутрил в сравнение с плацебо, които са по-изразени върху амбулаторното 24-часово АН, отколкото върху АН измерено в лекарския кабинет. Тези резултати потвърждават антихипертензивната ефективност на новата молекула.

Повишаването на серумната концентрация на Big-ET-1 при приложението на даглутрил показва, че понижаването на АН е резултат главно от инхибирането на ECE, което намалява синтеза на ET-1 и потиска вазоконстрикторния му ефект, опосредстван от ET_AP и ET_BP, експресирани

едновременно в СГМК. Получените резултати не са повлияни от евентуални корекции в антихипертензивната терапия или дневния прием на натрий, тъй като по време на проучването не са извършвани промени в съпътстващата антихипертензивна терапия и ежедневният прием на сол с храната е стабилен, потвърдено от липсата на промени в 24-часовата екскреция на натрий с урината. Освен това, не се установява натрупване и припокриване на ефектите на приложените лекарства при преминаването на пациентите от терапия с даглутрил към терапия с плацебо, поради съобразяването на продължителността на периода на отмиване от ефекта на даглутрил с неговия плазмен полуживот. Авторегресионният модел допълнително доказва, че даглутрил има антихипертензивен ефект, особено добре изразен върху СКН през целия 24-часов период, независимо от циркадианните промени в АН. Извършените чувствителни анализи потвърждават достоверността на получените резултати. Всичко това е в подкрепа на факта, че намаляването на АН е реален ефект от терапията с даглутрил.

По време на проучването средното СКН варира около 140 mmHg, въпреки лечението с лосартан, който в повечето случаи е комбиниран с два или повече антихипертензивни препарати. Това СКН надвишава прицелната стойност от 130 mmHg (таргет в дизайна на изследването), но е в съответствие с най-новите насоки, които не препоръчват толкова строг контрол на АН при пациентите със ЗД-2 [Mancia G et al, 2009].

В литературата има данни, че антагонистите на рецепторите на ЕТ-1 проявяват антихипертензивен и антипротеинуричен ефект. При пациенти с лека до умерена АХ, които са без антихипертензивна терапия, двойният ET_AP и ET_BP антагонист босентан, сравнен с плацебо, понижава статистически значимо АН измерено в лекарския кабинет и 24-часовото СКН и ДКН [Krum H et al, 1998]. Антихипертензивният му ефект е сравним с този на АСЕ-инхибитора еналаприл. Установено е, че добавянето на дарусентан, селективен ET_AP антагонист, най-малко към три антихипертензивни лекарства, намалява АН

измерено в лекарския кабинет и амбулаторното 24-часово СКН и ДКН, при пациенти с резистентна на лечение АХ, и то в по-голяма степен в сравнение с босентан [Weber MA et al, 2009]. При пациенти с изявена ДН, авосентан, по-малко селективен антагонист на ET_AP от дарусентан, комбиниран с АСЕ-инхибитор или ARB, намалява албуминурията без да понижи АН [Wenzel RR et al, 2009]. При изучаването на нови лекарствени молекули от първостепенна важност е въпросът, свързан с появата на НЛР. За съжаление, изследванията с антагонистите на рецепторите на ЕТ-1 докладват висок процент на НЛР, свързани със задържане на течности и поява на отоци [Kohan DE et al, 2011 (б)], което налага дори преждевременно прекъсване на проучването, изследващо ефектите на авосентан върху прогресията на изявената ДН [Mann JF et al, 2010]. Тези НЛР са свързани най-вече с компрометирането на диуретичния и натриуретичния ефект на ЕТ-1, модулирани от ET_BP в тубулната система на нефрона. Фактът, че НЛР се появяват и при използването на селективни антагонисти на ET_AP от една страна потвърждава наличието на относителност в този антагонизъм, а от друга страна поставя въпроса за ролята и на ET_AP в регулацията на диурезата. На фона на тези разсъждения не бива да се забравя и експерименталното изследване на Lenoir и сътрудници, които допускат, че потискането на ET_BP също е необходимо за постигне на максимален нефропротективен ефект от блокирането на рецепторите на ЕТ-1 [Lenoir O et al, 2014]. Явно е необходимо да се работи още много за да се изяснят сложните механизми на регулация на ЕТ-та система и значението на тяхното повливане. В това отношение представеното проучване е стъпка напред, защото даглутрил инхибира ECE и потиска образуването на ЕТ-1 без да засяга рецепторите му. Така те могат да окажат своето модулиращо действие върху натриурезата и диурезата. В действителност, само при 4 от пациентите, приемащи даглутрил се регистрира задържане на течности, което не налага прекратяване на терапията. Трима от пациентите са с периферен оток и един с оток на лицето. При единия от пациентите периферният оток се оказва резултат от

вазодилатиращия ефект на dCCB ласидипин и изчезва след намаляване на дозата му от 8 mg/ден на 4 mg/ден и повишаване дозата на диуретика хидрохлоротиазид от 25 mg/ден на 50 mg/ден. При втория пациент отокът не отминава след увеличаване дозата на хидрохлоротиазид от 12.5 mg/ден до 25 mg/ден и тъй като се задържа 2 седмици след прекратяване на терапията и участието в проучването се преценява, че отокът е резултат от съпровождащото бъбречно заболяване и не е ефект, свързан с лечението. Отокът на лицето е свързан с признаци за задръжане на течности (наддаване на тегло, намалена концентрация на хематокрит и хемоглобин) и отминава след приключване на лечението. Като цяло, обаче, даглутрил не предизвиква промяна в концентрацията на хемоглобина и хематокрита, което показва, че рискът от задържане на течности е много малък и че профилът му полза/риск е по-благоприятен в сравнение с антагонистите на рецепторите на ET-1 [Krum H et al, 1998; Weber MA et al, 2009]. Липсата на ангиоедем при участниците в проучването е факт с важно значение, тъй като при комбинирането на ACE-инхибитори с инхибитори на NEP е установена повишена честота на ангиоедема, свързано с потиснатото разграждане на брадикинина и повишената концентрация на NO [Messerli FH and Nussberger J, 2000]. Вероятно, намаленият синтез на ET-1 от даглутрил ограничава до известна степен активирането на ET_BP в ендотелните клетки, което се оказва достатъчно за намаляване на производството на NO и съответно за намаляване на риска от ангиоедем [Daull P et al, 2007]. По време на лечението с даглутрил се наблюдават още две НЛР, които не налагат намаляване на дозата или прекратяване на терапията, а именно AV-блок I степен и преходна хипотония. Това потвърждава безопасното приложение на новата молекула.

Противно на очакванията ни, терапията с даглутрил не води до значими промени в 24-часовата AER, бъбречната хемодинамика или фракционните клирънси на албумина и IgG, в сравнение с плацебо. При потискане синтеза на ET-1 е логично да се очаква понижение на албуминурията, свързано с

постгломерулярната вазодилатация и намалението на бъбречното перфузионно налягане [Mann JF et al, 2010; Kohan DE et al, 2011]. Какво би могло да противодейства на този механизъм? Увеличаването на NP, в резултат на инхибирането на NEP, би могло да повиши пропускливостта на ГБМ за плазмените албумини [Moore KB et al, 2007] и да индуцира вазодилатация на аферентните и вазоконстрикция на еферентните артериоли на гломерулите, което поддържа гломерулната перфузия и филтрация, въпреки понижаването на АН [Perico N et al, 1992]. Тази хипотеза може да обясни защо даглутрил не намалява СГФ и реналния плазмен ток.

Преобладаването на мъже в проучването може да бъде дискутирано като недостатък. Това е резултат както от по-високата честота на ДН при мъжете [Gall MA et al, 1997], така и от факта, че мъжете по-лесно от жените се съгласяват да участват в клинични изследвания, свързано с по-голямата автономност при придвижване и по-малката ангажираност в домакинското ежедневие. Въпреки това, няма информация за разлики в ефекта на ЕТ върху АН при мъжете и жените. Докладвано е също за подобен антихипертензивен ефект на антагонистите на рецепторите на ЕТ-1 при двата пола [Weber MA et al, 2009]. Затова считаме, че големият брой мъже не намалява валидността на данните и не оказва влияние върху обобщаването и приравняването на резултатите към двата пола.

Между предимствата, които увеличават силата и значимостта на представените данни е дизайнът cross-over, който позволява да се избегне интерперсоналната вариабилност на данните. Амбулаторното АН, AER и бъбречните функционални показатели са изследвани с методи златни стандарти [Gaspari F et al, 1995]. Сигурността на данните се потвърждава и от факта, че резултатите от анализите на показателите за ефикасност, предвидени по протокол, са подобни на резултатите, получени от модифицирания intention-to-treat анализ, в който се включват всички пациенти получили поне една доза от изследваното лекарство.

Бъдещи лонгитудинални проучвания трябва да установят дали:

- наблюдаваният антихипертензивен ефект на даглутрил води съответно до дългосрочни нефропротекция и кардиопротекция при тази тази група пациенти

- антихипертензивният ефект е асоцииран с подобряване на съдовата ригидност

- антихипертензивният ефект се проявява и при пациенти с недиабетна нефропатия

- даглутрил, приложен в по-високи дози, проявява антипротеинуричен ефект, наблюдаван при експериментални животни.

В заключение, това е първото рандомизирано клинично проучване, което установява, че при пациенти със ЗД-2, АХ и ДН, даглутрил, комбиниран орален инхибитор на ECE и NEP, приложен на фона на лосартан, намалява амбулаторното СКН. Понижаването на АН е резултат от инхибирането на ECE, при което се ограничава синтеза и ефекта на мощния вазоконстриктор ET-1. Благоприятният профил полза/риск на даглутрил в сравнение с антагонистите на рецепторите на ET-1 показва, че комбинираното инхибиране на ECE и NEP може да бъде ефективна антихипертензивна терапия в тази високорискова популация от пациенти.

ИЗВОДИ

I. Диабетна нефропатия, профилактика и лечение

При хипертензивни пациенти със захарен диабет тип 2:

1. Инхибирането на ACE е асоциирано със специфичен ренопротективен ефект, който при пациентите с нормоалбуминурия води до превенция на микроалбуминурията, а при пациентите с микроалбуминурия, освен че забавя нейната прогресия до макроалбуминурия, предизвиква също и регресия до нормоалбуминурия. Ренопротективният ефект е независим от понижаването на артериалното налягане и не се наблюдава при другите антихипертензивни лекарства. Затова инхибиторите на ACE трябва да бъдат:

   а) посочвани като лекарства на първи избор за превенция на микроалбуминурията

   б) предписвани за лечение на микроалбуминурията във възможно най-ранната фаза от нейното появяване

2. Блокирането на бавните L-тип потенциал-зависими калциеви канали с ndCCBs не проявява специфичен ренопротективен ефект при пациентите с нормоалбуминурия. Затова ndCCBs не могат да бъдат използвани за превенция на микроалбуминурията.

3. Комбинираното инхибиране на ACE и на бавните L-тип потенциал-зависими калциеви канали не води до потенциране на ренопротективния ефект, установен при самостоятелното инхибиране на ACE, при пациентите с нормоалбуминурия и микроалбуминурия. Затова:

   а) един ndCCB не може да бъде добавен към ACE-инхибитор с цел потенциране на ренопротективния ефект на ACE-инхибитора

   б) комбинацията между ACE-инхибитор и ndCCB може да бъде използвана за по-лесно постигане на препоръчваните таргетни стойности на артериалното налягане, което ще ограничи добавянето на други антихипертензивни лекарства

4. Комбинираното инхибиране на ECE и NEP, на фона на антагонизма на рецепторите на ангиотензин II, не проявява специфичен нефропротективен ефект при пациентите с диабетна нефропатия (микро- и макроалбуминурия) и не може да бъде използвано за нейното лечение.
5. Комбинираното инхибиране на ECE и NEP, на фона на антагонизма на рецепторите на ангиотензин II, проявява добър антихипертензивен ефект, който може да има клинично приложение като нов подход за ефективна и безопасна антихипертензивна терапия при пациентите със ЗД-2 и ДН.

II. Нормоалбуминурия, кардиоваскуларен риск, инхибиране на АСЕ

При хипертензивни пациенти със захарен диабет тип 2:

1. Нормоалбуминурията предсказва дългосрочен кардиоваскуларен риск, независимо от другите РФ и няма гранична стойност на албуминурията, която да разделя пациентите на такива с или без риск.
2. Инхибирането на АСЕ при пациентите с нормоалбуминурия премахва предиктивното значение на албуминурията по отношение на сърдечно-съдовите заболявания и осигурява дългосрочна кардиопротекция. За клиничната практика е важно навременното започване на терапия с АСЕ-инхибитор при тези пациенти.
3. Регресията на микроалбуминурията до нормоалбуминурия, установена при инхибирането на АСЕ, сама по себе си *(per se)* е асоциирана с намаляване на сърчено-съдовия риск и би могла да се превърне в терапевтична цел при превенцията на сърдечно-съдовите заболявания.

НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧНИ ПРИНОСИ

I. Диабетна нефропатия, профилактика и лечение

При хипертензивни пациенти със захарен диабет тип 2:

1. За първи път голямо клинично рандомизирано проучване показва, че инхибирането на ACE успешно намалява честотата на поява на микроалбуминурия. За сега не са установени други механизми за нейната превенция, което показва превъзходството на ACE-инхибиторите пред останалите антихипертензивни лекарства в профилактиката на ДН.
2. Доказва се, че ранното инхибиране на ACE води до ремисия на микроалбуминурията при почти 50% от пациентите, което ограничава прогресията на ДН.
3. Доказва се, че блокирането на бавните L-тип потенциал-зависими калциеви канали с ndCCBs, не ограничава честотата на поява на микроалбуминурия. Това помага за разрешаване противоречията в научната литература относно ролята на ndCCBs в профилактиката на ДН.
4. Доказва се, че комбинираното инхибиране на ACE и на бавните L-тип потенциал-зависими калциеви канали не води до потенциране на ренопротективния ефект, установен при самостоятелното инхибиране на ACE, при пациентите с нормоалбуминурия и микроалбуминурия. Това показва, че един ndCCB не може да бъде добавен към ACE-инхибитор с цел потенциране на ренопротективния ефект на ACE-инхибитора.
5. Потвърждава се, че комбинираното инхибиране на ACE и на бавните L-тип потенциал-зависими калциеви канали проявава добър антихипертензивен ефект.
6. За първи път се установява, че при пациентите с микро- и макроалбуминурия, комбинираното инхибиране на ECE и NEP, на фона на антагонизма на рецепторите на ангиотензин II, не намалява албуминурията и не проявява ренопротективен ефект. Показва се, че този подход не може да се използва за лечение на ДН.

7. За първи път се установява, че при пациентите с микро- и макроалбуминурия комбинираното инхибиране на ECE и NEP, на фона на антагонизма на рецепторите на ангиотензин II, проявява добър антихипертензивен ефект. Това може да бъде нов подход за ефективна и безопасна антихипертензивна терапия при пациентите със ЗД-2 и ДН.

II. Нормоалбуминурия, кардиоваскуларен риск, ACE-инхибитори

При хипертензивни пациенти със захарен диабет тип 2:

1. За първи път, само в популация от пациенти със ЗД-2 и нормоалбуминурия се установява, че и нормалните стойности на албуминурията предсказват повишен дългосрочен кардиоваскуларен риск, независимо от другите РФ и че няма гранична стойност на албуминурията, която да разделя пациентите на такива с или без риск.
2. Потвърждава се, че предиктивното значение на нормоалбуминурията по отношение на сърдечно-съдовите заболявания изчезва при навременно потискане активността на RAS чрез инхибиране на ACE.
3. Показва се, че регресията на микроалбуминурията до нормоалбуминурия сама по себе си *(per se)* е предиктор на намаляването на сърдечно-съдовите заболявания, независимо от цялостния сърдечно-съдов риск.

НАУЧНО-ПРИЛОЖНИ ПРИНОСИ

I. Диабетна нефропатия, профилактика и лечение

При хипертензивни пациенти със захарен диабет тип 2:

1. Специфичният ренопротективен ефект, наблюдаван при инхибирането на АСЕ, дава основание АСЕ-инхибиторите да бъдат посочени като лекарства на първи избор за превенция на микроалбуминурията в препоръките на редица европейски и американски асоциации. Очаква се това да ограничи заболеваемостта от ДН и асоцииираните сърдечно-съдови усложнения.
2. Ранното идентифициране на пациентите с микроалбуминурия и навременното започване на терапия с АСЕ-инхибитор ще даде възможност за ремисия на микроалбуминурията, ще ограничи прогресията на ДН и ще намали сърдечно-съдовата заболеваемост.
3. Комбинираното приложение на АСЕ-инхибитор и ndCCB може да бъде използвано за по-лесно постигане на препоръчваните таргетни стойности на артериалното налягане при пациентите с нормоалбуминурия и микроалбуминурия, което ще ограничи разходите по добавянето на други антихипертензивни лекарства и ще осигури по-добър комплайънс от страна на болните.
4. Комбинираното инхибиране на ECE и NEP с даглутрил 300 mg/ден, на фона на ARB, може да бъде ефективна и безопасна антихипертензивна терапия при пациентите с ДН.

II. Нормоалбуминурия, кардиоваскуларен риск, АСЕ-инхибитори

При хипертензивни пациенти със захарен диабет тип 2 и нормоалбуминурия:

1. Навременното започване на терапия с АСЕ-инхибитор би осигурило дългосрочна кардиопротекция.
2. Дори минималното намаляване на стойностите на албуминурията, които са в нормалните референтни граници, чрез подобряване на инсулиновата чувствителност, метаболитния профил, артериалното налягане, загубата на тегло, може да ограничи повишения кардиоваскуларен риск в дългосрочен план.
3. Регресията на микроалбуминурията до нормоалбуминурия, която се наблюдава при инхибирането на АСЕ, би могла да се превърне в терапевтична цел при превенцията на сърдечно-съдовите заболявания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Илиева Г, Толекова А. Сравнителен анализ на ефектите от комбинирано фармакологично въздействие върху ренин-ангиотензин-алдостероновата система. Юбилейна научна конференция с международно участие “20 години ВМИ-МФ-СТАРА ЗАГОРА”, *Сборник с доклади*. 2002; т. 1: 56-60.
2. Илиева Г, Толекова А, Логофетов А. Плазмена алдостеронова концентрация и плазмена ренинова активност при индуцирана чрез глюкозно обременяване хиповолемия, комбинация на хиповолемия и ацетизал, апликация на ацетизал и комбинация ацетизал и хипоксия. *Годишник ВМИ - Ст. Загора*. 1992; т. III: 71-76.
3. Илиева Г, Толекова А, Първанова А. Промени в ренин-ангиотензин-алдостероновата система и електролитния баланс след инхибиране на волтаж-зависимите калциеви канали и ангиотензин-конвертиращия ензим. Седма национална конференция “Съвременни тенденции в развитие на фундаменталните и приложни науки”, 6-7 юни, 1996 г. *Сборник от доклади.* 1996 (а); 259-264.
4. Илиева Г, Толекова А, Първанова А. Промени във водно-солевия баланс и някои хематологични показатели след въздействие с Nifedipine. Седма национална конференция “Съвременни тенденции в развитие на фундаменталните и приложни науки”, 6-7 юни, 1996 г. *Сборник от доклади.* 1996 (б); 274-279.
5. Логофетов А, Илиева Г, Толекова А. Плазмена ангиотензинова и алдостеронова концентрации при глюкозно обременяване и комбинация глюкоза плюс ацетизал. *Годишник ВМИ - Ст. Загора.* 1988; т. I: 69-75.
6. Толекова А, Янков К. Системен анализ на плазмената ренинова активност в условията на фармакологична и физиологична стимулация. Юбилейна научна конференция с международно участие “20 години ВМИ-МФ-СТАРА ЗАГОРА”, *Сборник с доклади.* 2002; т. 1: 61-65.
7. Abadir PM, Foster DB, Crow M, Cooke CA, Rucker JJ, Jain A, Smith BJ, Burks TN, Cohn RD, Fedarko NS, Carey RM, O'Rourke B, Walston JD. Identification and

characterization of a functional mitochondrial angiotensin system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108(36): 14849-14854.

8. Abassi ZA, Tate JE, Golomb E, Keiser HR. Role of neutral endopeptidase in the metabolism of endothelin. *Hypertension.* 1992; 20:89–95.
9. Abbott KC, Bakris G. Renal effects of antihypertensive medications: an overview. *J Clin Pharmacol.* 1993; 33(5): 392-399.
10. ACE Inhibitors in Diabetic Nephropathy Trialist Group. Should all patients with type 1 diabetes mellitus and microalbuminuria receive angiotensin-converting enzyme inhibitors? A meta-analysis of individual patient data. *Ann Intern Med*. 2001; 134: 370–379.
11. Achard V, Boullu-Ciocca S, Desbriere R, Nguyen G, Grino M. Renin receptor expression in human adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 292(1): R274-282.
12. Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, Bilous RW, Cull CA, Holman RR; UKPDS GROUP. Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney Int.* 2003; 63(1): 225-232.
13. Albiston AL, Diwakarla S, Fernando RN, Mountford SJ, Yeatman HR, Morgan B, Pham V, Holien JK, Parker MW, Thompson PE, Chai SY. Identification and development of specific inhibitors for insulin-regulated aminopeptidase as a new class of cognitive enhancers. *Br J Pharmacol*. 2011 (a); 164: 37–47.
14. Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, Sim P, Clune E, Mustafa T, Lee J, Mendelsohn FA, Simpson RJ, Connolly LM, Chai SY. Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J Biol Chem.* 2001; 276(52): 48623-48626.
15. Albiston AL, Yeatman HR, Pham V, Fuller SJ, Diwakarla S, Fernando RN, Chai SY. Distinct distribution of GLUT4 and insulin regulated aminopeptidase in the mouse kidney. *Regul Pept.* 2011 (b); 166(1-3): 83-89.

16. Allen SW, Chatfield BA, Koppenhafer SA, Schaffer MS, Wolfe RR, Abman SH. Circulating immunoreactive endothelin-1 in children with pulmonary hypertension. Association with acute hypoxic pulmonary vasoreactivity. *Am Rev Respir Dis.* 1993; 148: 519–522.
17. Allison PD. Survival analysis using the SAS system: a practical guide. Cary, N.C.: SAS Institute, 1995.
18. AMD-SID - Standard italiani per la cura del diabete mellito 2014. www.standarditaliani.it
19. American Diabetes Association. Standards of medical care for patients with diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 1998; 21 Suppl1: S23-31.
20. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*. 1990; 348: 730–732.
21. Araki S, Haneda M, Koya D, Hidaka H, Sugimoto T, Isono M, Isshiki K, Chin-Kanasaki M, Uzu T, Kashiwagi A. Reduction in microalbuminuria as an integrated indicator for renal and cardiovascular risk reduction in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2007; 56: 1727–1730.
22. Ardaillou R. Angiotensin II receptors. *J Am Soc Nephrol.* 1999; 10 Suppl 11: S30-39.
23. Arinami T, Ishikawa M, Inoue A, Yanagisawa M, Masaki T, Yoshida MC, Hamaguchi H. Chromosomal assignments of the human endothelin family genes: the endothelin-1 gene(EDN1) to 6p23-p24, the endothelin-2 gene(EDN2) to Ip34, and the endothelin-3 gene(EDN3) to 20q13.2-q13.3. *Am J Hum Genet.* 1991; 48: 990–996.
24. Arnlöv J, Evans JC, Meigs JB, Wang TJ, Fox CS, Levy D, Benjamin EJ, D'Agostino RB, Vasan RS: Low-grade albuminuria and incidence of cardiovascular disease events in nonhypertensive and nondiabetic individuals: The Framingham Heart Study. *Circulation*. 2005; 112: 969–975.

25. Auinger M et al. Diabetic Nephropathy - Update 2009 Guidelines of the Austrian Diabetes Society and of the Austrian Society of Nephrology. *Wiener Klinische Wochenschrift.* 2009; 121: S37-42.
26. Baba S. Nifedipine and enalapril equally reduce the progression of nephropathy in hypertensive type 2 diabetics. *Diabetes Res Clin Pract*. 2001; 54: 191–201.
27. Bakris GL, Copley JB, Vicknair N, Sadler R, Leurgans S. Calcium channel blockers versus other antihypertensive therapies on progression of NIDDM associated nephropathy. *Kidney Int.* 1996; 50(5): 1641-1650.
28. Bakris GL, Toto RD, McCullough PA, Rocha R, Purkayastha D, Davis P; GUARD (Gauging Albuminuria Reduction With Lotrel in Diabetic Patients With Hypertension) Study Investigators. Effects of different ACE inhibitor combinations on albuminuria: results of the GUARD study. *Kidney Int.* 2008; 73(11): 1303-1309.
29. Bakris GL, Weir MR, DeQuattro V, McMahon FG. Effects of an ACE inhibitor/calcium antagonist combination on proteinuria in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 1998; 54(4): 1283-1289.
30. Bakris GL, Weir MR, Secic M, Campbell B, Weis-McNulty A. Differential effects of calcium antagonist subclasses on markers of nephropathy progression. *Kidney Int.* 2004; 65: 1991-2002.
31. Bakris GL, Weir MR. Angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated elevations in serum creatinine: is this a cause for concern? *Arch Intern Med.* 2000; 160(5): 685-693.
32. Bakris GL, Williams B. Angiotensin converting enzyme inhibitors and calcium antagonists alone or combined: does the progression of diabetic renal disease differ? *J Hypertens Suppl.* 1995; 13(2): S95-101.
33. Balakrishnan SM, Wang HD, Gopalakrishnan V, Wilson TW, McNeill JR. Effect of an endothelin antagonist on hemodynamic responses to angiotensin II. *Hypertension*. 1996; 28: 806–809.
34. Baldi E, Dunn MJ. Endothelin binding and receptor down regulation in rat glomerular mesangial cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 1991; 256: 581–586.

35. Barnett AH, Bain SC, Bouter P, Karlberg B, Madsbad S, Jervell J, Mustonen J; Diabetics Exposed to Telmisartan and Enalapril Study Group. Angiotensin-receptor blockade versus converting-enzyme inhibition in type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med.* 2004; 351: 1952-1961.
36. Barton M: Therapeutic potential of endothelin receptor antagonists for chronic proteinuric renal disease in humans. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1802: 1203–1213.
37. Batlle D, Wysocki J, Soler MJ, Ranganath K. Angiotensin-converting enzyme 2: enhancing the degradation of angiotensin II as a potential therapy for diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2012; 81(6): 520-528.
38. Bauduceau B, Genès N, Chamontin B, Vaur L, Renault M, Etienne S, Marre M. Ambulatory blood pressure and urinary albumin excretion in diabetic (non-insulin-dependent and insulin-dependent) hypertensive patients: relationships at baseline and after treatment by the angiotensin converting enzyme inhibitor trandolapril. *Am J Hypertens.* 1998; 11(9): 1065-1073.
39. Bayes M, Rabasseda X, Prous JR. Gateways to clinical trials. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2003; 25(4): 317-340.
40. BENEDICT Group. The BErgamo NEphrologic DIabetes Complications Trial (BENEDICT): design and baseline characteristics. *Control Clin Trials.* 2003; 24(4): 442-461.
41. Benigni A, Zoja C, Remuzzi G. The renal toxicity of sustained glomerular protein traffic. *Lab Invest.* 1995; 73(4): 461-468.
42. Benz K, Amann K: Endothelin in diabetic renal disease. *Contrib Nephrol.* 2011; 172: 139–148.
43. Bettinaglio P, Galbusera A, Caprioli J, Orisio S, Perna A, Arnoldi F, Bucchioni S, Noris M; BENEDICT Study Group. Single conformation polymorphism (SSCP) as a quick and reliable method to genotype M235T polymorphism of angiotensinogen gene. *Clin Biochem*. 2002; 35(5): 363-368.

44. Bilous R, Chaturvedi N, Sjølie AK, Fuller J, Klein R, Orchard T, Porta M, Parving HH. Effect of candesartan on microalbuminuria and albumin excretion rate in diabetes: three randomized trials. *Ann Intern Med.* 2009; 151(1): 11-20, W3-4.
45. Bjorck S, Mulec H, Johnsen S A, Nordén G, Aurell M. Renal protective effect of enalaprilin diabetic nephropathy. *BMJ*. 1992; 304: 339–343.
46. Boggia J, Li Y, Thijs L, Hansen TW, Kikuya M, Björklund-Bodegård K, Richart T, Ohkubo T, Kuznetsova T, Torp-Pedersen C, Lind L, Ibsen H, Imai Y, Wang J, Sandoya E, O'Brien E, Staessen JA; International Database on Ambulatory blood pressure monitoring in relation to Cardiovascular Outcomes (IDACO) investigators. Prognostic accuracy of day versus night ambulatory blood pressure: a cohort study. *Lancet*. 2007; 370: 1219–1229.
47. Bosch J, Lonn E, Pogue J, Arnold JM, Dagenais GR, Yusuf S; HOPE/HOPE-TOO Study Investigators: Long-term effects of ramipril on cardiovascular events and on diabetes: Results of the HOPE study extension. *Circulation*. 2005; 112: 1339–1346.
48. Braun-Menendez E, Fasciolo JC, Leloir LF, Muñoz JM. The substance causing renal hypertension. *J Physiol.* 1940; 98(3): 283-298.
49. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, Remuzzi G, Snapinn SM, Zhang Z, Shahinfar S; RENAAL Study Investigators. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med*. 2001; 345: 861–869.
50. Bruzzi I, Corna D, Zoja C, Orisio S, Schiffrin EL, Cavallotti D, Remuzzi G, Benigni A. Time course and localization of endothelin-1 gene expression in a model of renal disease progression. *Am J Pathol.* 1997; 151: 1241–1247.
51. Bröchner-Mortensen J: A simple method for the determination of glomerular filtration rate. *Scand J Clin Lab Invest*. 1972; 30: 271-274.
52. Bumpus FM, Schwarz H, Page IH. Synthesis and pharmacology of the octapeptide angiotonin. *Science*. 1957; 125(3253): 886-887.

53. Campbell DJ, Kladis A, Valentijn AJ. Effects of losartan on angiotensin and bradykinin peptides and angiotensin-converting enzyme. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995; 26(2): 233-240.
54. Campbell DJ. Critical review of prorenin and (pro)renin receptor research. *Hypertension*. 2008; 51(5): 1259-1264.
55. Capurso C, Capurso A. From excess adiposity to insulin resistance: the role of free fatty acids. *Vascul Pharmacol.* 2012; 57(2-4): 91-97.
56. Carey RM, Howell NL, Jin XH, Siragy HM. Angiotensin type 2 receptor-mediated hypotension in angiotensin type-1 receptor-blocked rats. *Hypertension.* 2001; 38(6): 1272-1277.
57. Carey RM, Siragy HM. The intrarenal renin-angiotensin system and diabetic nephropathy. *Trends Endocrinol Metab.* 2003; 14(6): 274-281.
58. Castoldi G, di Gioia CR, Bombardi C, Maestroni S, Carletti R, Steckelings UM, Dahlöf B, Unger T, Zerbini G, Stella A. Prevention of diabetic nephropathy by compound 21, selective agonist of angiotensin type 2 receptors, in Zucker diabetic fatty rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014; 307(10): F1123-1131.
59. Chagnac A, Weinstein T, HermanM,Hirsh J,Gafter U,Ori Y: The effects of weight loss on renal function in patients with severe obesity. *J Am Soc Nephrol*. 2003; 14: 1480–1486.
60. Chai SY, Fernando R, Peck G, Ye SY, Mendelsohn FA, Jenkins TA, Albiston AL. The angiotensin IV/AT4 receptor. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61(21): 2728-2737.
61. Chamoux E, LeHoux JG, Gallo-Payet N. The AT2 receptor of angiotensin II and apoptosis in human fetal adrenal gland. *Endocr Res.* 2000; 26(4): 955-957.
62. Chappell MC. Emerging evidence for a functional angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-MAS receptor axis: more than regulation of blood pressure? *Hypertension.* 2007; 50(4): 596-599.
63. Chen L, McNeill JR, Wilson TW, Gopalakrishnan V. Heterogeneity in vascular smooth muscle responsiveness to angiotensin II. Role of endothelin. *Hypertension*. 1995; 26: 83–88.

64. Chen M, Todd-Turla K, Wang W-H, Cao X, Smart A, Brosius FC, Killen PD, Keiser JA, Briggs JP, Schnermann J. Endothlein-1 mRNa in glomerular and epithelial cells of kidney. *Am J Physiol.* 1993; 265: F542–550.
65. Chen X, Berrou J, Nguyen G, Sraer J-D, Rondeau E. Endothelin-1 induces rapid and long lasting internalization of the thrombin receptor in human glomerular epithelial cells. *Biochem Biophys Res Com*. 1995; 217: 445–451.
66. Chhabra KH, Chodavarapu H, Lazartigues E. Angiotensin converting enzyme 2: a new important player in the regulation of glycemia. *IUBMB Life.* 2013; 65(9): 731-738.
67. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones W, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ. Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute. National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*. 2003; 42: 1206–1252.
68. Chou SY, Porush JG. Renal actions of endothelin-1 and endothelin-3: interactions with the prostaglandin system and nitric oxide. *Am J Kidney Dis.* 1995; 26: 116–123.
69. Chu KY, Lau T, Carlsson PO, Leung PS. Angiotensin II type 1 receptor blockade improves beta-cell function and glucose tolerance in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes.* 2006; 55(2): 367-374.
70. Chun M, Lin HY, Henis YI, Lodish HF. Endothelin-induced endocytosis of cell surface ETA receptors. *J Biol Chem.* 1995; 270: 10855–10860.
71. Clavell AL, Stingo AJ, Margulies KB, Brandt RR, Burnett JC Jr. Role of endothelin receptor subtypes in the in vivo regulation of renal function. *Am J Physiol.* 1995; 268: F455–460.
72. Collett D. Modelling survival data in medical research. London: Chapman & Hall, 1994.

73. Consuegra-Sánchez L, Sanchis J, Núñez J, Cascón JD, Villegas M, Picó F. Increased mortality in patients with diabetes associated with olmesartan for the prevention/delay of microalbuminuria onset: a matter of concern? *Rev Esp Cardiol (Engl Ed).* 2012; 65(4): 378-380.
74. Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, Oliveira-dos-Santos AJ, da Costa J, Zhang L, Pei Y, Scholey J, Ferrario CM, Manoukian AS, Chappell MC, Backx PH, Yagil Y, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature.* 2002; 417(6891): 822-828.
75. Culman J, Baulmann J, Blume A, Unger T. The renin-angiotensin system in the brain: an update. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2001; 2(2): 96-102.
76. Cybulsky AV, Stewart DJ, Cybulsky MI. Glomerular epithelial cells produce endothelin-1. *J Am Soc Nephrol.* 1993; 3: 1398–1404.
77. D'Orleans-Juste P, Plante M, Honore JC, Carrier E, Labonte J. Synthesis and degradation of endothelin-1. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003; 81: 503–510.
78. d'Uscio LV, Moreau P, Shaw S, Takase H, Barton M, Luscher TF. Effects of chronic ETAreceptor blockade in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension.* 1997; 29: 435–441.
79. Dalla Vestra M, Saller A, Bortoloso E, Mauer M, Fioretto P. Structural involvement in type 1 and type 2 diabetic nephropathy. *Diabetes Metab.* 2000; 26 Suppl 4: 8-14.
80. Danser AH, Deinum J. Renin, prorenin and the putative (pro)renin receptor. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2005; 6(3): 163-165.
81. Danser AHJ, Saris JJ. Prorenin uptake in the heart: a prerequisite for local angiotensin generation? *J Mol Cell Cardiol.* 2002; 34: 1463–1472.
82. Daull P, Jeng AY, Battistini B. Towards triple vasopeptidase inhibitors for the treatment of cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007; 50: 247–256.
83. Davenport AP, Kuc RE, Hoskins SL, Karet FE, Fitzgerald F. [125I]-PD151242: a selective ligand for endothelin ETA receptors in human kidney which localizes to renal vasculature. *Br J Pharmacol.* 1994; 113: 1303–1310.

84. Dawson A, Struthers AD. Vasopeptidase inhibitors in heart failure. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2002; 3(3): 156-159.

85. de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extracts in rats. *Life Sci*. 1981; 28: 89-94.

86. de Bold AJ. Atrial natriuretic factor: a hormone produced by the heart. *Science.* 1985; 230 (4727): 767–770.

87. De Bruijn JH, Orofiamma BA, Pauly NC. Efficacy and tolerance of trandolapril (0.5-2 mg) administered for 4 weeks in patients with mild-to-moderate hypertension. Investigator Study Group. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1994; 23 Suppl 4: S60-64.

88. De Cosmo S, Motterlini N, Prudente S, Pellegrini F, Trevisan R, Bossi A, Remuzzi G, Trischitta V, Ruggenenti P; BENEDICT Study Group: Impact of the PPAR-gamma2 Pro12Ala polymorphism and ACE inhibitor therapy on new-onset microalbuminuria in type 2 diabetes: evidence from BENEDICT. *Diabetes.* 2009; 58: 2920–2929.

89. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.* 2000; 52(3): 415-472.

90. De Mattia G, Cassone-Faldetta M, Bellini C et al. Role of plasma and urinary endothelin-1 in early diabetic and hypertensive nephropathy. *Am J Hypertens*. 1998; 11: 983-988.

91. de Zeeuw D, Coll B, Andress D, Brennan JJ, Tang H, Houser M, Correa-Rotter R, Kohan DE, Lambers, Heerspink HJ, Makino H, Perkovic V, Pritchett Y, Remuzzi G, Tobe SW, Toto R, Viberti G, Parving HH: The endothelin antagonist atrasentan lowers residual albuminuria in patients with type 2 diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2014; 25: 1083–1093.

92. de Zeeuw D. Albuminuria, not only a cardiovascular/renal risk marker, but also a target for treatment? *Kidney Int Suppl.* 2004; (92): S2-6.

93. DeFronzo RA. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis. *Neth J Med.* 1997; 50(5): 191-197.

94. Deinum J, Ronn B, Mathiesen E, Derkx FHM, Hop WC, Schalekamp MADH. Increase in serum prorenin precedes onset of microalbuminuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1999; 42: 1006–1010.

95. Derkx FHM, Deinum J, Lipovski M, Verhaar M, Fischli W, Schalekamp MADH. Nonproteolytic "activation" of prorenin by active site-directed renin inhibitors as demonstrated by reninspecific monoclonal antibody. *J Biol Chem.* 1992; 267: 22837–22842.

96. Dessì-Fulgheri P, Sarzani R, Rappelli A. The natriuretic peptide system in obesity-related hypertension: new pathophysiological aspects. *J Nephrol.* 1998; 11(6): 296-299.

97. Dhakarwal P, Agrawal V, Kumar A, Goli KM, Agrawal V. Update on role of direct renin inhibitor in diabetic kidney disease. *Ren Fail.* 2014; 36(6): 963-969.

98. Dhaun N, Goddard J, Kohan DE, Pollock DM, Schiffrin EL, Webb DJ. Role of endothelin-1 in clinical hypertension: 20 years on. *Hypertension.* 2008; 52: 452–459.

99. Dickstein K, De Voogd HJ, Miric MP, Willenbrock R, Mitrovic V, Pacher R, Koopman PA. Effect of single doses of SLV306, an inhibitor of both neutral endopeptidase and endothelin-converting enzyme, on pulmonary pressures in congestive heart failure. *Am J Cardiol*. 2004; 94: 237–239.

100. Dilauro M, Burns KD. Angiotensin-(1-7) and its effects in the kidney. *Scientific World Journal.* 2009; 9: 522-535.

101. Dillingham MA, Anderson RJ. Inhibition of vasopressin action by atrial natriuretic factor. *Science.* 1986; 231: 1572-1573.

102. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel

angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 2000; 87(5): E1-9.

103. Douthwaite JA, Lees DM, Corder R. A role for increased mRNA stability in the induction of endothelin-1 synthesis by lipopolysaccharide. *Biochem Pharmacol.* 2003; 66: 589–594.

104. Dulin N, Sorokin A, Reed E, Elliott S, Kehrl J, Dunn M. RGS3 inhibits G protein-mediated signaling via translocation to the membrane and binding to Galpha. *Mol Cell Biol.* 1999; 19: 714–723.

105. Dzau VJ. Local expression and pathophysiological role of renin-angiotensin in the blood vessels and heart. *Basic Res Cardiol.* 1993; 88 Suppl 1: 1-14.

106. Edwards RM, Trizna W, Ohlstein EH. Renal microvascular effects of endothelin. *Am J Physiol.* 1990; 259: F217–221.

107. Emoto N, Yanagisawa M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem.* 1995; 270: 15262–15268.

108. Endlich K, Hoffend J, Steinhausen M. Localization of endothelin ETA and ETB receptormediated constriction in the renal microcirculation of rats. *J Physiol.* 1996; 497(Pt 1): 211–218.

109. Epstein M. Calcium antagonists and renal protection. Current status and future perspectives. *Arch Intern Med.* 1992; 152(8): 1573-1584.

110. Epstein M. Calcium antagonists and the kidney. Implications for renal protection. *Am J Hypertens.* 1993; 6(7 Pt 2): 251S-259S.

111. Ergul S, Parish DC, Puett D, Ergul A. Racial differences in plasma endothelin-1 concentrations in individuals with essential hypertension. *Hypertension*. 1996; 28: 652–655.

112. Eshøj O, Feldt-Rasmussen B, Larsen ML, Mogensen EF. Comparison of overnight, morning and 24-hour urine collections in the assessment of diabetic microalbuminuria. *Diabet Med.* 1987; 4(6): 531-533.

113. Esteban V, Ruperez M, Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Lorenzo O, Demaegdt H, Vanderheyden P, Egido J, Ruiz-Ortega M. Angiotensin IV activates the nuclear transcription factor-kappaB and related proinflammatory genes in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 2005; 96: 965–973.

114. Eurich DT, Majumdar SR, Tsuyuki RT, Johnson JA. Reduced mortality associated with the use of ACE inhibitors in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: 1330-1334.

115. Evans R, Madden A, Oliver J, Lewis T. Effects of ETA- and ETB- receptor antagonists on regional kidney blood flow, and response to intravenous endothelin-1, in anaesthetized rabbits. *J Hypertens.* 2001; 19: 1789–1799.

116. Faure S, Chapot R, Tallet D, Javellaud J, Achard JM, Oudart N. Cerebroprotective effect of angiotensin IV in experimental ischemic stroke in the rat mediated by AT(4) receptors. *J Physiol Pharmacol*. 2006; 57: 329–342.

117. Fellner SK, Arendshorst WJ. Endothelin A and B receptors of preglomerular vascular smooth muscle cells. *Kidney Int.* 2004; 65: 1810–1817.

118. Fernandez-Fernandez B, Ortiz A, Gomez-Guerrero C, Egido J. Therapeutic approaches to diabetic nephropathy--beyond the RAS. *Nat Rev Nephrol.* 2014; 10(6): 325-346.

119. Ferrari R, Cucchini F, Bolognesi R, Bachetti T, Boraso A, Bernocchi P, Gaia G, Visioli O. How do calcium antagonists differ in clinical practice? *Cardiovasc Drugs Ther.* 1994; 8 Suppl 3: 565-575.

120. Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DI. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension.* 1997; 30 (3 Pt 2): 535-541.

121. Ferrier C, Ferrari P, Weidmann P, Keller U, Beretta-Piccoli C, Riesen WF. Antihypertensive therapy with Ca2+. Antagonist verapamil and/or ACE inhibitor enalapril in NIDDM patients. *Diabetes Care.* 1991; 14(10): 911-914.

122. Fioretto P, Frigato F, Velussi M, Riva F, Muollo B, Carraro A, Brocco E, Cipollina MR, Abaterusso C, Trevisan M, et al. Effects of angiotensin converting

enzyme inhibitors and calcium antagonists on atrial natriuretic peptide release and action and on albumin excretion rate in hypertensive insulin-dependent diabetic patients. *Am J Hypertens.* 1992; 5(11): 837-846.

123. Fleming I, Kohlstedt K, Busse R. New fACEs to the renin-angiotensin system. *Physiology (Bethesda)*. 2005; 20: 91-95.

124. Fitzgerald SM, Evans RG, Bergström G, Anderson WP. Renal hemodynamic responses to intrarenal infusion of ligands for the putative angiotensin IV receptor in anesthetized rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999; 34(2): 206-211.

125. Fonseca VA. Insulin Resistance, Diabetes, Hypertension, and Renin–Angiotensin System Inhibition: Reducing Risk for Cardiovascular Disease. *J Clin Hypertens.* 2006; 8: 713–720.

126. Forman JP, Brenner BM. “Hypertension” and “microalbuminuria”: The bell tolls for thee. *Kidney Int*. 2006; 69: 22–28.

127. Fox CS, Coady S, Sorlie PD, Levy D, Meigs JB, D'Agostino RB Sr, Wilson PW, Savage PJ. Trends in cardiovascular complications of diabetes. *JAMA*. 2004; 292: 2495–2499.

128. Fretschner M, Endlich K, Gulbins E, Lang RE, Schlottmann K, Steinhausen M. Effects of endothelin on the renal microcirculation of the split hydronephrotic rat kidney. *Renal Physiol Biochem.* 1991; 14: 112–127.

129. Gall MA, Hougaard P, Borch-Johnsen K, Parving HH. Risk factors for development of incipient and overt diabetic nephropathy in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus: prospective, observational study. *BMJ.* 1997; 314(7083): 783-788.

130. Gammelgaard I, Wamberg S, Bie P. Systemic effects of angiotensin III in conscious dogs during acute double blockade of the renin-angiotensin-aldosterone-system. *Acta Physiol (Oxf).* 2006; 188(2): 129-138.

131. Gariepy CE, Ohuchi T, Williams SC, Richardson JA, Yanagisawa M. Salt-sensitive hypertension in endothelin-B receptor-deficient rats. *J Clin Invest.* 2000; 105: 925–933.

132. Gaspari F, Perco N, Ruggenenti P, Mosconi L, Amuchastegui CS, Guerini E, Daina E, Remuzzi G. Plasma clearance of nonradioactive iohexol as a measure of glomerular filtration rate. *J Am Soc Nephrol.* 1995; 6: 257-263.

133. Ge Y, Ahn D, Stricklett PK, Hughes AK, Yanagisawa M, Verbalis JG, Kohan DE. Collecting duct-specific knockout of endothelin-1 alters vasopressin regulation of urine osmolality. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005; 288: F912–920.

134. Gerstein HC, Mann JF, Yi Q, Zinman B, Dinneen SF, Hoogwerf B, Hallé JP, Young J, Rashkow A, Joyce C, Nawaz S, Yusuf S; HOPE Study Investigators. Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. *JAMA*. 2001; 286(4): 421-426.

135. Gerstein HC. Reduction of cardiovascular events and microvascular complications in diabetes with ACE inhibitor treatment: HOPE and MICRO-HOPE. *Diabetes Metab Res Rev.* 2002; 18 Suppl 3: S82-85.

136. Ghali JK, Liao Y, Simmons B, Castaner A, Cao G, Cooper RS. The prognostic role of left ventricular hypertrophy in patients with or without coronary artery disease. *Ann Intern Med.* 1992; 117(10): 831-836.

137. Giacchetti G, Sechi LA, Rilli S, Carey RM. The renin-angiotensin-aldosterone system, glucose metabolism and diabetes. *Trends Endocrinol Metab.* 2005; 16(3): 120-126.

138. Goetz KL. Physiology and pathophysiology of atrial peptides. *Am J Physiol.* 1988; 254 (1 Pt 1): E1–15.

139. Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. Studies on experimental hypertension: the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med* 1934; 59(3): 347–379.

140. Gonzalez AA, Prieto MC. Renin and the (pro)renin receptor in the renal collecting duct: Role in the pathogenesis of hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2015; 42(1): 14-21.

141. Graham DJ, Zhou EH, McKean S, Levenson M, Calia K, Gelperin K, Ding X, MaCurdy TE, Worrall C, Kelman JA. Cardiovascular and mortality risk in elderly

Medicare beneficiaries treated with olmesartan versus other angiotensin receptor blockers. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2014; 23(4): 331-339.

142. Graham I, Atar D, Borch-Johnsen K, Boysen G, Burell G, Cifkova R, Dallongeville J, De Backer G, Ebrahim S, Gjelsvik B, Herrmann-Lingen C, Hoes A, Humphries S, Knapton M, Perk J, Priori SG, Pyorala K, Reiner Z, Ruilope L, Sans-Menendez S, Op Reimer WS, Weissberg P, Wood D, Yarnell J, Zamorano JL, Walma E, Fitzgerald T, Cooney MT, Dudina A, Vahanian A, Camm J, De Caterina R, Dean V, Dickstein K, Funck-Brentano C, Filippatos G, Hellemans I, Kristensen SD, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Tendera M, Widimsky P, Zamorano JL, Altiner A, Bonora E, Durrington PN, Fagard R, Giampaoli S, Hemingway H, Hakansson J, Kjeldsen SE, Larsen mL, Mancia G, Manolis AJ, Orth-Gomer K, Pedersen T, Rayner M, Ryden L, Sammut M, Schneiderman N, Stalenhoef AF, Tokgözoglu L, Wiklund O, Zampelas A; European Society of Cardiology (ESC); European Association for Cardiovascular Prevention and Rehabilitation (EACPR); Council on Cardiovascular Nursing; European Association for Study of Diabetes (EASD); International Diabetes Federation Europe (IDF-Europe); European Stroke Initiative (EUSI); Society of Behavioural Medicine (ISBM); European Society of Hypertension (ESH); WONCA Europe (European Society of General Practice/Family Medicine); European Heart Network (EHN); European Atherosclerosis Society (EAS). European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: full text. Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2007; 14 Suppl 2: S1-113.

143. Grassi G, Quarti-Trevano F, Dell'Oro R, Mancia G. The "J curve" problem revisited: old and new findings. *Curr Hypertens Rep*. 2010; 12: 290–295.

144. Greenberg RN, Hill M, Crytzer J, Krause WJ, Eber SL, Hamra FK, Forte LR. Comparison of effects of uroguanylin, guanylin, and Escherichia coli heat-stable

enterotoxin STa in mouse intestine and kidney: evidence that uroguanylin is an intestinal natriuretic hormone. *J Investig Med*. 1997; 45: 276-283.

145. Groop LC, Eriksson JG. The etiology and pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes. *Ann Med.* 1992; 24(6): 483-489.

146. Gwathmey TM, Shaltout HA, Pendergrass KD, Pirro NT, Figueroa JP, Rose JC, Diz DI, Chappell MC. Nuclear angiotensin II type 2 (AT2) receptors are functionally linked to nitric oxide production. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009; 296(6): F1484-1493.

147. Hadjadj S, Belloum R, Bouhanick B, Gallois Y, Guilloteau G, Chatellier G, Alhenc-Gelas F, Marre M. Prognostic value of angiotensin-I converting enzyme I/D polymorphism for nephropathy in type 1 diabetes mellitus: a prospective study. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12(3): 541-549.

148. Haller H, Ito S, Izzo JL Jr, Januszewicz A, Katayama S, Menne J, Mimran A, Rabelink TJ, Ritz E, Ruilope LM, Rump LC, Viberti G; ROADMAP Trial Investigators. Olmesartan for the delay or prevention of microalbuminuria in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2011; 364(10): 907-917.

149. Handa RK, Krebs LT, Harding JW, Handa SE. Angiotensin IV AT4-receptor system in the rat kidney. *Am J Physiol.* 1998; 274 (2 Pt 2): F290-299.

150. Handelsman Y, Mechanick JI, Blonde L, Grunberger G, Bloomgarden ZT, Bray GA, Dagogo-Jack S, Davidson JA, Einhorn D, Ganda O, Garber AJ, Hirsch IB, Horton ES, Ismail-Beigi F, Jellinger PS, Jones KL, Jovanovič L, Lebovitz H, Levy P, Moghissi ES, Orzeck EA, Vinik AI, Wyne KL; AACE Task Force for Developing Diabetes Comprehensive Care Plan. American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for Clinical Practice for developing a diabetes mellitus comprehensive care plan. *Endocr Pract.* 2011; 17 Suppl 2: 1-53.

151. Harshfield GA, Alpert BS, Pulliam DA, Willey ES, Somes GW, Stapelton FB. Sodium excretion and racial differences in ambulatory blood pressure patterns. *Hypertension*. 1991; 18: 813–818.

152. Hayashi K, Wakino S, Sugano N, Ozawa Y, Homma K, Saruta T. Ca2+ channel subtypes and pharmacology in the kidney. *Circ Res.* 2007; 100(3): 342-353.

153. Haycock GB, Schwartz GJ, Wisotsky DH. Geometric method for measuring body surface area: a height-weight formula validated in infants, children, and adults. *J Pediatr.* 1978; 93(1): 62-66.

154. Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study Investigators. Effects of ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in people with diabetes melllitus: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. *Lancet*. 2000; 355: 253-259. [Erratum, *Lancet.* 2000; 356: 860].

155. Herman WH, Emancipator SN, Rhoten RL, Simonson MS. Vascular and glomerular expression of endothelin-1 in normal human kidney. *Am J Physiol*. 1998; 275: F8–17.

156. Herman WH, Wareham NJ. The diagnosis and classification of diabetes mellitus in nonpregnant adults. *Prim Care.* 1999; 26(4): 755-770.

157. Herrera M, Garvin J. A high-salt diet stimulates thick ascending limb eNOS expression by raising medullary osmolality and increasing release of endothelin-1. *Am J Physiol.* 2005; 288: F58–64.

158. Hillege HL, Fidler V, Diercks GF, van Gilst WH, de Zeeuw D, van Veldhuisen DJ, Gans RO, Janssen WM, Grobbee DE, de Jong PE; Prevention of Renal and Vascular End Stage Disease (PREVEND) Study Group: Urinary albumin excretion predicts cardiovascular and noncardiovascular mortality in general population. *Circulation.* 2002; 106: 1777–1782.

159. Hobart PM, Fogliano M, O'Connor BA, Schaefer IM, Chirgwin JM. Human renin gene: structure and sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984; 81(16): 5026-5030.

160. Hocher B, Schwarz A, Reinbacher D, Jacobi J, Lun A, Priem F, Bauer C, Neumayer HH, Raschack M. Effects of endothelin receptor antagonists on the progression of diabetic nephropathy. *Nephron.* 2001; 87(2): 161-169.

161. Hoffman A, Grossman E, Goldstein DS, Gill JRJ, Keiser HR. Urinary excretion rate ofendothelin-1 in patients with essential hypertension and salt sensitivity. *Kidney Int.* 1994; 45: 556–560.

162. Hollenberg NK, Fisher ND, Price DA. Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue: evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension.* 1998; 32(3): 387-392.

163. Hosoda K, Nakao K, Tamura N, Arai H, Ogawa Y, Suga S, Nakanishi S, Imura H. Organization, structure, chromosomal assignment, and expression of the gene encoding the human endothelin-A receptor. *J Biol Chem.* 1992; 267: 18797–18804.

164. Huang W, Lee D, Yang Z, Copolov DL, Lim AT. Norepinephrine stimulates immunoreactive (ir) atrial natriuretic peptide (ANP) secretion and pro-ANP mRNA expression from rat hypothalamic neurons in culture: effect of a2-adrenoceptors. *Endocrinology.* 1992; 130: 2426-2428.

165. Humalda JK, Goldsmith DJ, Thadhani R, de Borst MH. Vitamin D analogues to target residual proteinuria: potential impact on cardiorenal outcomes. *Nephrol Dial Transplant.* 2015; 30(12):1988-1994.

166. Hutchison FN, Cui X, Webster SK. The antiproteinuric action of angiotensin-converting enzyme is dependent on kinin. *J Am Soc Nephrol.* 1995; 6(4): 1216-1222.

167. Ibsen H,Olsen MH, Wachtell K, Borch-Johnsen K, Lindholm LH, Mogensen CE, Dahlöf B, Devereux RB, de Faire U, Fyhrquist F, Julius S, Kjeldsen SE, Lederballe-Pedersen O, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wan Y. Reduction in albuminuria translates to reduction in cardiovascular events in hypertensive patients: losartan intervention for endpoint reduction in hypertension study. *Hypertension*. 2005; 45: 198–202.

168. Ichihara A, Hayashi M, Kaneshiro Y, Suzuki F, Nakagawa T, Tada Y, Koura Y, Nishiyama A, Okada H, Uddin MN, Nabi AH, Ishida Y, Inagami T, Saruta T. Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the "handle"

region for nonproteolytic activation of prorenin. *J Clin Invest.* 2004; 114(8): 1128-1135.

169. Ichihara A, Suzuki F, Nakagawa T, Kaneshiro Y, Takemitsu T, Sakoda M, Nabi AH, Nishiyama A, Sugaya T, Hayashi M, Inagami T. Prorenin receptor blockade inhibits development of glomerulosclerosis in diabetic angiotensin II type 1a receptor-deficient mice. *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17(7): 1950-1961.

170. Ichihara S, Senbonmatsu T, Price E Jr, Ichiki T, Gaffney FA, Inagami T. Angiotensin II type 2 receptor is essential for left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis in chronic angiotensin II-induced hypertension. *Circulation.* 2001; 104(3): 346-351.

171. Iglarz M, Schiffrin EL. Role of endothelin-1 in hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2003; 5: 144–148.

172. Ikeda M, Kohno M, Takeda T. Endothelin production in cultured mesangial cells of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1995; 25: 1196–1201.

173. Ilieva G, Tolekova A, Logofetov A, Trifonova K. Plasma renin activity in tachistin-stimulated hypercalcemia and under the effect of chlorazine. Eksp Med Morfol. 1994; 32(3-4): 1-8. [Article in Bulgarian].

174. Ilieva G, Tolekova A, Logofetov A. Plasma aldosterone concentration during hypoxia, stimulated hyperglycaemia and when protein synthesis is blocked with actinomycin D. *Acta Physiol Pharmacol Bulg.* 1990; 16(4): 37-41.

175. Ilieva G, Tolekova A, Slavov E, Parvanova A, Logofetov A. The change of Electrolyte Balance and Renin-Angiotensin-Aldosterone system after peroral and intraperitoneal treatment with Nifedipine. In: Acid-Base and Electrolyte Balance, Molecular, Cellular, and Clinical aspects (eds. Natale Gaspare De Santo end Giovambatista Capasso), *Papers from the Second G.A.Borelli Conference*, presented July 8 and 9,1995; Istituto Italiano per gli Studi Filosofici, Naples, 1995, 335-340.

176. Imai T, Hirata Y, Emori T, Yanagisawa M, Masaki T, Marumo F. Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. *Hypertension.* 1992; 19: 753–757.

177. Imig JD, Navar GL, Zou LX, O'Reilly KC, Allen PL, Kaysen JH, Hammond TG, Navar LG. Renal endosomes contain angiotensin peptides, converting enzyme, and AT(1A) receptors. *Am J Physiol.* 1999; 277(2 Pt 2): F303-311.

178. Imig JD, Pham BT, LeBlanc EA, Reddy KM, Falck JR, Inscho EW. Cytochrome P450 and cyclooxygenase metabolites contribute to the endothelin-1 afferent arteriolar vasoconstrictor and calcium responses. *Hypertension.* 2000; 35: 307–312.

179. Imig JD. Eicosanoid regulation of the renal vasculature. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000; 279: F965–981.

180. Inoue A, Yanagisawa M, Takuwa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T. The human preproendothelin-1 gene. *J Biol Chem.* 1989; 264: 14954–14959.

181. Inscho EW, Imig JD, Cook AK, Pollock DM. ETA and ETB receptors differentially modulate afferent and efferent arteriolar responses to endothelin. *Br J Pharmacol.* 2005; 146: 1019–1026.

182. Israili ZH, Hall WD. Cough and angioneurotic edema associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. A review of the literature and pathophysiology. *Ann Intern Med.* 1992; 117(3): 234-242.

183. Ito H, Hirata Y, Adachi S, Tanaka M, Tsujino M, Koike A, Nogami A, Murumo F, Hiroe M. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J Clin Invest.* 1993; 92: 398–403.

184. Iwasaki S, Homma T, Matsuda Y, Kon V. Endothelin receptor subtype B mediates autoinduction of endothelin-1 in rat mesangial cells. *J Biol Chem.* 1995; 270: 6997–7003.

185. Jackman HL, Morris PW, Deddish PA, Skidgel RA, Erdos EG. Inactivation of endothelin I by deamidase (lysosomal protective protein). *J Biol Chem.* 1992; 267: 2872–2875.

186. Jacques D, Sader S, Perreault C, Abdel-Samad D, Jules F, Provost C. NPY, ET-1, and Ang II nuclear receptors in human endocardial endothelial cells. *Can J Physiol Pharmacol.* 2006; 84: 299–307.

187. Jennings DL, Kalus JS, Coleman CI, Manierski C, Yee J. Combination therapy with an ACE inhibitor and an angiotensin receptor blocker for diabetic nephropathy: a meta-analysis. *Diabet Med*. 2007; 24: 486-493.

188. Juillerat L, Nussberger J, Ménard J, Mooser V, Christen Y, Waeber B, Graf P, Brunner HR. Determinants of angiotensin II generation during converting enzyme inhibition. *Hypertension.* 1990; 16(5): 564-572.

189. Kailasam MT, Parmer RJ, Cervenka JH, Wu RA, Ziegler MG, Kennedy BP, Adegbile IA, O'Connor DT. Divergent effects of dihydropyridine and phenylalkylamine calcium channel antagonist classes on autonomic function in human hypertension. *Hypertension*. 1995; 26(1): 143-149.

190. Kangawa K, Matsuo H. Purification and complete amino acid sequence of a-human atrial natriuretic polypeptide (a-hANP). *Biochem Biophys Res Commun*. 1984; 118: 131-139.

191. Kaplan NM. Implications for cost-effectiveness. Combination therapy for systemic hypertension. *Am J Cardiol.* 1995; 76(8): 595-597.

192. Kaplan NM. The challenge of managing multiple cardiovascular risk factors. *Am J Hypertens.* 1997; 10(7 Pt 2): 167S-169S.

193. Karet FE, Davenport AP. Localization of endothelin peptides in human kidney. *Kidney Int.* 1996; 49: 382–387.

194. Karet FE, Kuc RE, Davenport AP. Novel ligands BQ123 and BQ3020 characterize endothelin receptor subtypes ETA and ETB in human kidney. *Kidney Int.* 1993; 44: 36–42.

195. Keller CK, Bergis KH, Fliser D, Ritz E. Renal findings in patients with short-term type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol.* 1996; 7(12): 2627-2635.

196. Kim MJ, Song JH, Suh JH, Lee SW, Kim GA. Additive antiproteinuric effect of combination therapy with ACE inhibitor and angiotensin II receptor antagonist: differential short-term response between IgA nephropathy and diabetic nephropathy. *Yonsei Med J*. 2003; 44: 463-472.

197. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care.* 1998; 21(9): 1414-1431.

198. Kitamura K, Tanaka T, Kato J, Eto T, Tanaka K: Regional distribution of immunoreactive endothelin in porcine tissue: Abundance in inner medulla of kidney. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989; 161: 348–352.

199. Ko SH, Hong OK, Kim JW, Ahn YB, Song KH, Cha BY, Son HY, Kim MJ, Jeong IK, Yoon KH. High glucose increases extracellular matrix production in pancreatic stellate cells by activating the renin-angiotensin system. *J Cell Biochem.* 2006; 98(2): 343-355.

200. Kobori H, Harrison-Bernard LM, Navar LG. Enhancement of angiotensinogen expression in angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension.* 2001; 37(5): 1329-1335.

201. Kohan DE, Cleland JG, Rubin LJ, Theodorescu D, Barton M: Clinical trials with endothelin receptor antagonists: What went wrong and where can we improve? *Life Sci*. 2012; 91: 528–539.

202. Kohan DE, Hughes AK, Perkins SP. Characterization of endothelin receptors in the inner medullary collecting duct of the rat. *J Biol Chem.* 1992; 267: 12336–12340.

203. Kohan DE, Inscho EW, Wesson D, Pollock DM. Physiology of endothelin and the kidney. *Compr Physiol.* 2011 (a); 1(2): 883-919.

204. Kohan DE, Padilla E. Endothelin-1 is an autocrine factor in rat inner medullary collecting ducts. *Am J Physiol.* 1992; 263: F607–612.

205. Kohan DE, Padilla E. Osmolar regulation of endothelin-1 production by rat inner medullary collecting duct. *J Clin Invest.* 1993; 91: 1235–1240.

206. Kohan DE, Pollock DM. Endothelin antagonists for diabetic and non-diabetic chronic kidney disease. *Br J Clin Pharmacol.* 2013; 76(4): 573-579.

207. Kohan DE, Pritchett Y, Molitch M, Wen S, Garimella T, Audhya P, Andress DL. Addition of atrasentan to renin-angiotensin system blockade reduces albuminuria in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2011 (б); 22(4): 763-772.

208. Kohan DE. Endothelin and collecting duct sodium and water transport. *Contrib Nephrol.* 2011; 172: 94-106.

209. Kohan DE. Endothelin production by human inner medullary collecting duct cells. *J Am Soc Nephrol.* 1993; 3: 1719–1721.

210. Kohan DE. Endothelin synthesis by rabbit renal tubule cells. *Am J Physiol.* 1991; 261: F221–F226.

211. Kohan DE. Endothelins in the normal and diseased kidney. *Am J Kid Dis.* 1997; 29: 2–26.

212. Kohno M, Murakawa K, Yasunari K, Yokokawa K, Horio T, Kurihara N, Takeda T. Prolonged blood pressure elevation after endothelin administration in bilaterally nephrectomized rats. *Metabolism.* 1989; 38: 712–713.

213. Koitka A, Cooper ME, Thomas MC, Tikellis C. Angiotensin converting enzyme 2 in the kidney. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008; 35(4): 420-425.

214. Kong X, Wang X, Hellermann G, Lockey RF, Mohapatra S. Mice Deficient in Atrial Natriuretic Peptide Receptor A (NPRA) Exhibit Decreased Lung Inflammation: Implication of NPRA Signaling in Asthma Pathogenesis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2007; 119 (1): S127.

215. Koopmans RP, Insel PA, Michel MC. Pharmacogenetics of hypertension treatment: a structured review. *Pharmacogenetics*. 2003; 13(12): 705-713.

216. Kopp UC, Olson LA, DiBona GF. Renorenal reflex responses to mechano- and chemoreceptor stimulation in the dog and rat. *Am J Physiol.* 1984; 246: F67–77.

217. Koren MJ, Devereux RB, Casale PN, Savage DD, Laragh JH. Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension. *Ann Intern Med.* 1991; 114(5): 345-352.

218. Kowey PR, Dickson TZ, Zhang Z, Shahinfar S, Brenner BM; RENAAL Investigators. Losartan and end-organ protection - lessons from the RENAAL study. *Clin Cardiol.* 2005; 28(3): 136-142.

219. Kramár EA, Krishnan R, Harding JW, Wright JW. Role of nitric oxide in angiotensin IV-induced increases in cerebral blood flow. *Regul Pept.* 1998; 74(2-3): 185-192.

220. Krop M, Lu X, Danser AH, Meima ME. The (pro)renin receptor. A decade of research: what have we learned? *Pflugers Arch.* 2013; 465(1): 87-97.

221. Krum H, Viskoper RJ, Lacourciere Y, Budde M, Charlon V. The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. Bosentan Hypertension Investigators. *N Engl J Med.* 1998; 338(12): 784-790.

222. Kuc RE, Davenport AP. Endothelin-A-receptors in human aorta and pulmonary arteries are downregulated in patients with cardiovascular disease: an adaptive response to increased levels of endothelin-1? *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000; 36: S377–379.

223. Kucharewicz I, Pawlak R, Matys T, Chabielska E, Buczko W. Angiotensin-(1-7): an active member of the renin-angiotensin system. *J Physiol Pharmacol.* 2002; 53 (4 Pt 1): 533-540.

224. Kumar R, Singh VP, Baker KM. The intracellular renin-angiotensin system: a new paradigm. *Trends Endocrinol Metab.* 2007; 18(5): 208-214.

225. Kunikullaya UK, Ananthakrishnan V, Goturu J. Robert Tigerstedt and the discovery of renin - a revisit. *Int J Cardiol.* 2012; 158(1): 1-5.

226. Kunz R, Friedrich C, Wolbers M, Mann JF. Meta-analysis: effect of monotherapy and combination therapy with inhibitors of the renin angiotensin system on proteinuria in renal disease. *Ann Intern Med.* 2008; 148(1): 30-48.

227. Kurtz A, Kaissling B, Busse R, Baier W. Endothelial cells modulate renin secretion from isolated mouse juxtaglomerular cells. *J Clin Invest.* 1991; 88: 1147–1154.

228. Lacourcière Y, Bélanger A, Godin C, Hallé JP, Ross S, Wright N, Marion J. Long-term comparison of losartan and enalapril on kidney function in hypertensive type 2 diabetics with early nephropathy. *Kidney Int.* 2000; 58: 762-769.

229. Laghmani K, Preisig P, Alpern R. The role of endothelin in proximal tubule proton secretion and the adaptation to a chronic metabolic acidosis. *J Nephrol.* 2002; 15(Suppli 5): S75–87.

230. Lanese DM, Yuan BH, McMurtry IF, Conger JD. Comparative sensitivities of isolated rat renal arterioles to endothelin. *Am J Physiol.* 1992; 263: F894–899.

231. Law MR, Morris JK, Wald NJ. Use of blood pressure lowering drugs in the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of 147 randomised trials in the context of expectations from prospective epidemiological studies. *BMJ.* 2009; 338: b1665.

232. Lebovitz HE, Wiegmann TB, Cnaan A, Shahinfar S, Sica DA, Broadstone V, Schwartz SL, Mengel MC, Segal R, Versaggi JA. Renal protective effects of enalapril in hypertensive NIDDM: role of baseline albuminuria. *Kidney Int Suppl.* 1994; 45: S150-155.

233. Lee TJ, Shin SJ, Tsai JH. Increased urinary endothelin-1 like immunoreactivity in NIDDM patients with albuminuria. *Diabetes care*. 1994; 17: 263-266.

234. Lenoir O, Milon M, Virsolvy A, Hénique C, Schmitt A, Massé JM, Kotelevtsev Y, Yanagisawa M, Webb DJ, Richard S, Tharaux PL. Direct action of endothelin-1 on podocytes promotes diabetic glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol.* 2014; 25(5): 1050-1062.

235. Leung PS. The peptide hormone angiotensin II: its new functions in tissues and organs. *Curr Protein Pept Sci.* 2004; 5(4): 267-273.

236. Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med.* 1998; 339: 321-328.

237. Levin ER, Hu R-M, Rossi M, Pickart M. Arginine vasopressin stimulates atrial natriuretic peptide gene expression and secretion from rat diencephalic neurons. *Endocrinology.* 1992; 131: 1417-1423.

238. Levin ER, Isackson PJ, Hu R-M. Endothelin increases atrial natriuretic peptide production in cultured rat diencephalic neurons. *Endocrinology.* 1991; 128: 2925-2930.

239. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med.* 1990; 322(22): 1561-1566.

240. Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. The effect of angiotensinconverting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med*. 1993; 329: 1456–1462.

241. Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, Berl T, Pohl MA, Lewis JB, Ritz E, Atkins RC, Rohde R, Raz I; Collaborative Study Group. l. Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2001; 345: 851–860.

242. Li XC, Campbell DJ, Ohishi M, Yuan S, Zhuo JL. AT1 receptor-activated signaling mediates angiotensin IV-induced renal cortical vasoconstriction in rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006; 290(5): F1024-1033.

243. Li XC, Zhuo JL. Intracellular ANG II directly induces in vitro transcription of TGF-beta1, MCP-1, and NHE-3 mRNAs in isolated rat renal cortical nuclei via activation of nuclear AT1a receptors. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008; 294(4): C1034-1045.

244. Li XC, Zhuo JL. Proximal tubule-dominant transfer of AT(1a) receptors induces blood pressure responses to intracellular angiotensin II in AT(1a) receptor-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2013; 304(8): R588-598.

245. Licht C, Laghmani K, Yanagisawa M, Preisig PA, Alpern RJ. An autocrine role for endothelin-1 in the regulation of proximal tubule NHE3. *Kidney Int.* 2004; 65: 1320–1326.

246. Lindholm LH, Ibsen H, Dahlöf B, Devereux RB, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Julius S, Kjeldsen SE, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H, Aurup P, Edelman J, Snapinn S; LIFE Study Group. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet.* 2002; 359(9311): 1004-1010.

247. Liu G, Zhou TB, Jiang Z, Zheng D. Association of ACE I/D gene polymorphism with T2DN susceptibility and the risk of T2DM developing into T2DN in a Caucasian population. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2015; 16(1): 165-171.

248. Lombardi F, Parati G. An update on: cardiovascular and respiratory changes during sleep in normal and hypertensive subjects. *Cardiovasc Res.* 2000; 45(1): 200-211.

249. Loutzenhiser R, Epstein M, Hayashi K, Horton C. Direct visualization of effects of endothelin on the renal microvasculature. *Am J Physiol.* 1990; 258: F61–68.

250. Lüscher TF, Barton M: Endothelins and endothelin receptor antagonists: Therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs.*Circulation*. 2000; 102: 2434–2440.

251. Lüscher TF, Yang Z. Calcium antagonists and ACE inhibitors. Effect on endothelium and vascular smooth muscle. *Drugs.* 1993; 46 Suppl 2: 121-132.

252. Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, Grassi G, Heagerty AM, Kjeldsen SE, Laurent S, Narkiewicz K, Ruilope L, Rynkiewicz A, Schmieder RE, Boudier HA, Zanchetti A, Vahanian A, Camm J, De Caterina R, Dean V, Dickstein K, Filippatos G, Funck-Brentano C, Hellemans I, Kristensen SD, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Tendera M, Widimsky P,

Zamorano JL, Erdine S, Kiowski W, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Lindholm LH, Viigimaa M, Adamopoulos S, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Bertomeu V, Clement D, Erdine S, Farsang C, Gaita D, Lip G, Mallion JM, Manolis AJ, Nilsson PM, O'Brien E, Ponikowski P, Redon J, Ruschitzka F, Tamargo J, van Zwieten P, Waeber B, Williams B; Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension; European Society of Cardiology. 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens.* 2007; 25(6): 1105-1187.

253. Mancia G, Laurent S, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Burnier M, Caulfield MJ, Cifkova R, Clément D, Coca A, Dominiczak A, Erdine S, Fagard R, Farsang C, Grassi G, Haller H, Heagerty A, Kjeldsen SE, Kiowski W, Mallion JM, Manolis A, Narkiewicz K, Nilsson P, Olsen MH, Rahn KH, Redon J, Rodicio J, Ruilope L, Schmieder RE, Struijker-Boudier HA, van Zwieten PA, Viigimaa M, Zanchetti A; European Society of Hypertension. Reappraisal of European guidelines on hypertension management: a European Society of hypertension task force document. *J Hypertens*. 2009; 27: 2121–2158.

254. Mancia G, Omboni S, Grassi G. Combination treatment in hypertension: the VeraTran Study. *Am J Hypertens.* 1997; 10(7 Pt 2): 153S-158S.

255. Mancini GB, Henry GC, Macaya C, O'Neill BJ, Pucillo AL, Carere RG, Wargovich TJ, Mudra H, Lüscher TF, Klibaner MI, Haber HE, Uprichard AC, Pepine CJ, Pitt B: Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing Endothelial Dysfunction) Study. *Circulation.* 1996; 94: 258–265.

256. Mann JF, Green D, Jamerson K, Ruilope LM, Kuranoff SJ, Littke T, Viberti G; ASCEND Study Group. Avosentan for overt diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2010; 21(3): 527-535.

257. Mann JF, Schmieder RE, McQueen M, Dyal L, Schumacher H, Pogue J, Wang X, Maggioni A, Budaj A, Chaithiraphan S, Dickstein K, Keltai M, Metsärinne K, Oto A, Parkhomenko A, Piegas LS, Svendsen TL, Teo KK, Yusuf S; ONTARGET investigators. Renal outcomes with telmisartan, ramipril, or both, in people at high vascular risk (the ONTARGET study): a multicentre, randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet*. 2008; 372: 547-553.

258. Marchetti J, Meneton P, Lebrun F, Bloch-Faure M, Rajerison RM. The parietal sheet of Bowman's capsule of rat renal glomerulus: a target of endothelin and PAF. *Am J Physiol.* 1995; 268: F1053–1061.

259. Marin-Grez M, Fleming JT, Steinhausen M. Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilatation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney. *Nature*. 1986; 324: 473-476.

260. Markova P, Tolekova A, Ilieva G, Gurchev R. Role of endogenous endotelins in the regulation of plasma renin activity by nitric oxide and renal nerves in spontaneously hypertensive rats. *Acta medica bulgarica.* 2007; 1.

261. Markova P, Tolekova A, Ilieva Г, Chakalov I. Effect of renal nerves and nitric oxide on plasma renin activity in spontaneously hypertensive rats. *Trakia journal of sciences.* 2006; 4(3): 16-20.

262. Marre M. Genetics and the prediction of complications in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 1999; 22 Suppl 2: B53-58.

263. Mathew J, Sleight P, Lonn E, Johnstone D, Pogue J, Yi Q, Bosch J, Sussex B, Probstfield J, Yusuf S; Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Investigators. Reduction of cardiovascular risk by regression of electrocardiographic markers of left ventricular hypertrophy by the angiotensin-converting enzyme inhibitor ramipril. *Circulation.* 2001; 104(14): 1615-1621.

264. Matsumoto T, Wada A, Tsutamoto T, Ohnishi M, Isono T, Kinoshita M. Chymase inhibition prevents cardiac fibrosis and improves diastolic dysfunction in the progression of heart failure. *Circulation.* 2003; 107: 2555-2558.

265. Matsuo G, Matsummura Y, Tadano K, Hashimoto T, Morimoto S. Effects of sarafotoxin S6c on renal haemodynamics and urine formation in anaesthetized dogs. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1997; 24: 487–491.

266. Mattock MB, Barnes DJ, Viberti G, Keen H, Burt D, Hughes JM, Fitzgerald AP, Sandhu B, Jackson PG. Microalbuminuria and coronary heart disease in NIDDM: an incidence study. *Diabetes.* 1998; 47(11): 1786-1792.

267. Menard J, Bellet M. Calcium antagonists-ACE inhibitors combination therapy: objectives and methodology of clinical development. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993; 21 Suppl 2: S49-54.

268. Menne J, Ritz E, Ruilope LM, Chatzikyrkou C, Viberti G, Haller H. The Randomized Olmesartan and Diabetes Microalbuminuria Prevention (ROADMAP) observational follow-up study: benefits of RAS blockade with olmesartan treatment are sustained after study discontinuation. *J Am Heart Assoc.* 2014; 3(2): e000810.

269. Messerli FH, Mancia G, Conti CR, Hewkin AC, Kupfer S, Champion A, Kolloch R, Benetos A, Pepine CJ. Dogma disputed: can aggressively lowering blood pressure in hypertensive patients with coronary artery disease be dangerous? *Ann Intern Med.* 2006; 144: 884–893.

270. Messerli FH, Nussberger J. Vasopeptidase inhibition and angio-oedema. *Lancet.* 2000; 356: 608–609.

271. Mimran A, Ribstein J. Angiotensin receptor blockers: pharmacology and clinical significance. *J Am Soc Nephrol.* 1999; 10 Suppl 12: S273-277.

272. Mizuiri S, Hemmi H, Arita M, Ohashi Y, Tanaka Y, Miyagi M, Sakai K, Ishikawa Y, Shibuya K, Hase H, Aikawa A. Expression of ACE and ACE2 in individuals with diabetic kidney disease and healthy controls. *Am J Kidney Dis.* 2008; 51(4): 613-623.

273. Mitchell KD, Navar LG. Influence of intrarenally generated angiotensin II on renal hemodynamics and tubular reabsorption. *Ren Physiol Biochem.* 1991; 14(4-5): 155-163.

274. Mogensen CE, Christensen CK. Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. *N Engl J Med.* 1984; 311(2): 89-93.

275. Mogensen CE, Neldam S, Tikkanen I, Oren S, Viskoper R, Watts RW, Cooper ME. Randomised controlled trial of dual blockade of renin-angiotensin system in patients with hypertension, microalbuminuria, and non-insulin dependent diabetes: the candesartan and lisinopril microalbuminuria (CALM) study. *BMJ*. 2000; 321: 1440-1444.

276. Mogensen CE. High blood pressure as a factor in the progression of diabetic nephropathy. *Acta Med Scand Suppl*. 1976; 602: 29-32.

277. Mogensen CE. Introduction: nature of microalbuminuria, proteinuria, and progressive renal disease. *J Diabetes Complications.* 1995; 9(1): 2-6.

278. Mogensen CE. Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity-onset diabetes. *N Engl J Med.* 1984; 310(6): 356-360.

279. Moore KB, McKenna K, Osman M, Tormey WP, McDonald D, Thompson CJ. Atrial natriuretic peptide increases urinary albumin excretion in people with normoalbuminuric type 2 diabetes. *Ir J Med Sci*. 2007; 176: 67–73.

280. Morelli E, Loon N, Meyer T, Peters W, Myers BD. Effects of converting-enzyme inhibition on barrier function in diabetic glomerulopathy. *Diabetes.* 1990; 39(1): 76-82.

281. Moridaira K, Nodera M, Sato G, Yanagisawa H. Detection of prepro-ET-1 mRNA in normal rat kidney by in situ RT-PCR. *Nephron Exp Nephrol.* 2003; 95: e55–61.

282. Morigi M, Buelli S, Angioletti S, Zanchi C, Longaretti L, Zoja C, Galbusera M, Gastoldi S, Mundel P, Remuzzi G, Benigni A. In response to protein load podocytes reorganize cytoskeleton and modulate endothelin-1 gene: implication for permselective dysfunction of chronic nephropathies. *Am J Pathol.* 2005; 166: 1309–1320.

283. Morigi M, Buelli S, Zanchi C, Longaretti L, Macconi D, Benigni A, Moioli D, Remuzzi G, Zoja C. Shigatoxin-induced endothelin-1 expression in cultured

podocytes autocrinally mediates actin remodeling. *Am J Pathol.* 2006; 169: 1965–1975.

284. Muller DN, Klanke B, Feldt S, Cordasic N, Hartner A, Schmieder RE, Luft FC, Hilgers KF. (Pro)renin receptor peptide inhibitor "handle-region" peptide does not affect hypertensive nephrosclerosis in Goldblatt rats. *Hypertension.* 2008; 51(3): 676-681.

285. Murakami K, Hirose S, Miyazaki H, Imai T, Hori H, Hayashi T, Kageyama R, Ohkubo H, Nakanishi S. Complementary DNA sequences of renin. State-of-the-art review. *Hypertension*. 1984; 6(2 Pt 2): 95-100.

286. Nadarajah R, Milagres R, Dilauro M, Gutsol A, Xiao F, Zimpelmann J, Kennedy C, Wysocki J, Batlle D, Burns KD. Podocyte-specific overexpression of human angiotensin-converting enzyme 2 attenuates diabetic nephropathy in mice. *Kidney Int.* 2012; 82(3): 292-303.

287. Nakagawa T, Akaki J, Satou R, Takaya M, Iwata H, Katsurada A, Nishiuchi K, Ohmura Y, Suzuki F, Nakamura Y. The His-Pro-Phe motif of angiotensinogen is a crucial determinant of the substrate specificity of renin. *Biol Chem.* 2007; 388(2): 237-246.

288. Nambi P, Pullen M, Wu H, Aiyar N, Ohlstein EH, Edwards RM. Identification of endothelin receptor subtypes in human renal cortex and medulla using subtypes-selective ligands. *Endocrinology.* 1992; 131: 1081–1086.

289. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classifi cation and stratifi cation. *Am J Kidney Dis.* 2002; 39 (Suppl 1): S1–266.

290. National Kidney Foundation. KDOQI Clinical Practice Guideline for Diabetes and CKD: 2012 Update. *Am J Kidney Dis.* 2012; 60(5): 850-886.

291. Navar L, Arendshorst W, Pallone T, Inscho E, Imig J, Bell P. The Renal Microcirculation. In: Tuma, RF.; D, W.; L, K., editors. *Handbook of Physiology, Microcirculation. San Diego: Elsevier.* 2008; p. 550-683.

292. Navar LG, Prieto MC, Satou R, Kobori H. Intrarenal angiotensin II and its contribution to the genesis of chronic hypertension. *Curr Opin Pharmacol.* 2011; 11(2): 180-186.

293. Nelson RG, Knowler WC, Pettitt DJ, Saad MF, Charles MA, Bennett PH. Assessing risk of overt nephropathy in diabetic patients from albumin excretion in untimed urine specimens. *Arch Intern Med*. 1991; 151: 1761-1765.

294. Nelson RG, Newman JM, Knowler WC, Sievers ML, Kunzelman CL, Pettitt DJ, Moffett CD, Teutsch SM, Bennett PH. Incidence of end-stage renal disease in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in Pima Indians. *Diabetologia.* 1988; 31(10): 730-736.

295. Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, Bouzhir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest.* 2002; 109(11): 1417-1427.

296. Niimura F, Labosky PA, Kakuchi J, Okubo S, Yoshida H, Oikawa T, Ichiki T, Naftilan AJ, Fogo A, Inagami T, et al. Gene targeting in mice reveals a requirement for angiotensin in the development and maintenance of kidney morphology and growth factor regulation. *J Clin Invest.* 1995; 96(6): 2947-2954.

297. Nishiyama A, Seth DM, Navar LG. Renal interstitial fluid concentrations of angiotensins I and II in anesthetized rats. *Hypertension.* 2002; 39(1): 129-134.

298. Niu MJ, Yang JK, Lin SS, Ji XJ, Guo LM. Loss of angiotensin-converting enzyme 2 leads to impaired glucose homeostasis in mice. *Endocrine.* 2008; 34(1-3): 56-61.

299. Nosadini R, Tonolo G. Cardiovascular and renal protection in type 2 diabetes mellitus: the role of calcium channel blockers. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13 Suppl 3: S216-223.

300. Numaguchi Y, Ishii M, Kubota R, Morita Y, Yamamoto K, Matsushita T, Okumura K, Murohara T. Ablation of angiotensin IV receptor attenuates hypofibrinolysis via PAI-1 downregulation and reduces occlusive arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29(12): 2102-2108.

301. Okin PM, Devereux RB, Jern S, Kjeldsen SE, Julius S, Nieminen MS, Snapinn S, Harris KE, Aurup P, Edelman JM, Dahlof B; Losartan Intervention for Endpoint reduction in hypertension Study Investigations. Regression of electrocardiographic left ventricular hypertrophy by losartan versus atenolol: The Losartan Intervention for Endpoint reduction in Hypertension (LIFE) Study. *Circulation.* 2003; 108(6): 684-690.

302. Ondetti MA, Rubin B, Cushman DW. Design of specific inhibitors of angiotensinconverting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science.* 1977; 196: 441–444.

303. ONTARGET Investigators, Yusuf S, Teo KK, Pogue J, Dyal L, Copland I, Schumacher H, Dagenais G, Sleight P, Anderson C. Telmisartan, ramipril, or both in patients at high risk for vascular events. *N Engl J Med.* 2008; 358(15): 1547-1559.

304. Ortlepp JR, Vosberg HP, Reith S, Ohme F, Mahon NG, Schröder D, Klues HG, Hanrath P, McKenna WJ. Genetic polymorphisms in the renin-angiotensin-aldosterone system associated with expression of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy: a study of five polymorphic genes in a family with a disease causing mutation in the myosin binding protein C gene. *Heart.* 2002; 87(3): 270-275.

305. Os I, Gudmundsdottir H, Kjeldsen SE, Oparil S. Treatment of isolated systolic hypertension in diabetes mellitus type 2. *Diabetes Obes Metab*. 2006; 8: 381–387.

306. Oshima Y, Kinouchi K, Ichihara A, Sakoda M, Kurauchi-Mito A, Bokuda K, Narita T, Kurosawa H, Sun-Wada GH, Wada Y, Yamada T, Takemoto M, Saleem MA, Quaggin SE, Itoh H. Prorenin receptor is essential for normal podocyte structure and function. *J Am Soc Nephrol.* 2011; 22(12): 2203-2212.

307. Otsuka A, Mikami H, Katahira K, Tsunetoshi T, Minamitani K, Ogihara T. Changes in plasma renin activity and aldosterone concentration in response to endothelin injection in dogs. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1989; 121: 361–364.

308. Owada A, Tomita K, Terada Y, Sakamoto H, Nonguchi H, Marumo F. Endothelin (ET)-3 stimulates cyclic guanosine 3',5'-monophosphate production via ETB receptor by producing nitric oxide in isolated rat glomerulus, and in cultured rat mesangial cells. *J Clin Invest.* 1994; 93: 556–563.

309. Oyekan A, Balazy M, McGiff JC. Renal oxygenases: differential contribution to vasoconstriction induced by ET-1 and ANG II. *Am J Physiol.* 1997; 273(1 Pt 2): R293-300.

310. Ozturk S, Sar F, Bengi-Bozkurt O, Kazancioglu R. Study of ACEI versus ARB in managing hypertensive overt diabetic nephropathy: long-term analysis. *Kidney Blood Press Res*. 2009; 32(4): 268-275.

311. Padia SH, Kemp BA, Howell NL, Fournie-Zaluski MC, Roques BP, Carey RM. Conversion of renal angiotensin II to angiotensin III is critical for AT2 receptor-mediated natriuresis in rats. *Hypertension.* 2008; 51(2): 460-465.

312. Padia SH, Kemp BA, Howell NL, Siragy HM, Fournie-Zaluski MC, Roques BP, Carey RM. Intrarenal aminopeptidase N inhibition augments natriuretic responses to angiotensin III in angiotensin type 1 receptor-blocked rats. *Hypertension.* 2007; 49(3): 625-630.

313. Page IH, Helmer OM. A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin-activator. *J Exp Med.* 1940; 71(1): 29-42.

314. Pallone TL, Zhang Z, Rhinehart K. Physiology of the renal medullary microcirculation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003; 284: F253–266.

315. Palmer SC, Mavridis D, Navarese E, Craig JC, Tonelli M, Salanti G, Wiebe N, Ruospo M, Wheeler DC, Strippoli GF. Comparative efficacy and safety of blood pressure-lowering agents in adults with diabetes and kidney disease: a network meta-analysis. *Lancet.* 2015; 385(9982): 2047-2056.

316. Parvanova A, Chiurchiu C, Ruggenenti P, Remuzzi G. Inhibition of the renin-angiotensin system and cardio-renal protection: focus on losartan and angiotensin receptor blockade. *Expert Opin Pharmacother.* 2005; 6(11): 1931-1942.

317. Parvanova A, Dimitrov BD, Ruggenenti P, Iliev I, Tolekova A, Trevisan R, Remuzzi G. Insulin resistance as a marker of type 2 diabetic nephropathy. *Proceedings of the Jubilee Scientific Conference of Thracian University,* Stara Zagora, October 2002: 12-16. [In English].

318. Parvanova AI, Iliev IP, Bossi AC, Trevisan R, Ruggenenti P, Remuzzi G, for VARIETY Study Group. VA.R.I.E.TY. Un trial prospettico, randomizzato, multicentrico finalizzato a testare se il doppio blocco del RAS con un ACE inibitore ed un sartano previene la microalbuminuria in pazienti con diabete mellito di tipo 2 e “high-normal” albuminuria più efficacemente di ciascun farmaco usato singolarmente. Atti XVIII Congresso Interassociativo AMD-SID Regione Lombardia, Bergamo, Italia, 21-22 settembre 2012. *G It Diabetol Metab.* 2012 (a); 32: 169-170. [In Italian].

319. Parvanova AI, Iliev IP, Bossi AC, Trillini M, Rota S, Aparicio C, Abbate M, Prandini S, Lecchi V, Yakymchuk S, Rubis N, Trevisan R, Ruggenenti P, Remuzzi G, for the PROCEED Study Group. Disegno dello studio PROCEED per la valutazione del possibile effetto antiproteinurico del Paracalcitolo, attivatore selettivo del recettore della vitamina D, in pazienti diabetici ipertesi. 20° Congresso Interassociativo AMD-SID Regione Lombardia, Gardone Riviera (BS), Italia, 3-4 ottobre 2014. G It Diabetol Metab. 2014; 34: 176-177. [In Italian].

320. Parvanova AI, Iliev IP, Trevisan R, Bossi AC, Ruggenenti P, Remuzzi G for VALID Study Group. VAL.I.D.: Un trial prospettico, randomizzato, multicentrico finalizzato a testare se il doppio blocco del RAS con un ACE inibitore ed un sartano previene la progressione verso l’insufficienza renale terminale in pazienti con diabete mellito di tipo 2 e nefropatia diabetica conclamata più efficacemente di ciascun farmaco usato singolarmente. Atti XVIII Congresso Interassociativo AMD-SID Regione Lombardia, Bergamo, Italia, 21-22 settembre 2012. *G It Diabetol Metab*. 2012 (б); 32: 168-169. [In Italian].

321. Parvanova A, Pisoni R, Dimitrov BD, Iliev I, Perna A, Ruggeneti P, Stucchi N, Lutz J, Remuzzi G. Relative renoprotective effect of ACE inhibitors (ACEi),

angiotensin II antagonists (ATA), ACEi and ATA combination and dihydropyridine calcium channel blockers (dCCBs) in overt diabetic nephropathy of Type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12: A0802.

322. Parvanova A, Trevisan R, Iliev I, Dimitrov BD, Vedovato M, Tiengo A, Remuzzi G, Ruggenenti P. Insulin resistance and microalbuminuria, A Cross-sectional, case-control study of 158 patients with type 2 diabetes and different degrees of urinary albumin excretion. *Diabetes*. 2006; 55: 1456-1462.

323. Parving HH, Hommel E, Smidt UM. Protection of kidney function and decrease in albuminuria by captopril in insulin dependent diabetics with nephropathy. *BMJ*. 1988; 297: 1086–1091.

324. Parving HH, Hovind P. Microalbuminuria in type 1 and type 2 diabetes mellitus: evidence with angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers for treating early and preventing clinical nephropathy. *Curr Hypertens Rep*. 2002; 4: 387–339.

325. Parving HH, Lehnert H, Bröchner-Mortensen J, Gomis R, Andersen S, Arner P; Irbesartan in Patients with Type 2 Diabetes and Microalbuminuria Study Group: The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2001; 345: 870–878.

326. Parving HH, Mauer M, Ritz E. Diabetic nephropathy. In: Brenner BM, ed. Brenner & Rector's The kidney. 7th ed. Vol. 2. Philadelphia: Saunders, 2004: 1777-1818.

327. Patel VB, Parajuli N, Oudit GY. Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in diabetic cardiovascular complications. *Clin Sci (Lond).* 2014; 126(7): 471-482.

328. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev.* 2006; 86(3): 747-803.

329. Perez-Maraver M, Carrera MJ, Micalo T, Sahun M, Vinzia C, Soler J, Montanya E. Renoprotective effect of diltiazem in hypertensive type 2 diabetic

patients with persistent microalbuminuria despite ACE inhibitor treatment. *Diabetes Res Clin Pract.* 2005; 70: 13–19.

330. Perico N, Amuchastegui SC, Colosio V, Sonzogni G, Bertani T, Remuzzi G. Evidence that an angiotensinconverting enzyme inhibitor has a different effect on glomerular injury according to the different phase of the disease at which the treatment is started. *J Am Soc Nephrol*. 1994; 5: 1139–1146.

331. Perico N, Benigni A, Gabanelli M, Piccinelli A, Ròg M, De Riva C, Remuzzi G. Atrial natriuretic peptide and prostacyclin synergistically mediate hyperfiltration and hyperperfusion of diabetic rats. *Diabetes.* 1992; 41(4): 533-538.

332. Perico N, Benigni A, Remuzzi G. Present and future drug treatments for chronic kidney diseases: evolving targets in renoprotection. *Nat Rev Drug Discov.* 2008; 7(11): 936-953.

333. Perkins BA, Ficociello LH, Silva KH, Finkelstein DM, Warram JH, Krolewski AS. Regression of microalbuminuria in type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 2003; 348: 2285-2293.

334. Peters J. Cytosolic (pro)renin and the matter of intracellular renin actions. *Front Biosci (Schol Ed).* 2013; 5: 198-205.

335. Phillips MI, Schmidt-Ott KM. The Discovery of Renin 100 Years Ago. *News Physiol Sci.* 1999; 14: 271-274.

336. Pistrosch F, Herbrig K, Kindel B, Passauer J, Fischer S, Gross P: Rosiglitazone improves glomerular hyperfiltration, renal endothelial dysfunction, andmicroalbuminuria of incipient diabetic nephropathy in patients. *Diabetes*. 2005; 54: 2206–2211.

337. Pohl MA, Blumenthal S, Cordonnier DJ, De Alvaro F, Deferrari G, Eisner G, Esmatjes E, Gilbert RE, Hunsicker LG, de Faria JB, Mangili R, Moore J Jr, Reisin E, Ritz E, Schernthaner G, Spitalewitz S, Tindall H, Rodby RA, Lewis EJ. Independent and additive impact of blood pressure control and angiotensin II receptor blockade on renal outcomes in the irbesartan diabetic nephropathy trial: clinical implications and limitations. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16(10): 3027-3037.

338. Pohl M, Kaminski H, Castrop H, Bader M, Himmerkus N, Bleich M, Bachmann S, Theilig F. Intrarenal renin angiotensin system revisited: role of megalin-dependent endocytosis along the proximal nephron. *J Biol Chem.* 2010; 285(53): 41935-41946.

339. Pollock DM, Jenkins JM, Cook AK, Imig JD, Inscho EW. L-type calcium channels in the renal microcirculatory response to endothelin. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005; 288: F771–777.

340. Potter LR, Yoder AR, Flora DR, Antos LK, Dickey DM. Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. *Handb Exp Pharmacol*. 2009; (191): 341–366.

341. Prieto MC, González-Villalobos RA, Botros FT, Martin VL, Pagán J, Satou R, Lara LS, Feng Y, Fernandes FB, Kobori H, Casarini DE, Navar LG. Reciprocal changes in renal ACE/ANG II and ACE2/ANG 1-7 are associated with enhanced collecting duct renin in Goldblatt hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011; 300(3): F749-755.

342. PROCOPA Study Group. Dissociation between blood pressure reduction and fall in proteinuria in primary renal disease: a randomized double-blind trial. *J Hypertens.* 2002; 20(4): 729-737.

343. Procopciuc L, Popescu T, Jebeleanu G, Pop D, Zdrenghea D. Essential arterial hypertension and polymorphism of angiotensinogen M235T gene. *J Cell Mol Med.* 2002; 6(2): 245-250.

344. Pugh JA, Stern MP, Haffner SM, Eifler CW, Zapata M. Excess incidence of treatment of end-stage renal disease in Mexican Americans. *Am J Epidemiol.* 1988; 127(1): 135-144

345. Pupilli C, Brunori M, Misciglia N, Selli C, Ianni L, Yanagisawa M, Mannelli M, Serio M. Presence and distribution of endothelin-1 gene expression in human kidney. *Am J Physiol.* 1994; 267: F679–687.

346. Pupilli C, Romagnani P, Lasagni L, Bellini F, Misciglia N, Emoto N, Yanagisawa M, Rizzo M, Mannelli M, Serio M. Localization of endothelin-converting enzyme-1 in human kidney. *Am J Physiol.* 1997; 273: F749–756.

347. Qiu C, Samsell L, Baylis C. Actions of endogenous endothelin on glomerular hemodynamics in the rat. *Am J Physiol.* 1995; 269: R469–473.

348. Orth S, Nowicki M, Wiecek A, Ritz E. Nephroprotective effect of ACE inhibitors. *Drugs.* 1993; 46 Suppl 2: 189-196.

349. Raff U, Ott C, Ruilope LM, Menne J, Haller H, Schmieder RE. Prevention of electrocardiographic left ventricular remodeling by the angiotensin receptor blocker olmesartan in patients with type 2 diabetes. *J Hypertens.* 2014; 32(11): 2267-2276.

350. Raij L, Shultz PJ, Tolins JP. Possible mechanism for the renoprotective effect of angiotensin converting enzyme inhibitors. *J Hypertens Suppl.* 1989; 7(7): S33-36; discussion S36-37.

351. Ran J, Hirano T, Fukui T, Saito K, Kageyama H, Okada K, Adachi M. Angiotensin II infusion decreases plasma adiponectin level via its type 1 receptor in rats: an implication for hypertension-related insulin resistance. *Metabolism.* 2006; 55(4): 478-488.

352. Rao MV, Qiu Y, Wang C, Bakris G. Hypertension and CKD: Kidney Early Evaluation Program (KEEP) and National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), 1999-2004. *Am J Kidney Dis.* 2008; 51(4 Suppl 2): S30-37.

353. Ravid M, Brosh D, Ravid-Safran D, Levy Z, Rachmani R. Main risk factors for nephropathy in type 2 diabetes mellitus are plasma cholesterol levels, mean blood pressure, and hyperglycemia. *Arch Intern Med.* 1998; 158(9): 998-1004.

354. Rebibou JM, He CJ, Delarue F, Peraldi MN, Adida C, Rondeau E, Sraer JD. Functional endothelin-1 receptors on human glomerular podocytes and mesangial cells. *Nephrol Dial Transplant.* 1992; 7: 288–292.

355. Redding KM, Chen BL, Singh A, Re RN, Navar LG, Seth DM, Sigmund CD, Tang WW, Cook JL. Transgenic mice expressing an intracellular fluorescent fusion

of angiotensin II demonstrate renal thrombotic microangiopathy and elevated blood pressure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010; 298(6): H1807-1818.

356. Redmond EM, Cahill PA, Hodges R, Zhang S, Sitzmann JV. Regulation of endothelin receptors by nitric oxide in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol.* 1996; 166: 469–479.

357. Remer T. Influence of nutrition on acid-base balance--metabolic aspects. *Eur J Nutr.* 2001; 40: 214–220.

358. Remuzzi G, Bertani T. Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med.* 1998; 339(20): 1448-1456.

359. Remuzzi G, Schieppati A, Ruggenenti P. Clinical practice. Nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2002; 346: 1145–1151.

360. Resink TJ, Hahn AW, Scott-Burden T, Powell J, Weber E, Buhler FR. Inducible endothelin mRNA expression and peptide secretion in cultured human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; 168: 1303–1310.

361. Ritthaler T, Scholz H, Ackermann M, Riegger G, Kurtz A, Kramer BK. Effects of endothelins on renin secretion from isolated mouse renal justaglomerular cells. *Am J Physiol.* 1995; 268: F39–45.

362. Ritz E. Albuminuria and vascular damage - the vicious twins. *N Engl J Med*. 2003; 348: 2349-2352.

363. Ritz E, Orth SR. Nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1999; 341(15): 1127-1133.

364. Robinson M, Williams SM. Role of two angiotensinogen polymorphisms in blood pressure variation. *J Hum Hypertens.* 2004; 18(12): 865-869.

365. Rossi NF. Effect of endothelin-3 on vasopressin release in vitro and water excretion in vivo in Long-Evans rats. *J Physiol.* 1993; 461: 501–511.

366. Rossing P. Diabetic nephropathy: worldwide epidemic and effects of current treatment on natural history. *Curr Diab Rep.* 2006; 6(6): 479-483.

367. Rubattu S, Sciarretta S, Valenti V, Stanzione R, Volpe M. Natriuretic peptides: an update on bioactivity, potential therapeutic use, and implication in cardiovascular diseases. *Am J Hypertens.* 2008; 21(7): 733-741.

368. Rubio DM, Schoenbaum EE, Lee LS, Schteingart DE, Marantz PR, Anderson KE, Platt LD, Baez A, Esposito K: Defining translational research: Implications for training. *Acad Med*. 2010; 85: 470–475.

369. Ruggenenti P, Cravedi P, Remuzzi G. The RAAS in the pathogenesis and treatment of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol.* 2010; 6(6): 319-330.

370. Ruggenenti P, Fassi A, Ilieva AP, Bruno S, Iliev IP, Brusegan V, Rubis N, Gherardi G, Arnoldi F, Ganeva M, Ene-Iordache B, Gaspari F, Perna A, Bossi A, Trevisan R, Dodesini AR, Remuzzi G; Bergamo Nephrologic Diabetes Complications Trial (BENEDICT) Investigators: Preventing microalbuminuria in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2004; 351: 1941–1951.

371. Ruggenenti P, Iliev I, Costa GM, Parvanova A, Perna A, Giuliano GA, Motterlini N, Ene-Iordache B, Remuzzi G; Bergamo Nephrologic Diabetes Complications Trial Study Group. Preventing left ventricular hypertrophy by ACE inhibition in hypertensive patients with type 2 diabetes: a prespecified analysis of the Bergamo Nephrologic Diabetes Complications Trial (BENEDICT). *Diabetes Care.* 2008; 31(8): 1629-1634.

372. Ruggenenti P, Lauria G, Iliev IP, Fassi A, Ilieva AP, Rota S, Chiurchiu C, Barlovic DP, Sghirlanzoni A, Lombardi R, Penza P, Cavaletti G, Piatti ML, Frigeni B, Filipponi M, Rubis N, Noris G, Motterlini N, Ene-Iordache B, Gaspari F, Perna A, Zaletel J, Bossi A, Dodesini AR, Trevisan R, Remuzzi G; DEMAND Study Investigators. Effects of manidipine and delapril in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus: the delapril and manidipine for nephroprotection in diabetes (DEMAND) randomized clinical trial. *Hypertension*. 2011; 58(5): 776-783.

373. Ruggenenti P, Perna A, Ganeva M, Ene-Iordache B, Remuzzi G; BENEDICT Study Group. Impact of blood pressure control and angiotensin-converting enzyme

inhibitor therapy on new-onset microalbuminuria in type 2 diabetes: a post hoc analysis of the BENEDICT trial. *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17(12): 3472-3481.

374. Ruggenenti P, Perticucci E, Cravedi P, Gambara V, Costantini M, Sharma SK, Perna A, Remuzzi G. Role of remission clinics in the longitudinal treatment of CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2008; 19(6): 1213-1224.

375. Ruggenenti P, Porrini E, Motterlini N, Perna A, Ilieva AP, Iliev IP, Dodesini AR, Trevisan R, Bossi A, Sampietro G, Capitoni E, Gaspari F, Rubis N, Ene-Iordache B, Remuzzi G, for the BENEDICT Study Investigators. Measurable urinary albumin predicts cardiovascuilar risk among normoalbuminuric patients with type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol.* 2012; 23(10): 1717-1724.

376. Ruggenenti P, Remuzzi G. Dual RAS blockade-controversy resolved. *Nat Rev Nephrol.* 2013 (a); 9(11): 640. Ruggenenti P, Remuzzi G. RAS blockade: Nephroprotection by dual RAS blockade--a welcome back. *Nat Rev Nephrol.* 2015; 11(9): 507-508.

377. Ruggenenti P, Remuzzi G. Proteinuria: Is the ONTARGET renal substudy actually off target? *Nat Rev Nephrol.* 2009; 5(8): 436-437.

378. Ruggenenti P, Remuzzi G. Renin-angiotensin system: Meta-analyses can misdirect decisions on treatment. *Nat Rev Nephrol.* 2013 (б); 9(6): 311-312.

379. Ruggenenti P, Remuzzi G. The diagnosis of renal involvement in non-insulindependent diabetes mellitus. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1997; 6: 141-145.

380. Ruiz-Ortega M, Esteban V, Rupérez M, Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Carvajal G, Egido J. Renal and vascular hypertension-induced inflammation: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2006; 15(2): 159-166.

381. Russell FD, Skepper JN, Davenport AP. Human endothelial cell storage granules: a novel intracellular site for isoforms of the endothelin-converting enzyme. *Circ Res.* 1998; 83: 314–321.

382. Rydén L, Grant PJ, Anker SD, Berne C, Cosentino F, Danchin N, Deaton C, Escaned J, Hammes HP, Huikuri H, Marre M, Marx N, Mellbin L, Ostergren J,

Patrono C, Seferovic P, Uva MS, Taskinen MR, Tendera M, Tuomilehto J, Valensi P, Zamorano JL. ESC Guidelines on diabetes, pre- diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD - Summary. *Diab Vasc Dis Res*. 2014; 11(3): 133-173.

383. Rydén L, Grant PJ, Anker SD, Berne C, Cosentino F, Danchin N, Deaton C, Escaned J, Hammes HP, Huikuri H, Marre M, Marx N, Mellbin L, Ostergren J, Patrono C, Seferovic P, Sousa Uva M, Taskinen MR, Tendera M, Tuomilehto J, Valensi P, Zamorano JL; Grupa Robocza Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego (ESC), European Association for the Study of Diabetes (EASD). ESC guidelines on diabetes, pre-diabetes and diseases of the cardiovascular system developed in cooperation with the EASD. *Kardiol Pol.* 2013; 71 Suppl 11: S319-394.

384. Rydén L, Standl E, Bartnik M, Van den Berghe G, Betteridge J, de Boer MJ, Cosentino F, Jönsson B, Laakso M, Malmberg K, Priori S, Ostergren J, Tuomilehto J, Thrainsdottir I, Vanhorebeek I, Stramba-Badiale M, Lindgren P, Qiao Q, Priori SG, Blanc JJ, Budaj A, Camm J, Dean V, Deckers J, Dickstein K, Lekakis J, McGregor K, Metra M, Morais J, Osterspey A, Tamargo J, Zamorano JL, Deckers JW, Bertrand M, Charbonnel B, Erdmann E, Ferrannini E, Flyvbjerg A, Gohlke H, Juanatey JR, Graham I, Monteiro PF, Parhofer K, Pyörälä K, Raz I, Schernthaner G, Volpe M, Wood D; Task Force on Diabetes and Cardiovascular Diseases of the European Society of Cardiology (ESC); European Association for the Study of Diabetes (EASD). Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: executive summary. *Eur Heart J.* 2007; 28(1): 88-136.

385. Sadjadi J, Kramer GL, Yu CH, Burress Welborn M 3rd, Chappell MC, Gregory Modrall J. Angiotensin converting enzyme-independent angiotensin II production by chymase is up-regulated in the ischemic kidney in renovascular hypertension. *J Surg Res.* 2005 (a); 127(2): 65-69.

386. Sadjadi J, Kramer GL, Yu CH, Welborn MB 3rd, Modrall JG. Angiotensin II exerts positive feedback on the intrarenal renin-angiotensin system by an

angiotensin converting enzyme-dependent mechanism. *J Surg Res.* 2005 (б); 129(2): 272-277.

387. Sagnella GA. Atrial natriuretic peptide mimetics and vasopeptidase inhibitors. *Cardiovasc Res*. 2001; 51: 416-428.

388. Saito Y, Nakao K, Arai H, K Nishimura, K Okumura, K Obata, G Takemura, H Fujiwara, A Sugawara, T Yamada. Augmented expression of atrial natriuretic polypeptide gene in ventricle of human failing heart. *J Clin Invest*. 1989; 83: 298-305.

389. Sakoda M, Ichihara A, Kaneshiro Y, Takemitsu T, Nakazato Y, Nabi AH, Nakagawa T, Suzuki F, Inagami T, Itoh H. (Pro)renin receptor-mediated activation of mitogen-activated protein kinases in human vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res.* 2007; 30(11): 1139-1146.

390. Saleh MA, Pollock JS, Pollock DM. Distinct actions of endothelin A-selective versus combined endothelin A/B receptor antagonists in early diabetic kidney disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011; 338(1): 263-270.

391. Samson WK. Recent advances in ANF research. *Trends Endocrinol Metab*. 1992; 3: 86-90.

392. Santos RA, Ferreira AJ, Simões E Silva AC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol.* 2008; 93(5): 519-527.

393. Sato A. The necessity and effectiveness of mineralocorticoid receptor antagonist in the treatment of diabetic nephropathy. *Hypertens Res.* 2015; 38(6): 367-374.

394. Saxenhofer H, Raselli A, Weidmann P, Forssmann WG, Bub A, Ferrari P, Shaw SG. Urodilatin, a natriuretic factor from kidneys, can modify renal and cardiovascular function in men. *Am J Physiol*. 1990; 259: F832-838.

395. Sayed-Tabatabaei FA, Oostra BA, Isaacs A, van Duijn CM, Witteman JC. ACE polymorphisms. *Circ Res.* 2006; 98(9): 1123-1133.

396. Schefe JH, Menk M, Reinemund J, Effertz K, Hobbs RM, Pandolfi PP, Ruiz P, Unger T, Funke-Kaiser H. A novel signal transduction cascade involving direct physical interaction of the renin/prorenin receptor with the transcription factor promyelocytic zinc finger protein. *Circ Res.* 2006; 99(12): 1355-1366.

397. Schievink B, Kröpelin T, Mulder S, Parving HH, Remuzzi G, Dwyer J, Vemer P, de Zeeuw D, Heerspink HL. Early renin-angiotensin-system intervention is more beneficial than late intervention in delaying end-stage renal disease in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2015 Oct 5. doi: 10.1111/dom.12583. [Epub ahead of print].

398. Schneider M, Lerch M, Papiri M, Buechel P, Boehlen L, Shaw S, Risen W, Weidmann P. Metabolic neutrality of combined verapamil-trandolapril treatment in contrast to beta-blocker-low-dose chlortalidone treatment in hypertensive type 2 diabetes. *J Hypertens.* 1996; 14(5): 669-677.

399. Schneider MP, Inscho EW, Pollock DM. Attenuated vasoconstrictor responses to endothelin in afferent arterioles during a high-salt diet. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007; 292: F1208–1214.

400. Schnermann J, Lorenz JN, Briggs JP, Keiser JA. Induction of water diuresis by endothelin in rats. *Am J Physiol.* 1992; 263: F516–526.

401. Schricker K, Scholz H, Hamann M, Clozel M, Kramer BK, Kurtz A. Role of endogenous endothelins in the renin system of normal and two-kidney, one clip rats. *Hypertension.* 1995; 25: 1025–1029.

402. Schroeder AC, Imig JD, LeBlanc EA, Pham BT, Pollock DM, Inscho EW. Endothelin-mediated calcium signaling in preglomerular smooth muscle cells. *Hypertension.* 2000; 35: 280–286.

403. Schomerus M, Spiegelhalder B, Stieren B, Eichelbaum M. Physiological disposition of verapamil in man. *Cardiovasc Res.* 1976; 10(5): 605-612.

404. Schultz HD, Gardner DG, Deschepper CF, Coleridge HM, Coleridge JC. Vagal C-fiber blockade abolishes sympathetic inhibition by atrial natriuretic factor. *Am J Physiol*. 1988; 155: R6-13.

405. Schulz-Knappe P, Forssmann K, Herbst F, Hock D, Pipkorn R, Forssmann WG. Isolation and structural analysis of “urodilatin,” a new peptide of the cardiodilatin-(ANP)-family, extracted from human urine. *Klin Wochenschr*. 1988; 66: 752-759.

406. Schweitz H, Vigne P, Moinier D, Frelin C, Lazdunski M. A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (Dendroaspis angusticeps). *J Biol Chem.* 1992; 267(20): 13928–13932.

407. Seaquist ER, Goetz FC, Rich S, Barbosa J. Familial clustering of diabetic kidney disease. Evidence for genetic susceptibility to diabetic nephropathy. *N Engl J Med.* 1989; 320(18): 1161-1165.

408. Seedat YK, Croasdale MA, Milne FJ, Opie LH, Pinkney-Atkinson VJ, Rayner BL, Veriava Y; Guideline Committee, Southern African Hypertension Society; Directorate: Chronic Diseases, Disabilities and Geriatrics, National Department of Health. South African hypertension guideline 2006. *S Afr Med J.* 2006; 96(4 Pt 2): 337-362.

409. Seikaly MG, Arant BS, Seney FD Jr. Endogenous angiotensin concentration in specific intrarenal fluid compartment of the rat. *J Clin Invest.* 1990; 86: 1352–1357.

410. Seki N, Hashimoto N, Suzuki Y, Yagui K, Saito Y. Differential effects of RAS inhibitors associated with ACE gene polymorphisms in type 2 diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract.* 2006; 72(2): 135-141.

411. Shao Y, He M, Zhou L, Yao T, Huang Y, Lu LM. Chronic angiotensin (1-7) injection accelerates STZ-induced diabetic renal injury. *Acta Pharmacol Sin.* 2008; 29(7): 829-837.

412. Simonson MS. Endothelins: multifunctional renal peptides. *Physiol Rev.* 1993; 73: 375-411.

413. Skeggs LT Jr, Kahn JR, Shumway NP. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J Exp Med.* 1956; 103(3): 295-259.

414. Sleight P, Redon J, Verdecchia P, Mancia G, Gao P, Fagard R, Schumacher H, Weber M, Böhm M, Williams B, Pogue J, Koon T, Yusuf S; ONTARGET

investigators. Prognostic value of blood pressure in patients with high vascular risk in the ongoing telmisartan alone and in combination with Ramipril global endpoint trial study. *J Hypertens*. 2009; 27: 1360–1369.

415. Smith AC, Toto R, Bakris GL. Differential effects of calcium channel blockers on size selectivity of proteinuria in diabetic glomerulopathy. *Kidney Int.* 1998; 54(3): 889-896.

416. Song JC, White CM. Clinical pharmacokinetics and selective pharmacodynamics of new angiotensin converting enzyme inhibitors: an update. *Clin Pharmacokinet*. 2002; 41: 207–224.

417. Sorokin A, Kohan DE. Physiology and pathology of endothelin-1 in renal mesangium. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003; 285: F579–589.

418. Speed JS, Pollock DM: Endothelin, kidney disease, and hypertension. *Hypertension.* 2013; 61: 1142–1145.

419. Steiner G, Pauly NC. Comparison of the efficacy and safety of trandolapril and nifedipine SR in mild-to-moderate hypertension. Investigator Study Group. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1994; 23 Suppl 4: S81-85.

420. Stergiou GS, Skeva II, Baibas NM, Kalkana CB, Roussias LG, Mountokalakis TD. Does the antihypertensive response to angiotensin converting enzyme inhibition predict the antihypertensive response to angiotensin receptor antagonism? *Am J Hypertens*. 2001; 14(7 Pt 1): 688-693.

421. Strippoli GF, Craig M, Craig JC. Antihypertensive agents for preventing diabetic kidney disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005; (4): CD004136. Update in: *Cochrane Database Syst Rev.* 2012; 12: CD004136.

422. Strippoli GF, Craig M, Schena FP, Craig JC. Antihypertensive agents for primary prevention of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16: 3081-3091.

423. Sukenaga Y, Kamoshita K,Takai S, Migazaki M. Development of the chymase inhibitor as an anti-tissue remodelling drug in myocardial infarction and some other possibilities. *Jpn J Pharmacol.* 2002; 90: 218-222.

424. Tabrizchi R. SLV-306. Solvay. *Curr Opin Investig Drugs.* 2003; 4(3): 329-332.

425. Taguma Y, Kitamoto Y, Futaki G, Ueda H, Monma H, Ishizaki M, Takahashi H, Sekino H, Sasaki Y. Effect of captopril on heavy proteinuria in azotemic diabetics. *N Engl J Med.* 1985; 313: 1617–1620.

426. Tahara A, Tsukada J, Tomura Y, Suzuki T, Yatsu T, Shibasaki M. Effect of YM218, a nonpeptide vasopressin V(1A) receptor-selective antagonist, on rat mesangial cell hyperplasia and hypertrophy. *Vascul Pharmacol.* 2007; 46: 463–469.

427. Takagi M, Matsuoka H, Atarashi K, Yagi S. Endothelin: a new inhibitor of renin release. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988; 157: 1164–1168.

428. Takahashi K, Ghatei MA, Lam HC, O'Halloran DJ, Bloom SR: Elevated plasma endothelin in patients with diabetes mellitus. *Diabetologia*.1990: 33: 306–310.

429. Takahashi K, Yamamoto H, Hirose T, Hiraishi K, Shoji I, Shibasaki A, Kato I, Kaneko K, Sasano H, Satoh F, Totsune K. Expression of (pro)renin receptor in human kidneys with end-stage kidney disease due to diabetic nephropathy. *Peptides.* 2010; 31(7): 1405-1408.

430. Takeda M, Breyer MD, Noland TD, Homma T, Hoover RL, Inagami T, Kon V. Endothelin-1 receptor antagonist: effects on endothelin- and cyclosporine-treated mesangial cells. *Kidney Int.* 1992; 42: 1713–1719.

431. Teppo AM, Groop L. Urinary exretion of plasma proteins in diabetic subjects. Increased excretion of kappa light chains in diabetic patients with and without proliferative retinopathy. *Diabetes.* 1985; 34: 589-594.

432. Tervonen V, Arjamaa O, Kokkonen K, Ruskoaho H, Vuolteenaho O. A novel cardiac hormone related to A-, B- and C-type natriuretic peptides. *Endocrinology.* 1998; 139(9): 4021–4025.

433. The DCCT/EDIC Research Group Correction: Retinopathy and Nephropathy in Patients with Type 1 Diabetes Four Years after a Trial of Intensive Therapy. *N Engl J Med.* 2000; 342(18): 1376.

434. The EUCLID Study Group. Randomised placebo controlled trial of lisinopril in normotensive patients with insulin-dependent diabetes and normoalbuminuria or microalbuminuria. *Lancet*. 1997; 349: 1787–1792.

435. The GISEN group. Randomised placebocontrolled trial of effect of ramipril on decline in glomerular filtration rate and risk of terminal renal failure in proteinuric, non-diabetic nephropathy. *Lancet.* 1997; 349: 1857–1863.

436. The sixth report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Arch Intern Med*. 1997; 157: 2413-2446. [Erratum, Arch Intern Med. 1998; 158: 573.]

437. Thöne-Reinke C, Simon K, Richter CM, Godes M, Neumayer HH, Thormählen D, Hocher B. Inhibition of both neutral endopeptidase and endothelin-converting enzyme by SLV306 reduces proteinuria and urinary albumin excretion in diabetic rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004; 44 Suppl 1: S76-79.

438. Tikellis C, Johnston CI, Forbes JM, Burns WC, Burrell LM, Risvanis J, Cooper ME. Characterization of renal angiotensin-converting enzyme 2 in diabetic nephropathy. *Hypertension*. 2003; 41(3): 392-397.

439. Tikkanen I, Tikkanen T, Cao Z, Allen TJ, Davis BJ, Lassila M, Casley D, Johnston CI, Burrell LM, Cooper ME. Combined inhibition of neutral endopeptidase with angiotensin converting enzyme or endothelin converting enzyme in experimental diabetes. *J Hypertens.* 2002; 20(4): 707-714.

440. Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev.* 1993; 45: 205–251.

441. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 2000; 275(43): 33238-33243.

442. Tolekova A, Ilieva G, Parvanova A. Comparison of the effects on RAAS of the combination of ACE inhibition with calcium channel blockade. *IMAB Annual proceedings (scientific papers).* 1996; 2(1): 209-210.

443. Tolekova A, Popov B, Uzunova V. Schematic illustration of the regulatory mechanisms of renin and insulin secretion and the homeostasis. *Buldarian medicine.* 2005; 13 (2): 27-29.

444. Tolekova A, Popov B. Schematic illustration of the mechanisms for maintenance of electrolyte and glucose homeostasis. *Med Hypotheses.* 1999; 53(3): 184-185.

445. Tolins JP, Raij L. Antihypertensive therapy and the progression of chronic renal disease. Are there renoprotective drugs? *Semin Nephrol.* 1991; 11(5): 538-548.

446. Trevisan R, Tiengo A. Effect of low-dose ramipril on microalbuminuria in normotensive or mild hypertensive non-insulin-dependent diabetic patients. North-East Italy Microalbuminuria Study Group. *Am J Hypertens.* 1995; 8(9): 876-883.

447. Tsutsumi Y, Matsubara H, Masaki H, Kurihara H, Murasawa S, Takai S, Miyazaki M, Nozawa Y, Ozono R, Nakagawa K, Miwa T, Kawada N, Mori Y, Shibasaki Y, Tanaka Y, Fujiyama S, Koyama Y, Fujiyama A, Takahashi H, Iwasaka T. Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *J Clin Invest.* 1999; 104(7): 925-935.

448. Uchida S, Horie M, Yanagisawa M, Matsushita Y, Kurokawa K, Ogata E. Polarized secreton of endothelin-1 and big ET-1 in MDCK cells is inhibited by cell Na+ flux and disrupted by NH4Cl. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1991; 17(Suppl 7): S226–228.

449. Uchida S, Takemoto F, Ogata E, Kurokawa K. Detection of endothelin-1 mRNA by RT-PCR in isolated rat renal tubules. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 188: 108–113.

450. Ujiie K, Terada Y, Nonoguchi H, Shinohara M, Tomita K, Marumo F. Messenger RNA expression and synthesis of endothelin-1 along rat nephron segments. *J Clin Invest.* 1992; 90: 1043–1048.

451. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and

risk ofcomplications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). Lancet. 1998 (a); 352(9131): 837-853. [Erratum in *Lancet*. 1999; 354(9178): 602].

452. UK Prospective Diabetes Study Group. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. BMJ. 1998 (б); 317: 703. [Erratum in *BMJ.* 1999; 318: 29].

453. Umschweif G, Shabashov D, Alexandrovich AG, Trembovler V, Horowitz M, Shohami E. Neuroprotection after traumatic brain injury in heat-acclimated mice involves induced neurogenesis and activation of angiotensin receptor type 2 signaling. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2014; 34(8): 1381-1390.

454. Unger T, Li J. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2004; 5 Suppl 1: S7-10

455. Urata H, Boehm KD, Philip A, Kinoshita A, Gabrovsek J, Bumpus FM, Husain A. Cellular localization and regional distribution of an angiotensin II-forming chymase in the heart. *J Clin Invest.* 1993; 91(4): 1269-1281.

456. Urata H, Nishimura H, Ganten D. Mechanisms of angiotensin II formation in humans. *Eur Heart J.* 1995; 16 Suppl N: 79-85.

457. Varagic J, Trask AJ, Jessup JA, Chappell MC, Ferrario CM. New angiotensins. *J Mol Med (Berl).* 2008; 86(6): 663-671.

458. Velloso LA, Folli F, Perego L, Saad MJ. The multi-faceted cross-talk between the insulin and angiotensin II signaling systems. *Diabetes Metab Res Rev.* 2006; 22(2): 98-107.

459. Veltmar A, Gohlke P, Unger T. From tissue angiotensin converting enzyme inhibition to antihypertensive effect. *Am J Hypertens.* 1991; 4(3 Pt 2): 263S-269S.

460. Vesely D, Douglass MA, Dietz JR, Gower WR Jr, McCormick MT, Rodriguez-Paz G, Schocken DD. Three peptides from the atrial natriuretic factor prohormone amino terminus lower blood pressure and produce diuresis, natriuresis, and/or kaliuresis in humans. *Circulation*. 1994; 90: 1129-1140.

461. Viberti G, Mogensen CE, Groop LC, Pauls JF. Effect of captopril on progression to clinical proteinuria in patients with insulindependent diabetes mellitus

and microalbuminuria. European Microalbuminuria Captopril Study Group. *JAMA*. 1994; 271: 275–279.

462. Viberti G, Wheeldon NM. Microalbuminuria reduction with valsartan in patients with type 2 diabetes mellitus: a blood pressure-independent effect. *Circulation*. 2002; 106: 672–678.

463. Viberti GC, Hill RD, Jarrett RJ, Argyropoulos A, Mahmud U, Keen H. Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet.* 1982 26; 1: 1430-1432.

464. Vijayaraghavan K, Deedwania PC. The renin angiotensin system as a therapeutic target to prevent diabetes and its complications. *Cardiol Clin.* 2005; 23(2): 165-183.

465. Vinh A, Widdop RE, Drummond GR, Gaspari TA. Chronic angiotensin IV treatment reverses endothelial dysfunction in ApoE-deficient mice. *Cardiovasc Res*. 2008; 77: 178–187.

466. Vogt L, Chiurchiu C, Chadha-Boreham H, Danaietash P, Dingemanse J, Hadjadj S, Krum H, Navis G, Neuhart E, Parvanova AI, Ruggenenti P, Woittiez AJ, Zimlichman R, Remuzzi G, de Zeeuw D; PROLONG (PROteinuria Lowering with urOteNsin receptor antaGonists) Study Group. Effect of the urotensin receptor antagonist palosuran in hypertensive patients with type 2 diabetic nephropathy. *Hypertension*. 2010; 55(5): 1206-1209.

467. Waanders F, Visser FW, Gans RO. Current concepts in the management of diabetic nephropathy. *Neth J Med.* 2013; 71(9): 448-458.

468. Wachtell K, Ibsen H, Olsen MH, Borch-Johnsen K, Lindholm LH, Mogensen CE,Dahlöf B,Devereux RB, BeeversG, de Faire U, Fyhrquist F, Julius S, Kjeldsen SE, Kristianson K, Lederballe-Pedersen O, Nieminen MS, Okin PM, Omvik P, Oparil S, Wedel H, Snapinn SM, Aurup P: Albuminuria and cardiovascular risk in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy: The LIFE study. *Ann Intern Med*. 2003; 139: 901–906.

469. Wada J, Sun L, Kanwar YS. Discovery of genes related to diabetic nephropathy in various animal models by current techniques. *Contrib to Nephrol.* 2011; 169: 161–174.

470. Weber MA, Black H, Bakris G, Krum H, Linas S, Weiss R, Linseman JV, Wiens BL, Warren MS, Lindholm LH. A selective endothelin-receptor antagonist to reduce blood pressure in patients with treatment-resistant hypertension: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2009; 374(9699): 1423-1431.

471. Wei CC, Meng QC, Palmer R, Hageman GR, Durand J, Bradley WE, Farrell DM, Hankes GH, Oparil S, Dell'Italia LJ. Evidence for angiotensin-converting enzyme- and chymase-mediated angiotensin II formation in the interstitial fluid space of the dog heart in vivo. *Circulation*. 1999; 99: 2583–2589.

472. Weidmann P, Boehlen LM, de Courten M, Ferrari P. Antihypertensive therapy in diabetic patients. *J Hum Hypertens.* 1992; 6 Suppl 2:S23-36.

473. Weiner ID, Frank AE, Wingo CS. Apical proton secretion by the inner stripe of the outer medullary collecting duct. *Am J Physiol.* 1999; 276: F606–613.

474. Wendel M, Knels L, Kummer W, Koch T. Distribution of endothelin receptor subtypes ETA and ETB in the rat kidney. *J Histochem Cytochem.* 2006; 54: 1193–1203.

475. Wenzel RR, Littke T, Kuranoff S, Jürgens C, Bruck H, Ritz E, Philipp T, Mitchell A; SPP301 (Avosentan) Endothelin Antagonist Evaluation in Diabetic Nephropathy Study Investigators. Avosentan reduces albumin excretion in diabetics with macroalbuminuria. *J Am Soc Nephrol.* 2009; 20(3): 655-664.

476. Wijeyaratne CN, Moult PJA. The effect of a human atrial natriuretic peptide on plasma volume and vascular permeability in normotensive subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993; 76: 343-346.

477. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004; 27(5): 1047-1053.

478. Williams ME. Diabetic nephropathy: the proteinuria hypothesis. *Am J Nephrol.* 2005; 25(2): 77-94.

479. Wong YC, Sim MK, Lee KO. Des-aspartate-angiotensin-I and angiotensin IV improve glucose tolerance and insulin signalling in diet-induced hyperglycaemic mice. *Biochem Pharmacol.* 2011; 82: 1198–1208.

480. Worgall S, Manz F, Kleschin K, Feth F, Rascher W. Elevated urinary excretion of endothelin-like immunoreactivity in children with renal disease is related to urine flow rate. *Clin Nephrol.* 1994; 41: 331–337.

481. World Health Organisation. Diabetes. (Fact Sheet No 312) WHO, 2011.

482. Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S, deWit D, Yanagisawa M. ECE-1: A membranebound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell.* 1994; 78: 473–485.

483. Yamamoto T, Hirohama T, Uemura H. Endothelin B receptor-like immunoreactivity in podocytes of the rat kidney. *Arch Histol Cytol.* 2002; 65: 245–250.

484. Yamashita K, Discher D, Hu J, Bishopric N, Webster K. Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia. Contributions of hypoxia-inducible factor-1, activator protein-1, GATA-2, AND p300/CBP. *J Biol Chem.* 2001; 276: 12645–12653.

485. Yanagisawa H, Hammer RE, Richardson JA, Emoto N, Williams SC, Takeda S-i, Clouthier DE, Yanagisawa M. Disruption of *ECE-1* and *ECE-2* reveals a role for endothelin-converting enzyme-2 in murine cardiac development. *J Clin Invest.* 2000; 105: 925–933.

486. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988; 332(6163): 411-415.

487. Yang RH, Jin HK, Wyss JM, Chen YF, Oparil S. Pressor effect of blocking atrial atriuretic peptide in nucleus tractus solitarii. *Hypertension*. 1992; 19(2): 198-205.

488. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.* 2000; 342(3): 145-153.

489. Zannad F. Trandolapril. How does it differ from other angiotensin converting enzyme inhibitors? *Drugs.* 1993; 46 Suppl 2: 172-181.

490. Zatz R, Dunn BR, Meyer TW, Anderson S, Rennke HG, Brenner BM. Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. *J Clin Invest*. 1986; 77(6): 1925–1930.

491. Zeiher A, Goebel H, Schächinger V, Ihling C. Tissue Endothelin-1 Immunoreactivity in the Active Coronary Atherosclerotic Plaque A Clue to the Mechanism of Increased Vasoreactivity of the Culprit Lesion in Unstable Angina. *Circulation*. 1995; 91(4): 941-947.

492. Zhang X, Xu X, Nasjletti A, Hintze TH. Amlodipine enhances NO production induced by an ACE inhibitor through a kinin-mediated mechanism in canine coronary microvessels. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000; 35(2): 195-202.

493. Zhuo JL, Ferrao FM, Zheng Y, Li XC. New frontiers in the intrarenal Renin-Angiotensin system: a critical review of classical and new paradigms. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013; 4(166): 1-14.

494. Zhuo JL, Imig JD, Hammond TG, Orengo S, Benes E, Navar LG. Ang II accumulation in rat renal endosomes during Ang II-induced hypertension: role of AT(1) receptor. *Hypertension*. 2002; 39(1): 116-121.

495. Zhuo JL, Li XC, Garvin JL, Navar LG, Carretero OA. Intracellular ANG II induces cytosolic Ca2+ mobilization by stimulating intracellular AT1 receptors in proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006; 290(6): F1382-1390.

496. Zimmerman D, Burns KD. Angiotensin-(1-7) in kidney disease: a review of the controversies. *Clin Sci (Lond).* 2012; 123(6): 333-346.

497. Zoja C, Orisio S, Perico N, Benigni A, Morigi M, Benatti L, Rambaldi A, Remuzzi G. Constitutive expression of endothelin gene in cultured human

mesangial cells and its modulation by transforming growth factor-s, thrombin, and a thromboxane A2 analogue. *Lab Invest.* 1991; 64: 16-20.