

Fumo di sigaretta e disfunzione renale nel diabete mellito

Olga Lamacchia, Alessandra Pilotti, Mauro Cignarelli

Dipartimento di Scienze Mediche e del Lavoro, Cattedra di Endocrinologia e Malattie del Metabolismo, Foggia

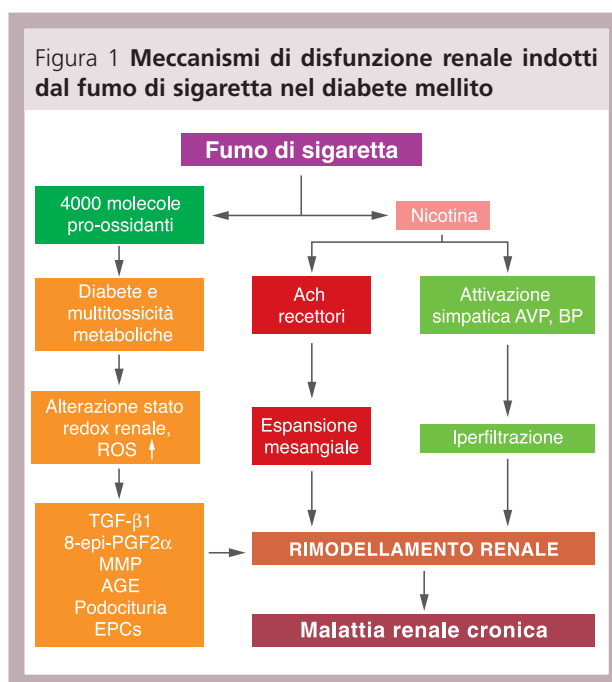
Introduzione

La maggior parte dei pazienti con diabete mellito tipo 2 (DMT2) presenta attualmente una aspettativa di vita sufficientemente lunga per sviluppare la nefropatia e la insufficienza renale terminale (ESRD) (1) e pertanto, anche a causa dell'impressionante aumento della sua incidenza, il DMT2 è divenuto il maggior responsabile di ESRD nei paesi occidentali. La nefropatia diabetica (ND) è ritenuta svilupparsi nel 35% circa dei pazienti con diabete mellito tipo 1 (DMT1) e nel 15-20% dei pazienti con DMT2 (2). Sebbene la maggior parte dei pazienti diabetici tipo 2 con microalbuminuria (75-80%) presenti le classiche lesioni di Kimmestiel-Wilson (3), circa il 20% di essi mostra tuttavia alterazioni vascolari renali non specifiche (arteriolosclerosi ialina e/o arteriolosclerosi iperplastica) associate a fibrosi tubulointerstiziale con minime o assenti alterazioni glomerulari suggerendo, pertanto, che differenti processi possano alla fine condurre alla disfunzione renale e alla malattia renale cronica (CKD) nel diabete mellito. Queste alterazioni sembrano essere strettamente associate a una accelerata aterogenesi macrovascolare, all'ischemia glomerulare, all'ipertensione sistemica e/o intraglomerulare, ma l'entità del loro rapporto con l'abitudine tabagica non è stata ancora completamente esplorata in casistiche adeguate.

Abitudine al fumo, nefropatia diabetica e disfunzione renale nel diabete mellito: dati epidemiologici

Le prime segnalazioni che hanno documentato l'aumentato rischio di disfunzione renale nei fumatori sono

Figura 1 Meccanismi di disfunzione renale indotti dal fumo di sigaretta nel diabete mellito



ACh: acetilcolina; AGE: prodotti finali di glicosilazione; AVP: vasopressina; BP: pressione arteriosa; EPCs: cellule endoteliali progenitrici; 8-epi-PGF_{2α}: 8-epi-prostaglandin F_{2α}; MMP: metalloproteinasi; ROS: specie reattive dell'ossigeno; TGF-β1: transforming growth factor-β1

derivate proprio da studi retrospettivi condotti in pazienti con DMT1. Nel 1978, nei pazienti affetti da DMT1, Christiansen JS riscontrò, infatti, un rischio di sviluppare ND significativamente più elevato nei pazienti fumatori rispetto ai non fumatori (4). In un ampio studio successivo è stato osservato che l'aumento della frequenza di nefropatia è parallelo a quello del consumo di sigarette (dal 13% nei pazienti fumatori con un consumo di sigarette <10/die, al 25% nei pazienti con un consumo >30/die) (5). Per quanto riguarda, d'altra parte, la progressione della nefropatia

in pazienti con DMT1 [definita come incremento della proteinuria >20% e/o riduzione della velocità di filtrazione glomerulare (GFR) >20% dopo 1 anno di follow-up], Sawicki et al. hanno riportato un *odds ratio* (OR) di 2,74 per ogni 10 pacchetti di sigarette/anno (6). Successivamente, diversi studi hanno confermato l'aumentato rischio di disfunzione renale nei pazienti con DMT1 fumatori, e hanno stabilito che il fumo non solo aumenta il rischio di sviluppare microalbuminuria (7) ma accelera anche la sua progressione verso la macroalbuminuria e la CKD (8, 9).

In contrasto con i numerosi dati riguardanti il DMT1, esistono pochi studi (e di coorti poco numerose) sul rapporto tra fumo e rischio di nefropatia nel DMT2, e poiché questi pazienti rappresentano la popolazione a rischio di ERSD a più rapida crescita, l'impatto del fumo sulla progressione della nefropatia potrebbe avere una notevole importanza. L'abitudine tabagica è stata recentemente dimostrata essere, infatti, un fattore di rischio per l'insorgenza di microalbuminuria in soggetti nipponici affetti da DMT2, indipendentemente dall'età, dal sesso, dai valori di emoglobina glicosilata (HbA_{1c}) e dalla durata del diabete (10). Uno studio prospettico su una ristretta coorte di pazienti con DMT2 ha concluso che il fumo di sigaretta promuove la progressione della nefropatia diabetica in pazienti con DMT2, così come è ben noto nel DMT1 (11). Un altro studio longitudinale comparativo su 16 pazienti con DMT1 e 16 con DMT2 ha dimostrato che il declino della velocità di filtrazione glomerulare (GFR) è approssimativamente del 55% più rapido nei fumatori rispetto ai non fumatori in entrambi i tipi di diabete (9).

Non c'è dubbio, quindi, che il fumo di sigaretta e il diabete, quando concomitanti, abbiano effetti renali dannosi che aumentano significativamente il rischio di albuminuria, CKD e ERSD.

Danno renale da fumo nel diabete: alterazioni della funzione e della struttura glomerulare

L'esposizione cronica attiva al fumo di sigaretta nei pazienti con DMT2 è associata ad alterazioni sia della struttura sia della funzione glomerulare. Paragonati ai non fumatori, i diabetici fumatori mostrano non solo un GFR e una escrezione urinaria di albumina (AER) più elevate (anche nel range della normoalbuminuria), ma anche un maggior ispessimento della membrana

basale glomerulare, senza significative differenze, invece, nelle lesioni interstiziali (12).

Recentemente Scott et al. hanno precisato che gli effetti avversi del fumo sono ancor più severi negli individui con uno scarso controllo glicemico (13). I dati ottenuti da Baggio et al. concordano con questi risultati: effettivamente l'AER, il rapporto mesangio/glomerulo (Vv) e lo spessore della membrana basale glomerulare (GBM), risultano massimamente spiegati dall'interazione tra l'abitudine al fumo e l'HbA_{1c} (12). Diversi studi suggeriscono, inoltre, che il fumo possa influenzare l'albuminuria e la funzione renale anche tramite l'incremento dei prodotti finali di glicazione avanzata (AGE), i quali sono noti peggiorare ulteriormente la permeabilità vascolare (14). Recentemente Jaimes et al. hanno fornito la prima dimostrazione che le cellule umane mesangiali (MC), dotate di recettori nicotinici, proliferano in maniera dose-dipendente se stimolate dalla nicotina. A concentrazione di 10⁻⁷ M, sovrapponibile a quella riscontrabile nel plasma dei fumatori attivi, la nicotina è stato infatti dimostrato stimolare sia la proliferazione delle MC, sia la sintesi di fibronectina, una componente cruciale della matrice coinvolta nella progressione della malattia renale cronica (15). Inoltre la nicotina, in aggiunta a quanto causato dalle altre concomitanti molecole pro-ossidanti presenti nel fumo, aumenta la produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (15). Questo studio ha messo in luce un meccanismo finora ignoto attraverso cui la nicotina, un composto del condensato del fumo di sigaretta (CS), può accelerare l'alterazione strutturale dei componenti del nefrone (15). A questo riguardo, i podociti giocano un ruolo fondamentale nella filtrazione glomerulare. Insulti cronici renali si accompagnano ad alterata podociturgia e a importanti alterazioni morfologiche, come osservato non solamente nei pazienti con DMT1 e con nefropatia diabetica iniziale, ma anche in quelli normotesi e normoalbuminurici (16). Nakamura T et al. hanno riscontrato un'elevata podociturgia con frequenza maggiore nei fumatori microalbuminurici (27 su 50 pazienti) rispetto ai non fumatori microalbuminurici (8 su 30 pazienti) (p = 0,017, χ^2 test); inoltre la podociturgia è risultata ridursi dopo 3 anni di astensione dal fumo in 10/13 pazienti (da 1,1 ± 0,8 a 1,7 ± 0,4 cellule/mL, p <0,01) mentre è risultata aumentare in tutti i pazienti che avevano continuato a fumare (16). Questi dati suggeriscono che il fumo di sigaretta può riconoscere nei podociti un bersaglio molto sensibile e iniziale del rimodellamento renale.

Potenziali meccanismi pro-ossidanti ed emodinamici indotti dal fumo nella patogenesi della disfunzione renale

Nonostante siano stati ipotizzati diversi potenziali meccanismi causali di disfunzione renale, la natura dell'effetto nefrotossico del fumo non è stata ancora ben chiarita (17). Possono essere comunque postulabili i seguenti meccanismi patogenetici:

- 1) effetti acuti, in particolare l'attivazione simpatica [che influenza la pressione arteriosa (BP) e l'emodinamica renale];
- 2) effetti cronici, in particolare la disfunzione delle cellule endoteliali [ridotta disponibilità di ossido nitrico (NO) e ridotta vasodilatazione].

L'aumento della BP e della risposta cardiaca conseguenti all'attivazione simpatica e il concomitante rilascio di vasopressina indotto dalla nicotina, sembrano costituire il principale meccanismo responsabile degli effetti renali avversi evocati in acuto dal fumo. La nicotina, oltre agli effetti cellulari succitati stimola, come è noto, direttamente il rilascio di catecolamine dalle terminazioni nervose simpatiche periferiche così come dalla midollare del surrene. L'aumentata attività simpatica *per se* accelera la progressione dell'insufficienza renale indipendentemente dagli effetti sulla BP (18). Sulla base di questi meccanismi vasoattivi, è stato ipotizzato che episodi ripetuti di ipoperfusione renale acuta indotti dal fumo potrebbero favorire le alterazioni strutturali dei vasi preglomerulari e quindi l'obsolescenza glomerulare. Questi effetti condurrebbero a ipertrofia e iperfiltrazione dei rimanenti glomeruli, eventi che spiegherebbero l'elevato GFR (un predittore dell'ispessimento della GBM e marker precoce di malattia renale nel diabete) osservabile con elevata frequenza nei fumatori (19, 20).

A parte la nicotina, il fumo di sigaretta contiene oltre 4000 costituenti noti, inclusa una grande quantità di radicali liberi e molecole pro-ossidanti e, pertanto, gli elevati livelli di stress ossidativo provocati dal fumo sono in grado di influenzare la mobilitazione e/o la sopravvivenza delle cellule endoteliali progenitrici (EPC) (21). La formazione di ROS nelle EPC isolate da fumatori è stata riscontrata, infatti, essere significativamente aumentata e il numero di EPC isolabili dal sangue periferico dei fumatori cronici è risultato conseguentemente ridotto di oltre il 50% (21).

Il fumo di sigaretta esercita, inoltre, un effetto inibitorio sui componenti della via L-arginina - NO.

Pertanto, gli effetti potenziali del fumo di sigaretta sulla disponibilità di L-arginina intracellulare potrebbero costituire, nel quadro dello stress ossidativo e della progressione dell'aterogenesi, un ulteriore meccanismo negativo sulla sopravvivenza delle cellule endoteliali (EC) (22). Il fumo di sigaretta contiene, comunque, un gran numero di elementi tossici o potenzialmente tossici in grado non solo di alterare la funzione delle EC, ma anche di attivare la proliferazione della muscolatura liscia e delle cellule infiammatorie (23). In aggiunta, è stato riportato che il fumo di sigaretta è causa di attivazione della protein-chinasi C (PKC) e di molteplici effetti dannosi cellulari, quali il danno del DNA, l'apoptosi e l'espressione dell'interleuchina-8 (24). A conferma dei meccanismi succitati, in un recente studio è stato dimostrato che l'estratto del fumo di sigaretta (CSE) è in grado di ridurre direttamente l'attività enzimatica della NOS endoteliale in maniera concentrazione dipendente, ma non quella della NOS inducibile (25). Gli stessi autori hanno anche dimostrato, dopo una breve esposizione delle EC al CSE, un marcato incremento della produzione di ROS congiuntamente a quello della dimetil-arginina asimmetrica, noti fattori patogenetici per malattie vascolari (26).

Fumo, stato redox, rimodellamento renale e stimolo alla fibrosi

Lo stress ossidativo è quindi un importante meccanismo patogenetico del danno renale indotto dal fumo. Il fumo di sigaretta provoca disfunzione endoteliale associata a una iperproduzione di ROS (27) che viene aggravata dalla tipica riduzione nel diabete mellito dei meccanismi anti-ossidanti (28). Recentemente, ha destato molto interesse il riscontro dell'aumento nei fumatori dei livelli di 8-epi-PGF_{2α} (29). Questi sono prodotti stabili della perossidazione lipidica dell'acido arachidonico (30), catalizzata dai radicali liberi, che producono un aumento del diacilglicerolo nelle cellule endoteliali con conseguente attivazione della PKC e quindi della sintesi del fattore di crescita trasformante β (TGF-β1), principale citochina fibrogenetica già eccessivamente prodotta nel diabete e implicata nella patogenesi della nefropatia diabetica (31). L'aumento della produzione degli AGE da parte del fumo attivo costituisce un ulteriore meccanismo di attivazione del TGF-β1 e delle molecole di adesione cellulare nell'endotelio umano e, quindi, di induzione di fibrosi renale

(32). Rispetto ai controlli, i soggetti diabetici mostrano livelli urinari più elevati di 8-epi-PGF_{2α} e di TGF-β1 e, nell'ambito dei pazienti con DMT1, livelli più elevati sono stati riscontrati tra i fumatori rispetto ai non fumatori. D'altra parte la cessazione dell'abitudine tabagica, è stata dimostrata produrre una riduzione di 8-epi-PGF_{2α} e di TGF-β1 a livelli paragonabili a quelli osservabili nei diabetici non fumatori (33). Analogamente, anche nei soggetti con DMT2 la cessazione dal fumo ha mostrato associarsi a una regressione dei fattori implicati nel danno renale, testimoniata dalla riduzione degli elevati livelli di escrezione urinaria di TGF-β1, citochina che gioca un ruolo importante nel rimodellamento renale.

Il rimodellamento è un processo adattativo di riarrangiamento strutturale che si sviluppa nel lungo periodo come risposta cronica a stimoli dannosi o ai cambiamenti delle condizioni emodinamiche. Questo processo può assurgere a livello di entità patologica e col tempo condurre a una condizione di CKD quando si verificano, a causa della potenza e/o della durata dello stimolo dannoso, una perdita del suo controllo. In questo contesto la matrice extracellulare (ECM) sembra giocare un ruolo chiave (34).

Pertanto, in una sorprendente varietà di malattie incluso il diabete mellito, un eccessivo e prolungato stimolo aggiuntivo indotto dal fumo di sigaretta può contribuire alla fibrosi patologica, allo *scarring* e alla deposizione della matrice, i.e. al rimodellamento renale.

Fumo e riduzione del GFR nel DMT2

Una percentuale significativa di CKD in pazienti con DMT2 non è spiegabile sulla base della nefropatia diabetica (35) ma sembra essere, invece, una conseguenza della perdita del controllo del rimodellamento renale in risposta alle multiple tossicità del DMT2, che potrebbe verosimilmente subire esacerbazioni dall'abitudine tabagica. Recentemente abbiamo quantificato questa possibilità in un'ampia coorte di soggetti di sesso maschile con DMT2 (158 fumatori e 158 non fumatori) reclutati consecutivamente (20). Il numero dei pazienti affetti da CKD (definita come GFR stimato (e-GFR) <60 mL/min/1,73 m² per minimo 3 mesi) è risultato essere significativamente più elevato nei fumatori rispetto ai non fumatori (20,9% vs 12,0%, p = 0,03) e il rischio di sviluppare CKD associato al fumo è risultato essere quasi raddoppiato (OR 1,93, IC 95%

1,04-3,56; p = 0,04), anche dopo aggiustamento per età, HbA_{1c} e albuminuria. La maggior frequenza di CKD è stata riscontrata essere ancora più elevata nei fumatori appartenenti al primo terzile di durata di malattia, indicando un possibile ruolo del fumo nell'accelerazione del danno e del rimodellamento renale con meccanismi verosimilmente additivi a quelli già attivati dalle alterazioni metaboliche, dall'albuminuria e/o dallo stress emodinamico, tipici del diabete mellito.

È noto che l'aumento del GFR costituisce un marker precoce di malattia renale nel diabete (36). Nella nostra casistica abbiamo osservato nei diabetici non affetti da CKD un valore di e-GFR significativamente più elevato nei fumatori rispetto ai non fumatori (96,91 ± 20,24 mL/min/1,73 m² vs 87,01 ± 18,02 mL/min/1,73 m², p = 0,000) e ancor più elevato nei soggetti nel primo terzile di durata di malattia (n = 41, 101,91 ± 20,92 mL/min/1,73 m² vs n = 52, 89,93 ± 17,13 mL/min/1,73 m², p = 0,003). Inoltre, tra i diabetici senza CKD, la prevalenza dei soggetti con iperfiltrazione (>120 mL/min/1,73 m²) è risultata essere significativamente più elevata nei soggetti fumatori [19/125 (15,2%) vs 8/139 (5,8%); p = 0,01] e l'iperfiltrazione è noto fattore di rischio per la progressione verso la CKD (36). Nei fumatori le unità FORT (*free oxygen radical test*), marker di stress ossidativo, sono risultate marcatamente più elevate rispetto ai non fumatori (560 ± 91,5 vs 442 ± 87,2 unità FORT, p <0,0001). Questi risultati non sorprendono poiché è noto che i fumatori hanno un esaltato livello di stress ossidativo, infiammazione e di disfunzione endoteliale (34).

Pertanto si può ipotizzare che sul comune terreno fertile del diabete mellito, dell'ipertensione, della lipotossicità e dell'elevata albuminuria, anche nel range della normalità, l'abitudine al fumo possa ulteriormente alterare lo stato redox renale e accelerare quindi il declino del GFR in conseguenza di una induzione di una maggior suscettibilità alla perdita del controllo del rimodellamento renale (37).

Qual è il reale beneficio derivante dalla cessazione del fumo?

Nei pazienti con DMT1 e nefropatia, in condizioni di adeguato controllo pressorio ma compenso glicemico ancora inadeguato, la cessazione del fumo è stata dimostrata ridurre significativamente l'escrezione urinaria di albumina (8). In un altro *survey*, la progressio-

ne verso l'insufficienza renale è stata riscontrata nel 53% dei fumatori, nel 33% di ex-fumatori e solo nell'11% dei non fumatori (7). È plausibile presumere che ciò possa verificarsi anche per le altre malattie renali non correlate al diabete. Nei soggetti non diabetici con normale funzione renale, Pinto-Sietsma et al. hanno osservato, infatti, che il rischio di microalbuminuria è minimo negli ex-fumatori, ma ancora significativamente elevato nei fumatori (38). D'altra parte la riduzione del flusso plasmatico renale indotta dal fumo non sembra essere del tutto reversibile dopo cessazione del fumo (39). Al di là delle evidenze riportate riguardanti la regressione dei marker di stress ossidativo negli ex-fumatori, i dati clinici finora ottenuti non consentono però di trarre una conclusione definitiva sulla dimensione del beneficio sulla funzione renale derivante dalla cessazione del fumo. Quando i meccanismi di impatto del fumo sulla disfunzione renale nei pazienti con malattia diabetica saranno più chiari, si potrà razionalmente concludere che la cessazione del fumo costituisce una delle misure più efficaci per ritardare la progressione dell'insufficienza renale. Sfortunatamente, recenti dati osservazionali non hanno mostrato differenze nell'abitudine tabagica tra i pazienti diabetici e una popolazione paragonabile non diabetica (40) e la prevalenza dei fumatori nella popolazione diabetica sembra rispecchiare quella della popolazione generale, soprattutto nelle fasce d'età più giovani. Sulla base dei dati riportati in rassegna e in attesa di implementare le nostre conoscenze sui meccanismi patogenetici del rimodellamento renale nei soggetti fumatori affetti da DM, risulta comunque evidente la urgente necessità di intraprendere misure aggressive e preventive per abolire l'abitudine al fumo in questi pazienti.

Bibliografia

- Ritz E, Orth SR. Nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 341: 1127-1133, 1999.
- USRDS 2001 Annual data report: atlas of end-stage renal disease in the united states. Bethesda, MD: United States Renal Data System, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2001.
- Fabre J, Balant LP, Dayer PG, et al. The kidney in maturity onset diabetes mellitus: a clinical study of 510 patients. *Kidney Int* 21: 730-738, 1982.
- Christiansen JS. Cigarette smoking and prevalence of microangiopathy in juvenile-onset insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1: 146-149, 1978.
- Telmer S, Christiansen JS, Andersen AR, et al. Smoking habits and prevalence of clinical diabetic microangiopathy in insulin-dependent diabetics. *Acta Med Scand* 215: 63-68, 1984.
- Sawicki PT, Didjurgeit U, Mühlhauser I, et al. Smoking is associated with progression of diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 17: 126-131, 1994.
- Gerstein HC, Mann JF, Pogue J, et al. Prevalence and determinants of microalbuminuria in high-risk diabetic and nondiabetic patients in the heart outcomes prevention evaluation study. The HOPE Study Investigators. *Diabetes Care* 23 Suppl 2: B35-39, 2000.
- Mühlhauser I, Sawicki P, Berger M. Cigarette-smoking as a risk factor for macroproteinuria and proliferative retinopathy in type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 29: 500-502, 1986.
- Biesenbach G, Janko O, Zazgornik J. Similar rate of progression in the predialysis phase in type I and type II diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 9: 1097-1102, 1994.
- Yokoyama H, Tomonaga O, Hirayama M, et al. Predictors of the progression of diabetic nephropathy and the beneficial effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors in NIDDM patients. *Diabetologia* 40: 405-411, 1997.
- Biesenbach G, Grafinger P, Janko O, Zazgornik J. Influence of cigarette-smoking on the progression of clinical diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients. *Clin Nephrol* 48: 146-150, 1997.
- Baggio B, Budakovic A, Dalla Vestra M, et al. Effects of cigarette smoking on glomerular structure and function in type 2 diabetic patients. *J Am Soc Nephrol* 13: 2730-2736, 2002.
- Scott LJ, Warram JH, Hanna LS, et al. A nonlinear effect of hyperglycemia and current cigarette smoking are major determinants of the onset of microalbuminuria in type 1 diabetes. *Diabetes* 50: 2842-2849, 2001.
- Makita Z, Radoff S, Rayfield EJ, et al. Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 325: 836-842, 1991.
- Jaimes E, Tian RX, Raji L. Nicotine: The Link between cigarette smoking and the progression of renal injury? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292(1): H76-82, 2006.
- Nakamura T, Kawagoe Y, Koide H. Effect of cigarette smoking on urinary podocyte excretion in early diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 26: 1324-1325, 2003.
- Orth SR. Smoking—a renal risk factor. *Nephron* 86: 12-26, 2000.
- Amann K, Rump LC, Simonaviciene A, et al. Effects of low dose sympathetic inhibition on glomerulosclerosis and albuminuria in subtotaly nephrectomized rats. *J Am Soc Nephrol* 11: 1469-1478, 2000.
- Remuzzi G. Effect of cigarette smoking on renal function and vascular endothelium. *Contrib Nephrol* 130: 45-52, 2000.
- De Cosmo S, Lamacchia O, Raueo A, et al. Cigarette smoking is associated with low glomerular filtration rate in male patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 29(11): 2467-2470, 2006.
- Michaud SE, Dussault S, Haddad P, et al. Circulating endothelial progenitor cells from healthy smokers exhibit impaired functional activities. *Atherosclerosis* 187(2): 423-432, 2006
- Susckek C, Schnorr O, Hemmrich K, et al. Critical role of L-arginine in endothelial cell survival during oxidative stress. *Circulation* 107: 2607-2614, 2003.
- Carnevali S, Petruzzelli S, Longoni B, et al. Cigarette smoke

- extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L955-963, 2003.
24. Wang H, Ye Y, Zhu M, Cho C. Increased interleukin-8 expression by cigarette smoke extract in endothelial cells. *Environ Toxicol Pharmacol*. 9: 19-23, 2000.
 25. Zhang WZ, Venardos K, Chin-Dusting J, Kaye DM. Adverse effects of cigarette smoke on NO bioavailability role of arginine metabolism and oxidative stress. *Hypertension* 48: 278-285, 2006.
 26. Boger RH. Association of asymmetric dimethylarginine and endothelial dysfunction. *Clin Chem Lab Med* 41: 1467-1472, 2003.
 27. Church D, Pryor W. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect* 96: 111-126, 1985.
 28. Santini S, Marra G, Giardina B, et al. Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. *Diabetes* 46: 1853-1858, 1997.
 29. Morrow JD, Frei B, Longmire AW, et al. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2 isoprostanes) in smokers. *NEJM* 332: 1198-1203, 1995.
 30. Practicò D. F2-isoprostanes: sensitive and specific non-invasive indices of lipid peroxidation in vivo. *Atherosclerosis* 147: 1-10, 1999.
 31. Sharma K, Ziyadeh F, Alzhabi B, et al. Increased renal production of transforming growth factor TGF- β 1 in patients with type II diabetes. *Diabetes* 46: 84-89, 1997.
 32. Nicholl ID, Bucala R. Advanced glycation end-products and cigarette smoking. *Cell Mol Biol (Noisy-le-Grand)* 44: 1025-1033, 1998.
 33. Flores L, Vidal M, Abian J, et al. The effects of smoking and its cessation on 8-epi-PGF_{2 α} and transforming growth factor-beta 1 in type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med* 21: 285-289, 2004.
 34. Agarwal R. Smoking, oxidative stress and inflammation-impact on resting energy expenditure in diabetic nephropathy. *BMC Nephrology* 6: 13, 2005.
 35. MacIsaac RJ, Tsalamandris C, Panagiotopoulos S, et al. Nonalbuminuric renal insufficiency in type 2 diabetes: *Diabetes Care* 27(1): 195-200, 2004.
 36. Silveiro SP, Friedman R, de Azevedo MJ, et al. Five-year prospective study of glomerular filtration rate and albumin excretion rate in normofiltering and hyperfiltering normoalbuminuric NIDDM patients. *Diabetes Care* 19(2): 171-4, 1996.
 37. Hayden MR, Whaley-Connell A, Sowers JR. Renal redox stress and remodeling in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and diabetic nephropathy: paying homage to the podocyte. *Am J Nephrol* 25: 553-569, 2005.
 38. Pinto-Sietsma SJ, Mulder J, Janssen WM, et al. Smoking is related to albuminuria and abnormal renal function in nondiabetic persons. *Ann Intern Med* 133: 585-591, 2000.
 39. Gambaro G, Verlato F, Budakovic A, et al. Renal impairment in chronic cigarette smokers. *J Am Soc Nephrol* 9: 562-567, 1998.
 40. Ford ES, Malarcher AM, Herman WH, Aubert RE. Diabetes mellitus and cigarette smoking. Findings from the 1989 national health interview survey. *Diabetes Care* 17: 688-692, 1994.

