

# Pathobiochemie und Diagnostik der diabetischen Nephropathie

## Pathobiochemistry and Diagnostics of Diabetic Nephropathy

E. Schleicher<sup>1,2</sup>

**Zusammenfassung:** Fast die Hälfte aller hämodialysepflichtigen Patienten sind Diabetiker. Epidemiologische Untersuchungen zeigen, daß die Hyperglykämie ein wesentlicher Faktor für die Entstehung der diabetischen Nephropathie ist. Als pathogenetische Mechanismen werden neben der extrazellulär ablaufenden Glykierungsreaktion und den daraus entstehenden Folgeprodukten („advanced glycation end“ (AGE) products), die Glucose-induzierte Aktivierung der Proteinkinase C und die Induktion von Zytokinen diskutiert. Von besonderen Interesse ist dabei die Induktion des Transforming Growth Factors  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), da dieser Faktor die *de-novo* Synthese von Komponenten der extrazellulären Matrix induziert. Die Laboratoriumsdiagnostik der diabetischen Nephropathie ist bislang auf wenige Parameter beschränkt. Neben der klassischen Bestimmung der harnpflichtigen Substanzen im Serum und der Kreatinin-Clearance hat sich vor allem die Bestimmung von Albumin im Urin als wichtiger Marker zur Früherkennung der diabetischen Nephropathie bewährt. Während die Mikroalbuminurie bei Typ 1-Diabetikern relativ sicher eine diabetische Nephropathie anzeigt, liegen bei Typ 2-Diabetikern häufig auch andere Nierenerkrankungen vor, die daher ausgeschlossen werden müssen. Die in mehreren Laboratorien gefundene erhöhte Ausscheidung von TGF- $\beta$ 1 im Urin muß noch auf ihren Wert als Früherkennungsparameter für die diabetischen Nephropathie überprüft werden. Trotz vieler Untersuchungen gibt es bislang noch keine genetischen bzw. molekularbiologischen Parameter, die die Anfälligkeit von Diabetikern, eine Nephropathie zu entwickeln, zuverlässig erfassen.

**Schlüsselwörter:** Diabetische Nephropathien/Pathobiochemie; Diabetische Nephropathien/Genetik; Diabetische Nephropathien/Vorbeugung und Überwachung; Albuminurie; Transforming Growth Factor  $\beta$ .

**Summary:** Nearly half of all patients on hemodialysis are diabetic. Epidemiologic studies indicate that hyperglycemia is an important factor for the development of diabetic nephropathy. The following pathogenetic mechanisms are discussed: (i), the extracellular occurring glycation reaction and the resultant advanced glycation end (AGE) products, (ii), high glucose-induced activation of protein kinase C and (iii), the induction of cytokines. Particularly interesting is the induction of transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), since this factor induces the *de novo* synthesis of components of the extra-cellular matrix. The laboratory diagnosis of the diabetic nephropathy is still limited to only a few parameters. Besides the classical determination of creatinine and urea in serum and the creatinine clearance, the determination of urinary albumin levels has been proven to be an important marker for the early detection of diabetic nephropathy. The presence of persistent microalbuminuria in type 1 diabetic patients indicates diabetic nephropathy with relatively high specificity. Microalbuminuria in type 2 diabetes may also be caused by other kidney diseases which should therefore be excluded. Several laboratories are currently investigating if increased TGF- $\beta$ 1 levels in urine of diabetic patients is of value for the prediction of the development of diabetic nephropathy. Up to now no genetic or molecular biology markers have been found to predict the susceptibility of an individual diabetic patient to develop diabetic nephropathy.

**Keywords:** Diabetic Nephropathies/physiopathology; Diabetic Nephropathies/prevention and control; Diabetic Nephropathies/genetics; Albuminuria; Transforming Growth Factor  $\beta$ .

Nach einem Vortrag auf dem Kongreß für Laboratoriumsmedizin 1998, gehalten am 17. November 1998 in Düsseldorf

<sup>1</sup>Medizinische Klinik IV, Universität Tübingen

<sup>2</sup>Korrespondenzadresse: Prof. Dr. Erwin Schleicher, Med. Klinik und Poliklinik IV, Eberhard-Karls-Universität, Otfried-Müller-Str. 10, D-72076 Tübingen. Fax: +49-7071-29-5974; E-mail: [enschlei@med.uni-tuebingen.de](mailto:enschlei@med.uni-tuebingen.de)  
Eingegangen: 15. Februar 1999

**D**iabetes mellitus ist in den USA und in Europa eine der häufigsten Ursachen für terminales Nierenversagen. Während früher die niereninsuffizienten Diabetiker vor allem Typ 1 Diabetiker waren, stellen heute die Typ 2 Diabetiker einen ständig steigenden Anteil dar. Etwa 30-40% aller Patienten mit Typ 1 Diabetes entwickeln eine Nephropathie, die aber nicht in allen Fällen zu Nierenversagen führt. Epidemiologische Stu-

dien zeigen, daß bei Typ 1 Diabetikern nach ca. 12 Jahren Diabetesdauer der Höhepunkt der Nephropathiemanifestation erreicht ist und daß nach dieser Zeit die Nephropathieinzidenz stark abfällt [1]. Da es eine beträchtliche ethnische Variabilität der Nephropathieinzidenz gibt und da nicht alle, sondern nur etwa ein Drittel der Typ 1 Diabetiker eine Nephropathie entwickeln, wird eine genetische Komponente bei der Entstehung der diabetischen Nephropathie angenommen [2]. Obwohl weniger Typ 2 Diabetiker eine manifeste Nephropathie entwickeln die in eine terminale Niereninsuffizienz übergeht, gewinnt diese Patientengruppe wegen der steigenden Zahl an Typ 2 Diabetikern an Bedeutung. Da verschiedene Studien zeigen konnten, daß der Verlauf der diabetischen Nephropathie durch therapeutische Interventionen beeinflusst werden kann, ist es wichtig, frühe Marker für eine beginnende Nephropathie zur Verfügung zu haben.

## Strukturelle und funktionelle Veränderung im Verlauf der diabetischen Nephropathie

Die erste auffällige Veränderung nach Manifestation des Diabetes mellitus ist die Zunahme des Nieren- und des glomerulären Volumens [3]. Während dieser frühen Phase weisen die hypertrophen Glomeruli eine normale Struktur auf. Diese z.T. durch hämodynamische Faktoren bedingte Veränderungen sind potentiell reversibel; sie sind kein sicherer Früherkennungsparameter für eine diabetische Nephropathie. Erst nach mehreren Jahren wird eine Verdickung der glomerulären Basalmembran und eine deutliche Zunahme der glomerulären mesangialen Matrix beobachtet. Die Zunahme der glomerulären extrazellulären Matrix korreliert in etwa mit dem Ausmaß der Mikroalbuminurie (vgl. auch Tabelle 1). Diese Veränderungen werden sowohl bei Typ 1 als auch bei Typ 2 Diabetes beobachtet [4]. Detaillierte immunhistochemische Untersuchungen zeigen, daß im Verlauf der Entwicklung der diabetischen Glomerulosklerose zunächst die physiologischen Kollagentypen vermehrt abgelagert werden [5]. Im weiteren Verlauf werden diese physiologischen Kollagentypen dann durch andere z.T. interstitielle Kollagene ersetzt [5-7]. Man nimmt an, daß diese strukturellen Veränderungen irreversibel sind. Entsprechende morphologische und strukturelle Veränderungen lassen sich auch im renalen Interstitium und in den glomerulären Arteriolen nachweisen. Tierexperimentelle Untersuchungen zeigen eindeutig, daß die vermehrte Matrixproteinablagerung bei Diabetes durch erhöhte Kollagensynthese verursacht wird [8]. Mit der

Zunahme der glomerulären Matrixproteine geht eine Abnahme des Basalmembran-assoziierten Heparansulfat-Proteoglycans einher [6]. Da das negativ geladene Heparansulfat-Proteoglycan die anionische Barriere der glomerulären Basalmembran darstellt, erklärt die Abnahme des Heparansulfat-Proteoglycans die erhöhte glomeruläre Albuminpermeabilität.

Der früheste klinische Nachweis einer Nephropathie ist das Auftreten einer Mikroalbuminurie. Ohne spezifische Intervention entwickeln 80% aller Typ 1 Diabetiker mit einer persistierenden Mikroalbuminurie mit einer Rate von 10-20% pro Jahr innerhalb von 10-15 Jahren eine manifeste Nephropathie [9]. Für Typ 2 Diabetiker liegen die Zahlen niedriger, etwa 20-40% der Patienten mit persistierender Mikroalbuminurie entwickeln eine manifeste Nephropathie. Im weiteren Verlauf fällt auch die glomeruläre Filtrationsrate mit großer individueller Variabilität ab und führt bei den meisten Typ 1 Diabetikern zur Niereninsuffizienz, während nur etwa 20% der Typ 2 Diabetiker nach der Manifestation der Nephropathie niereninsuffizient werden. Typ 2 Diabetiker weisen zwar zum Zeitpunkt der Diagnose des Diabetes häufiger als Typ 1 Diabetiker eine Mikroalbuminurie auf, da aber bei älteren Personen häufig auch andere Nierenerkrankungen vorliegen, ist in diesem Fall eine Mikroalbuminurie weniger spezifisch für den Nachweis einer diabetischen Nephropathie. Neben einer Indikatorfunktion für die Manifestation einer diabetischen Nephropathie ist die Albuminurie auch ein Marker für ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko. Typ 1 oder Typ 2 Diabetiker mit persistierender Albuminurie weisen eine vielfach erhöhte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität auf [1]. Aus diesem Grund stellt der Befund einer Mikroalbuminurie einen Hinweis auf weitere extrarenale vaskuläre Schäden dar.

## Pathobiochemie der diabetischen Nephropathie

Da die Entwicklung der diabetischen Nephropathie durch eine schlechte Stoffwechseleinstellung begünstigt wird, liegt es nahe, die Hyperglykämie als Ursache für die renalen Veränderungen anzunehmen [10, 11]. Für die erhöhte, toxische Wirkung der Glukose werden zwei prinzipiell unterschiedliche Mechanismen diskutiert:

- Im ersten Fall reagiert die Glukose direkt - also ohne Enzymwirkung - mit Proteinen. Diese als nicht-enzymatische Glykosylierung oder Glykierung bekannte Reaktion führt bei erhöhtem Glukosespiegel zur vermehrten Glykierung von Proteinen insbesondere von Proteinen mit einer langen Lebensdauer wie z.B. Kollagenen. Diese Glykierung der Proteine ist Ausgangspunkt für die sehr langsame Entstehung von „advanced glycation end products“ (AGE-products) [11]. Man geht davon aus, daß nicht die Glykierung der Proteine wohl aber die

**Nicht standardisierte Abkürzungen:** ACE, angiotensinogen converting enzyme; AGE, advanced glycation end (products); TGF, transforming growth factor.

**Tabelle 1** Stadien der Albuminurie (nach Empfehlungen der Amerikanischen Diabetesgesellschaft [9]). Durch verschiedene Einflußgrößen wie z.B. kurzzeitige Hyperglykämie, körperliche Anstrengung, Harnwegsinfektionen, signifikante Hypertension, Herzinsuffizienz und akute fieberige Erkrankungen können vorübergehende erhöhte Albuminausscheidungen auftreten.

| Stadium          | 24 h-Urin [mg/24h] | Zeitsammlung [ $\mu$ g/min] | Spontanurin [ $\mu$ g/mg Kreatinin] |
|------------------|--------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| Normal           | <30                | <20                         | <30                                 |
| Mikroalbuminurie | 30-300             | 20-200                      | 30-300                              |
| Makroalbuminurie | >300               | >200                        | >300                                |

**Tabelle 2** Struktur und Funktion von Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)

|                         | Struktur                                  | Funktion                                                                                  |
|-------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Aktives TGF- $\beta$ 1  | 12,5 kDa Protein (homodimer)              | Prosklerotisch (Matrixproteinsynthese $\uparrow$ )<br>Immunsuppressiv<br>Antiproliferativ |
| Latentes TGF- $\beta$ 1 | Im Komplex mit latency-associated Peptide | Biologisch inaktiv                                                                        |

AGE-Produkte bei der Entwicklung diabetischer Gefäßschäden beteiligt sind [11]. Ein möglicher Mechanismus wurde mit der Charakterisierung von AGE-Rezeptoren u.a. auf glomerulären Zellen gezeigt. Durch Zugabe von AGE-modifizierten Proteinen kann, nach spezifischer Bindung an AGE-Rezeptoren, die Zelle zur Produktion und Sekretion von Zytokinen induziert werden [12-14]. Um diese Hyperglykämie-induzierte vermehrte AGE-Bildung im Diabetes zu hemmen, wurden Inhibitoren dieser Reaktion entwickelt (z.B. Aminoguanidin) [15].

Im zweiten Fall muß die Glukose verstoffwechselt werden d.h. Glukose muß von den betroffenen Zellen aufgenommen werden, um ihre Wirkung zu entfalten. In Modelluntersuchungen konnte gezeigt werden, daß glomeruläre und tubuläre Zellen unter Hyperglykämie das Zytokin Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), dessen Eigenschaften in Tabelle 2 dargestellt sind, vermehrt synthetisieren. Neben den anderen biologischen Wirkungen ist TGF- $\beta$ 1 einer der wirksamsten, die Matrixproduktion induzierenden Faktoren. Inzwischen konnte sowohl tierexperimentell als auch bei diabetischen Patienten eine vermehrte glomeruläre TGF- $\beta$ 1 Expression nachgewiesen werden [16]. Daß TGF- $\beta$ 1 bei der Entstehung der frühen renalen Veränderungen kausal beteiligt ist, wurde durch den Einsatz von neutralisierenden Anti-TGF- $\beta$ -Antikörpern gezeigt [17].

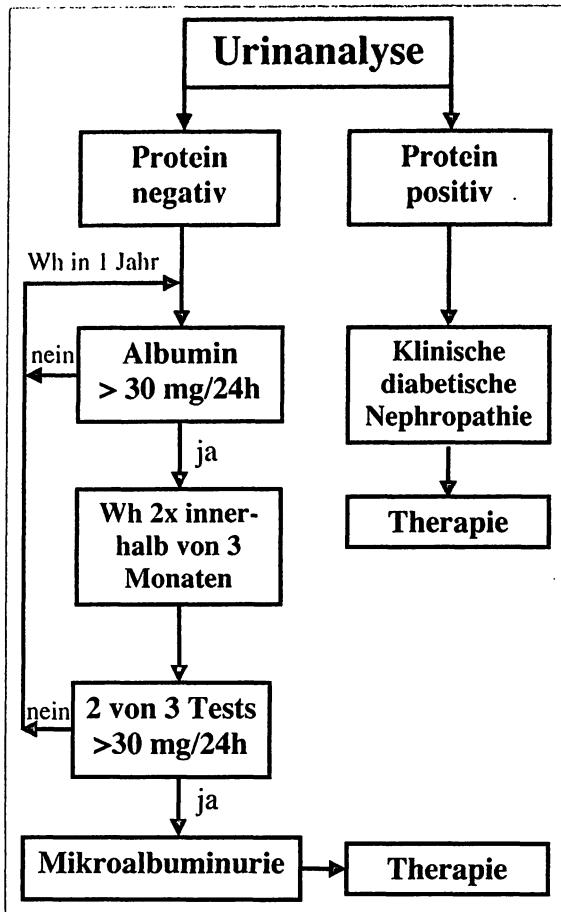
Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen legen nahe, daß die Proteinkinase C im Diabetes aktiviert ist. Die Beteiligung der Proteinkinase C u.a. bei der Induktion des TGF- $\beta$ 1, wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen [18,19]. Die kausale Beteiligung der Proteinkinase C wird durch neue Tierexperimente gezeigt, bei

denen durch die Behandlung mit einem Proteinkinase C Inhibitor (LY-333531) die Diabetes-induzierten, frühen (6 Wochen) Effekte an der Niere verhindert werden konnten [20]. Der vermehrte oxidative Stress im Diabetes könnte auch für die vermehrte Zytokinbildung im Diabetes verantwortlich sein. Verschiedene Hinweise sprechen dafür, daß Hyperglykämie zu vermehrter Bildung von Sauerstoffradikalen führt. So konnte kürzlich in kultivierten Endothelzellen gezeigt werden, daß die durch erhöhte Glukosekonzentration induzierte Apoptose durch reaktive Sauerstoffspezies vermittelt wird [21].

## Diagnostik der diabetischen Nephropathie

Obwohl der natürliche Verlauf der diabetischen Nephropathie sehr komplex und noch nicht in allen Details aufgeklärt ist, ist die Bestimmung der Albuminausscheidung im Urin ein wichtiger Parameter für die Einteilung des Nephropathiestadiums (siehe auch Tabelle 1). Die Mikroalbuminurie ist der früheste Parameter zur Erkennung einer diabetischen Nephropathie. In diesem Stadium ist die Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) normal oder aufgrund der renalen Hypertrophie und Hyperperfusion erhöht, so daß die GFR keine Bedeutung für Diagnose einer beginnenden Nephropathie hat. Diese Beobachtungen sind nicht nur für die Diagnostik relevant, sondern auch für die Verlaufskontrolle der Therapie der diabetischen Nephropathie.

Als Screening für die Albuminausscheidung schlägt die Amerikanische Diabetesgesellschaft das in Abbildung 1 schematisch dargestellte Vorgehen vor [9]:



**Abbildung 1** Schematisches Vorgehen beim Screening auf das Vorliegen einer Mikroalbuminurie (modifiziert nach [9]). Es ist besonders auf Beimengung von Blut bzw. Leukozyten zu achten, um andere Ursachen der Albuminerhöhung zu erkennen wie z.B. Blutungen oder Harnwegsinfektionen.

Routineurinanalysen sollten jährlich durchgeführt werden. Falls der Urin positiv für Protein ist, sollte ein entsprechender Therapieplan entworfen werden. Liegt keine Proteinurie vor, ist die Bestimmung der Mikroalbuminurie notwendig. Dabei ist zu beachten, daß kurzzeitige Hyperglykämie, körperliche Anstrengung, signifikante Hypertension, Herzinsuffizienz und akute fiebrige Erkrankungen zu einer transienten Erhöhung der Albuminausscheidung im Urin führen können. Wegen dieser Einflußgrößen und wegen der beträchtlichen intraindividuellen Variabilität sollten wenigstens 2 von 3 Bestimmungen auf Mikroalbuminurie positiv sein, bevor der Patient als „mikroalbuminurisch“ klassifiziert wird. Andere Nierenerkrankungen, die zu einer Albuminurie führen, können über die Klinik, die Sonographie und über den Nachweis von Blut bzw.

Leukozyten im Urin oder andere Verfahren erkannt werden [22].

Da bei Typ 1 Diabetikern selten vor der Pubertät eine Mikroalbuminurie auftritt, sollte das Screening nach der Pubertät und nach mindestens 5 Jahren Diabetesdauer beginnen. Bei Typ 2 Diabetikern sollte immer bei Diagnosestellung eine Albuminbestimmung im Urin durchgeführt werden, da der Diabetesbeginn bereits längere Zeit zurückliegen kann. Wie in Tabelle 1 gezeigt, kann eine Mikroalbuminurie nach 3 Methoden bestimmt werden [9]:

1. im 24-Stunden Urin zusammen mit der Kreatinin-Konzentration (so daß in Verbindung mit einer Messung des Plasma-Kreatinins die Kreatinin-Clearance simultan bestimmt werden kann)
2. in einer über eine bestimmte Zeit gesammelten Urinprobe (z.B. 4 Stunden- oder über Nacht-Sammlung),
3. durch Bestimmung des Albumin-Kreatinin Verhältnisses einer Spontanurinprobe

In der Praxis ist die Spontanurinprobe bzw. die Übernachtssammlung am einfachsten durchzuführen. Inzwischen sind auch spezielle Teststreifen für den Nachweis einer Mikroalbuminurie erhältlich, die eine Sensitivität von 95% und eine Spezifität von 93% aufweisen [9].

## Neue Marker

Für die Früherkennung der Entwicklung einer diabetischen Nephropathie werden einerseits die Proteine, die in der Pathogenese der Erkrankung eine Rolle spielen, evaluiert und andererseits wird nach genetischen Markern gesucht, mit denen das Nephropathie-Risiko abgeschätzt werden kann. Aufgrund der wahrscheinlich kausalen Bedeutung des TGF- $\beta$ 1 bei der Entstehung der diabetischen Nephropathie wurde versucht TGF- $\beta$ 1 im Blut und Urin von diabetischen Patienten zu messen und seine diagnostische Relevanz zu evaluieren. Da TGF- $\beta$ 1,2 bei der Blutgerinnung in großen Mengen aus den Thrombozyten freigesetzt wird, ist die Bestimmung des TGF- $\beta$ 1 nur im Plasma sinnvoll [23].

Bislang liegen nur wenige Studien zur Bedeutung der TGF- $\beta$ 1-Urinausscheidung als Früherkennungsmarker für die diabetischen Nephropathie vor. In der Studie von Ellis et al. [24] wurde die TGF- $\beta$ 1-Ausscheidung von 46 Typ 1 Diabetikern mit der Mikroalbuminurie verglichen. Es zeigte sich, daß die TGF- $\beta$ 1-Ausscheidung bei den mikroalbuminurischen Patienten ( $n=13$ ) um 50% höher war als in der Gruppe von normoalbuminurischen Patienten ( $n=18$ ). Da die individuelle Streuung sehr groß war, erwies sich das TGF- $\beta$ 1 in dieser Studie nicht als geeigneter Marker. In einer weiteren Studie [25] konnte kein Unterschied in der TGF- $\beta$ 1-Ausscheidung im Urin bei den verschiedenen Nephropathiestadien gefunden werden, obwohl bei allen diabetischen Patienten eine drastische Er-

höhung gegenüber dem Normalkollektiv gefunden wurde. Dagegen fanden japanische Autoren [26] nicht nur eine höhere TGF- $\beta$ -Ausscheidung im Urin von diabetischen Patienten, sondern auch eine Korrelation der TGF- $\beta$ 1-Ausscheidung mit dem Nephropathiestadium. In eigenen Untersuchungen konnten wir auch eine erhöhte TGF- $\beta$ 1-Ausscheidung bei diabetischen Patienten nachweisen (*Rashied* und *Schleicher*, unveröffentlicht). Diese Untersuchungen zeigten aber sowohl eine hohe Variabilität der TGF- $\beta$ 1-Ausscheidungen der einzelnen Patienten, als auch eine schlechte Wiederfindung von zugesetzten TGF- $\beta$ 1 Standard bei den individuellen Patientenurinen. Auf die Problematik der TGF- $\beta$ 1-Messung wurde bereits von *Kropf* et al. hingewiesen [27]. Um festzustellen, ob bei Diabetikern die renale TGF- $\beta$ 1-Synthese erhöht ist, wurde die renale Nettoproduktion von TGF- $\beta$ 1 mittels AV-Differenz in 14 Typ 2 Diabetikern und 11 Nichtdiabetikern bestimmt [28]. Eine signifikante renale TGF- $\beta$ 1 Nettoproduktion konnte nur bei diabetischen Patienten gefunden werden. Die renale Nettoproduktionsrate von Endothelin war bei Diabetikern nicht erhöht [28]. Über die Aussagekraft der Bestimmung der Endothelinausscheidung im Urin als Früherkennungsparameter liegen widersprüchliche Ergebnisse vor [29].

Die Tatsache, daß ca. zwei Drittel aller Typ 1 Diabetiker trotz einer teilweisen schlechten Stoffwechseleinstellung keine Nephropathie erleiden und das gehäufte Auftreten von diabetischer Nephropathie in manchen Familien weist darauf hin, daß es eine genetische Komponente für das Auftreten einer diabetischen Nephropathie gibt. Besonders intensiv wurde der ACE-Polymorphismus (D/I) als möglicher genetischer Marker untersucht [30]. Trotz vieler beteiligter Laboratorien konnte keine sichere Assoziation des ACE-Polymorphismus zu der Entwicklung einer diabetischen Nephropathie gefunden werden. Auch die Beziehung zwischen diabetischer Nephropathie und genetischen Markern für die Hypertension z.B. erhöhter Natrium/Lithium- und Natrium/Protonentransport könnte relevant sein, obwohl dies auch kontrovers diskutiert wird [31].

## Schlußfolgerung

Neben den klassischen Parametern zur Beurteilung der Nierenfunktion hat sich die Bestimmung der Mikroalbuminurie als Parameter für die Früherkennung einer diabetischen Nephropathie fest etabliert. Durch jährliche Kontrolle der Albuminausscheidung im Urin können Patienten mit beginnender Nephropathie identifiziert werden. Durch therapeutische Intervention, wie z.B. verbesserte Stoffwechselkontrolle, aggressive antihypertensive Therapie, kann die Geschwindigkeit der Progression der Nephropathie verlangsamt werden. Bislang ist keiner der vorgeschlagenen neuen Marker, wie z.B. das Zytokin TGF- $\beta$ , in der Lage, eine bessere Vorhersage als die Mikroalbuminurie zu lei-

sten. Auch die Suche nach einem genetischen Suszeptibilitätsmarker ist bislang nicht erfolgreich gewesen.

## Literatur

1. Borch-Johnson K, Andersen PK, Deckert T. The effect of proteinuria on relative mortality in Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1985;28:590-6.
2. Pettitt DJ, Knowler WC, Nelson RG. Familial factors in diabetic nephropathy. In: Mogensen CE, editor. *The Kidney and Hypertension in Diabetes mellitus*. Boston (MA): Kluwer Academic Publishers, 1997:205-14.
3. Mauer SM, Ellis E, Bilous RW, Steffes MW. The pathology of diabetic nephropathy. In: Draznin B, editor. *Complications of Diabetes Mellitus*. New York (NY): Alan R. Liss Inc., 1989:95-101.
4. Osterby R, Gall MA, Schmitz A, Nielsen FS, Nyberg G, Parving H-H. Glomerular structure and function in proteinuric type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 1993;36:1064-70.
5. Kim Y, Kleppel M, Butkowski R, Mauer M, Wieslander J, Michael A. Differential expression of basement membrane collagen chains in diabetic nephropathy. *Am J Pathol* 1991;138:413-20.
6. Nerlich A, Schleicher E. Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in human diabetic glomerular lesions. *Am J Pathol* 1991;139:889-99.
7. Nerlich A, Schleicher ED, Wiest I, Specks U, Timpl R. Immunohistochemical localization of collagen VI in diabetic glomeruli. *Kidney Int* 1994;45:1648-56.
8. Ceol M, Nerlich A, Baggio B, Anglani F, Sauer U, Schleicher E, Gambaro G. Increased glomerular (I (IV) collagen expression and deposition in long-term diabetic rats in prevented by chronic glycosaminoglycan treatment. *Lab Invest* 1996;74:484-95.
9. American Diabetes Association. *Diabetic Nephropathy*. *Diabetes Care* 1998;21:50-3.
10. Ayo SH, Radnik RA, Glass IJWF, Garoni GA, Rampt ER, Appling DR, Kreisberg JI. Increased extracellular matrix synthesis and mRNA in mesangial cells grown in high-glucose medium. *Am J Physiol* 1990;260:F185-91.
11. Schleicher E, Nerlich A. The role of hyperglycemia in the development of diabetic complications. *Horm Metabol Res* 1996;28:367-73.
12. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* 1988;318:1315-21.
13. Vlassara H, Brownlee M, Cerami A. Novel macrophage receptor for glucose-modified proteins is distinct from previously described scavenger receptors. *J Exp Med* 1986;164:1301-9.
14. Doi T, Vlassara H, Kirsstein M, Yamada Y, Striker GE, Striker LJ. Receptor-specific increase in extracellular matrix production in mouse mesangial cells by advanced glycosylation end products is mediated via platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:2873-7.
15. Soulis T, Cooper ME, Sastra S, Thallas V, Panagiotopoulos S, Bjerrum O, Jerums G. Relative contributions of advanced glycation and nitric oxide synthase inhibition to aminoguanidine-mediated renoprotection in diabetic rats. *Diabetologia* 1997;40:1141-51.
16. Iwano M, Kubo A, Nishino T, Satō H, Nishioka H, Akai Y, Kurioka H, Fujii Y, Kanauchi M, Shiiki H, Dohi K. Quantification of glomerular TGF- $\beta$  1 mRNA in patients with diabetes mellitus. *Kidney Int* 1996;49:1120-6.
17. Sharma K, Ziyadeh FN. Perspectives in diabetes. Hyperglycaemia and diabetic kidney disease. The case for transforming growth factor- $\beta$  as a key mediator. *Diabetes* 1995;44:1139-46.
18. Ayo SH, Radnik R, Garoni JA, Troyer DA, Kreisberg JA. High glucose increases diacylglycerol mass and activates protein kinase C in mesangial cells. *Am J Physiol* 1991;261:F571-7.
19. Larkins RG, Dunlop ME. The link between hyperglycaemia and diabetic nephropathy. *Diabetologia* 1992;35:499-504.
20. Ishii H, Jirousek MR, Koya D, Tagaki C, Xia P, Clermont A, Bursell SE, Kern TS, Ballas LM, Heath WF, Stramm LE, Feener EP, King GL. Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science* 1996;272:728-31.

21. Du XL, Sui GZ, Stockklauser-Färber K, Weiß J, Zink S, Schwippert B, Wu QX., Tschöpe D, Rösen P. Induction of apoptosis by high proinsulin and glucose in cultured human umbilical vein endothelial cells mediated by reactive oxygen species. *Diabetologia* 1998;41:249-56.
22. Hofmann W, Edel H, Guder WG. Urineiweiß-Differenzierung. Ein neues Konzept zur nichtinvasiven Diagnostik von Nierenerkrankungen. *Münch Med Wschr* 1997;139:488-94.
23. Pfeiffer A, Middelberg-Bisping K, Drewes C, Schatz H. Elevated plasma levels of transforming growth factor-beta 1 in NIDDM. *Diabetes Care* 1996; 19:1113-7.
24. Ellis D, Forrest. KY-Z, Erbey J, Orchard TJ. Urinary measurement of transforming growth factor- $\beta$  and type IV collagen as new markers of renal injury: application in diabetic nephropathy. *Clin Chem* 1998;44:950-6.
25. Fagerudd JA, Groop P-H, Honkanen E, Teppo A.-M. Urinary excretion of TGF- $\beta$ 1, PDGF-BB and fibronectin in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Kidney Int* 1997;52:195-7.
26. Sato H; Iwano M, Akai Y, Kurioka H, Kubo A, Yamaguchi T, Hirata E, Kanauchi M, Dohi K. Increased excretion of urinary transforming growth factor beta 1 in patients with diabetic nephropathy. *Am J Nephrol* 1998;18:490-4.
27. Kropf J, Schurek JO, Wollner A, Gressner AM. Immunological measurement of transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) in blood; assay development and comparison. *Clin Chem* 1997; 43:1965-74.
28. Sharma K, Ziyadeh FN, Alzahabi B, McGowan TA, Kapoor S, Kurnik BR, Kurnik PB, Weisberg LS. Increased renal production of transforming growth factor beta1 in patients with type II diabetes. *Diabetes* 1997;46:854-9.
29. Mattyus I, Zimmerhackl LB, Schwarz A, Brandis M, Miltenyi, Tulassay T. Renal excretion of endothelin in children. *Pediatr Nephrol* 1997;11:513-21.
30. Pföhl M, Frost D, Koch M, Clemens P, Patzies A, Schmülling RM, Beischer W, Häring HU. Lack of association between the insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and diabetic nephropathy in IDDM patients. *Horm Metab Res* 1998;30:276-80.
31. Mangili R. Microalbuminuria in Diabetes. *Clin Chem Lab Med* 1998;36:941-6.